

20  
21



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA



"ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA  
DE CEPAS DE H.pylori EN NIÑOS Y ADULTOS CON  
ENFERMEDAD ACIDO PEPTICA UTILIZANDO  
PRUEBA DE SENSIBILIDAD E TEST"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

ESAUUL MONZON BAUTISTA

DIRECTOR DE TESIS: M en C. GERARDO GONZALEZ VALENCIA

ASESOR DE TESIS : ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ

MEXICO D.F.

MARZO DE 1999.

277981



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

26  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA.

“ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE  
*Helicobacter pylori* EN NIÑOS Y ADULTOS CON ENFERMEDAD ACIDO PEPTICA UTILIZANDO  
PRUEBA DE SENSIBILIDAD E TEST.”

TESIS ELABORADA  
POR:  
MONZON BAUTISTA ESAUL

PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

DIRECTOR: GERARDO GONZALEZ VALENCIA

ASESOR: ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ

MEXICO D.F. MARZO DE 1999.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DEDICATORIAS :

Con mucho cariño , admiración y respeto a mis padres :

José Monzón y Celia Bautista

A quienes les estaré siempre agradecido por impulsarme hacia la superación .

A mis hermanos :

Rebeca, Elizabeth , Esthela , Natividad é Ignacio.

Que en todo momento han estado cerca de mi brindandome su apoyo .

A todo el personal del laboratorio de Bacteriología de la UIMEIP que colaboró en la realización de este trabajo.

Agradecimientos:

M. en C. Gerardo González Valencia.

Dr Javier Torres L.

Margarita Camorlinga P.

Por su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

Q.F.B. Roberto Cruz González Melendez.

Por su comprensión y consejos para llevar a buen termino este trabajo

## INDICE:

INTRODUCCION-----	5
FUNDAMENTACION TEORICA-----	6
ANTECEDENTES HISTORICOS-----	9
CLASIFICACION-----	10
MORFOLOGIA-----	11
CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS-----	13
ASOCIACION DE <i>H.pylori</i> EN PATOLOGIAS	
GASTRODUODENALES-----	15
PATOGENESIS-----	16
MECANISMO DE PATOGENICIDAD-----	18
EPIDEMIOLOGIA-----	19
DIAGNOSTICO-----	21
TRATAMIENTO-----	28
PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD-----	31
JUSTIFICACION TEORICA-----	39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	39
OBJETIVOS-----	40
HIPOTESIS-----	40
PROGRAMA DE TRABAJO-----	41
MATERIAL-----	43
EQUIPO-----	44

<b>REACTIVOS</b>	<b>45</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>47</b>
<b>DIAGRAMA DE FLUJO</b>	<b>48</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>ANALISIS DE RESULTADOS</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO</b>	<b>60</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>62</b>

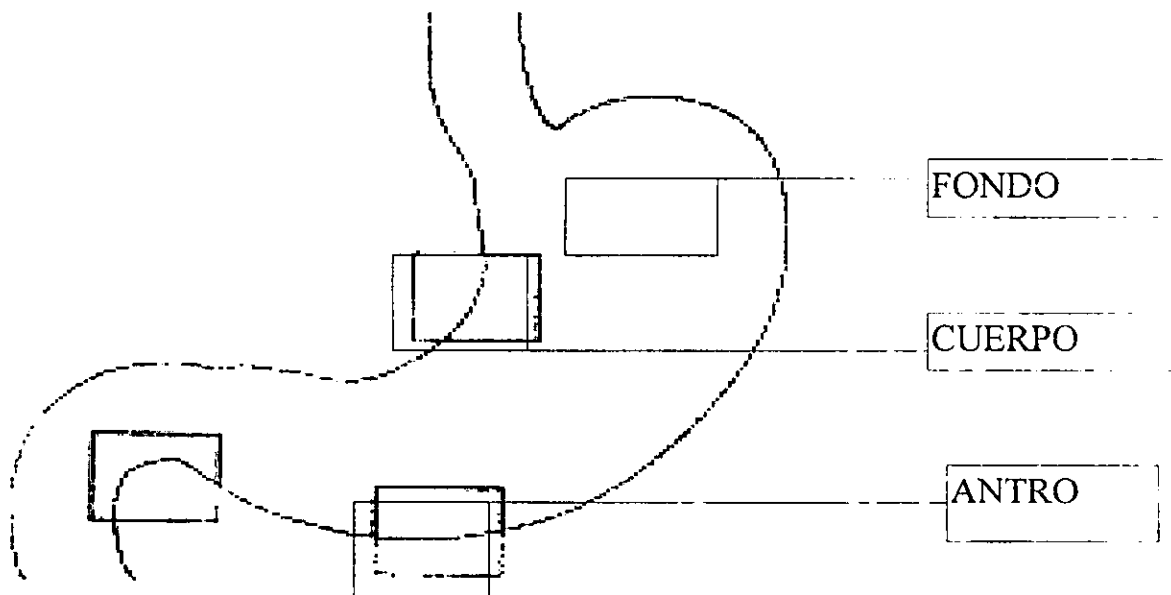
## INTRODUCCION:

