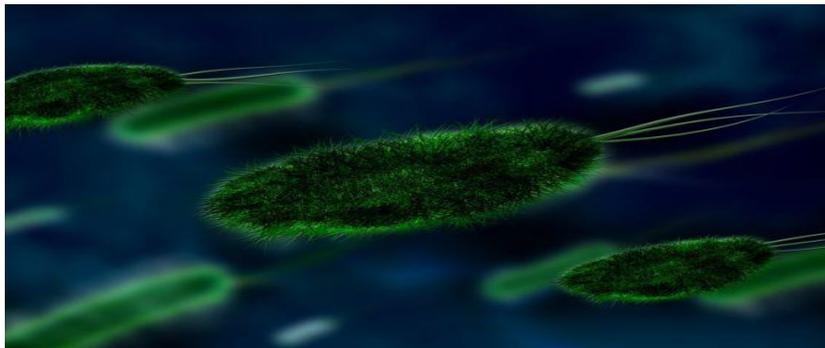




**Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"**

**Laboratorio Nacional de Referencia de *Neisserias* y *Helicobacter pylori***

**Diagnóstico y resistencia antimicrobiana de  
*Helicobacter pylori*. Instituto de Gastroenterología,  
abril-septiembre 2018**



**AUTORA: Dra. Lei Fu**

**Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología**

**LA HABANA**

**2018**

**Año 60 de la Revolución**



**Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"**

**Laboratorio Nacional de Referencia de *Neisserias* y *Helicobacter pylori***

**Diagnóstico y resistencia antimicrobiana de  
*Helicobacter pylori*. Instituto de Gastroenterología,  
abril-septiembre 2018**

**AUTORA:** Dra. Lei Fu

**TUTORES:** Dr. Rafael Llanes Caballero, MsC

Dr. Ulises Periles, DM

**ASESORAS:** Dra. Rosabel Falcón, DrC

Lic. Onelkis Feliciano, MsC

**Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología**

**LA HABANA**

**2018**

**Año 60 de la Revolución**

*El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad.*

*Victor Hugo*

# DEDICATORIA

*Esta tesis está dedicada a mi familia, mi tutor Llanes, mi esposo, mi compañero Zexi Tan y a todos los que confiaron en mí por su amor infinito y por darme los mejores momentos de mi vida.*

# AGRADECIMIENTOS

El mayor agradecimiento es para mi país, China, por darme la oportunidad de estudiar en Cuba.

A mis padres, mi esposo y demás familiares por darme apoyo, amor, cariño y la fuerza para seguir adelante con mis estudios..

Al IPK por permitirme realizar la Maestría en Bacteriología-Micología y al Departamento de Docencia.

Al Instituto de gastroenterología por el apoyo científico.

A mis tutores Dr. Rafael y Dr. Periles por tener siempre un consejo y una enseñanza, por darme su confianza, por haber tenido la paciencia para entenderme y guiarme en todo este tiempo sin su ayuda este trabajo nunca hubiera llegado a su fin. Nunca se me olvidará lo que aprendí junto a ellos en cada día.

A mis asesoras Dra. Rosabel y Lic. Onelkis por tener siempre tiempo para explicarme cada vez que tuve duda en mi investigación.

A todos los profesores y colegas del Departamento de Bacteriología-Micología del IPK por su apoyo incondicional y sincero.

A mis amigos Zexi, Grechen e Irina, por tener su apoyo siempre que los necesité.

A profesora María Teresa, profesora Lili, profesora Ana, profesor Tony, profesora Rosy, Oderay, Misleidis y Naty, por enseñarme sus conocimientos y estar siempre a mi lado.

Gracias a todas las personas que de forma directa e indirecta que me apoyaron y estuvieron cerca de mí siempre.

*Gracias.*

## RESUMEN

La resistencia de *H. pylori* frente a los antimicrobianos, es la principal causa de fallo terapéutico. En el estudio, se evaluó el desempeño de la prueba rápida de ureasa (PRU) en muestras biopsias gástricas de 157 pacientes que acudieron al Instituto de Gastroenterología entre abril y julio de 2018 y se estudió la susceptibilidad de un número limitado de aislamientos de *H. pylori* frente a seis antimicrobianos, por el método de Etest. Se estudiaron las mutaciones relacionadas con resistencia a claritromicina por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa que amplifica un fragmento del gen de la 23S ARNr, seguido del análisis con enzimas de restricción. La PRU exhibió un buen desempeño según los parámetros de sensibilidad (87 %), especificidad (76,6 %) e índice de Kappa (0,64) evaluados. Se recuperaron 40 cultivos de antro y 35 de cuerpo, siendo conservados 56 cultivos en congelación. El porcentaje de resistencia encontrado fue de 94,7 %, 56,3 % y 25 %, frente a metronidazol, levofloxacin y claritromicina, respectivamente; y un 6,2 % a tetraciclina y rifampicina. No hubo aislamientos resistentes a la amoxicilina. Nueve de los 16 aislamientos mostraron resistencia a dos o más antibióticos, siendo la de mayor frecuencia la multiresistencia a metronidazol y levofloxacin. Los aislamientos resistentes a claritromicina revelaron una mutación en A2143G. La presente investigación proporciona una información preliminar de interés para definir futuras estrategias terapéuticas de la infección por *H. pylori* en el país, particularmente, en las fallas del tratamiento de primera línea.

# ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivos .....	4
II. MARCO TEÓRICO .....	5
II.1. Características microbiológicas de <i>Helicobacter pylori</i> .....	5
II.2. Epidemiología .....	6
II.3. <i>Helicobacter pylori</i> y enfermedades asociadas.....	7
II.4. Diagnósticos microbiológicos .....	9
II.5. Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	12
II.6. Métodos de detección de la resistencia antimicrobiana .....	15
II.7. Tratamiento .....	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
III.1. Tipo de estudio.....	20
III.2. Universo y muestra .....	20
III.3. Técnicas y procedimientos.....	21
III.3.1. Estudio endoscópico y toma de biopsias gástricas a los pacientes.....	21
III.3.2. Pruebas de laboratorio .....	21
III.3.3. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	22
III.3.4. Detección del mecanismo genético de resistencia a claritromicina .....	23
III.4. Procesamiento de la información y análisis de los resultados .....	25
III.5. Consideraciones éticas .....	25
III.6. Limitaciones del estudio .....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27

# ÍNDICE

IV.1. Evaluación del desempeño de la PRU .....	27
IV.2. Perfil de la susceptibilidad antimicrobiana de <i>H. pylori</i> .....	29
IV.3. Mecanismo de resistencia a la claritromicina .....	36
IV.4. Discusión general .....	38
V. CONCLUSIONES.....	41
VI. RECOMENDACIONES.....	42
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
VIII. ANEXOS	

## I. INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es una bacteria gramnegativa que posee una morfología variable espirilar o cocoide, es microaerofílica y coloniza eficientemente el estómago humano. Fue aislada por primera vez en 1983 por Marshall y Warren, lo que revolucionó los estudios de las enfermedades gastrointestinales (Hosseini, *et al.*, 2012). La prevalencia de la infección por *H. pylori* ha aumentado en los países en vías de desarrollo, mientras su frecuencia decrece en los países más industrializados, como resultado del mejoramiento en las condiciones de vida (viviendas confortables, mejoría en calidad del agua de consumo, mayor disponibilidad de alcantarillado, entre otros factores) (Gold, 2014; 2015; Galbán *et al.*, 2012). Se estima que en el mundo más del 50 % de los individuos están infectados por este microorganismo, en particular en países en vías de desarrollo en donde la tasa de infección sobrepasa el 80 % de la población (Zhang *et al.*, 2014). La infección se adquiere generalmente durante la primera infancia y su persistencia puede ocasionar la aparición de diversas enfermedades como gastritis crónica, úlcera gástrica, duodenal, linfoma gástrico asociado a tejido linfático (MALT) y adenocarcinoma gástrico (McMahon *et al.*, 2015).

*Helicobacter pylori* elabora diversos determinantes de virulencia: enzima ureasa, toxinas cagA, vac A y el lipooligosacárido, los cuales contribuyen al daño tisular (Feliciano *et al.*, 2015; Miernyk *et al.*, 2011). Existe una clara asociación entre la bacteria con la gastritis nodular, la úlcera gástrica, duodenal, el adenocarcinoma de estómago y el linfoma MALT, de hecho cuando el microorganismo es erradicado, las metástasis extra-gástricas desaparecen (Gold, 2014; González-Carbajal, 2003).

Los principales síntomas de las enfermedades provocadas por *H. pylori* incluyen: dolor epigástrico, náuseas vómitos, pirosis, regurgitaciones, sangrado digestivo, anorexia, pérdida de peso y anemia, entre otros. El diagnóstico de laboratorio de esta bacteria se realiza a partir de la biopsia gástrica mediante el análisis histológico, el cultivo, la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la

prueba rápida de la ureasa (PRU), las dos primeras se consideran como regla de oro, aunque hoy día se aboga por el uso de pruebas no invasivas como son la detección de antígeno en heces y de anticuerpos séricos (Escobar MP, 2003; Rodríguez A, *et al.*, 2013). Dado que no existe un único método diagnóstico ideal para diagnosticar la infección por *H. pylori*, resulta necesario conocer las ventajas y desventajas de las pruebas, así como evaluar su funcionamiento (Llanes *et al.*, 2014; Moncayo *et al.*, 2006).

El control de la infección por *H. pylori* y la disminución de las complicaciones dependen en gran medida del éxito del tratamiento de los pacientes. Diferentes grupos de expertos internacionales: Consenso Europeo de Maastrich, Consenso de Norteamérica, Consenso Asiático y Consenso Italiano establecieron las pautas de tratamiento de las infecciones producidas por esta bacteria. Los principales esquemas incluyen la combinación de un inhibidor de la bomba de protones (IBP), y dos o tres antimicrobianos: 1) IBP más amoxicilina, claritromicina y nitroimidazol 2) IBP más metronidazol, tetraciclina y sales de bismuto 3) IBP más furazolidona y amoxicilina 4) IBP más levofloxacina y amoxicilina, los cuales se administran entre 10-14 días (Malfertheiner, *et al.*, 2012; Vakil *et al.*, 2000; Sugano *et al.*, 2015; Tolone *et al.*, 2012). La elección del esquema de tratamiento se realiza en base a los datos de prevalencia de la resistencia de *H. pylori* reportados por los países, en particular a la claritromicina, metronidazol, tetraciclina y levofloxacina (Malfertheiner, *et al.*, 2012; Vakil *et al.*, 2000; Sugano *et al.*, 2015; Tolone *et al.*, 2012). De ahí que resulte necesario llevar a cabo estudios periódicos de la sensibilidad de los aislamientos de esta bacteria a diferentes drogas antimicrobianas por técnicas de difusión con discos o tiras de Etest y por dilución en agar, así como determinar las mutaciones genéticas relacionadas con la resistencia a los antibióticos, en especial la claritromicina (Malfertheiner, *et al.*, 2012; Sugano *et al.*, 2015).

En Cuba existen escasos reportes sobre la sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de *H. pylori*. En el año 2005, Gutiérrez y colaboradores notificaron un 3 % de resistencia a claritromicina en 121 aislamientos de esta bacteria recuperados en la

provincia La Habana (Gutiérrez *et al.*, 2005). En el período 2005-2007, el Laboratorio Nacional de Referencia de *Neisserias* y *Helicobacter* (LNRNH) del IPK, investigó la sensibilidad de 70 aislamientos obtenidos de niños y adultos, de tres hospitales de La Habana, lo que demostró una resistencia elevada a metronidazol (85 %) y ciprofloxacina (22,5 %), una resistencia moderada a claritromicina (10 %) y una baja resistencia a amoxicilina (1,6 %) y no se encontró ningún aislamiento resistente a tetraciclina. También fueron identificadas varias mutaciones en los genes *rdxA* y *23SARNr*, relacionadas con la resistencia a metronidazol y claritromicina, respectivamente (Llanes *et al.*, 2010a).

El presente estudio forma parte de un proyecto de investigación asociado a programa del LNRNH, que tiene como objetivo perfeccionar el estudio de la resistencia antimicrobiana de *H. pylori* en Cuba. Permitirá estudiar la sensibilidad antimicrobiana de aislamientos clínicos de esta bacteria recuperadas en los primeros meses de 2018 en el Instituto de Gastroenterología (IGE). Serán evaluadas las drogas antimicrobianas empleadas en el tratamiento de primera línea: metronidazol, claritromicina, tetraciclina, amoxicilina, segunda línea: levofloxacina y tercera línea: rifampicina, de la infección por *H. pylori* y se identificarán los mecanismos genéticos de la resistencia a claritromicina. Asimismo, se evaluará el funcionamiento de la PRU frente al cultivo.

## OBJETIVOS

1. Evaluar el desempeño diagnóstico de la prueba rápida de ureasa en pacientes con síntomas dispépticos atendidos en el Instituto de Gastroenterología.
2. Determinar la susceptibilidad de aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de esta infección.
3. Identificar las principales mutaciones relacionadas con la resistencia de *Helicobacter pylori* a claritromicina.

