

Infection with *Helicobacter pylori*. Prevalence, research and impact of antibiotic resistance

Antibiotic resistance is probably the primary cause of failed therapy for infectious disease, particularly for infection with *Helicobacter pylori*. Since the relevance of infection with *H. pylori* in the pathogenesis of peptic gastroduodenal disease and gastric neoplasms was unveiled, the effectiveness of treatment with a number of antibiotics and therapeutic schemes has been investigated (1). *H. pylori* is intrinsically resistant to glycopeptides, cefsulodin, polymyxines, nalidixic acid, trimetoprim, sulfonamides, nystatin, amphotericin B, and cycloheximide, whereas wild-type strains are susceptible to β -lactams (except cefsulodin), phosphomycin, macrolides, aminoglycosides, tetracyclines, chloramphenicol, rifampicin, fluoroquinolones, 5-nitroimidazoles, and nitrofurans (2). So-called quadruple therapy with a proton-pump inhibitor (PPI) in combination with bismuth, tetracyclines and metronidazole, and most particularly triple therapy with a PPI associated with clarithromycin and amoxicillin or metronidazole represent the most widely accepted therapies. The European Helicobacter Study Group (EHSG) reported in 1997 the conclusions of the 1st Consensus Conference held in Maastricht, and recommended triple therapy as first-line treatment for infection with *H. pylori*, with quadruple therapy being held in reserve for potential first-line treatment failures (3). Triple therapy has remained the first-choice regimen during the past decade, and has been recommended by most consensus meetings and both European and American scientific societies (4-8). The initial effectiveness of this regimen, around 80-90%, has progressively declined to below 80-70% in the last few years, which has led to consider novel therapeutic approaches (9-19). Acquired resistance to commonly-used antibiotics, particularly clarithromycin and metronidazole, is thought to be the primary cause of treatment failure, but other causes such as non-compliance or prescriptions with inadequate dosage or duration should also be taken into account (20-22).

Prevalence of antibiotic resistance of *H. pylori*

During the period 1999-2003 multiple studies were reported on the prevalence of primary antibiotic resistance in *H. pylori*, and significant variations were seen among countries or even regions and ethnic groups within countries. In Europe, a low prevalence of resistance to clarithromycin was reported in the Netherlands, Germany, and Sweden (1.7-2.9%), which was higher in Spain, France and Portugal (12-22%) (22-27). Interestingly, prevalence in northern Italy was 1.8 versus 23.4% in central Italy (28-29). It was 10-12% in the United States, 25% in Mexico, in 9.8% in Brazil, 11-13% in Japan, and 5-6% in Korea (30-37). The prevalence of resis-

Editorial

tance to metronidazole was 15-40% in Europe, 20-35% in the United States, 76% in Mexico, 53% in Brazil, 9-12% in Japan and 40% in Korea, while that of resistance to amoxicillin and tetracyclines was below 1% (22-37). A meta-analysis of 20 clinical trials in the USA acknowledges an increased prevalence of resistance to clarithromycin, from 4.9% in 1993-95 to 10.1% in 1995-99 (38). A multicenter European study with homogeneous methodology performed in 22 countries during 1998 found that the prevalence of primary resistance to clarithromycin was 9.9%, to metronidazole was 33.1%, and to amoxicillin was 0.8%. Resistance to clarithromycin was more common in children versus adults, and in southern (18%) versus central (9.3%) or northern (4.2%) European countries. Simultaneous resistance to clarithromycin and metronidazole was also more frequent in southern European countries (39).

A multicenter European study was carried out in 14 countries during 1999-2002 to assess *H. pylori* antibiotic resistance in the pediatric population. The prevalence of primary resistance to clarithromycin was 20%, higher in younger children (< 6 vs. > 12 years) and in people residing in southern Europe; that of primary resistance to metronidazole was 23%, to both clarithromycin and metronidazole was 5.3%, and to amoxicillin was 0.6% (40).

In Spain several studies on the primary antibiotic resistance of *H. pylori* were published during 1999-2004, which revealed that the prevalence of resistance to clarithromycin ranged from 8.7 to 13%, and to metronidazole from 13.8 to 42% (26,41-44). In Seville, in our healthcare area, we observed that the prevalence of resistance to clarithromycin was 10%, and to metronidazole was 28.6%, during the period 1996-1998, consistent with previously reported data (45).

More recent publications (2006-09) show that, in the last decade, primary resistance to clarithromycin has either remained stable or increased, which would account for the progressively decreased effectiveness of triple therapy. Zullo et al., during 2004-06, identified in Italy a prevalence of primary resistance to clarithromycin of 16.9%, more common in patients with non-ulcer dyspepsia (19.1%) (46). Boyanova et al., in Bulgaria, observed a prevalence of primary resistance to clarithromycin of 10% during the period 1996-99, and of 17.9% during the period 2005-07 (47), and such an increase was also seen in other studies in Great Britain, Korea and Japan (48-50). Storskurubb et al., in Sweden, saw a low prevalence of primary resistance to clarithromycin (1.5%) and metronidazole (16.2%), which they relate to low use because of restrictive antibiotic policies (51). Aboderin et al. reported the opposite in Nigeria upon detection of 100% resistance to clarithromycin, ampicillin, and metronidazole in 32 study cases, which they related to uncontrolled use of these antibiotics (52). Agudo et al., in Madrid (Spain), during the period 2002-06, identified in children a high primary and secondary resistance to clarithromycin (49.2 and 70.6%), superior to that seen with metronidazole (32.8 and 41.2%), and dual resistance to clarithromycin and metronidazole, both primary and secondary, in 15.4 and 26.5% of cases, respectively; the authors highlighted the huge negative effect of such a high prevalence on the efficacy of triple therapy for *H. pylori* eradication (53). Kalach, during 1999-2005 in France, also detected in children a high prevalence of primary resistance to clarithromycin (23.2%), lower than that seen in Spain and that remained stable since 1994-98 (22.1%) (54). Antibiotic resistance and its negative influence on the effectiveness of eradicating therapies for *H. pylori* was a most relevant topic at the Third Maastricht Consensus Conference (6). Increased resistance to clarithromycin was endorsed in association with a greater use, and triple therapy with a PPI, amoxicillin or metronidazole, and clar-