Ante el incremento de la incidencia de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) en problemas ácido pépticos se ha hecho necesario el estudio de sensibilidad antimicrobiana a los antibióticos recomendados en la triple terapia (metronidazol, amoxicilina y claritromicina) en la erradicación de ésta bacteria en estudio. Se consiguió el aislamiento de 160 cepas de las cuales 120 pertenecían a pacientes adultos y el resto a niños. El aislamiento se llevo a cabo a partir de biopsias de antro y cuerpo de el estomago por medio de cultivo en agar sangre de caballo al 10% con y sin mezcla de antibióticos. Una vez identificadas las cepas por pruebas de ureasa, catalasa y oxidasa, se realizo prueba de sensibilidad mediante la prueba "E TEST" a los antibióticos recomendados en la triple terapia (metronidazol, amoxicilina y claritromicina). La resistencia a metronidazol fue superior al 50% en cepas de niños y adultos. El porcentaje de resistencia a claritromicina fue el mismo en niños y adultos. Se encontraron cepas resistentes a amoxicilina superando en 20%. Se encontraron cepas resistentes a mas de 2 antibióticos, 5% para cepas de niños y 10% para cepas de adultos. Se encontró una combinación de antibióticos (amoxicilina y claritromicina) con menor resistencia. La zona del estomago en donde se localizo un mayor patrón de resistencia fue en el cuerpo para las cepas de adultos y el antro para las cepas de niños.

## FUNDAMENTACION TEORICA :

El estómago esta situado en la porción superior de la cavidad abdominal, debajo del hígado y del diafragma y aproximadamente cinco sextas partes de la masa gástrica están a la izquierda de la línea media. Dicho de otra manera se considera que está situado en el epigástro y el hipocóndrio izquierdo. Sin embargo, esta posición se modifica con frecuencia.

DIVISIONES: Las tres divisiones del estómago son fondo, cuerpo y piloro. El fondo es la porción agrandada a la izquierda y por arriba de la desembocadura del esófago en el estómago<sup>(1,61,62)</sup>. El cuerpo es la porción central y el piloro la porción inferior, tales divisiones se observan en la siguiente figura:





## GLANDULAS :

En ciertas fosas de la mucosa gástrica están embebidas numerosas glándulas tubulares microscópicas, particularmente en el fondo y en el cuerpo del estómago. Las glándulas secretan casi todo el jugo gástrico, líquido compuesto por moco, enzima y ácido clorhídrico. Las células epiteliales que constituyen la superficie de la mucosa gástrica (cerca de la luz del estómago) secretan moco. Las células principales (células zimógenas) secretan las enzima del jugo gástrico. Las células parietales secretan ácido clorhídrico y se cree que también producen la misteriosa proteína llamada factor intrínseco (61,62).