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. Características microbiológicas de *Helicobacter pylori*

Desde finales del siglo XIX se empezó a describir la presencia de bacterias espiriladas que habitaban los estómagos de hombres, perros y gatos, pero no fue hasta 1982 cuando los médicos Robert Warren y Warren Marshall, en Australia, lograron cultivar al *Helicobacter pylori*, a partir de muestras de tejido gástrico obtenidas por biopsia de pacientes con úlcera y gastritis.

El género *Helicobacter* junto con *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Wollinella* forman parte de la clase *Epsilobacteria*, subdivisión *Thiobacteria*, división *Proteobacteria* (Cavalier, 2002). La familia *Helicobacter* está compuesta por 20 especies genéticamente diferenciadas, las cuales pueden dividirse en dos grupos, las enterohepáticas y las gástricas. *H. pylori* está entre las especies gástricas y es capaz de sobrevivir en la superficie de la mucosa estomacal gracias a la acción de la enzima ureasa (Solnick *et al.*, 2002).

*Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo, que mide de 2,5 a 5µm, con 4 a 8 flagelos polares y con una morfología helicoidal o espirilada a manera de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios de cultivo artificiales. Este microorganismo puede adoptar una forma cocoide en los cultivos más prolongados o en aquellos sometidos a situaciones no favorables para el crecimiento, como el uso de antimicrobianos, factores físicos y químicos como el calor, la acción de sustancias químicas, entre otros.

*Helicobacter pylori* es un microorganismo “fastidioso” o de difícil crecimiento, necesita de una atmósfera de microaerofilia (5 % de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y 85 % de N<sub>2</sub>), alta humedad, temperatura de 35-37 °C y un tiempo de incubación de 5 a 10 días (Llanes *et al.*, 2014). Crece en medios sólidos enriquecidos como Agar Columbia, Agar *Brucella*, Agar Wilkins-Chalgren, Agar Mueller-Hinton y Agar

*Helicobacter*, suplementado con 5 a 7% de sangre de carnero, pudiéndose utilizar además suero de caballo, suero fetal bovino, e isovitalex y una combinación de al menos 4 antimicrobianos que inhiben el crecimiento de la microbiota acompañante. De todos los medios de cultivo, la base de agar Columbia suplementada con 7 % de sangre y los antibióticos trimetoprim, vancomicina, cefsulodina y anfotericina B, ha sido la más empleada para el aislamiento de *H. pylori* (Megraud, 2005). Las colonias tienen un diámetro de 1-2 mm, son transparentes, translúcidas, húmedas y no producen hemólisis. Desde el punto de vista metabólico, el microorganismo elabora escasas enzimas como la citocromo oxidasa, catalasa y ureasa, las que resultan útiles para su identificación definitiva (Buzas, 2015).

### II.2. Epidemiología

*Helicobacter pylori* es un microorganismo ampliamente distribuido en el mundo y se estima que más de dos tercios de la población mundial está infectada por esta bacteria (Zhang *et al.*, 2014). La distribución de la infección a nivel mundial es heterogénea, con una prevalencia que oscila entre 30-50 % en los países desarrollados, mientras que en los países en vías de desarrollo alcanza el 60-90%. Estos patrones parecen reflejar una correlación inversa entre la situación socioeconómica y el riesgo de infección (Eusebi *et al.*, 2014).

En Cuba, no existen investigaciones sobre la prevalencia por *H. pylori* en poblaciones asintomáticas; en tanto que en pacientes con síntomas dispépticos la prevalencia de la infección oscila entre el 60-70% de los adultos y 30-40% en niños (Llanes *et al.*, 2011; Alonso *et al.*, 2013; Corrales, 2016).

El mecanismo exacto por el cual se adquiere *H. pylori* aún no está bien esclarecido, pero se conoce que factores como el hacinamiento, las condiciones socioeconómicas y ambientales desfavorables pudieran condicionar la aparición de la infección (Axon, 2014). La transmisión del microorganismo ocurre en edades tempranas de la vida, donde el contagio se considera un fenómeno reflejo de la

exposición continuada a partir del nacimiento y la alta frecuencia de reinfección hasta los primeros años de la vida adulta. (Adekhha *et al.*, 2013).

Se han descrito más de una vía para la propagación de la infección por *H. pylori*, pero resulta imprescindible el contacto estrecho a través de la exposición oral-oral, gastro-oral y fecal-oral (Mladenova *et al.*, 2006). La vía de transmisión oral-oral, ocurre cuando la bacteria presente en el jugo gástrico alcanza la cavidad oral a través del reflujo gastroesofágico, que contamina la saliva. Esta última pudiera actuar como vehículo que disemina el microorganismo a las manos, los utensilios de comer y los surcos gingivales (Loster *et al.*, 2009).

La transmisión gastro-oral, se relaciona con los pacientes sometidos a endoscopia sin una adecuada desinfección previa de los gastroscopios (Ford *et al.*, 2010). La transmisión fecal-oral ocurre a través del contacto con el agua y los alimentos contaminados con la bacteria. Muchas investigaciones apoyan esta última vía de transmisión, ya que al emplearse diferentes pruebas de laboratorio se detecta la bacteria en las heces de pacientes con gastritis y otras patologías gastroduodenales (Agusti *et al.*, 2010; Falsafi *et al.*, 2009).

### **II.3. *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas**

La presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica de los humanos induce diferentes afecciones gastrointestinales que van desde una gastritis leve, por lo general asintomática hasta la úlcera péptica y el cáncer gástrico (Savoldi *et al.*, 2018). Además, se describe la asociación etiológica de esta infección con un gran número de trastornos extradigestivos que incluyen enfermedades cardiovasculares, alergias de la piel y enfermedades autoinmunes (Chey *et al.*, 2017).

Dentro de las afecciones gastrointestinales se encuentran la gastritis, la úlcera péptica, la metaplasia y el cáncer gástrico. A continuación se abordarán los aspectos fundamentales de cada una de ellas.

Gastritis crónica: se acepta que prácticamente todas las personas infectadas por *H. pylori* desarrollan una gastritis crónica superficial y si no se lleva a cabo un tratamiento que permita la erradicación de la infección, ésta se prolonga durante décadas, y en muchos casos durante toda la vida. En la mayor parte de los casos (>85%), la inflamación crónica está asociada a la infección por *H. pylori*, por lo que esta bacteria es la causa más importante de gastritis crónica (Gonzalez-Carvajal *et al.*, 2003).

Úlcera péptica: la asociación de *H. pylori* con la úlcera duodenal y la úlcera gástrica es clara, ya que un 90-95% de los pacientes infectados por el microorganismo tienen un riesgo de 3 a 10 veces mayor a padecer la enfermedad ulcerosa. Estos pacientes pueden expresar síntomas compatibles con la dispepsia, típica de la enfermedad ulcerosa: epigastralgia o dolor en hemiabdomen superior, que disminuye con la ingesta de alimentos y antiácidos. La sintomatología ulcerosa puede acompañarse de vómitos, anorexia, adelgazamiento y con menos frecuencia puede dar lugar a una hemorragia digestiva (Azevedo *et al.*, 2009).

Metaplasia intestinal: se caracteriza, desde el punto de vista histológico, por la presencia en la mucosa gástrica de enterocitos o células de tipo absorbentes (intestinales), acompañadas o no de células caliciformes en el epitelio superficial de la mucosa gástrica o en las glándulas productoras de moco. Con frecuencia se presenta cierto grado de gastritis atrófica, expresada por la pérdida en mayor o menor grado de las glándulas gástricas. La metaplasia intestinal puede estar presente en cualquier segmento del estómago, pero es más frecuente en el antro y la región prepilórica. Sus alteraciones histológicas se interpretan como la antesala del complejo proceso de degeneración maligna que finalmente lleva al establecimiento del cáncer gástrico (Trajkow *et al.*, 2007).

Cáncer gástrico: Existen varias hipótesis para explicar la asociación de *H. pylori* y el cáncer gástrico, la más aceptada es la capacidad que tiene este microorganismo para desarrollar gastritis crónica, metaplasia intestinal y displasia

que según su intensidad y persistencia, incrementan el riesgo de cáncer gástrico (Llorens, 2006, Savoldi *et al.*, 2018). La bacteria, al infectar la mucosa gástrica, provoca una gastritis crónica atrófica multifocal, asociada con hipoclorhidria, lo cual facilita el sobrecrecimiento bacteriano y el aumento de nitrosaminas, que tienen alta capacidad mutagénica, siendo las responsables de las lesiones premalignas. La Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), categorizan a *H. pylori* como agente carcinogénico tipo I (Pasechnikov *et al.*, 2014).

### II.4. Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de laboratorio de *H. pylori* se realiza por pruebas invasivas (requieren de una endoscopia digestiva alta con toma de muestras de biopsia de la mucosa gástrica) y no invasivas (no necesitan de la endoscopia). A partir de fragmentos de biopsias gástricas se puede realizar la PRU, el cultivo, el estudio histopatológico y las pruebas moleculares. Estas pruebas tienen generalmente una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, el carácter invasivo y las limitaciones para la recuperación bacteriana (dependen de la carga bacteriana, el tipo de medio de transporte empleado, y las condiciones de incubación del cultivo), han llevado a la búsqueda de pruebas no invasivas. Entre estas últimas se encuentran las técnicas de detección de antígeno en heces, de diferentes tipos de inmunoglobulinas en el suero, así como la prueba de urea espirada (Llanes *et al.*, 2014).

Dado que no existe un único método diagnóstico ideal para diagnosticar la infección por *H. pylori*, resulta necesario conocer las ventajas y desventajas de las pruebas diagnósticas existentes y evaluar su funcionamiento, en especial cuando se estudian por primera vez. Hoy en día se recomienda emplear la combinación de al menos tres pruebas de laboratorio para diagnosticar un paciente (Llanes *et al.*, 2010; Moncayo *et al.*, 2006).

Histología: el estudio de las biopsias gástricas, consiste en la observación de la morfología de los microorganismos, en los cortes histológicos de las biopsias. Se

considera el método más confiable para establecer el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Permite la observación de la morfología bacteriana y además la visualización de los cambios histopatológicos en la mucosa gástrica del hospedero. La sensibilidad de esta prueba es variable y oscila entre el 85- 90%, mientras que la especificidad es casi del 100% por lo que es considerada como el “método de referencia” (Pourakbari *et al.*, 2013). Es un procedimiento efectivo, y altamente requerido para el control de *H. pylori* en países con tasas de incidencia altas (Gámez *et al.*, 2008).

Existen algunos factores específicos que disminuyen su sensibilidad, como son: la baja densidad de microorganismos y la desigual distribución de la bacteria en el estómago; esto último afecta por igual a todos los métodos directos de detección y, por tanto, se recomienda tomar varias biopsias para aumentar la sensibilidad de las técnicas (Fawcett *et al.*, 2004).

En la red hospitalaria cubana, la histología, es una de las técnicas más empleadas para la detección de la infección por *H. pylori*, no obstante su éxito en el diagnóstico pudiera estar sesgado por errores en el muestreo, la experiencia del médico patólogo a cargo, el tipo de tinción que se emplee, el escaso número de bacterias en la muestra, así como la presencia de las formas atípicas del microorganismo. (Llanes *et al.*, 2011; Corrales, 2016).

Prueba rápida de la ureasa (PRU): *H. pylori* posee la enzima ureasa con capacidad para la colonización y persistencia en la cavidad gástrica. Se localiza tanto en la membrana como en el espacio periplásmico y está compuesta por una estructura hexámera. La actividad ureasa de *H. pylori* es más potente que la de otras bacterias como *Proteus*, *Klesiella* y *Yersinia* (Chen *et al.*, 1998).

La enzima ureasa cumple dos funciones adaptativas: protección frente al ácido de la mucosa gástrica, provisión de nitrógeno en forma de amonio y actúa como factor de virulencia en la patogenia de la úlcera gástrica (Alarcon *et at.*, 2004). Esta enzima descompone la urea en anhídrido carbónico y amoníaco, y esta reacción se demuestra mediante un cambio de coloración del medio de naranja amarillo a rosa

fuerte, debido a la acción del indicador de pH rojo de fenol. Este cambio de color puede ser inmediato (en 5 minutos), lo que indica mayor número de bacterias presentes o tardío en cualquier momento dentro de las 24 horas de la toma de muestra (Paredes *et al.*, 2011).

La PRU es un método ampliamente usado con una sensibilidad de 75 al 100%, y especificidad de 84 a 100 % (Guarner *et al.*, 2010; Vaira *et al.*, 2010). Es más empleada en adultos, ya que en los niños su sensibilidad es relativamente baja, dado por la baja densidad de *H. pylori* en la mucosa gástrica (Dondi *et al.*, 2006). Se ha informado que la sensibilidad de la PRU y el tiempo de reacción positiva se mejora aumentando el número de muestras de biopsias tomadas (Seo *et al.*, 2014). Por su sencillez, rapidez y bajo costo, se considera como una técnica de elección para el diagnóstico inicial de la infección por *H. pylori* en aquellos pacientes que se someten a endoscopia (Megraud *et al.*, 2005).