Editorial

ithromycin was recommended for populations with resistance prevalence lower than 15-20%, whereas clarithromycin should otherwise be withheld. Quadruple therapy with a PPI, bismuth, tetracyclines and metronidazole may be an alternative to triple therapy as first-line regimen. The impact on triple therapy effectiveness is higher in cases with resistance to clarithromycin versus resistance to metronidazole (21,55). In the review by Megraud, published in 2004 (21), the effectiveness of triple therapy with a PPI, amoxicillin and clarithromycin is seen to decrease from 87.8 to 18.3% depending on sensitivity or resistance to the latter antibiotic, with a loss of efficacy at virtually 70%. That study also revealed that the efficacy of triple therapy with a PPI, amoxicillin and metronidazole, depending on the presence of susceptibility or resistance to the latter antimicrobial, has decreased from 89.4 to 64.4%, with a loss of efficacy at 25%, and that the effectiveness of triple therapy with a PPI, clarithromycin and metronidazole has decrease from 97 to 0%, according to susceptibility or resistance to both antibiotics, with an efficacy of 72.6% in case of clarithromycin susceptibility and metronidazole resistance, and of 50% in the opposite situation. It is thought that treatment for *H. pylori* infection should be recommended when efficacy is higher than 80% (intention-to-treat) or 85% (per protocol) (3,11,56). The current effectiveness of triple therapy as first-choice regimen is usually below 80%, even 70% in some studies (9-12), and cannot be therefore recommended.

Mechanisms of antibiotic resistance in *H. pylori*

Evidence suggests that the mechanisms of antimicrobial resistance in *H. pylori* mainly result from chromosomal mutations (22,57) primarily acquired through vertical transmission among bacteria. Chromosomal mutations will show up in the offspring, which will consequently lead to a progressive increase in the prevalence of antimicrobial resistance. Horizontal transference from a resistant to a susceptible strain, both of them in the stomach, cannot be ruled out.

Clarithromycin is a bacteriostatic antibiotic; a semisynthetic derivative of erythromycin, it belongs in the macrolide class, and is the most powerful drug against *H. pylori*. It targets ribosomes, thereby blocking bacterial protein synthesis. Resistance to clarithromycin results from point mutations that occur in the 23S rRNA gene and modify ribosome structure, impairing antibiotic binding. Most common mutations include adenine replacement by cytosine or guanine at position 2142 (A2142C, A2142G), or by guanine at position 2143 (A2143G); A2115G and G2141A occur less commonly. These mutations enable resistant strains to tolerate increasing antibiotic concentrations, from 1 to 64 µg/mL (58,59).

Amoxicillin is a bactericidal antibiotic inhibiting bacterial wall synthesis. The prevalence of *H. pylori* resistance to amoxicillin is very low, and this antibiotic requires the presence of penicillin-binding proteins (PBPs) for proper functioning. The mechanism of resistance generated by *H. pylori* consists of mutations in gene *pbp* that result in changed PBPs with greater antibiotic affinity. Resistant strains do not generate amoxicillin-PBP complexes, and thus preclude bactericidal effects (57).

Tetracyclines are bacteriostatic antibiotics that target ribosomes to block bacterial protein synthesis. The prevalence of resistance to tetracyclines in *H. pylori* is very low, and is acquired via mutations in the 16S rRNA gene, primarily in adenine-guanine-adenine triplets at positions 926 to 928 (AGA 926-928); single, dual or even

Editorial

triple substitutions may occur. A triple replacement of AGA926-928 by thymine, thymine and cytosine, respectively (AGA926-928→TTC), in the 16S rRNA gene enables strains to tolerate antibiotic concentrations up to 64 µg/mL; dual mutations allow the tolerance of concentrations up to 8 µg/mL, and single replacements enable tolerance to 2 µg/mL (60,61). The presence of other potential mechanisms of resistance has been discussed in recent years, involving either TetA efflux protein (62) or the presence of a membrane permeability inhibitor.

Metronidazole is a bactericidal antibiotic within the nitroimidazole class that has been widely and indiscriminately used in the management of multiple infections, thus conditioning a high prevalence of resistance in *H. pylori*. Nitroimidazoles, on entering target cells, are activated via a reduction process mediated by the enzyme NADPH-nitroreductase, which damages DNA and bacterial structures. The mechanisms of resistance currently known are based on mutations in genes *rdxA* and *frxA*, which would block cell-related nitroimidazole activation.

Levofloxacin and ciprofloxacin are bactericidal antibiotics in the quinolone class; their mechanism of action is similar and consists of blocking bacterial DNA replication by binding the enzyme DNA-gyrase, coded for by genes *gyrA* and *gyrB*. *H. pylori* resistance to these antibiotics is conditioned by mutations in *gyrA* QRDR (*quinolone resistance-determining region*) (63).

Methods for the study of *H. pylori* antibiotic susceptibility

Multiple methods are available for the study of *H. pylori* antibiotic susceptibility, which may be categorized as phenotypical methods, most commonly used and based on gastric biopsy cultures, including agar dilution and E-test (epsilometer test), and genotypical methods, including fluorescent in situ hybridation, PCR (polymerase chain reaction), both conventional and with sequencing, RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) PCR, and real-time PCR, which allows to directly detect chromosomal mutations in gastric biopsies and feces. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), formerly the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recommends agar dilution as gold standard for the study of *H. pylori* susceptibility to antibiotics, specifically for minimum inhibitory concentration (MIC) estimates, and establishes cutoff points for clarithromycin (64). The British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) recommends in turn E-test diffusion, which has a high correlation with agar dilution. E-test has the benefit of being a quantitative method with direct MIC expression; it also adapts to slow-growing bacteria such as *H. pylori* (65). Other available methods include broth dilution and disk diffusion (66,67). Cutoff points suggested for clarithromycin include: ≤ 0.25 µg/mL for susceptible strains, ≥ 1 µg/mL for resistant strains, and 0,5 µg/mL for intermediate strains. These cutoffs have allowed excellent predicting values for the success of triple therapy with a PPI, clarithromycin and amoxicillin. No standardized criteria are available for antibiotics, including amoxicillin, tetracyclines, rifabutin, and levofloxacin. However, agar dilution may be used, and literature-endorsed cutoff points are used (47,68). Metronidazole is special in that most studies have shown an absence of interlab and intralab reproducibility on unknown grounds (2). Absent correlation between *H. pylori* susceptibility and eradicating therapy outcomes should also be counted in. *H. pylori* strains with a high MIC may be eradicated, possibly due to a variable redox potential within the stomach. The cutoff point usually considered to define resistance to metron-

Editorial

idazole is ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. EHSg, at the 3rd Maastricht Consensus Conference, discourages the use of metronidazole susceptibility tests in clinical practice for want of clinico-bacteriological correlation (6).