## FUNCIONES:

- 1.- Actúa como reservorio al almacenar los alimentos hasta que pueden ser digeridos parcialmente y continuar por el aparato gastrointestinal.
- 2.- Secreta jugo gástrico, uno de los jugos cuyas enzima digieren los alimentos.
- 3.- Por contracciones de la túnica muscular, produce movimientos de batido o mezcla de los alimentos disgregándolos en partículas pequeñas y mezclándolos con el jugo gástrico. En el momento adecuado el contenido gástrico pasa por contracción de ésta víscera hasta el duodeno.
- 4.- Secreta el factor intrínseco.
- 5.- Absorbe en cierta medida agua, alcohol y algunos fármacos.
- 6.- Produce la hormona llamada gastrina en las células ubicadas en la región pilórica(61,62).

## BIOLOGIA DE LA SECRECIÓN ACIDA :

Sitio de la secreción ácida : La célula parietal de la mucosa gástrica tiene como función producir HCl a una concentración de 160 mM, es decir a un pH de 0.8. Dado que el ácido solamente se requiere durante el periodo digestivo , existe un sistema de regulación altamente sofisticado para lograr el control apropiado de la secreción ácida . Este sistema incluye interacciones entre la activación de los receptores en la superficie latero-basal de la célula parietal (limite con el torrente sanguíneo) y la regulación de la bomba en el lado canalicular de la membrana.

La bomba de ácido gástrica :La producción de ácido por la célula parietal es debido a la activación de una enzima transportadora , la :  $H^+/K^+$ -ATPasa. Esta enzima hidroliza ATP y secreta  $H^+$  mientras absorbe  $K^+$ . La primera mitad del ciclo transfiere la energía del ATP a la proteína mediante la formación de una unión covalente fosfo-aspartil en la parte citoplásmica de la enzima. Esta energía se traduce en la salida de protones desde el interior de la célula hacia la luz de los canaliculos secretorios. La segunda mitad del ciclo utiliza la energía restante dentro de la proteína, para absorber  $K^+$  desde la luz del compartimiento canalicular hasta el citoplasma de la célula parietal. En esta parte del ciclo se pierde la union fosfato. Por lo anterior, el punto de partida de que la energía que proviene del ATP para trasladarse en energía vectorial de transporte es un proceso en dos partes. La ausencia de  $K^+$  en la luz del canaliculo secretorio detiene la mitad del ciclo de la enzima y por lo tanto detiene la secreción de ácido por la enzima <sup>(59)</sup>.

## ANTECEDENTES HISTORICOS :

La presencia de organismos espirilares en el estomago de mamíferos (principalmente perros ) fue descrito inicialmente por Bizonnero en 1893<sup>(1,7)</sup>; tres años después en 1896 Salomón describió organismos espirales "espirilos" tanto en gatos como en perros; en 1906 Baltour observó espiroquetas en gastritis y úlcera intestinal de perros y monos. En el mismo año la primera descripción de éste microorganismo en humanos fue realizada por Krienitz en 1906; evidencias de la presencia de la bacteria en el epitelio gástrico se remontan a 1924 cuando Lucko y Seth describieron la presencia de considerable producción de ureasa en el estómago. En 1938 Doenges describió espiroquetas con la descripción morfológica actual de *Helicobacter pylori* en estómagos de víctimas accidentadas<sup>(1,7,26,28,35,41)</sup>.

En 1975 Steer y Colin - Jones describieron a la bacteria sobre la superficie luminal de las células epiteliales de pacientes con úlcera gástrica. El crédito del redescubrimiento de éste organismo y subsecuentes eventos son atribuibles a Marshall y Warren quienes lograron por primera vez el aislamiento de *H.pylori* y publicaron en 1983 un trabajo en donde se ponía atención a la estrecha relación entre *H. pylori*, gastritis y úlcera duodenal<sup>(1,3,6,7,35,41,59)</sup>.