Cultivo: el aislamiento mediante cultivo es el método más específico y presenta ventajas, como permitir el estudio de sensibilidad de *H. pylori* a los diferentes antimicrobianos, la caracterización de factores de virulencia y la posibilidad de tipado de cepas con fines epidemiológicos (Gisbert *et al.*, 2012). La especificidad del cultivo es del 100% (Guaner *et al.*, 2010; López-Brea *et al.*, 2004), pero su sensibilidad es menor y varía en relación con la recogida, transporte y almacenamiento de la muestra, medios de cultivo utilizados y las condiciones de incubación (Ndip *et al.*, 2004). A pesar de sus limitaciones ofrece una buena fiabilidad diagnóstica. Se recomienda el cultivo del antro pilórico en los pacientes que no han recibido tratamiento de la infección, mientras que aquellos que han sido sometidos a tratamientos erradicadores se aconseja el cultivo tanto del antro como del cuerpo gástrico para mejorar la detección de *H.pylori* (Kalem *et al.*, 2010).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): mediante la técnica de PCR es posible detectar el ácido desoxiribonucleico (ADN) de *H. pylori* en concentraciones mínimas, a partir de biopsias gástricas, para lo cual se utilizan diferentes iniciadores de secuencias para amplificar varios genes como: el gen *ureA*, *glm* y la secuencia de la subunidad 16S del ribosoma (*ARNr 16S*) (Yakoob *et al.*, 2006). En los últimos años,

la posibilidad de estudiar diversos tipos de muestras clínicas que incluye el tejido fijado en parafina y muestras no invasivas como las heces, saliva y la placa dental, ha revelado que existe una correlación entre la presencia de *H. pylori* en el aparato digestivo y diferentes patologías gastroduodenales (Medina *et al.*, 2010).

### II.5. Mecanismos de resistencia antimicrobiana

La resistencia bacteriana es la principal causa del fracaso de las terapias antimicrobianas. En *H. pylori* la resistencia puede ser primaria o natural, que se define como la incapacidad intrínseca del antibiótico para erradicar la infección desde el primer tratamiento y secundaria o adquirida, que se desarrolla después del tratamiento con un antibiótico (Martínez *et al.*, 2014).

El fenómeno de la resistencia se debe esencialmente a mutaciones cromosomales que se transmiten en forma vertical desde las poblaciones bacterianas resistentes a la descendencia. Se han identificado los mecanismos por los cuales los genes implicados en las mutaciones cromosomales de *H. pylori* inducen la resistencia antimicrobiana (Megraud F., 2004)

Claritromicina: es un macrólido que inhibe la síntesis de proteínas dependiente del ARN, uniéndose a los receptores ubicados en el ribosoma 50S, especialmente en el 23S *ARNr*; en esta región se ubican las principales mutaciones asociadas con la resistencia a macrólidos (Rugge *et al.*, 2003).

En Europa, se ha observado un aumento en la resistencia a claritromicina, siendo las tasas de resistencia en Alemania hasta de un 75,4% (Selgrad M *et al.*, 2013), mientras que en Francia, las tasas de resistencia oscilan entre un 18,6% y 41,6%. Asimismo, en Japón, un estudio que evaluó un total de 3307 aislamientos clínicos de *H. pylori* reveló un aumento periódico en los niveles de resistencia, del 18,9% al 27,7% (Zhao LJ *et al.*, 2014). En América Latina, las tasas más altas se observan en México, Colombia, Argentina y Brasil (Vega *et al.*, 2010). En Cuba la resistencia a claritromicina (10%) es baja (Llanes *et al.*, 2010).

La resistencia a claritromicina se presenta por mutaciones puntuales en el gen que codifica para el ARNr 23S. Las mutaciones responsables del 90% de los casos de resistencia se producen por sustitución de la adenina por citosina o guanina en la posición 2142 (A2142C o 2142G) o de una adenina por una guanina en la posición 2143 (A2143G).

Cuando se estudian los mecanismos genéticos de resistencia a claritromicina en *H. pylori* por PCR-RFLP, se debe utilizar una cepa control sensible al antibiótico. El fragmento de 768 pb en el genotipo salvaje, tiene una secuencia diana que tras su digestión con la enzima Bsal genera dos fragmentos de restricción (108 y 660 pb), en el caso de la digestión con MbolI no existe ningún sitio de reconocimiento y se mantiene la talla del amplicón. En las cepas resistentes, la presencia de la mutación A2143G se revela por la presencia de los siguientes fragmentos: 108, 310 y 350 pb; cuando existe la mutación A2142G, los fragmentos de ADN de restricción presentan 418 pb y 350 pb (Versalovic, 1997)

Metronidazol: es un compuesto heterocíclico con un núcleo de 5 carbonos y un radical nitro (NO<sub>2</sub>). Los nitroimidazoles son activados al ingresar en la célula por la enzima NADPH nitrorreductasa, los transforma en intermediarios imidazoles que ocasionan daños estructurales en el ADN, la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular (Van der Wouden *et al.*, 2001).

Las literatura científica refleja un amplio rango de porcentajes de resistencia a este antimicrobiano, entre 97,6% en Colombia (Yepes *et al.*, *et al.*, 2008) y 12,5% en Chile (Otth L *et al.*, 2011); aunque la tendencia de la prevalencia en México, Brasil, y Cuba supera el 50% (Llanes *et al.*, 2010).

La resistencia a nitroimidazoles involucra dos genes denominados *rdxA* y *frxA*. El gen *rdxA* codifica para una NADPH nitrorreductasa insensible al oxígeno, dona electrones y activa al metronidazol. El gen *frxA* codifica para la NADPH flavinoxidorreductasa y contribuye en la activación del metronidazol en el interior celular (Llanes *et al.*, 2010). Las mutaciones que inactivan el gen *rdxA* originan codones de parada o sustituciones que hacen a la proteína disfuncional (Llanes *et al.*, 2010).

Amoxicilina: es un antibiótico  $\beta$ -lactámico que inhibe la síntesis de la pared bacteriana ocasionando un desequilibrio osmótico y lisis bacteriana. Por ser la amoxicilina lábil al ácido, los IBP mejoran su estabilidad y biodisponibilidad (Figueroa *et al.*, 2012). En el mundo, la resistencia general a la amoxicilina es baja. Un estudio realizado en Europa, Asia, Estados Unidos y Medio Oriente informa resistencias entre 0 y 0,9% (Megraud, 2004). En América Latina, en países como Chile, Paraguay, Brasil y Venezuela, la tasa de resistencia varía entre 0 y 2%. (Tseng *et al.*, 2009).

La resistencia se presenta por mutaciones de las proteínas fijadoras de la penicilina (PBP siglas en inglés). La mutación PBP1A presenta mayor afinidad por el fármaco y al manifestarse afecta su efectividad antibiótica. La mutación S414R sola puede ocasionar fenotipos resistentes. Otras mutaciones informadas son la S402G, E406A, S417T, T555S, N561Y, S542R, T540I y I562V (Ortiz *et al.*, 2006).

Tetraciclina: las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma e inhiben la unión de los aminoácidos a la cadena polipeptídica en formación. La mutación puntual en el gen *rrn 16S* codifica para el ácido ribonucleico ribosomal 16 de la subunidad 30S e impide la unión del aminoacil ARN de transferencia. Las mutaciones en la tripleta de bases adenina, guanina y adenina se localizan en las posiciones 926 a la 928 (AGA 926928) del gen *rrn 16s* en la llamada caja C. Las mutaciones en las posiciones 965 a 967 que codifica para la proteína de flujo TetA (P) disminuyen la afinidad del antibiótico (Zullo *et al.*, 2011).

De manera general el comportamiento de la resistencia a este antibiotico es baja, pero inusualmente en Chile y Colombia se han informado tasas altas (Otth *et al.*, 2011).

Levofloxacina: las fluoroquinolonas actúan inhibiendo las topoisomerasas o girasas bacterianas. Las quinolonas detienen la replicación del ADN porque inhiben la subunidad A de la girasa del ADN en la región determinante de resistencia a quinolonas; las mutaciones de esta región originan resistencia a levofloxacin. Las mutaciones en las posiciones 91 (Asp91Gly, Asn, Ala o Tyr) y 87 (Asn87Lys) se han

encontrado presentes en el 100% de los aislamientos de *H. pylori* resistentes a las fluoroquinolonas (Savoldi *et al.*, 2018).

En Latinoamérica el porcentaje de resistencia más elevado ha sido detectado en Perú (37%) (Mochizuki *et al.*, 2011). En Taiwán, la resistencia se cuadruplicó después de 2004 de 3,2% a 16,3% (Kuo CH *et al.*, 2012.)

A pesar de un ambiente de creciente resistencia a antibióticos a nivel global, se ha postulado la necesidad de guiar la terapia erradicadora mediante el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de *H pylori*.

### **II.6. Métodos de detección de la resistencia antimicrobiana**

Los métodos de detección de la resistencia se clasifican en fenotípicos, los cuales están basados en las técnicas de cultivo y genotípicos o técnicas moleculares.

La realización del cultivo y el antibiograma antes de iniciar un tratamiento de erradicación de *H. pylori* no se realiza de forma rutinaria, excepto en pacientes con fracasos a terapias anteriores, para detectar la resistencia secundaria. El conocimiento de los patrones locales de sensibilidad puede ser una herramienta valiosa para recomendar los esquemas más apropiados en cada población en particular (Lopez-Gongora *et al.*, 2015; Chey *et al.*, 2017).

Prueba de dilución en agar: constituye el método de referencia recomendado actualmente por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, siglas en inglés), para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori*. A pesar de que este método permite obtener cuantitativamente los patrones de resistencia, determinando las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), estas pruebas son laboriosas, por lo que no son de uso común en la práctica clínica. Se recomiendan para llevar a cabo estudios epidemiológicos de resistencia de *H . pylori* en laboratorios de referencia que analizan grandes cantidades de aislamientos (Best *et al.*, 2003).

Prueba de Epsilometer test (E-test): el E-test es un método cuantitativo que permite determinar las CIM, empleando la técnica de difusión en agar. Se ha reportado que este método posee una concordancia satisfactoria, del 91,3% cuando se compara con el método de dilución en agar (Megraud, 2004). Aunque se acepta que existe una buena concordancia entre estos ambos métodos para la mayoría de los antimicrobianos estudiados, existe controversia con los resultados obtenidos con el metronidazol (Selgrad M *et al.*, 2013). Algunos autores han atribuido estas diferencias a la presencia de cepas susceptibles y resistentes simultáneamente en un 5 a un 10% de los aislamientos (Sisson G *et al.*, 2001), sin embargo, Best y cols., señalan que si se sigue estrictamente el protocolo establecido, la concordancia es del 100%. (Best L *et al.*, 2003).

Prueba de difusión con discos de antimicrobiano: este método cualitativo es también utilizado en la práctica clínica para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori*, aunque con menos frecuencia que la difusión con tiras de Etest y la dilución en agar, habiéndose propuesto guías para su uso con la claritromicina y el metronidazol (Mc Nulty C *et al.*, 2002).

Los métodos moleculares de detección de la resistencia antimicrobiana de *H. pylori* constituyen alternativas a las pruebas convencionales, estos son rápidos, no requieren de la presencia de bacterias vivas y permiten obtener resultados reproducibles y fáciles de estandarizar. Dentro de estos, la secuenciación de ácidos nucleicos representa la técnica más robusta para detectar las mutaciones relacionadas con la resistencia antibiótica en cualquiera de los antibióticos empleados en el tratamiento de *H. pylori* (Nizhisawa y Suzuki, 2014).

Las primeras pruebas moleculares para identificar las mutaciones de resistencia en *H. pylori* fueron dirigidas a la detección de mutaciones en el gen *ARNr 23s*, responsable de la resistencia a claritromicina y fueron realizadas a partir de cultivos de esta bacteria. Una de las primeras técnicas empleadas fue la prueba de PCR, con posterior digestión con enzimas de restricción (PCR asociada al análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP, siglas en inglés) (Versalovic J *et al.*, 1997).

El análisis de amplificación mediante sonda en línea (PCR- line probe assay [LIPA]), la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), el análisis de enlace de oligonucleótidos (PCR- oligonucleotide ligation assay [OLA]) y el PCR en tiempo real, son varios de los métodos moleculares que se utilizan para identificar las mutaciones relacionadas con la resistencia a claritromicina y las fluoroquinolonas (Megraud 2004; Nishisawa & Suzuki, 2012). En la actualidad existen varios métodos comerciales que identifican *H. pylori* y detectan a la vez las mutaciones de resistencia a claritromicina (Seeplex, Seegene Corea; Helico DR, Hain, Alemania; GeneCube y , Toyobo, Japón) (Nizhisawa y Suzuki, 2014).

Con relación al metronidazol, dada la existencia de múltiples mutaciones relacionadas con la resistencia, no se han desarrollado métodos moleculares para la detección de los mecanismos genéticos de resistencia. Igual situación ocurre con la amoxicilina y la rifabutina, lo que unido a la baja prevalencia de aislamientos resistentes ha conducido a un escaso desarrollo de pruebas moleculares para identificar las mutaciones de resistencia (Nizhisawa y Suzuki, 2012).

En el caso de la tetraciclina, existe una prueba de PCR-RFLP que distingue entre las mutaciones que provocan la alta resistencia a este antibiótico de aquellas con baja resistencia (Ribeiro *et al.*,2004). Glocker y colaboradores en Alemania, desarrollaron una PCR en tiempo real para la detección de mutaciones de resistencia a tetraciclina (Glocker *et al.*,2005).