Genotypical methods are particularly used for the study of clarithromycin resistance, but may also be applied for other antibiotics. Chromosomal mutations responsible for antibiotic resistance may be easily detected with molecular testing based on fluorescent *in situ* hybridation (69) or genomic amplification, mainly using PCR-related techniques (22). The advantages of such molecular tests include a shorter time for results, and an excellent correlation with susceptibility as assessed using phenotypical methods. Their main shortcoming is that they require a molecular microbiology laboratory. The first genotypical method used was RFLP PCR. This test amplifies the region harboring mutations, and synthesized fragments are then treated with restriction endonucleases that recognize specific mutation-generated sites. The size of the resulting fragments indicates the presence or absence of a mutation (22). RFLP PCR is a simple method but uses conventional PCR, which delays results and requires amplicon manipulation because of contamination risks. PCR with subsequent amplified fragment sequencing has been used on gastric bacteria and biopsies to assess resistance to clarithromycin and quinolones. It may also be used for other antibiotics such as amoxicillin. The technique is somewhat complex but automation has allowed its development (22). Lastly, real-time PCR has been successfully used (22,70) to detect any mutations in the amplified region, and represents a relevant advance as results may be obtained within 2 hours. It has been used to directly identify *H. pylori* in biopsy and fecal samples, as well as in cultured bacteria. Real-time PCR for fecal samples has become a promising diagnostic technique as it represents a rapid, non-invasive method allowing direct bacterial identification and an assessment of clarithromycin susceptibility. A higher degree of standardization demands a commercially available kit with high sensitivity and specificity.

The study by Torres Debat et al. included in this issue of the *Spanish Journal of Gastroenterology* (71) is first to inform on the prevalence of *H. pylori* antibiotic resistance in Uruguay, and also investigates the molecular mechanisms of clarithromycin resistance using PCR. The authors research the prevalence of antibiotic resistance using the E-test in two time periods and two adult populations with gastric biopsy cultures positive for *H. pylori*, and diverse ethnic descent. In 2001 they studied 19 patients representative of the general population, and in 2006 they studied 31 patients of African descent. The prevalence of resistance to metronidazole was 36.8 and 35.5%, respectively; to clarithromycin, 0 and 19.4%; to levofloxacin, 5.2 and 3.2%; and to amoxicillin and tetracyclines, 0% for both groups. Of note is the variable prevalence of clarithromycin resistance in these two periods of time and/or population groups. The fact that antibiotic – and specifically clarithromycin – resistance prevalence varies among countries or among regions, social groups, or ethnic groups within one same country is well known. Information available on antibiotic resistance prevalence in African populations or Latin American countries is insufficient. In Mexico, during the years 1995-97, the prevalence reported for clarithromycin resistance was 25% (32); recently, a prevalence of 2% was acknowledged in Paraguay (72). Aboderin, during the period 2002-06 in Nigeria, detected a 100% prevalence of clarithromycin resistance, and that for other antibiotics was also very high (52). Available data are anyway inadequate for drawing conclusions. The prevalence of clarithromycin resistance found in 2006 by Torres Debat et al. in Uruguay is high, and these authors also state that whether this reflects the current

Editorial

status in the general population, with a rapid increase during the last few years, or the current status in a specific Uruguayan ethnic group is uncertain, the latter possibility being potentially supported by the finding of one single mutation at position 2143 in all cases (71). The high prevalence of resistance to metronidazole is similar to that currently seen in some developed rather than – as claimed by the authors – developing countries (39).

As previously stated, it is accepted that triple therapy should not be used to manage *H. pylori* infection when the prevalence of clarithromycin resistance is higher than 15-20%, as in the above study; in such cases other therapeutic alternatives should be considered. It would be desirable to have regularly updated, reliable information on the prevalence of antibiotic resistance in *H. pylori*, specifically regarding clarithromycin, for the various countries, regions or healthcare areas, so that the potentially most effective eradicating regimen could be assessed on an individual basis. The study of antibiotic resistance is particularly necessary when low effectiveness is found regarding triple therapy for *H. pylori* eradication, and in certain patients following the failure of an initial or second eradicating therapy.

M. Castro-Fernández and J. Vargas-Romero¹

Unit of Clinical Management of Digestives Diseases and ¹Clinical Management of Microbiology. CIBERehd. Hospital Universitario de Valme. Sevilla, Spain

REFERENCES

1. Gisbert JP, Pajares R, Pajares JM. Evolution of Helicobacter pylori therapy from a meta-analytical perspective. *Helicobacter* 2007; 12(Supl. 2): 50-8.
2. Lambert, T, Megraud F, Gerbaud G, Courvalin P. Susceptibility of Campylobacter pyloridis to 20 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 510-1.
3. The European Helicobacter pylori Study Group (EHPSG). Current European concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht Consensus Report. *Gut* 1997; 41: 8-13.
4. Monés J, Gisbert JP, Borda F, Domínguez-Muñoz E, y Grupo Conferencia Española de Consenso sobre Helicobacter pylori. Indications, diagnostic test and Helicobacter pylori eradication therapy. Recommendations by the 2nd Spanish Consensus Conference. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 348-74.
5. Gisbert JP, Calvet X, Gomollón F, Monés J, y Grupo Conferencia Española de Consenso sobre Helicobacter pylori. Tratamiento erradicador de Helicobacter pylori. Recomendaciones de la II Conferencia Española de Consenso. *Med Clin (Barc)* 2005; 125: 301-16.
6. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al., The European Helicobacter Study Group (EHSG). Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-81.
7. Caselli M, Zullo A, Maconi G, Parente F, Alvisi V, Casetti T, et al., the Working Group of the Cervia II Meeting. "Cervia II Working Group Report 2006": Guidelines on diagnosis and treatment of Helicobacter pylori infection in Italy. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 782-9.
8. Chey WD, Wong BCY, and the Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of the Helicobacter pylori Infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1808-25.
9. Egan BJ, Marzio L, O'Connor H, O'Morain C. Treatment of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2008; 13(Supl. 1): 35-40.
10. Vakil N, Megraud F. Eradication therapy for Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2007; 133: 985-1001.
11. Graham DY, Lu H, Yamaoka. Therapy for Helicobacter pylori infection can be improved. *Drugs* 2008; 68: 725-36.
12. Boixeda D, Martín de Argila C, Bermejo F, López San Román A, Hernández Ranz F, Gracia Plaza A. seven-day protom pump inhibitor, amoxicillin and clarithromycin triole therapy. Factors that influence Helicobacter pylori eradication success. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 202-5.
13. Calvet X, Ducons J, Bujanda L, Bory F, Montserrat A, Gisbert JP, HP Study Group of the Asociación Española de Gastroenterología. Seven versus ten days of rabeprazole triple therapy for Helicobacter pylori eradication: a multicenter randomized trial. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1696-701.
14. Gisbert JP, González L, Calvet X, García N, López, Roque M, et al. Protom pump inhibitor, clarithromycin an either amoxycillin or nitrimidazole. A meta-analysis of eradication of Helicobacter pylori. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1319-28.