## CLASIFICACIÓN :

El organismo cultivado por Marshall y Warren inicialmente fue clasificado como una especie del género *Campylobacter*, sin embargo la secuencia de genes de RNAr y estudios de ultraestructura entre otros indican la existencia de suficientes diferencias con respecto al género *Campylobacter* llevando a la designación de un nuevo género denominado *Helicobacter*. Las especies aisladas de estomago o intestino de mamíferos han sido aisladas y estudiadas lo que ha permitido establecer diferencias entre las especies tal como lo indica la siguiente tabla 1<sup>(7,8,35,66,67)</sup>:

tabla 1: DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES DE *Helicobacter*.

ESPECIE	HUESPED	ACTIVIDAD UREASICA	SITIO DE LOCALIZACION
<i>H. pylori</i>	humanos monos gatos	+	estomago
<i>H. nemestrinae</i>	macaco	+	estomago
<i>H. acinonyx</i>	cheetah	+	estomago
<i>H. helmanii</i>	humanos y otros mamiferos	+	estomago
<i>H. felis</i>	gatos y perros	+	estomago
<i>H. mustelae</i>	hurones	+	estomago
<i>H. rappini</i>	humano y otros mamiferos	+	estomago e intestino
<i>H. muridarum</i>	rata y raton	+	estomago e intestino
<i>H. hepaticus</i>	raton	+	higado
<i>H. canis</i>	perro	-	intestino
<i>H. fennielliae</i>	humano	-	intestino
<i>H. cinaedi</i>	humano	-	intestino

## MORFOLOGIA:

El organismo presenta una forma de bacilo espiral, es gram negativo. Presenta dimensiones de 0.5-0.6  $\mu\text{m}$  con cuatro a seis flagelos retraídos. *H. pylori* presenta movilidad debido a la forma en espiral y a la presencia de flagelos<sup>(65)</sup>. Algunas diferencias morfológicas de algunas especies del género *Helicobacter* pueden observarse en la siguiente figura 2:

*H. pylori*

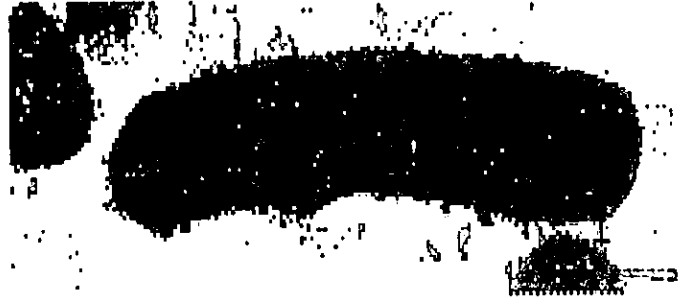
0.5-0.6  $\mu\text{m}$  X 3-5  $\mu\text{m}$   
Helicoidal con forma en "S"  
2 a 3 doblesces, gram (-)



*H. mustelae*

0.5-2 o 3  $\mu\text{m}$

recto con terminaciones  
redondeadas



*H. felis*

0.4 X 5-7.5  $\mu\text{m}$   
Helicoidal, estrecho  
forma espiral  
5-7 doblesces



*H. muridarum*

0.5-0.6  $\mu\text{m}$  X 3.5-5  $\mu\text{m}$   
Helicoidal con forma en "S"  
2-3 doblesces  
fibras periplasmicas a lo  
largo



*Gastrospirillum hominis*

0.4-0.5  $\mu\text{m}$  X 5-8  $\mu\text{m}$   
Helicoidal estrecho  
forma espiral  
5-7 doblesces



Se han observado formas cocoides ante las que se han postulado como formas viables

pero no cultivables<sup>(1,7,35,37,41,65)</sup> .

## CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS:

El género *Helicobacter* fue establecido en 1989 durante una reestructuración taxonómica de las especies de *Campylobacter pylori* y *Campylobacter mustelae* . Una serie de datos convincentes producto del análisis de ácidos grasos celulares, ultraestructura, quinonas respiratorias, susceptibilidad antimicrobiana, requerimientos de crecimiento, capacidad enzimática y la secuenciación en el RNAr 16S, permitieron el establecimiento de un nuevo género. El microorganismo es microaerofílico con óptimo crecimiento a 37 °C . El organismo es asacarolítico además de que su contenido de G+C en su DNA se encuentra entre un 35 a 44% por mol. Las características de algunas especies del género *Helicobacter* se mencionan a continuación<sup>(35)</sup>.

*H.pylori* es identificado en base a características morfológicas coloniales, (colonias translúcidas, de 1 a 3 mm , con borde regular y en forma de gotas de rocío) las colonias microscópicamente se observan como bacilos Gram negativos helicoidales, en forma de "U" o cocoides.

pero no cultivables<sup>(1,7,35,37,41,65)</sup> .

## CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS:

El género *Helicobacter* fue establecido en 1989 durante una reestructuración taxonómica de las especies de *Campylobacter pylori* y *Campylobacter mustelae* . Una serie de datos convincentes producto del análisis de ácidos grasos celulares, ultraestructura, quinonas respiratorias, susceptibilidad antimicrobiana, requerimientos de crecimiento, capacidad enzimática y la secuenciación en el RNAr 16S, permitieron el establecimiento de un nuevo género. El microorganismo es microaerofílico con óptimo crecimiento a 37 °C . El organismo es asacarolítico además de que su contenido de G+C en su DNA se encuentra entre un 35 a 44% por mol. Las características de algunas especies del género *Helicobacter* se mencionan a continuación<sup>(35)</sup>.

*H.pylori* es identificado en base a características morfológicas coloniales, (colonias translúcidas, de 1 a 3 mm , con borde regular y en forma de gotas de rocío) las colonias microscópicamente se observan como bacilos Gram negativos helicoidales, en forma de "U" o cocoides.



CARACTERISTICAS	<i>H.pylori</i>	<i>H.cinaedi</i>	<i>H.fennelliae</i>
oxidasa	+	+	+
catalasa	+	+	+
ureasa	+	-	-
hidrolisis del hipurato	-	-	-
produccion H <sub>2</sub> S (TSI)	-	-	-
γglutamyl transpeptidasa	+	NA	NA
reducción nitratos	-	+	-
crecimiento microaerobio			
25°C	-	-	-
37°C	+	+	+
42°C	-	-	-
susceptibilidad			
acido nalidixico 30μg/disco	R	S	S
cephalotina 30μg/disco	S	I	S
crecimiento/ bilis 1%	-	+	+
glicina 1%	-	+	+
hidrolisis acet.de indoxilo	-	-	+
acidos grasos celulares	Lamber gpG	Lamber gpD	Lamber gpE

#### SIGNIFICADO DE LOS SIGNOS:

+, >90%positivos; -, >90%negativos;

NA no hay actividad; S, susceptible; R, resistente; I, intermedio;

El grupo de Lambert gp G esta caracterizado por la presencia de 19:O cyc,3-OH -16:O y 3-OH -18:O y la ausencia de 16:1 y 3-OH -14:O . El grupo de Lambert D esta caracterizado por la presencia de 12 :O, 3-OH-12:O y 3-OH -16:O y la ausencia de 16:1 y 3-OH -14:O. El grupo de Lambert E, esta caracterizado por la presencia de un aldehido en el carbono 16 y un dimetilacetilo en el carbono 16 y la ausencia de 16:1.

### **ASOCIACION DE *H.pylori* EN PATOLOGIAS GASTRODUODENALES .**

La infección por *H.pylori* ocurre en la población humana a través de todo el mundo, la prevalencia de infección aumenta a medida que avanza la edad .La transmisión aparentemente ocurre humano - humano siendo el humano el principal reservorio de infección; se ha observado una posible transmisión fecal-oral ya que ha sido cultivado *H.pylori* de muestras de heces y de placa dental .Se ha relacionado la transmisión por el hacinamiento familiar en donde se sospecha una transmisión persona a persona<sub>(1,3,6,7,11,23,28,29,35)</sub>.