### II.7. Tratamiento

Existen diferentes regímenes terapéuticos para erradicar la infección por *H. pylori*. La elección del esquema de tratamiento se deben realizar en base a los datos de prevalencia de la resistencia locales reportados por los países, en particular a la claritromicina, metronidazol, tetraciclina y levofloxacina (Malfertheiner, *et al.*, 2012; Vakil *et al.*, 2000; Sugano *et al.*, 2015; Tolone *et al.*, 2012).

Los consensos internacionales sobre el manejo de la infección por *H. pylori* coinciden en destacar que el aumento de la resistencia a los antibióticos utilizados es uno de los factores que pueden explicar las bajas tasas de erradicación más bajas de

erradicación de la infección que se están consiguiendo actualmente. Estos consensos abogan por abandonar la triple terapia clásica y utilizar pautas cuádruples con o sin bismuto, buscando mayores porcentajes de éxito (Gisbert *et al.*, 2016; Crowe, 2017). Sin embargo, la aplicación de estas recomendaciones en el ámbito local requiere una reflexión, ya que los resultados de los ensayos clínicos en los que se basan no son extrapolables a todos los países, debido a la alta variabilidad geográfica en las tasas de resistencia a antibióticos y a las diferencias entre individuos en función de la exposición previa a antibióticos.

Entre los esquemas terapéuticos propuestos para el tratamiento de *H. pylori* están los siguientes que se expresan en la tabla II. 1 (Malfertheiner, *et al.*, 2012; Vakil *et al.*, 2000; Sugano *et al.*, 2015; Tolone *et al.*, 2012).

**Tabla II.1: Tratamientos según consensos internacionales para la infección por *Helicobacter pylori*.**

	PRIMERA LÍNEA	
Terapia clásica	AMX + CLA + IBP	No usar cuando prevalencia resistencia claritromicina > 15%
Terapia concomitante	AMX + CLA + MTZ +IBP	Tres antimicrobianos
Terapia cuádruple	TET + MTZ + BIS + IBP	Dos antimicrobianos + sales bismuto
	SEGUNDA LÍNEA	
Terapia cuádruple	TET + MTZ + BIS + IBP	Dos antimicrobianos + sales bismuto
Terapia con fluoroquinolonas	LEV + AMX + IBP	
	TERCERA LÍNEA	
Terapia cuádruple	TET + MTZ + BIS + IBP	Dos antimicrobianos + sales bismuto
Terapia con rifabutina	RFB + AMX + IBP	

IBP: inhibidor de la bomba de protones BIS: Sales de bismuto TET: tetraciclina; AMX: amoxicilina; CLA: claritromicina; MTZ: metronidazol; LEV: levofloxacin; RFB: rifabutina

En países donde la sensibilidad a la claritromicina esté por encima del 15% el esquema terapéutico de primera línea más recomendado es la terapia cuádruple, por 10 a 14 días, ya que con estos tratamientos se han obtenido los rangos más altos de curación, superiores al 90%. El uso de los antisecretores (IBP o un antagonista de los receptores histamínicos H2 (AH2), es debido a que ciertos antimicrobianos disminuyen su efectividad bajo las condiciones luminales ácidas del estómago (Chey *et al*, 2017).

Con el uso de la terapia concomitante y la terapia múltiple se busca lograr una tasa de erradicación superior al 90%, con mínimos efectos colaterales, y ejerciendo una presión selectiva mínima de cepas resistentes (Malfertheiner *et al.*, 2016). Especialmente en los niños la erradicación de *H. pylori* se recomienda en presencia de úlcera péptica o anemia ferropénica inexplicada que no responde al tratamiento. También se puede considerar en niños con síntomas dispépticos cuando la infección por *H. pylori* se detecta a partir de una biopsia y en niños infectados con algún familiar de primer grado con cáncer gástrico (Koletzko, 2011).

En años recientes el tratamiento combinado de la amoxicilina con la levofloxacina, representa una opción a emplear como tratamiento de segunda línea, cuando se producen fallos a la terapia clásica y la concomitante. Asimismo, la terapia con rifampicina ha ganado importancia como tratamiento de tercera línea de la infección por *H. pylori* (Malfertheiner *et al.*, 2016).

En Cuba no existe un consenso nacional que conduzca a recomendar las opciones terapéuticas que pudieran garantizar una buena eficacia ( $\geq 90\%$ ) del tratamiento de los pacientes.. De ahí que resulte de utilidad realizar la evaluación periódica de los resultados de la sensibilidad antimicrobiana in vitro de *H. pylori* y relacionar los resultados con el éxito del tratamiento.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal en el Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias-Helicobacter (LNRNH) del IPK y en el Instituto de Gastroenterología (IGE), en el período abril-julio de 2018.

#### III.2. Universo y muestra

El universo de estudio estuvo compuesto por la totalidad de los pacientes adultos (>18 años), con síntomas dispépticos: acidez, náuseas, vómitos y dolor en epigastrio, que acudieron al servicio de endoscopia del IGE en el citado período. La muestra estuvo representada por 157 pacientes con dicha sintomatología, que firmaron el consentimiento informado por escrito y cuyas lesiones endoscópicas eran compatibles con úlcera péptica gástrica y duodenal, gastritis atrófica y nodular.

##### *Criterios de inclusión y exclusión*

Criterios de inclusión: pacientes que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado (anexo 1).

##### Criterios de exclusión

- Pacientes que consumieron antimicrobianos o IBP en las últimas tres semanas antes de la toma de muestras.
- Pacientes cuyo resultado del estudio endoscópico reveló otro tipo de lesiones no compatibles con úlcera péptica gástrica o duodenal, gastritis antral nodular, ni cáncer gástrico.
- Pacientes que no cooperaron con la realización de la prueba de endoscopia, porque eran alérgicos a la lidocaína o tenían alguna enfermedad aguda como IRA o asma bronquial en el momento de llevar a cabo este proceder invasivo.

### III.3. Técnicas y procedimientos

#### III.3.1. Estudio endoscópico y toma de biopsias gástricas a los pacientes

Para la realización de la endoscopia digestiva superior se utilizó un video-endoscopio. Se aplicó anestesia (xilocaína al 2%) en la faringe del paciente antes de la endoscopia. Se tomaron tres fragmentos de biopsia gástrica, dos de la curvatura mayor del antro pilórico gástrico (uno para realizar la PRU), y el otro para el cultivo. El tercer fragmento de la curvatura mayor del cuerpo gástrico se empleó también en el cultivo.

#### III.3.2. Pruebas de laboratorio

Prueba rápida de ureasa: una de las piezas de biopsia gástrica tomadas por endoscopia fue inoculada en un vial de 1,5 mL que contenía 0,3 mL de caldo urea de Rustigian & Stuart, según la metodología descrita por Llanes *et al.*, 2010. El vial se colocó a temperatura ambiente durante 1 hora (en el propio salón de endoscopia). El resultado fue considerado como positivo cuando se observó un cambio de coloración de amarillo a fucsia, en este intervalo de tiempo (Llanes *et al.*, 2010).

Cultivo: dos fragmentos de biopsia de estómago, uno de antro y otro de cuerpo, fueron inoculados en un vial que contenía medio de transporte Portagerm pylori (Biomérieux, Francia), siendo colocado en refrigeración de 2-8 °C hasta su traslado al LNRNH del IPK (no más de 24 horas después de tomada la muestra). Una vez en el laboratorio fueron sembrados en placas con medio selectivo de agar Columbia (BIOCEN, Cuba), enriquecido con 10 % de sangre de carnero, 1 % de suplemento Vitox (Oxoid, EUA) y suplemento inhibidor VCNT (Oxoid). La incubación de las placas se realizó a 37 °C por un período de 5-7 días, bajo condiciones de microaerofilia (5 % de O<sub>2</sub>, 10 % de CO<sub>2</sub> y 85 % de N<sub>2</sub>) generadas por el sistema Campygen (Oxoid).

La identificación de las colonias se realizó en base a su morfología (coloración de Gram) y la positividad de las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa y ureasa

(Llanes *et al.*, 2010). Se realizaron subcultivos ulteriores en medio no selectivo de agar Columbia (BIOCEN) enriquecido con sangre de carnero al 10 %, y suero fetal bovino al 1 % (GIBCO, EUA), incubándose por 48-72 horas en idénticas condiciones. Finalmente, los cultivos antes de la realización de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fueron conservados en caldo triptona soya más glicerol al 20% en congelación a -80°C.

#### **III.3.3. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana**

A partir de cultivos con 72h de crecimiento, se preparó una suspensión del microorganismo en 4 mL de solución salina fisiológica estéril. La suspensión bacteriana fue ajustada hasta alcanzar el patrón 3 de la escala de Mc Farland. Dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación, la suspensión bacteriana fue inoculada con un hisopo estéril sobre placas de Petri de 150mm, previamente temperadas y secadas, que contenían agar Müeller Hinton (Oxoid) con 5% de sangre de carnero de más de 2 semanas de extracción. Posterior a la inoculación, las placas se dejaron secar por 15 min a temperatura ambiente, luego de lo cual se colocaron 3 tiras de Etest de antibióticos de la casa comercial Biomerieux, Francia, previamente temperadas. Los antimicrobianos utilizados fueron: amoxicilina, claritromicina, levofloxacina, metronidazol, rifampicina y tetraciclina. Cada experimento se realizó por duplicado.

La incubación final de las placas se realizó en campana de vidrio, en las condiciones de microaerofilia anteriormente descritas, por 72 horas y luego de este período se realizó la lectura de la CIM, en el punto en que se producía la intersección entre la zona de inhibición del crecimiento y la tira de Etest, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como control se utilizó la cepa de referencia de *H. pylori* ATCC 43504, la cual posee los siguientes parámetros de sensibilidad antimicrobiana (datos reflejados en la Tabla III.1) (Megraud, 2004).

Tabla III.1. Parámetros de sensibilidad antimicrobiana descritos para la cepa de referencia de *H. pylori* ATCC 43504.

Antimicrobiano	Rango de CIM (µg/mL)
Amoxicilina	0,015-0,12
Claritromicina	0,015-0,12
Metronidazol	64-256
Tetraciclina	0,12-1
Levofloxacin	0,12-1
Rifampicina	0,12-1

En la Tabla III.2 se observan los puntos de corte para establecer las categorías de resistencia y/o susceptible, según las guías del Clinical Laboratory Standard International (CLSI) para claritromicina y de Eucast para el resto de los antimicrobianos (Savoldi, *et al.*, 2018).

Tabla III.2. Puntos de corte establecidos para las categorías de resistente y susceptible de *H. pylori*, según las guías del Clinical Laboratory Standard International y de Eucast.

Antimicrobiano	Sensible	Resistente
Amoxicilina	<1 µg/mL	≥1 µg/mL
Claritromicina	<1 µg/mL	≥1 µg/mL
Metronidazol	<8 µg/mL	≥8 µg/mL
Tetraciclina	<1 µg/mL	≥1 µg/mL
Levofloxacin	<1 µg/mL	≥1 µg/mL
Rifampicina	<1 µg/mL	≥1 µg/mL

### III.3.4. Detección del mecanismo genético de resistencia a claritromicina

Se realizó a aquellos aislamientos de *H. pylori* que resultaron resistentes a este antibiótico, para ello se utilizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa,

que amplifica un fragmento del gen de 768 pb de la 23S *ARNr*, seguido del análisis con enzimas de restricción (PCR-RFLP), según establece el protocolo de Oleastro *et al.*, 2003.

- *Purificación y preservación del ADN*

La purificación de ADN se realizó mediante el sistema comercial Winzard® Genomic DNA purification (Promega, EE.UU), a partir de la recolección del crecimiento bacteriano en 600µL de tampón lisis, siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del material genético se verificó mediante la realización de una electroforesis submarina en gel de agarosa al 0,8 % que codifica para la subunidad A de la enzima ureasa de *H. pylori*. El ADN resuspendido en un volumen final de 100µL de solución de rehidratación, se conservó en congelación a -20 °C para su utilización posterior en la técnica de PCR.

- *Detección de mutaciones en un fragmento del gen 23S ARNr*

La detección de las mutaciones en las posiciones 2142 y 2143 del dominio V del gen *ARNr* 23S que confieren resistencia a claritromicina se determinó por PCR-RFLP. El PCR se realizó utilizando los cebadores descritos por Suzuki y colaboradores Hp23Sr6 sentido (5'-CACACAGGTAGATGAGATGAGTA-3') y Hp23Sr7 antisentido (5'-CACACAGAACCACCGGATCACTA-3'), que amplifican un fragmento de 768 pb. Cada reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50µL, con 5µL de tampón 10X (Promega), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, (Promega), 0,2mM de cada dinucleótido trifosfato (Promega), 25pmol de cada cebador, 0,25U de GoTaq ADN polimerasa (Promega) y 3µL de ADN. Cada reacción se sometió a un control positivo con la cepa de referencia ATCC 43504 y un control de esterilidad, que consistió en la sustitución de la alícuota de muestra por agua bidestilada estéril. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Eppendorf modelo Mastercycler personal, Alemania). Las condiciones de PCR fueron: 94°C 5 minutos seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante

30 segundos y un ciclo a 72°C durante 7 minutos. Dos alícuotas de las reacciones de amplificación (10µL) se digirieron por separado con las enzimas de restricción Bsal durante 1 hora y MbolI durante 24 horas (New England BioLabs) a 37 °C (Oleastro *et al.*, 2003).