Editorial

15. Antos D, Schneider-Brachert W, Bästlein E, Hänel C, Haferland C, Buchner M, et al. 7-day triple therapy of *Helicobacter pylori* infection with levofloxacin, amoxicillin, and high-dose esomeprazole in patients with known antimicrobial sensitivity. *Helicobacter* 2006; 11: 39-45.
16. Nista E, Candelli M, Zocco MA, Cremonini F, Ojetti V, Finizio R, et al. Levofloxacin-based triple therapy in first-line treatment for *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1985-90.
17. Gisbert JP, Fernández-Bermejo M, Molina-Infante M, Pérez-Gallardo B, Prieto-Bermejo AB, Mateos-Rodríguez JM, et al. Levofloxacin, amoxicillin, and omeprazole as first-line triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43(4): 384-5.
18. Castro-Fernández M, Lamas E, Pérez-Pastor A, Pabón M, Aparcero R, Vargas-Romero J et al. Efficacy of triple therapy with a proton pump inhibitor, levofloxacin, and amoxicillin as first-line treatment to eradicate *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig* 2009; 101: 395-402.
19. Sánchez Delgado J, Calvet X, Bujanda L, Gisbert JP, Titó L, Castro M. Ten-day sequential treatment for *Helicobacter pylori* eradication in clinical practice. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2220-3.
20. Pajares García JM, Pajares-Villarroya R, Gisbert JP. *Helicobacter pylori* infection: antibiotic resistance. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 63-70.
21. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-84.
22. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 280-322.
23. Debets-Ossenkopp YJ, Herscheid A, Pot RGJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 511-5.
24. Wolle K, Leodolter A, Malfertheimer P, König W. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. *J Med Microbiol* 2002; 51: 705-9.
25. Megraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E, O'Morain C, Spiller R, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicentre trial: the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2747-52.
26. Cuchí Burgos E, Forné Bardera M, Quintana Riera S, Lite Lite J, Garau Alemany J. Evolution of the sensitivity of 235 strains of *Helicobacter pylori* from 1995 to 1998 and impact of antibiotic treatment. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 157-60.
27. Cabrita J, Oleastro M, Matos R, Mantente A, Cabral J, Barros R, et al. Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999). *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 1029-31.
28. Toracchio S, Marzio L. Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated in central Italy during the years 1998-2002. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 541-5.
29. Pilotto A, Rassa M, Leandro G, Franceschi M, Di Mario F. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Northeast Italy: a multicentre study. *GISU Interdisciplinary Group for the Study of Ulcer. Dig Liver Dis* 2000; 32: 763-8.
30. Laine L, Fennerty MB, Osato M, Sugg J, Suchower L, Probst P, et al. Esomeprazole-based *Helicobacter pylori* eradication therapy and the effect of antibiotic resistance: results of three US multicentre, double-blind trials. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3393-8.
31. Osato MS, Reddy R, Reddy SG, Penland RL, Malaty HM, Graham DY, et al. Pattern of primary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole or clarithromycin in the United States. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1217-20.
32. Torres J, Camorlinga-Ponce M, Pérez-Pérez G, Madrazo-de la Garza A, Dehesa M, González-Valencia G, et al. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2677-80.
33. Prazeres Magalhaes P, de Magalhaes Queiroz DM, Campos Barbosa DV, Aguilar Rocha G, Nogueira Mendes E, Santos A, et al. *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2021-3.
34. Perez Aldana L, Kato M, Nakagawa S, Kawarasaki M, Nagasako T, Mizushima T, et al. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance. *Helicobacter* 2002; 7: 306-9.
35. Kato M, Yamaoka Y, Kim JJ, Reddy R, Asaka M, Kashima K, et al. Regional differences in metronidazole resistance and increasing clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2214-6.
36. Kim JJ, Reddy R, Lee M, Kim JM, Osato MS, Graham DY, et al. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 459-61.
37. Eun CS, Han DS, Park JY, Jeon YC, Hahm JS, Kim KS, et al. Changing pattern of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korean patients with peptic ulcer diseases. *J Gastroenterol* 2003; 38: 436-41.
38. Meyer JM, Silliman NP, Wang W, Siepmann NY, Suggs JE, Morris D, et al. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) STUDY, 1993-1999. *Ann Intern Med* 2002; 136: 13-24.
39. Glupczynski Y, Megraud F, López-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 820-3.
40. Koletzko S, Richey F, Bontems P, Crome J, Kalach N, Monteiro ML, et al. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. *Gut* 2006; 55: 1711-6.
41. Rojas Feria M, Suárez Barrenechea AI, Conejo Gonzalo C, Hergueta Delgado P, Romero Castro R, Herreras Gutiérrez JM. Resistance of *Helicobacter pylori* to antimicrobial treatment in a Seville hospital catchment area. *Rev Esp Enferm Dig* 2000; 92: 793-8.
42. Toro C, García-Samaniego J, Carbó J, Iñiguez A, Alarcón T, López-Brea M, et al. Prevalence of primary He-

Editorial

- licobacter pylori resistance to eight antimicrobial agents in a hospital in Madrid. *Rev Esp Quimioter* 2001; 14: 172-6.
43. Ferrero M, Ducóns JA, Sicilia B, Santolaria S, Sierra E, Gomollón F. Factors affecting the variation in antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* over a 3-year period. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: 245-8.
 44. Gomollón F, Santolaria S, Sicilia B, Ferrero M, Revillo MJ, Ducóns J, et al. Resistencia de *Helicobacter pylori* al metronidazol y a la claritromicina: análisis descriptivo entre 1997 y 2000. *Med Clin (Barc)* 2004; 123: 481-5.
 45. García Díaz E, Romero Gómez M, Vargas J, Guil A, Bernal S, Castro M. Prevalence and clinical significance of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig* 2000; 92: 656-60.
 46. Zullo A, Perna F, Hassan C, Ricci C, Saracino I, Morini S, et al. Primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated in northern and central Italy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 1429-34.
 47. Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Davidkov L, Kamburov V, Jelev C, et al. Prevalence and evolution of *Helicobacter pylori* resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 409-15.
 48. Chisholm SA, Teare EL, Davies K, Owen RJ. Surveillance of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* at centres in England and Wales over a six-year period (2000-2005). *Eur Surveill* 2007; 12: E3-4.
 49. Bang SY, Han DS, Eun CS, Kim JE, Ahn SB, Sohn JH, et al. Changing patterns of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer disease. *Korean J Gastroenterol* 2007; 50: 356-62.
 50. Kobayashi I, Murakami K, Kato M, Kato S, Azuma T, Takahashi S, et al. Changing antimicrobial susceptibility epidemiology of *Helicobacter pylori* strains in Japan between 2002 and 2005. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 4006-10.
 51. Storskrubb T, Aro P, Ronkainen J, Wreiber KK, Nyhlin H, Bolling-Sternevald E, et al. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains in a random adult Swedish population. *Helicobacter* 2006; 11: 224-30.
 52. Aboderin OA, Abdu AR, Odetoyin B, Oneke IN, Lawal OO, Ndububa DA, et al. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* from patients in Ife-Ife, South-west, Nigeria. *Afr Health Sci* 2007; 7: 143-7.
 53. Agudo S, Alarcón T, Cibrelus L, Urruzuno P, Martínez MJ, López-Brea M. High percentage of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* isolates obtained from Spanish children. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22: 88-92.
 54. Kalach N, Serhal L, Asmar E, Campeotto F, Bergeret M, Dehecq E, et al. *Helicobacter pylori* primary resistant strains over 11 years in French children. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 217-22.
 55. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 343-57.
 56. Graham DY, Lu H, Yamaoka Y. A report to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter* 2007; 12: 275-8.
 57. Gerrits MM, Van Vliet AHM, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 699-709.
 58. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffy MV, Beyer J, Flamm RK, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 477-80.
 59. Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bebear CM, Lamouliatte H, Megraud F. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2724-8.
 60. Trieber CA, Taylor DE. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol* 2002; 184: 2131-40.
 61. Dailidienė D, Bertoli MT, Miciulevičienė J, Mukhopadhyay AK, Dailidė G, Pascasio MA, et al. Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3940-6.
 62. Li Y, Dannelly HK. Inactivation of the putative tetracycline resistance gene HP1165 in *Helicobacter pylori* led to loss of inducible tetracycline resistance. *Arch Microbiol* 2006; 185: 255-62.
 63. Bogaerts P, Berhin C, Nizet H, Glupczynski Y. Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter* 2006; 11: 441-5.
 64. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement M100-S19. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, January 2009; 29: 91.
 65. Glupczynski Y, Broutet N, Cantagrel A, Andersen LP, Alarcón T, Lopez Brea M, et al. Comparison of the E test and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 549-52.
 66. Sisto F, Maddalena M, Russello G, Bonomi A, Dubini F. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* determined by microdilution method using a new medium. *Curr Microbiol* 2009; 58: 559-63.
 67. Grignon B, Tankovic J, Megraud F, Glupczynski Y, Husson MO, Conroy MC, et al. Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Microb Drug Resist* 2002; 8: 61-6.
 68. Wu H, Shi XD, Wang HT, Liu JX. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxicillin. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 121-3.
 69. Vega AE, Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in frozen gastric biopsies from pediatric patients by a commercially available fluorescent in situ hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59(4): 421-3.
 70. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 397-402.
 71. Torres Debat ME, Pérez Pérez G, Olivares A, Fernández L, Raisler K, Gonzalez N, et al. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* and mechanisms of clarithromycin resistance in strains isolated from patients in Uruguay. *Rev Esp Enferm Dig* 2009; 101: 757-62.
 72. Fariña N, Kasamatsu E, Samudio M, Morán M, Sanabria R, Laspina F. Antimicrobial susceptibility of *H. pylori* strains obtained from Paraguayan patients. *Rev Med Chil* 2007; 135: 1009-14.

Editorial

Infección por *Helicobacter pylori*. Prevalencia, investigación y repercusión de la resistencia antibiótica

La resistencia a los antibióticos es probablemente la principal causa del fracaso del tratamiento de las enfermedades infecciosas y, en concreto, de la infección por *Helicobacter pylori*. Desde el descubrimiento de la gran trascendencia de la infección por *H. pylori* en la patogenia de la enfermedad péptica gastroduodenal y de las neoplasias gástricas se ha investigado la eficacia en su tratamiento de numerosos antibióticos y esquemas terapéuticos (1). *H. pylori* es intrínsecamente resistente a glucopéptidos, cefsulodin, polimixinas, ácido nalidíxico, trimetoprim, sulfonamidas, nistatina, anfotericina B, y cicloheximida, mientras que las cepas salvajes son susceptibles a β -lactámicos (excepto cefsulodin), fosfomicina, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, rifampicina, fluoroquinolonas, 5-nitroimidazoles y nitrofuranos (2). La denominada cuádruple terapia, asociando un inhibidor de la bomba de protones (IBP), bismuto, tetraciclinas y metronidazol y, especialmente, la triple terapia, asociando un IBP, con claritromicina y amoxicilina o metronidazol, son los tratamientos que han tenido mayor aceptación y sobre los que se tiene mayor experiencia. El *European Helicobacter Study Group* (EHSg), publicó en 1997 las conclusiones de la 1ª Conferencia de Consenso de Maastricht y recomendó la triple terapia como tratamiento de primera elección de la infección por *H. pylori*, reservándose la cuádruple terapia para los posibles fallos del primer tratamiento (3). La triple terapia se ha mantenido como el tratamiento de primera elección en la última década, siendo recomendado por la mayoría de las reuniones de consenso y asociaciones científicas europeas y americanas (4-8). La eficacia inicial de este tratamiento, aproximadamente del 80-90%, ha disminuido de forma progresiva y en los últimos años es inferior al 80-70%, planteándose nuevos esquemas terapéuticos (9-19). Se considera que la resistencia adquirida a los antibióticos habitualmente utilizados, especialmente a la claritromicina y metronidazol, es la principal causa del fracaso del tratamiento, debiéndose admitir otras causas como son el incumplimiento terapéutico o la indicación de tratamientos con dosis o duración inadecuadas (20-22).