- *Análisis de los resultados*

Para la visualización de los productos de la reacción, se tomaron 10µL de ADN, se unieron a 2µL de tampón de corrida (Loading buffer 6X, Promega) y se aplicaron en un gel de agarosa (Merck, EE.UU) al 2,5%, con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (Promega). La corrida electroforética se realizó en una cámara electroforesis (Mupid®One, Japón) a 70 Volts, con el tampón Tris-Borato-EDTA, pH 8, durante 1 hora. Los resultados de la electroforesis se visualizaron a través de un transluminador (Vilber Loumat, Francia) de luz UV. Se determinaron las tallas de los productos amplificados, comparándose con el patrón obtenido por el marcador de peso molecular de ADN (100 pb DNA Step Ladder, Promega).

#### **III.4. Procesamiento de la información y análisis de los resultados**

La información de los resultados de las pruebas diagnósticas de *H. pylori* fue vaciada en una base de datos de Microsoft Excel, siendo analizada mediante el programa estadístico Epidat versión 3.1. Para llevar a cabo el análisis estadístico de los resultados se determinó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, el índice de validez y de verosimilitud positiva y negativa, así como la prueba de Kappa (Moncayo *et al.*, 2006, Llanes *et al.*, 2014).

#### **III.5. Consideraciones éticas**

El estudio forma parte del proyecto de investigación Papel de *H. pylori* en enfermedades extradigestivas, que actualmente se desarrolla en el LNRNH del IPK y que tiene la aprobación del Comité de Ética de dicha institución (CEI-IPK 73-1857). Para este estudio resultó imprescindible la aceptación del paciente de participar en la investigación y la firma del consentimiento informado (anexo 1).

Los pacientes fueron informados acerca de los objetivos, alcance de la investigación, beneficios y voluntariedad de su participación.

#### **III.6. Limitaciones del estudio**

En el protocolo de investigación se previó realizar los estudios de la sensibilidad antimicrobiana a todos los cultivos conservados de *H. pylori*. Sin embargo, por limitaciones logísticas (problemas con el suministro de gas licuado, contaminación de las placas y de los cultivos, escasez de sobres de microaerofilia), así como lo limitado del tiempo para llevar a cabo las pruebas de sensibilidad *in vitro*, estas se realizaron a un menor número de aislamientos.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 157 pacientes a quienes se les realizó el diagnóstico de laboratorio de *H. pylori* por dos pruebas diagnósticas, la PRU y el cultivo, la primera prueba tuvo una positividad de 42 % (66 casos), mientras que 91 casos fueron negativos por PRU. El cultivo de biopsias de antro y cuerpo gástricos, realizados a igual número de pacientes, reveló un mayor porcentaje de positividad en las muestras obtenidas del antro (25,5 %) que en el cuerpo (22,3 %) estomacal. Del total de cultivos positivos, se logró conservar cincuenta y seis cultivos de *H. pylori* en congelación a -80 °C. El resto de los cultivos no fue conservado como consecuencia de la contaminación con hongos filamentosos, lo cual ha sido reportado por otros autores (Megraud, 2005; McMahon, 2015). Se debe señalar que el suplemento inhibidor utilizado en el estudio (VCNT), contiene como antimicótico la nistatina, que tiene un pobre efecto inhibidor de los hongos filamentosos, a diferencia de la anfotericina B, la cual forma parte de varios suplementos comerciales para favorecer el crecimiento de *H. pylori* (Megraud, 2005).

### IV.1. Evaluación del desempeño de la PRU

Al evaluar los resultados de la PRU, a partir de muestras de biopsias de antro gástrico de 157 pacientes atendidos en el IGE, esta tuvo un buen desempeño con relación al cultivo, según los parámetros analizados en la Tabla IV.1.

**Tabla IV.1. Parámetros de desempeño de la prueba rápida de ureasa de antro gástrico para el diagnóstico de *H. pylori* en 157 pacientes. IGE, abril-julio, 2018**

Parámetros	Valor	IC 95%
Sensibilidad	87%	76,14-97,78
Especificidad	76,6%	68,25-84,91
Valor predictivo positivo	60,6%	48,06-73,15
Valor predictivo negativo	93,4%	87,76-99,05
Índice de validez	79,6%	73-86,24
Razón de verosimilitud positiva	3,71	2,6-5,29
Razón de verosimilitud negativa	0,17	0,08-0,36
Índice Kappa	0,64	0,51-0,76

Teniendo en cuenta este resultado y las ventajas que ofrece la PRU: sencillez, rapidez (provee el resultado en una hora), no requerir de equipamiento para su realización (Llanes *et al*, 2014), sugieren su empleo en el IGE, institución de salud que realiza alrededor de 400 endoscopias digestivas altas cada mes (Galbán *et al*, 2012).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sensibilidad (87%), especificidad (76,6 %), e Índice de Kappa (IK) (0,64) resultan similares a los de una investigación realizada en el hospital del IPK en 64 pacientes (sensibilidad 85,7 % y especificidad de 90,5 %) (Llanes *et al*, 2010). En cambio tiene un menor desempeño que los obtenidos por Rodríguez en el hospital de San Antonio de los Baños (sensibilidad 100 %, especificidad 82,8%, e IK, 0,85) (Rodríguez *et al*, 2013).

La evaluación de otros métodos caseros para determinar la actividad ureasa de *H. pylori* reportan valores de sensibilidad y especificidad superiores al 80%

(Moncayo et al, 2006). Adicionalmente, estos valores pueden variar bajo ciertas circunstancias: pacientes con sangramiento digestivo alto, tratamiento previo con IBP, antagonistas del receptor-H2, antimicrobianos y compuestos que contienen bismuto. Otros factores que influyen son la cantidad de microorganismos presentes en la muestra y el tiempo de lectura del resultado de la PRU (Bermúdez et al, 2009).

En la actual investigación se empleó una variante de PRU más rápida (lectura del resultado en 1 hora), con respecto a la utilizada en otras investigaciones realizadas en el país (lectura del resultado en 4 horas). Para la preparación de la primera variante se emplea el reactivo de urea, agua destilada y un indicador de pH, mientras que a la segunda se le agregan tres reactivos que actúan como tampones y garantizan una mayor estabilidad del diagnosticador (Llanes et al, datos no publicados, 2018)

Internacionalmente, la comparación de las PRU caseras con las pruebas de oro (cultivo e histología), revelan valores de sensibilidad y especificidad que oscilan entre 75-100% (Krogfelt et al., 2005, Moncayo et al., 2006). Por tal motivo consideramos que los resultados de este estudio demuestran la factibilidad del empleo de esta técnica en las instituciones de salud endoscopias digestivas.

#### **IV.2. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori***

La erradicación de *H. pylori* se ve afectada por la resistencia que desarrolla esta bacteria a los antimicrobianos empleados en el tratamiento de esta infección, y es el principal determinante de fallo terapéutico (Chey, 2017, Dang & Graham, 2017).

El mayor porcentaje de resistencia antimicrobiana en los aislamientos clínicos de *H. pylori* investigados se observó frente a metronidazol (94,7 %) (18/19 aislamientos). Adicionalmente, esta resistencia resultó de alto nivel, pues los valores de CIM para el 50 % de los aislamientos (CIM<sub>50</sub>) y para el 90 % de estos

(CIM<sub>90</sub>) fueron iguales o superiores a 256 µg/mL. De los 16 aislamientos a los que se les investigó la susceptibilidad a la levofloxacina, nueve (56,3 %) mostraron resistencia. En el caso de claritromicina, el 25 % (4/16 aislamientos) resultó resistente. Para la tetraciclina y la rifampicina el 6,2% (1/16) fue resistente a los dos antibacterianos y no se encontró ningún aislamiento resistente a la amoxicilina (Tabla IV.2).

**Tabla IV.2. Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos clínicos de *H. pylori*. IGE, abril-julio 2018**

Antimicrobiano	No. aislamientos		Valores CIM			Total aislamientos
	S	R	Rango CIM	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	
<b>Metronidazol</b>	1	18	0,023->256	0,002->32	>256	19
<b>Levofloxacina</b>	7	9	0,002->32	<0,016-12	>32	16
<b>Claritromicina</b>	12	4	<0,016-12	<0,016-2	12	16
<b>Tetraciclina</b>	15	1	<0,016-2	<0,016-1,5	0,125	16
<b>Rifampicina</b>	15	1	<0,016-1,5	<0,016-0,016	1	16
<b>Amoxicilina</b>	19	0	<0,016-0,016	0,002->32	0,016	19

S=Sensible; R=Resistente

Los antimicrobianos de primera línea metronidazol, amoxicilina, claritromicina y tetraciclina son empleados en el tratamiento de *H. pylori*, siendo el macrólido, un pilar fundamental en el éxito de diversos esquemas terapéuticos (Dang & Graham, 2017). De estos antimicrobianos, la mayor prevalencia de la resistencia es frente a metronidazol, siendo más elevada en los países en desarrollo, debido a su amplio uso en tratamientos previos contra las infecciones parasitarias, ginecológicas y dentales (Savoldi *et al.*, 2018).

En la presente investigación, se obtuvo un 94,7 % de aislamientos resistentes al metronidazol, cifra comparable a las reportadas en países como China (95,5 %) (Ji *et al.*, 2015), República Dominicana (83 %) (Miftahussurur *et al.*, 2017), así como en diversos países africanos en donde la prevalencia de la resistencia primaria y

secundaria a este antibiótico es del 91 % (Savoldi *et al.*, 2018). En Cuba, en un estudio realizado a 70 aislamientos recuperados entre 2005-2007, se encontró un porcentaje de resistencia elevado (85 %) a metronidazol (Llanes *et al.*, 2010). La resistencia a este antimicrobiano en el actual estudio supera además, a la notificada en otros países de América Latina, como Costa Rica (42 %) y Venezuela (59 %) (Camargo *et al.*, 2014), de Europa (38 %), el Sudeste de Asia (59 %) y el Pacífico (55 %) (Savoldi *et al.*, 2018).

En Cuba, el uso frecuente de metronidazol en el tratamiento de la giardiasis, enfermedad altamente prevalente en el país, así como de las infecciones ginecológicas, podrían ser las causas de esta elevada resistencia (Lara *et al.*, 2003).

La mayoría de las cepas resistentes al metronidazol, tuvieron CIMs altas, siendo la CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de 256 µg/ml y >256 µg/ml, lo que pudiera tener una importante repercusión en el manejo clínico de los pacientes, pues CIMs superiores a 32 µg/ml están asociadas con un mayor fallo terapéutico (Thung *et al.*, 2016).

Algunos investigadores han sugerido que el tamaño del inóculo puede afectar los resultados de la prueba de E-test, especialmente los inóculos ajustados con valores de 3 o más de la escala de Mc Farland tienden a producir un mayor valor de CIM. Sin embargo, otros estudios han demostrado que las lecturas de las CIMs, no se modifican al utilizar un patrón de 3 o 4 de la escala de Mc. Farland (Mc Nulty, 2002). En la actual investigación se realizaron duplicados de cada experimento utilizando un inóculo equivalente al patrón de 3 de dicha escala y los valores CIMs obtenidos resultaron similares.

La resistencia de *H. pylori* a la levofloxacina, antimicrobiano que se emplea en la terapia de segunda línea de esta infección bacteriana fue la segunda más frecuentemente detectada (56,3 %) en el actual estudio. Cifras similares de resistencia han sido reportadas por Chey y colaboradores en Estados Unidos, en

el período 2011-2016 (53, 5 %) (Chey *et al*, 2017). La OMS notifica porcentajes elevados de resistencia a levofloxacina en Perú (37 %) (Martínez *et al*, 2014), República Dominicana (35,7 %) (Miftahussurur *et al*, 2017), así como el Mediterráneo Este (32 %), el Pacífico Occidental (31 %) y el Sudeste de Asia (25%) (Savoldi *et al*, 2018).

La levofloxacina apenas se emplea en Cuba como tratamiento de la infección por *H. pylori*, este medicamento es escasamente utilizado para el manejo de algunas infecciones respiratorias y por micobacterias no tuberculosas en el país, pero se hace bajo un estricto control (Hernández *et al*, 2016). Sin embargo, la ciprofloxacina es uno de los antimicrobianos más usados para el tratamiento de diversas infecciones en pacientes que acuden a la atención primaria y secundaria de salud (Lara *et al*, 2003; Hernández *et al*, 2016), por lo que la resistencia a la levofloxacina pudiera ser resultado de la resistencia cruzada ejercida por otras fluoroquinolonas.

La resistencia a la claritromicina en aislamientos de *H. pylori* es de suma importancia, ya que se ha demostrado que su aparición puede reducir hasta en un 60% las tasas de erradicación de la infección con la terapia antibiótica clásica y la concomitante, e incluso algunos autores consideran que la resistencia a esta droga es 100% predictiva del fallo terapéutico (Megraud, 2004).