Prevalencia de la resistencia antibiótica de *H. pylori*

Durante los años 1999-2003 se publicaron numerosos estudios sobre la prevalencia de la resistencia antibiótica primaria de *H. pylori*, observándose variaciones significativas entre distintos países e incluso entre distintas regiones o grupos étnicos de un mismo país. En Europa se comunicó una prevalencia baja de resistencia a la claritromicina en Holanda, en Alemania y en Suecia (1,7-2,9%), y más elevada en España, Francia y Portugal (12-22%) (22-27). Es destacable que en el norte de Italia era del 1,8% y en el centro de Italia del 23,4% (28,29). En Estados Unidos era del 10-12%, en México del 25%, en Brasil del 9,8%, en Japón del 11-13% y en Korea

Editorial

del 5-6% (30-37). La prevalencia de la resistencia al metronidazol era del 15-40% en Europa, del 20-35% en Estados Unidos, del 76% en México, del 53% en Brasil, del 9-12% en Japón y del 40% en Korea, mientras que para la amoxicilina y tetraciclinas era inferior al 1% (22-37). En Estados Unidos mediante un meta-análisis de 20 ensayos clínicos se constata un incremento de la prevalencia de resistencia a la claritromicina, desde un 4,9% en 1993-95 a un 10,1% en 1995-99 (38). En un estudio multicéntrico realizado en Europa durante 1998, con la participación de 22 países y con una metodología homogénea, se observó una prevalencia de resistencia primaria a la claritromicina del 9,9%, al metronidazol del 33,1%, y a la amoxicilina del 0,8%. La resistencia a la claritromicina era más habitual en niños que en adultos y en países del sur (18%) que en países del centro (9,3%) y del norte de Europa (4,2%). La resistencia simultánea a claritromicina y metronidazol era también más frecuente en países del sur de Europa (39).

Durante los años 1999-2002 se realizó un estudio multicéntrico europeo con participación de 14 países para estudiar la resistencia a los antibióticos de *H. pylori* en la población pediátrica. Se detectó una prevalencia de resistencia primaria a la claritromicina del 20%, siendo superior en niños de menor edad (< 6 vs. > 12 años), y residentes en el sur de Europa, siendo para el metronidazol del 23%, simultánea para claritromicina y metronidazol del 5,3% y para la amoxicilina del 0,6% (40).

En España durante los años 1999-2004 se publicaron varios estudios sobre la resistencia antibiótica primaria de *H. pylori* y se observó que la prevalencia de la resistencia a claritromicina oscilaba entre el 8,7 y el 13% y a metronidazol entre el 13,8 y el 42% (26,41-44). En Sevilla, en nuestra área sanitaria, durante los años 1996-8, observamos una prevalencia para la claritromicina del 10% y para el metronidazol del 28,6%, acordes con los datos previamente referidos (45).

En publicaciones más recientes (2006-09) se muestra que, en la última década, hay en unos casos estabilidad y en otros casos incremento de la resistencia primaria a la claritromicina que justificarían el descenso progresivo de la efectividad de la triple terapia. Zullo y cols., en Italia durante 2004-06, detectan una prevalencia de resistencia primaria a claritromicina del 16,9%, siendo más frecuente en pacientes con dispepsia no ulcerosa (19,1%) (46). Boyanova y cols., en Bulgaria, observan una prevalencia de resistencia primaria a la claritromicina del 10% durante los años 1996-99 y del 17,9% durante los años 2005-07 (47), observándose este incremento también en otros estudios procedentes de Gran Bretaña, Korea y Japón (48-50). Storskurubb y cols., en Suecia, observan una baja prevalencia de resistencia primaria a la claritromicina (1,5%) y al metronidazol (16,2%), que relacionan con un bajo consumo de estos fármacos por una política antibiótica restrictiva (51). Aboderin y cols. comunican la situación contraria en Nigeria al detectar en 32 casos estudiados una resistencia a la claritromicina, ampicilina y metronidazol del 100%, relacionándolo con el consumo incontrolado de estos antibióticos (52). Agudo y cols., en Madrid (España) durante los años 2002-06, detectan en niños una elevada resistencia primaria y secundaria a la claritromicina (49,2 y 70,6%), superior a la observada para el metronidazol (32,8 y 41,2%) y una doble resistencia a claritromicina y metronidazol, primaria y secundaria, en el 15,4 y 26,5% de los casos respectivamente, resaltando los autores el gran efecto negativo de esta alta prevalencia en la eficacia de la triple terapia en la erradicación de *H. pylori* (53). Kalach, en Francia durante los años 1999-2005, detectan también en niños una prevalencia de resistencia primaria a la claritromicina elevada (23,2%), aunque menor que en España, que se mantenía estable respecto a la observada en los años 1994-98 (22,1%) (54). La resistencia a los antibióticos y su negativa influencia en la efectividad de los trata-

Editorial

mientos erradicadores de *H. pylori* constituyó un tema de máxima relevancia en la III Conferencia de Consenso de Maastrich (6). Se admite el incremento de la resistencia a la claritromicina, en relación a su mayor consumo y se recomienda la triple terapia con un IBP, amoxicilina o metronidazol y claritromicina en poblaciones con una prevalencia de resistencia a este antibiótico menor del 15-20%, no debiendo ser utilizada la claritromicina en la situación contraria. La cuádruple terapia con un IBP, bismuto, tetraciclinas y metronidazol podría ser una alternativa a la triple terapia como tratamiento de primera elección. La repercusión sobre la efectividad de la triple terapia es mayor en los casos de resistencia a claritromicina que en los casos de resistencia metronidazol (21,55). En la revisión realizada por Megraud, publicada en 2004 (21), se observa que la eficacia de la triple terapia con un IBP, amoxicilina y claritromicina disminuye desde un 87,8 a un 18,3%, según exista sensibilidad o resistencia a este último antibiótico, con una pérdida de eficacia de prácticamente el 70%. En el mismo estudio se observa que la eficacia de la triple terapia con un IBP, amoxicilina y metronidazol, según exista sensibilidad o resistencia a este último antibiótico, disminuye desde un 89,4 a un 64,4%, con una pérdida de eficacia de un 25%, y que la eficacia de la triple terapia con un IBP, claritromicina y metronidazol disminuye desde un 97, a un 0%, según exista sensibilidad o resistencia a ambos antibióticos, siendo la eficacia del 72,6% en casos de sensibilidad a claritromicina y resistencia a metronidazol y del 50% en la situación contraria. Se considera que un tratamiento para la infección por *H. pylori* debe recomendarse cuando presenta una eficacia superior al 80% por intención de tratar y superior al 85% por protocolo (3,11,56). La eficacia actual de la triple terapia, como tratamiento de primera elección es habitualmente inferior al 80% y en algunos estudios inferior al 70% (9-12), no siendo por tanto una opción terapéutica recomendable.

Mecanismos de resistencia antibiótica de *H. pylori*

Las evidencias indican que los mecanismos de resistencia antimicrobiana en *H. pylori* son esencialmente debidos a mutaciones cromosómicas (22,57), que son adquiridas fundamentalmente por transmisión desde un microorganismo a otro en forma vertical. Las mutaciones cromosómicas aparecerán en la descendencia y, como consecuencia, se producirá un progresivo incremento de la prevalencia de la resistencia antimicrobiana. La transferencia horizontal genética de una cepa bacteriana resistente a una susceptible, presentes simultáneamente en el estómago, no puede ser excluida.

La claritromicina es un antibiótico bacteriostático, derivado semisintético de la eritromicina, pertenece al grupo de los macrólidos y es el fármaco más potente frente a *H. pylori*. Actúa a nivel de los ribosomas bloqueando la síntesis proteica bacteriana. La resistencia a la claritromicina es el resultado de mutaciones puntuales que se presentan en el gen 23S rRNA que modifican la estructura de los ribosomas, afectando a su unión con el antibiótico. Las mutaciones más frecuentes son la sustitución de la adenina por una citosina o guanina en la posición 2142 (A2142C, A2142G) o por una guanina en la posición 2143 (A2143G) y menos frecuentemente A2115G y G2141A. Estas mutaciones provocan que las cepas resistentes toleren concentraciones crecientes del antibiótico que van desde 1 hasta 64 µg/ml (58,59).

La amoxicilina es un antibiótico bactericida que inhibe la síntesis de la pared bacteriana. La prevalencia de resistencia de *H. pylori* a la amoxicilina es muy baja y para que este antibiótico cumpla su función es necesaria la presencia de las proteí-

Editorial

nas de unión a penicilina (PBP, del inglés *penicillin binding proteins*). El mecanismo de resistencia creado por *H. pylori* consiste en mutaciones en el gen *pbp* que dan origen a la síntesis de PBP alteradas, que tienen menor afinidad con el antibiótico. En las cepas resistentes no se forma el complejo amoxicilina-PBP y se evita la acción bactericida del antibiótico (57).

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos que actúan a nivel de los ribosomas bloqueando la síntesis proteica bacteriana. La prevalencia de resistencia a las tetraciclinas de *H. pylori* es muy baja, y se adquiere por mutaciones en el gen 16S rRNA, fundamentalmente en el triplete de bases adenina, guanina y adenina de las posiciones 926 a la 928 (AGA 926-928), pudiéndose producir simples, dobles o hasta triples sustituciones. La triple sustitución de las bases AGA926-928 por timina, timina y citosina, respectivamente (AGA926-928 → TTC), en el gen 16S rRNA permite que las cepas toleren concentraciones del antibiótico de hasta 64 µg/ml, las dobles mutaciones permiten tolerar concentraciones de hasta 8 µg/ml y la simple sustitución de una de estas bases permite tolerar concentraciones de 2 µg/ml (60,61). En los últimos años se ha debatido la existencia de otros posibles mecanismos de resistencia, bien por la acción de la proteína de eflujo TetA (62) o por la existencia de un mecanismo de reducción de la permeabilidad de la membrana.

El metronidazol es un antibiótico bactericida, perteneciente al grupo de los nitroimidazoles, que ha sido muy utilizado en el tratamiento de diversas infecciones, de forma indiscriminada, condicionando que la prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a este antibiótico sea elevada. Los nitroimidazoles, al penetrar en las células diana, son activados por un proceso de reducción mediado por la enzima NADPH nitrorreductasa, ocasionando daño al ADN y estructuras bacterianas. Los mecanismos de resistencia conocidos radican en mutaciones en los genes *rdxA* y *frxA* que impedirían el proceso de activación celular de los nitroimidazoles.

Levofloxacin y ciprofloxacino son antibióticos bactericidas, pertenecientes al grupo de las quinolonas, con mecanismo de acción similar que consiste en bloquear la replicación del ADN bacteriano por su unión con la enzima ADN girasa, codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*. La resistencia de *H. pylori* a estos antibióticos está condicionada por mutaciones en el QRDR (*quinolone resistance-determining region*) del *gyrA* (63).

Métodos estudio de sensibilidad antibiótica de *H. pylori*

Disponemos de diversos métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica de *H. pylori* que pueden clasificarse en métodos fenotípicos, más utilizados y basados en el cultivo de biopsias gástricas, como son la dilución en agar y el E-test (método del epsilómetro), y métodos genotípicos como la hibridación fluorescente *in situ*, la PCR (*polymerase chain reaction*) convencional y con secuenciación, la PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) y la PCR en tiempo-real, que permite detectar las mutaciones cromosómicas directamente en las biopsias gástricas y en heces. El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), anteriormente *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) recomienda el método de dilución en agar como el método de referencia o *gold standard* para el estudio de la sensibilidad de *H. pylori* a los antibióticos y, en concreto, para el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y establece puntos de corte para la claritromicina (64). La *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) recomienda, en cambio, la difusión con E-test que presenta muy buena correlación con

Editorial

el método de dilución en agar. El E-test tiene la ventaja de ser un método cuantitativo con una expresión directa de las CMI, y además, se adapta a las bacterias de crecimiento lento, como *H. pylori* (65). Otros métodos de estudio disponibles son la dilución en caldo y la difusión en disco (66,67). Los puntos de corte propuestos para la claritromicina son: para las cepas sensibles de $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$, para las cepas resistentes de ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ y para las cepas intermedias de $0,5$ $\mu\text{g/ml}$. Con estos puntos de corte se han obtenido excelentes valores predictivos en el éxito de la triple terapia con un IBP, claritromicina y amoxicilina. No existen criterios estandarizados para otros antibióticos como la amoxicilina, tetraciclinas, rifabutina y levofloxacino. Sin embargo, la dilución en agar puede ser aplicada y, se utilizan puntos de corte aceptados por la bibliografía (47,68). El metronidazol es un caso especial porque la mayoría de los estudios han demostrado una ausencia de reproducibilidad inter- e intralaboratorio, sin conocerse bien los motivos (2). La falta de correlación entre los resultados de sensibilidad de *H. pylori* y el resultado del tratamiento erradicador es también un hecho. Las cepas de *H. pylori* con una CMI alta pueden ser erradicadas, debido posiblemente a un potencial redox variable dentro del estómago. El punto de corte utilizado habitualmente para definir la resistencia a metronidazol es ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$. El EHS en la III Conferencia de Consenso de Maastrich desaconseja, por la falta de correlación clínico-bacteriológica, el uso en práctica clínica de pruebas de sensibilidad a metronidazol (6).