En los últimos años, se ha observado un incremento en el número de aislamientos resistentes a claritromicina (Savoldi *et al*, 2018). En América, la resistencia a esta droga es muy variable, estimándose la prevalencia entre un 2,2 % y 63 % (Martínez *et al*, 2014). En el actual estudio, se encontró un 25 % de aislamientos resistentes, similar a lo reportado en Colombia (18,8 %) y Argentina (26,7 %) (Figuroa *et al*, 2012; Scalestky, *et al*, 2011), sin embargo en México, según un estudio realizado en el 2011 por Ayala y colaboradores, apenas un 5 % de las cepas estudiadas eran resistentes (Ayala *et al*, 2011). Un reporte de la OMS señala que la prevalencia de la resistencia primaria y secundaria de *H. pylori* a

claritromicina en América Latina es entre 10- 17 %, la cual está por debajo de lo notificado por otras regiones geográficas como Europa Occidental y Asia Pacífico, que muestran cifras entre 29-34 % (Savoldi *et al*, 2018). La frecuencia de aislamientos resistentes a este macrólido en el presente estudio pudiera reflejar el empleo reciente del medicamento en el tratamiento empírico de la infección por *H. pylori* en Cuba, como parte de la terapia clásica (Infante M, comunicación personal, 2018). La existencia de resistencia cruzada con otros macrólidos también ha sido notificada en estudios previos (Chey *et al*, 2017; Dang *et al*, 2017) y dado que la azitromicina es uno de los antibióticos más consumidos en la actualidad en el mundo y en Cuba, la actual resistencia pudiera reflejar el patrón de uso de los diferentes macrólidos en nuestro país (Savoldi *et al*, 2018; Lara *et al*, 2003).

Muchos autores consideran que la resistencia de *H. pylori* frente a la amoxicilina se presenta de manera excepcional, demostrándose que en países de Europa y América Latina existe un 100 % de sensibilidad a este antibiótico (Savoldi *et al*, 2018). La presente investigación no fue la excepción, porque no se encontró ningún aislamiento resistente a este  $\beta$ -lactámico. Esta cifra es bastante similar a otro reporte cubano que informa una resistencia de 1,6% (Llanes *et al*, 2010). La OMS notifica que la prevalencia mundial de resistencia primaria y secundaria a amoxicilina es inferior al 10% en todas las regiones geográficas, excepto en el Mediterráneo Este, donde se ha detectado que es del 14 % (Savoldi *et al*, 2018). Sin embargo, Martínez y colaboradores en un artículo de revisión en América Latina notifican que la prevalencia de la resistencia varía entre 0-38%, con los mayores porcentajes en Brasil (29-38%) y Colombia (20,5%). Estas diferencias pudieran estar dadas por el uso de diferentes puntos de corte para interpretar la resistencia a la amoxicilina (0,5, 1 y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Savoldi *et al*, 2018, Camargo *et al*, 2014).

La conservación previa de los aislamientos de *H. pylori* en congelación a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  es uno de los factores que pudiera afectar la expresión de resistencia a la

amoxicilina, pues se ha reportado que la resistencia a esta droga es inestable y se pierde luego de la congelación (Dore *et al.*, 1999).

La tetraciclina es un antibiótico de amplio espectro, recomendado en diferentes esquemas terapéuticos de primera y segunda línea de la erradicación de *H. pylori* (Chey, *et al.*, 2017, Thung *et al.*, 2016). En el presente estudio solo un aislamiento resultó resistente a este antibiótico. La mayoría de las publicaciones internacionales no comunican resistencia de la bacteria a este fármaco en países de América Latina, Europa, el Sudeste de Asia, ni el Pacífico Occidental (Savoldi *et al.*, 2018), así como en un estudio previo llevado a cabo en Cuba (Llanes *et al.*, 2010). La prevalencia mundial de resistencia de *H. pylori* a la tetraciclina es inferior al 5 %, siendo la región del Mediterráneo Este la única que notifica una prevalencia del 10% (Savoldi *et al.*, 2018). La cifra de resistencia del actual estudio resulta similar a la notificada en Venezuela (7 %) (Martínez *et al.*, 2014).

Existen escasos reportes sobre la susceptibilidad *in vitro* de *H. pylori* a la rifampicina (Nishizawa y Suzuki, 2014, Suzuki *et al.*, 2009). La tasa media de resistencia de la bacteria a este antibiótico, calculada de los datos de 11 estudios realizados a 2982 pacientes, es de 1,3%. Sin embargo, cuando se incluyen pacientes que no recibieron tratamiento previo, esta desciende a 0,6% (Gilbert y Calvet, 2012). Suzuki y colaboradores evalúan la sensibilidad de 94 aislamientos de *H. pylori* a la rifabutina, en pacientes procedentes de dos hospitales japoneses, uno de ellos especializado en la atención a pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, que incluye la tuberculosis; encuentran un porcentaje de resistencia de 7,4%, en enfermos tratados previamente con rifampicina (Suzuki *et al.*, 2009). Otros estudios internacionales que notifican resistencia a rifampicina son los de Irán, Alemania y Bulgaria, con el 23,1%, 13,4% y 8,6%, respectivamente (Hooi, *et al.*, 2017). Debemos señalar que el paciente cubano del cual se aisló *H. pylori* resistente (CIM = 1,5 µg/mL), no tenía antecedente de tratamiento previo con rifampicina, ni contacto con pacientes tuberculosos.

De los 16 aislamientos de *H. pylori* a los cuales se le investigó la sensibilidad a todos los antimicrobianos, el 56,3 % (9 aislamientos) presentó resistencia a más de un antibiótico. El patrón de resistencia múltiple representado por metronidazol-levofloxacina (MET-LEV) fue el más frecuentemente hallado con un 25 % (4 aislamientos). El patrón de multiresistencia metronidazol-levofloxacina-claritromicina le siguió en frecuencia (18,8 %) con tres aislamientos. Finalmente fueron detectados otros tres patrones de resistencia múltiple (MTZ+CLA+LEV; MTZ+TET+LEV y MTZ+CLA+RIF) Los resultados anteriormente expuestos se muestran en la Tabla IV.3.

**Tabla IV.3. Número de aislamientos de *H. pylori* (n=9) multiresistentes, IGE, abril-julio 2018**

Tipo de resistencia	No. de aislamientos
<b>Doble resistencia</b>	
MTZ+LEV	4
<b>Triple resistencia</b>	
MTZ+CLA+LEV	3
MTZ+TET+LEV	1
MTZ+CLA+RIF	1
<b>Total</b>	<b>9</b>

MTZ=metronidazol CLA=claritromicina LEV=levofloxacina TET=tetraciclina  
RIF =rifampicina

En República Dominicana, Miftahussurur y colaboradores detectan un 35,7 % de multiresistencia en 64 aislamientos de *H. pylori* investigados (Miftahussurur *et al.*, 2017), con un predominio de aquellos con dobles mutaciones, siendo la MTZ-LEV, la más frecuentemente encontrada. En un hospital de la ciudad de Zaragoza, España, se detecta un 27,5 % de multiresistencia *in vitro* a los antibióticos, con un predominio de las mutaciones MTZ-CLA y MTZ-CLA-LEV (Cosme *et al.*, 2017).

### IV.3. Mecanismo de resistencia a claritromicina

La resistencia a la claritromicina en *H. pylori* se le asocia a modificaciones postranscripcionales o mutaciones puntuales situadas en el dominio V peptidiltransferasa del *ARNr 23S*, estas mutaciones están asociadas con la pérdida de unión del macrólido al ribosoma (Klesiewicz *et al.*, 2014). Estas mutaciones incluyen la transición, de una adenina a guanina en la posición 2143, 2142 y transversión en 2142 de adenina a citosina. Una vez establecidas estas mutaciones se inhibe la capacidad de unión de la claritromicina a los ribosomas, y por lo tanto, la interferencia en el proceso de elongación y síntesis de proteínas es nula (Nishizawa & Suzuki, 2014).

En el actual estudio, dos de los cuatro aislamientos de *H. pylori* que mostraron resistencia a claritromicina, fueron analizados por la técnica de PCR-RFLC (Figura IV.1), produciéndose la amplificación del fragmento de 768 pb correspondiente al gen *ARNr 23S*. La posterior digestión con la enzima *MbolI* identificó al genotipo salvaje (Figura IV-1 (A)). La digestión con la enzima *BsaI* reveló la presencia de la mutación A2143G, identificada por las bandas de 350, 310 y 108 pb. La digestión del producto de amplificación de la cepa control de *H. pylori* ATCC 43504 (sensible a claritromicina), mostró dos bandas de 610 y 108 pb, diferentes al genotipo resistente (B).

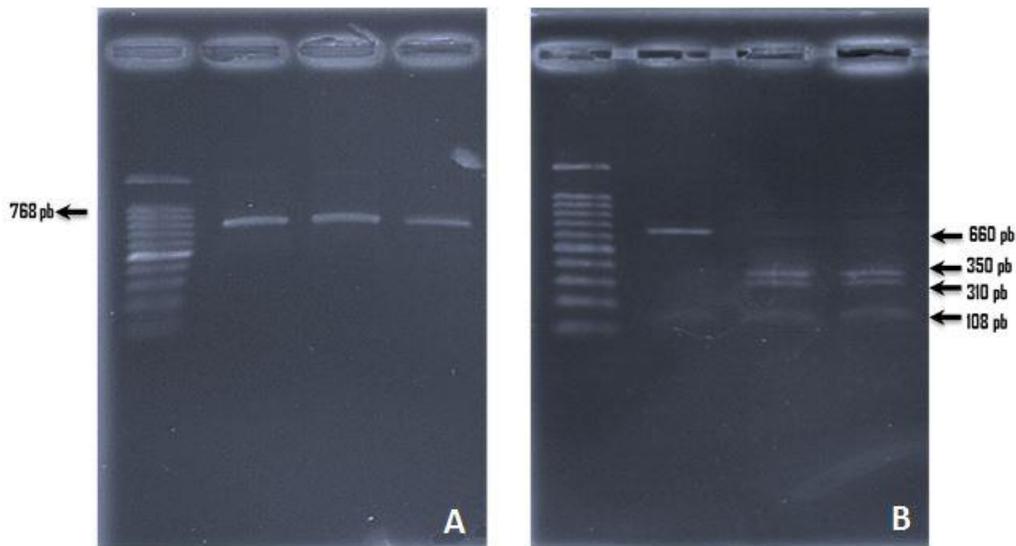


Figura IV.1. Electroforesis en geles de agarosa al 1,5% del análisis por PCR-RFLP de la resistencia a claritromicina de *Helicobacter pylori*. Tres cepas se digirieron con las enzimas *Mbol*I y *Bsa*I (A), genotipo salvaje (banda intacta 768 pb) y (B), genotipo salvaje (bandas a 660 y 108 pb) genotipo resistente con mutación A2143G (bandas de 350, 310 y 108 pb). M, marcador de peso molecular de 100pb (Promega, EE.UU); carriles: 1) ADN de *H. pylori* ATCC 43504; 2 y 3): ADN de aislamiento resistente 1A y 2C.

Este resultado coincide con otro llevado a cabo en el LNRNH en el que fueron analizados 3 cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina por PCR-secuenciación y encuentra la presencia de la mutación A2143G en dos de las cepas y la mutación A2142C en la otra cepa (Llanes *et al*, 2010). El predominio de la mutación A2143G en aislamientos resistentes a este macrólido también ha sido descrito por otros autores (Nishisawa y Suzuki, 2014 y Versalovic, 1997) en diferentes países y regiones del mundo. Se debe destacar que esta mutación tiene un mayor impacto clínico que el resto de las mutaciones relacionadas con la resistencia a claritromicina (Miftahussurur *et al.*, 2017).

### IV.3. Discusión general

La evaluación de la PRU en muestras de biopsias gástricas de pacientes con síntomas dispépticos y lesiones endoscópicas de úlcera péptica, gastritis atrófica y gastritis nodular, tuvo un buen desempeño diagnóstico, por lo que puede ser usada como prueba diagnóstica para detectar la infección bacteriana. Estas lesiones endoscópicas son producidas generalmente por *H. pylori* (Galbán *et al*, 2012), por lo que el empleo de la PRU pudiera garantizar un diagnóstico rápido y confiable de la infección en instituciones de salud que realizan endoscopias digestivas altas.

La detección de resistencia *in vitro* de *H. pylori* mediante las pruebas de sensibilidad antibiótica, a partir de los cultivos de biopsia gástrica y la detección de mutaciones de resistencia, tanto de cultivos como directamente de las muestras de biopsias, constituye la estrategia más útil para recomendar el tratamiento adecuado a los pacientes, en especial aquellos que han recibido tratamiento previo de esta infección. Sin embargo, estas pruebas son costosas y no están disponibles en todos los laboratorios (Savoldi *et al.*, 2018; Chey *et al.*, 2017).

Diferentes comités de expertos internacionales recomiendan esquemas de tratamiento de la infección por *H. pylori* basados en evidencias científicas y sugieren el empleo de aquellos antibióticos cuyo umbral de resistencia no rebase el 15% (Savoldi *et al.*, 2018; Chey *et al.*, 2017, Malfertheiner, *et al.*, 2017).