Los métodos genotípicos son utilizados sobre todo para estudiar la resistencia a la claritromicina, aunque también pueden ser empleados para otros antibióticos. Las mutaciones cromosómicas, responsables de la resistencia antibiótica, pueden ser fácilmente detectadas con pruebas moleculares basadas en la hibridación fluorescente *in situ* (69) o en la amplificación genómica sobre todo con técnicas de PCR (22). La ventaja de estas pruebas moleculares es el menor tiempo para la obtención de resultados y la excelente correlación con la sensibilidad obtenida por métodos fenotípicos. La principal desventaja es que se requiere disponibilidad de un laboratorio de microbiología molecular. El primer método genotípico utilizado fue la PCR-RFLP. En este ensayo, se amplifica la región que contiene las mutaciones y luego los fragmentos sintetizados son tratados con endonucleasas de restricción que reconocen sitios específicos creados por las mutaciones. El tamaño de los fragmentos resultantes indica la presencia o ausencia de la mutación (22). La PCR-RFLP es un método simple, pero tiene la desventaja de utilizar una PCR convencional, respecto a la demora en la obtención de resultados y la necesidad de manipular los amplicones obtenidos, por el riesgo de contaminaciones. El método de PCR y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados ha sido utilizado sobre bacterias y biopsias gástricas para la resistencia a claritromicina y quinolonas. Pero puede ser aplicado para otros antibióticos como amoxicilina. Es una tecnología algo compleja, aunque la automatización ha permitido su desarrollo (22). Por último se ha utilizado con éxito la PCR en tiempo-real (22,70) que permite detectar cualquier tipo de mutación en la región amplificada y el método representa un progreso importante, porque el resultado puede ser obtenido en 2 horas. Ha sido utilizada para detectar *H. pylori* directamente en muestras de biopsia y heces, así como en bacterias cultivadas. La PCR en tiempo-real en heces se ha convertido en una de las técnicas diagnósticas más prometedoras porque es un método rápido, no invasivo, que permite una detección directa de la bacteria y valorar la sensibilidad a la claritromicina. Un mayor grado de normalización o estandarización de esta técnica debe terminar con la disponibilidad de un kit comercial con buena sensibilidad y especificidad.

Editorial

En el estudio de Torres Debat y cols., incluido en este número de la *Revista Española de Enfermedades Digestivas* (71), se aporta por primera vez información sobre la prevalencia de resistencia antibiótica de *H. pylori* en Uruguay y asimismo se investigan, mediante PCR, los mecanismos moleculares de resistencia a la claritromicina. Los autores investigan la prevalencia de resistencia a los antibióticos, mediante E-test, en dos periodos de tiempo y en dos poblaciones de edad adulta, con cultivo de biopsia gástrica positivo para *H. pylori*, y distintas en sus orígenes étnicos. En el año 2001 se estudian 19 pacientes representativos de la población general y en el año 2006 se estudian 31 pacientes descendientes de africanos. La prevalencia de resistencia a metronidazol resultó respectivamente del 36,8 y 35,5%, a claritromicina del 0 y 19,4%, a levofloxacino del 5,2 y 3,2%, y a la amoxicilina y tetraciclinas del 0%, en ambos grupos. Es destacable la variable prevalencia a la claritromicina en los dos periodos de tiempo y/o en los dos grupos de población estudiados. Es conocido que la prevalencia de resistencia a los antibióticos, y en concreto a la claritromicina, varía entre distintos países y, en un determinado país, entre distintas regiones, grupos sociales o grupos étnicos. No disponemos de suficiente información sobre prevalencia de resistencia a los antibióticos en poblaciones de origen africano o en países latino-americanos. En México, durante los años 1995-97, se comunicó una prevalencia de resistencia a la claritromicina del 25% (32) y recientemente en Paraguay se detectó una prevalencia de resistencia a este antibiótico del 2% (72). Aboderin, durante los años 2002-06 en Nigeria, detectó una prevalencia de resistencia a la claritromicina del 100%, siendo también muy elevada para otros antibióticos (52). Los datos existentes son, en cualquier caso, insuficientes para obtener conclusiones. La prevalencia de resistencia a la claritromicina durante el año 2006 aportada en el estudio de Torres Debat y cols. en Uruguay es alta y, como también opinan los autores, no se puede aclarar si refleja la situación actual de la población general, con un rápido incremento en los últimos años, o como puede sospecharse refleja la situación actual de un determinado grupo étnico de Uruguay, siendo esto último posiblemente apoyado por la detección en todos los casos de una única mutación genética en la posición 2143 (71). La elevada prevalencia de resistencia a metronidazol es más bien similar a la observada actualmente en algunos países desarrollados y no, como refieren los autores, similar a la existente en países en vías de desarrollo (39).

Se admite, como se ha comentado previamente, que con una prevalencia de resistencia a la claritromicina mayor al 15-20%, presente en el estudio que comentamos y en otros previamente referidos, no debería utilizarse la triple terapia, incluyendo este antibiótico de forma empírica en el tratamiento de la infección por *H. pylori*, debiéndose considerar otras alternativas terapéuticas. Sería deseable poder disponer de una información fiable y actualizada periódicamente sobre la prevalencia de las resistencias antibióticas de *H. pylori*, en concreto a la claritromicina, en los distintos países, regiones o áreas sanitarias, pudiéndose valorar en cada caso el tratamiento erradicador potencialmente más efectivo. La investigación de la resistencia antibiótica es especialmente necesaria cuando detectemos una baja efectividad de la triple terapia en la erradicación de *H. pylori* y, en pacientes concretos, tras fracaso del primer y, sobre todo, segundo tratamiento erradicador.

M. Castro Fernández y J. Vargas Romero¹

Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Digestivas y ¹Unidad de Gestión Clínica de Microbiología. CIBERehd. Hospital Universitario de Valme. Sevilla