En el presente estudio, la alta frecuencia de resistencia a metronidazol en aislamientos de *H. pylori* y su elevado nivel (CIM  $\geq$  256  $\mu$ g/mL), corrobora su persistencia como un fenómeno previamente detectado en nuestro país (Llanes *et al.*, 2010), que pudiera comprometer el éxito del esquema de tratamiento más empleado en Cuba (metronidazol, amoxicilina más IBP) (Paniagua & Piñol, 2017). La resistencia a metronidazol, a diferencia de la claritromicina, pudiera resultar

menos relevante desde el punto de vista clínico y pudiera revertirse incrementando la duración del tratamiento con metronidazol a 14 días e incorporar sales de bismuto al esquema (terapia cuádruple) (Chey *et al.*, 2016, Savoldi *et al.*, 2018; Malfertheiner *et al.*, 2011).

Esta investigación representa la primera realizada en Cuba que estudia la sensibilidad *in vitro* de *H. pylori* a la levofloxacin, antibiótico de segunda línea que se recomienda en pacientes con fallas a los tratamientos de primera línea de la infección (Gisbert, 2009). La cifra de resistencia encontrada rebasa a lo reportado en otros países de Latinoamérica y pudiera ser el resultado de la resistencia cruzada con otras fluoroquinolonas (Martínez *et al.*, 2014; Camargo *et al.*, 2014). Esta resistencia no resulta un fenómeno emergente en Cuba, pues previamente fue detectada la resistencia a otra fluoroquinolona (ciprofloxacina) (Llanes *et al.*, 2010).

El porcentaje de resistencia a claritromicina en el actual estudio (25 %) resulta casi dos veces más elevado que el detectado previamente en Cuba (10 %) (Llanes *et al.*, 2010), lo que pudiera obedecer al empleo en los últimos años del macrólido en el tratamiento de esta infección bacteriana (Paniagua y Piñol, 2017). Asimismo, la identificación de la mutación A2143G, como causa de la resistencia a la claritromicina en dos aislamientos estudiados resulta un fenómeno antes detectado en el país (Llanes *et al.*, 2010).

La baja cifra de resistencia de los aislamientos de *H. pylori* a la amoxicilina y tetraciclina ha sido previamente reportado en Cuba (Llanes *et al.*, 2010), lo que unido a la baja resistencia a la rifampicina hace que estos antimicrobianos pudieran ser recomendados en diferentes esquemas de tratamiento en el país.

En el actual estudio resulta necesario destacar el elevado porcentaje de aislamientos de *H. pylori* multirresistentes, lo cual pudiera comprometer el éxito

de la terapia de esta infección que cuenta con un espectro de antibióticos limitado en el país (Paniagua y Piñol, 2017).

Cuba exhibe una elevada prevalencia de la infección por *H. pylori* (Galbán *et al*, 2012, Llanes 2014), la que pudiera provocar un incremento de la recurrencia de la enfermedad, en especial por el hecho de que la combinación terapéutica que más se emplea es metronidazol, amoxicilina y omeprazol (Paniagua & Piñol, 2017).

El presente estudio tiene como principal limitación, el bajo número de aislamientos de *H. pylori* investigados, pero provee una información preliminar que resulta de interés para definir futuras estrategias terapéuticas de esta infección en el país, en especial en los fallos de tratamiento de primera línea. Resultaría de utilidad completar el estudio de la sensibilidad antimicrobiana al resto de los aislamientos conservados y evaluar nuevos mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas y la tetraciclina.

## V. CONCLUSIONES

1. La prueba rápida de ureasa mostró un desempeño bueno, lo que corrobora su utilidad como método diagnóstico rápido de la infección por *H. pylori* en las instituciones de la atención primaria y secundaria de salud.
2. La elevada multirresistencia a metronidazol y levofloxacina pudiera comprometer el éxito del tratamiento de la infección por *H. pylori* en nuestro medio, por lo que se recomienda el empleo de la amoxicilina y tetraciclina, que mostraron una elevada actividad antimicrobiana *in vitro*.
3. La excelente actividad *in vitro* de rifampicina sugiere el empleo de la rifabutina en casos de multirresistencia a metronidazol, levofloxacina y claritromicina.
4. La resistencia a claritromicina estuvo mediada por la mutación A2143G, lo que la convierte en el principal mecanismo involucrado en la resistencia a este antibiótico.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar el estudio de la sensibilidad antimicrobiana al resto de los aislamientos de *H. pylori* recuperados
2. Determinar las bases genéticas de la resistencia a las fluoroquinolonas y tetraciclina en aislamientos de *H. pylori*
3. Caracterizar el comportamiento de las variables clínico-epidemiológicas y demográficas de los pacientes en estudio

**VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adlekha S, Chadha T, Krishnan P, Sumangala B. (2013). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy in a medical college hospital in Kerala, India. *Ann Med Health Sci Res.* 3:559–63.

Agusti, G., Codony, F., Fittipaldi, M., Adrados, B. & Morato, J. (2010). Viability Determination of *Helicobacter pylori* Using Propidium Monoazide Quantitative PCR. *Black Publis Ltd . 15 : 473-476.*

Alarcón T, Baquero M, Domingo D, López-Brea M, Royo G. (2004). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Ed: Emilia Cercenado y Rafael Cantón. En: *Microbiol Clinica, Doyma, Barcelona.* 119 pp

Alonso, J., Rodríguez, B.L., Moreno, A. , Chao, L. (2013). Evaluación de la utilidad de diferentes métodos para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. *Rev Cubana Invest Biomed.* 32 (1): 102-110.

Axon, A. (2014). *Helicobacter pylori* and Public Health. *Helicobacter.* 19(1): 68-73.

Ayala G, Galván M, Chihu L, Fierros G, Sánchez A, Carrillo B, et al. Resistance to antibiotics and characterization of *Helicobacter pylori* strains from antrum and body from adults in Mexico. *Microb Drugs Resist* 2011; 17: 149-155. 96.

Azevedo, N. F., Huntington, J. & Goodman, K. J. (2009). The Epidemiology of *Helicobacter pylori* and Public Health Implications. *Helicobacter.* 14 (1): 1-7.

Bermúdez L, Torres LE, Rodríguez BL. Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Cubana Med.* 2009; 48:1.

Best L, Haldane D, Keelan M, Taylor D, Thomson A, 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(10):3138-44.

Buzas, G.M. (2015). *Helicobacter pylori*. *Orv Hetil.* 156(6): 203-10.

Camargo MC, García A, Riquelme A. The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America and the Caribbean. *Am J Gastroenterol.* 2014; 109(4): 485-95.

- Cavalier.S.T (2002). The neomuran origin of archeabacteria, the megibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 7-76.
- Chen, Y. K. (1998). Comparison of two rapid urease test. *Dig Dis Sci.* 24: 111-14
- Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. (2017) ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol.*; 112:212–238.
- Crowe SE. Treatment regimens for *Helicobacter pylori*. UpToDate, (2017). Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/treatment-regimens-for-helicobacter-pylori> [acceso 30 de mayo de 2017]
- Dang BN, Graham DY. (2017) *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance: a WHO high priority? *Nat Re Gastroenterol Hepatol* 14: 383-84
- Dondi, E., Aapa, R., Boldorini, R., Fonio, P., Zanetta, S. & Oderda, G. (2006). High accuracy of noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection in very young children. *J Pediatr.* 149 (6): 817-821.
- Dore M, Osato M, Realdi G, Mura I, Graham D, Sepulveda A. (1999) Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother.* 43:47-5.
- Doron B, Ben-Zvi H, Perets TT, (2015). Trends in Secondary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* from 2007 to 2014: Has the Tide Turned? *J Clin Microbiol* 53:522–527. doi:10.1128/JCM.03001-14.
- Elizalde, J.I. (2004). *Helicobacter pylori* y enfermedades relacionadas. Patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. *GH Cont.* 3 (6): 256-261.
- Escobar MP. (2003). En: Aspectos pediátricos de la infección por *Helicobacter pylori* Cap X. En: González Carbajal, Valmaña CE (eds). *Helicobacter pylori ¿el tercer dogma?*. La Habana, Edit. Científico-Técnica, 230 pps.
- Eusebi LH Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. (2014). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/hel.12165> DOI: 10.1111/hel.12155. Fecha de acceso 27 de octubre de 2017.
- Fawcett, P. T., Vinette, K. M., Gibney, K. M. & Proujansky, R. (2004). Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *H. pylori* infection in pediatric patients. *BMC Microbiol.* 4: 5-10.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Feliciano O, Gutiérrez O, Valdés O, (2015). Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, and iceA Genotypes in Cuban Patients with Upper Gastrointestinal Diseases. BioMed Res Int doi: 10.1155/2015/753710.

Figuroa M, Cortés A, Pazos A, Bravo LE. (2012) Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes de zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. Biomédica ; 32: 32-42.

Ford, A. C. & Axon, A. T. (2010). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. Helicobacter. 15 (1): 1- 6.

Galbán E, Arús E, Periles U. (2012) Endoscopic findings and associated risk factors in primary health care settings in Havana, Cuba. Medicc Rev 14: 30-37.

Gámez, E. M., M. P. A, M. Z. Miranda y G. A. Mulet (2008): Gastritis crónica antral por *Helicobacter pylori* en la infancia. Rev Cubana Pediatr. 80 (1): 10-17

Ghasemi-Kebria, F., Ghaemi, E., Azadfar, S. , Roshandel, G. (2013). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among Iranian children. Gastroenterol. 14:169-172.

Gisbert JP, Molina-Infante J, Amador J, Bermejo F, Bujanda L, Calvet X, (2016) IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Hepatol. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2016.05.003>

Glocker, E., Berning, M., Gerrits, M. M., Kusters, J. G., and Kist, M. (2005). Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to Tetracycline in *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3166–3170. doi: 10.1128/AAC.49.8.3166-3170.2005.

Gold B. *Helicobacter pylori* Infection in Pediatric Patients: (2014) Gastroenterol & Hepatol ; 10, Issue 12, Supplement 7. 05US14EBP1368

González Carbajal M. (2003) Aspectos epidemiológicos de mayor relieve de la infección por *Helicobacter pylori*. Cap. V. En: González Carbajal, Valmaña CE (eds). *Helicobacter pylori ¿el tercer dogma?* La Habana, Edit. Científico-Técnica, . 230 pps.

Guarner, J., Kalach, N., Elitsur, Y. y Koletzko, S. (2010). *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. Eur J Pediatr. 169: 15-25.

Gutiérrez B, Vidal T, Valmaña CE, (2005) *Helicobacter pylori* infection in Havana, Cuba. Prevalence and Cag A status of the strains. Vaccimonitor. 14: 45-49

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Hernández ME, Marín Y, Carrazana D, Vales M, Ramos Y. (2016). Consumo y resistencia a los antibacterianos en un hospital de segundo nivel. *Medicentro Electr*, 20(4): 268-77.

Hooi JKY, Lai WJ, Ng WK ( 2017) Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*;153:420-429.

Hosseini, E., Poursina, F., Van de Wiele, T., (2012). *Helicobacter pylori* in Iran: a systematic review on the association of genotypes and gastroduodenal diseases. *J Res Med Sci*. 17:280–292.

Kalem, F., Ozdemir, M. & Baysal, B. (2010). Investigation of the presence of *Helicobacter pylori* by different methods in patients with dyspeptic complaints. *Mikrobiyol Bul*. 44 (1): 29-34.

Koletzko S, Jones NL, Goodman K, Gold B, Rowland M, Cadranel S, (2011) Evidence-based guidelines from ESPGHAN and NASPGHAN for *Helicobacter pylori* infection in children. *JPGN.*;53:230-243

Krogfelt KA, Lehours P, Mégraud F. (2005) Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter.*;10:5–13.

Kuo CH, Kuo FC, Hu HM, Liu CJ, Wang S, Chen YH, (2012). The optimal First – Line Therapy of *Helicobacter pylori* Infection in Year 2012. *Gastroenterology Research and Practice* 11: 6-10

Lara MC, Cires M, García AJ. (2003). Consumo de antimicrobianos en la Atención primaria de salud. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 19. ISSN 1561-3038.

Llanes R, Feliciano O, Gutiérrez O, Gala A, Valdés L, Capó V, Llop A, Millan L, Rodríguez A. (2014). Nuevos conocimientos sobre el diagnóstico y la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* en Cuba. *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*; 2 (4): 1-9.

Llanes R, Feliciano O, Guzmán D, (2010). Use of a single biopsy specimen for diagnosing *Helicobacter pylori* infection by culture and two different PCR methods. *Trop Gastroenterol*, 31(2): 111-112.

Llanes R, Millán LM, Escobar MP, . (2011). Low Prevalence of *Helicobacter pylori* among symptomatic children from a Hospital in Havana, Cuba. *J Trop Pediatrics*; 58(3):231-234.

Llanes R, Soria C, Nagashima S, (2010a) High level metronidazole and ciprofloxacin resistance and elevated susceptibility to other drugs characterizes Cuban isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal Health Popul & Nutr*; 28 (2): 135-140.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Llorens P. (2006) Tumores gástricos. Gastroenterología y hepatología. Caracas: Editorial Mediterráneo. 38-47.

López-Brea, M. (2004). La infección por *Helicobacter pylori*. Rev Esp Quimioterap. 18(4): 271-272.

Lopez-Gongora S, Puig I, Calvet X, Villoria A, Baylina M, Munoz N,. (2015). Systematic review and meta-analysis: Susceptibility-guided versus empirical antibiotic treatment for *Helicobacter pylori* infection. J Antimicrob Chemother. Jun 114, 11: 129-33

Loster, B. W., Czesnikiewicz-Guzik, M., Bielanski, W., Karczewska, E., Loster, J. E., Kalukin, J., Guzik, T. J., Majewski, S. & Konturek, S. J. (2009). Prevalence and characterization of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection and colonization in dentists. J Physiol Pharmacol. 8: 13-18.

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. (2016). Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut.;10:1–25

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'morain, C. A., Atherton, J., Axon, A. T. R., Bazzoli, F., Gensini, G. F., Gisbert, J. P., Graham, D. Y., Rokkas, T., El-Omar, E. M., Kuipers, E. J. & (Ehsg, T. E. H. S. G. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection and the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut. 61: 646-664.

Martínez JD, Henao SC, Lizarazo JI. Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Latin America and the Caribbean. Rev Col Gastroenterol. 29 (3) 2014: 218-227.

Martínez JD, Henao SC, Lizarazo JI. (2014). Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Latin America and the Caribbean. Rev Colombiana Gastroenterol; 29(3): 217-26.

Mc Nulty C. (2002). Helicobacter Working Group. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. J Antimicrob Chemother. ;49:601-9.

Mcmahon, B. J., Bruce, M. G., Koch, A., et al. (2015). The diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Arctic regions with a high prevalence of infection: Expert Commentary. Epidemiol Infect. 144: 225-233.

Medina, M. L., Medina, M. G., Martín, G. T., Picón, S. O., Bancalari, A. & Merino, L. A. (2010). Molecular detection of *Helicobacter pylori* in oral samples from patients suffering digestive pathologies. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 15 :e38-42.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E, O'Morain C, Spiller R, et al. (1999). Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(11):2747-52.
- Mégraud F. (2004). *H. pylori* antibiotic resistance: Prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* ; 53:1374-84.
- Mégraud, F. (2005). Comparison of non-invasive tests to detect *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: results of a multicenter European study. *J Pediatr.* 146 (2): 198-203.
- Miernyk, K., Morris, J., Bruden, D., et al (2011). Characterization of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* Genotypes among Alaskans and Their Correlation with Clinical Disease. *J Clin Microbiol.* 49 (9): 3114-3121.
- Miftahussurur M, Cruz M, Subsomwong P, Jiménez JA, Hosking C, Nagashima H, Akada, et al. (2017). Clarithromycin-Based Triple Therapy Is Still Useful as an Initial Treatment for *Helicobacter pylori* Infection in the Dominican Republic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* 96(5), , pp. 1050–1059.
- Mitchell H, Katelaris P. (2016). Epidemiology, clinical impacts and current clinical management of *Helicobacter pylori* infection. *MJA.*; 204(10): 376-380.
- Mladenova, I., Durazzo, M. & Pellicano, R. (2006). Transmission of *Helicobacter pylori*: are there evidences for a fecal-oral route? *Minerva Med.* 97(1): 15-18.
- Mochizuki H, Nogueira AP. (2011). Determinación de la susceptibilidad de cepas de *Helicobacter pylori* a levofloxacino en formato pequeño y método de difusión en disco usando agar yema de huevo. *Rev Gastroenterol Perú;* 31: 224-229.
- Moncayo JI, Santa Cruz JJ. (2006). Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. *Colombia Méd.*;37(3):203-12.
- Ndip, R. N., Malange, A. E., Akoachere, J. F., Mackay, W. G., Titanji, V. P. & Weaver, L. T. (2004). *Helicobacter pylori* antigens in the faeces of asymptomatic children in the Buea and Limbe health districts of Cameroon: a pilot study. *Trop Med Int Health.* 9 (9): 1036-1040.
- Nishizawa T, Maekawa T, Watanabe N, et al (2015). Clarithromycin Versus metronidazole as First-line *Helicobacter pylori* Eradication: A Multicenter, Prospective, Randomized Controlled Study in Japan. *J Clin Gastroenterol.* 49(6):468-71. doi: 10.1097/MCG.000000000000165.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Oleastro M, Ménard A, Santos A, et al (2003). Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 41(1):397-402.
- Ortiz AP, Reis FC, Ferraz LFC, Gerrits MM, Mendoca S, Kuster JG, (2006). Differentially expressed genes in responses to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. FEMS Immunol Med Microbiol 60: 226-230
- Oth L, Wilson M, Fernández H, Oth C, Toledo C, Cárcamo V, (2011). Isolation of *Helicobacter pylori* in Gastric Mucosa and Susceptibility to Five Antimicrobial Drugs in Southern Chile. Braz J Microbiology; 42: 442-447
- Paredes, E. B., Rojas, P. G., Lopez, R. G., Maldonado, M. C., Chang, A. Z., Ochoa, Y. S., Rivera, A. P. & Tenorio, J. H. (2011). Utilidad del test rapido de Ureasa para la deteccion de *Helicobacter pylori* en la hemorragia digestiva alta por Ulcera peptica. Rev Gastroenterol. 31 (1): 17-20.
- Pasechnikov.V,Chukov.S, Fedorov.E, Kikuste.L & Leja.M (2014). Gastric cancer: Prevention,screening and early diagnosis. World J Gastroenterol. 20 (38): 13842-13862.
- Piccolomini R, Di Bonaventura G, Catamo G, Carbone F, Neri M. (1997). Comparative evaluation of the E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. J Clin Microbiol. 35(7):1842-6.
- Pourakbari, B., Ghazi, M., Mahmoudi, S., Mamishi, S., Hossein, Azhdarkosh, Najafi, M., Kazemi, B., Salavati, A. & Mirsalehian, A. (2013). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests. Brazilian J Microbiol. 44(3): 795-798.
- Ribeiro,M.L., Gerrits,M.M., Benvengo,Y.H., Berning,M., Godoy,A.P., Kuipers, E. J., et al.(2004). Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 40, 57–61. doi:10.1016/S0928-8244(03)00277-3.
- Rodríguez A, Llanes R, Bello M, (2013). Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes atendidos en el Hospital General Docente Iván Portuondo. Panorama Cuba y Salud.; 8(3): 26-32.
- Rugge M, Russo V, Guido M. Review article: what have we learnt from gastric biopsy?. Aliment Pharmacol Ther. 2003;17(Suppl 2):68-74.)

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rüssmann H, Kempf V, Koletzko S, Heesemann J, Autenrieth I. (2001). Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol. ;39(1):304-8.
- Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. (2018). Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions. Gastroenterology.. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.07.007.
- Scaletky I, Aranda K, García G, Goncalves M, Cardoso S, Iriya K, et al. (2011). Application of Real Time PCR Stool Assay for *Helicobacter pylori* Detection And Clarithromycin Susceptibility Testing in Brazilian Children. Helicobacter 16: 311-315.
- Selgrad M, Meissle J, Bornschein J, Kandulski A, Langner C, Varbanova M, et al. (2013). Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in central Germany and its relationship with the number of eradication therapies. Eur J Gastroenterol Hepatol. 25:1257-60.
- Seo, J. H., Park, J. S., Yeom, J. S., Lim, J. Y., Park, C. H., Woo, H. O., Baik, S. C., Lee, W. K., Cho, M. J., Rhee, K. H. & Youn, H. S. (2014). Correlation between Positive Rate and Number of Biopsy Samples on Urease Test in Childhood *Helicobacter pylori* Infection. J Korean Med Sci. 29:106-109.
- Sisson G, Jeong J-Y, Goodwin A, Bryden L, Rossler N, Lim-Morrison S et al. (2001). 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.;182:5091-6.
- Solnick, J. V., Schauer, B.D.(2002): Emergence of diverse Helicobacter species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin Microbiol Rev. 14 (1): 59-97.
- Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med. 2002;347(15):1175-86.
- Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E. J., et al. (2015). Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. Gut. 64:1353-1367.
- Suzuki,S., Suzuki,H.,Nishizawa,T.,Kaneko,F.,Ootani,S.,Muraoka, H., (2009). Past rifampicin dosing determines rifabutin resistance of *Helicobacter pylori*. Digestion. . 79,1– .doi:10.1159/000191204.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Thung I, Aramin H, Vasinskaya V. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; 43(4): 517-33.
- Tiing Ang, Kwong F, Daphne A, et al. The Changing Profile of *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance in Singapore: A 15-Year Study. *Helicobacter* 2016. 21: 261–265
- Tolone, S., Pellino, V., Vitaliti, G., et al. (2012). Evaluation of *Helicobacter pylori* eradication in pediatric patients by triple therapy plus lactoferrin and probiotics compared to triple therapy alone. *Italian J Pediatr*. 38: 63.
- Trajkow, D., K. Stardelova, M. Dimitrova, J. Mishevski y V. Serafimoski (2007):*Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. *Prilozi*. 28 (2): 39-46.
- Tseng YS, Wu DC, Chang CY, Kuo CH, Yang YC, Jan CM, (2009). Amoxicillin resistance with beta lactamase production in *Helicobacter pylori*. *Eur J ClinInvest*; 39: 807-812.
- Vaira, D., Vakil, N., Gatta, L., Ricci, C., Perna, F., Saracino, I., Fiorini, G. & Holton, J. (2010). A comparison amongst three rapid urease tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection in 375 consecutive dyspeptic. *Intern Emerg Med*. 5 (1): 41-47.
- Vakil, N. & Go, M. F. (2000). Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Gastroenterol*. 16 (1): 32-39.
- Van der Wouden EJ, Thijs JC, Kusters JG, Van Zwett AA, Kliebeur JC. (2001). Mechanism and clinical significance of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol*; 36: 10-14
- Vega AE, Cortiñas TI, Puig ON, Silva HJ. (2010). Molecular characterization and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* stains isolated in western Argentina. *Intern J of Infectious Dis*; 14S: 85-92
- Versalovic J, Osato M, Spakovsky K, Dore M, Reddy R, Stone G, et al (1997). . Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother*. ;40:283-6.
- Yakoob, J., Abid, S., Jafri, W., Abbas, Z., Islam, M. & Ahmad, Z. (2006). Comparison of biopsy-based methods for the detection of *Helicobacter pylori* infection. *Br J Biomed Sci*. 63 (4): 159-162.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Yepes CA, Rodríguez A, Ruiz A, Ariza B. (2008). Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el hospital universitario San Ignacio de Bogotá. Acta Médica Colombiana; 33: 11-14

Zhang, S. & Moss, S. F. (2014). Rodent models of Helicobacter infection, inflammation and disease. Methods Mol Biol. 921: 89-98.

Zhao LJ, Huang YQ, Chen BP, Mo XQ, Huang ZS, Huang XF (2014). *Helicobacter pylori* isolates from ethnic minority patients in Guangxi: Resistance rates, mechanisms, and genotype. World J Gastroenterol. 2014;20:4761-70.

Zullo V, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. (2011). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. World J Gastrointest Pathophysiol; 2: 35-41.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1. Consentimiento informado del paciente

TÍTULO DEL ESTUDIO: Diagnóstico y resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori*. Instituto de Gastroenterología, abril-septiembre 2018  
INVESTIGADORES PRINCIPALES: Dr. Rafael Llanes, Dra. Lei Fu

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se me informa que, por los trastornos digestivos que presento seré sometido a una endoscopia superior, para obtener 3 biopsias gástricas, con el fin de realizar el diagnóstico de la bacteria patógena *Helicobacter pylori* y conocer su sensibilidad a los principales antimicrobianos utilizados en el tratamiento de los pacientes. Para evitar molestias se me aplicará anestesia local en la farínge, con xilocaina. Todo ello, contribuirá a una mejor orientación del médico para la terapéutica de la infección por *H. pylori*.

Yo, \_\_\_\_\_, estoy de acuerdo que las muestras tomadas se utilicen para el diagnóstico microbiológico de *H. pylori*.

Por tanto:

- a.- dado que esta toma de muestra será realizada por un profesional no me causará daños y que este es un acto necesario para establecer el agente causal de la enfermedad y evaluar su sensibilidad a los antimicrobianos.
- b.- el posible beneficio que tendré de este estudio es establecer un mejor diagnóstico de la enfermedad, que unido al estudio de la susceptibilidad antimicrobiana permitan el tratamiento adecuado,
- c.- en cualquier momento me podré retirar del estudio, sin dar razones y sin que ello modifique la calidad de la atención médica que reciba,
- d.- mi identidad no será revelada y los datos demográficos y microbiológico-epidemiológicos permanecerán en forma confidencial, a menos que sean solicitados por ley. Los resultados de este estudio podrán ser publicados siempre que se cumplan los principios expuestos anteriormente,
- e.- este consentimiento ha sido firmado voluntariamente sin que haya sido forzado(a) u obligado(a), luego de haberse recibido la adecuada información,
- f.- Cualquier consulta que requiera hacerse en relación a mi participación en el estudio, deberá ser formulada al:

Especialista: ..... Fecha:.....

Lugar de aceptación: Consulta de Endoscopía del IGE

Nombre y firma del paciente incluido en el estudio:.....

Dirección:.....Teléfono contacto.....

Nombre y firma del paciente que desee retirarse del estudio .....