La infección por *H.pylori* es considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de úlcera péptica, linfoma gástrico y cancer gástrico observándose una tolerancia a la infección por décadas sin manifestación de síntomas; *H.pylori* se adapta bien por largos periodos de tiempo sobreviviendo en el medio ambiente gástrico causando daño a medida que avanza la edad ,tal como se indica en la siguiente figura( 3)<sub>(1,3,6,8,28,31)</sub>:

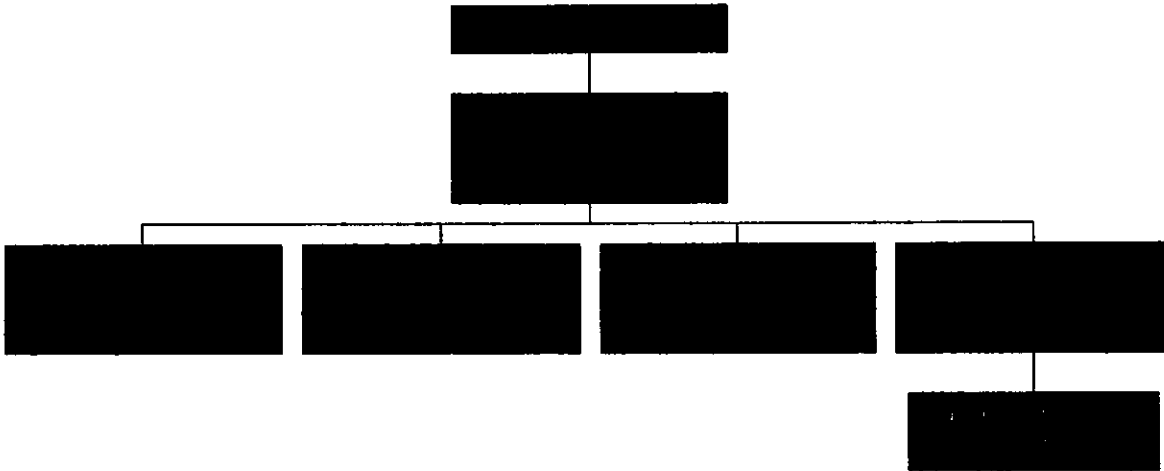
El grupo de Lambert gp G esta caracterizado por la presencia de 19:O cyc,3-OH -16:O y 3-OH -18:O y la ausencia de 16:1 y 3-OH -14:O . El grupo de Lambert D esta caracterizado por la presencia de 12 :O, 3-OH-12:O y 3-OH -16:O y la ausencia de 16:1 y 3-OH -14:O. El grupo de Lambert E, esta caracterizado por la presencia de un aldehido en el carbono 16 y un dimetilacetilo en el carbono 16 y la ausencia de 16:1.

### **ASOCIACION DE *H.pylori* EN PATOLOGIAS GASTRODUODENALES .**

La infección por *H.pylori* ocurre en la población humana a través de todo el mundo, la prevalencia de infección aumenta a medida que avanza la edad .La transmisión aparentemente ocurre humano - humano siendo el humano el principal reservorio de infección; se ha observado una posible transmisión fecal-oral ya que ha sido cultivado *H.pylori* de muestras de heces y de placa dental .Se ha relacionado la transmisión por el hacinamiento familiar en donde se sospecha una transmisión persona a persona<sub>(1,3,6,7,11,23,28,29,35)</sub>.

La infección por *H.pylori* es considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de úlcera péptica, linfoma gástrico y cancer gástrico observándose una tolerancia a la infección por décadas sin manifestación de síntomas; *H.pylori* se adapta bien por largos periodos de tiempo sobreviviendo en el medio ambiente gástrico causando daño a medida que avanza la edad ,tal como se indica en la siguiente figura( 3)<sub>(1,3,6,8,28,31)</sub>:

## CONSECUENCIAS CLINICAS DE INFECCION POR *Helicobacter pylori*:

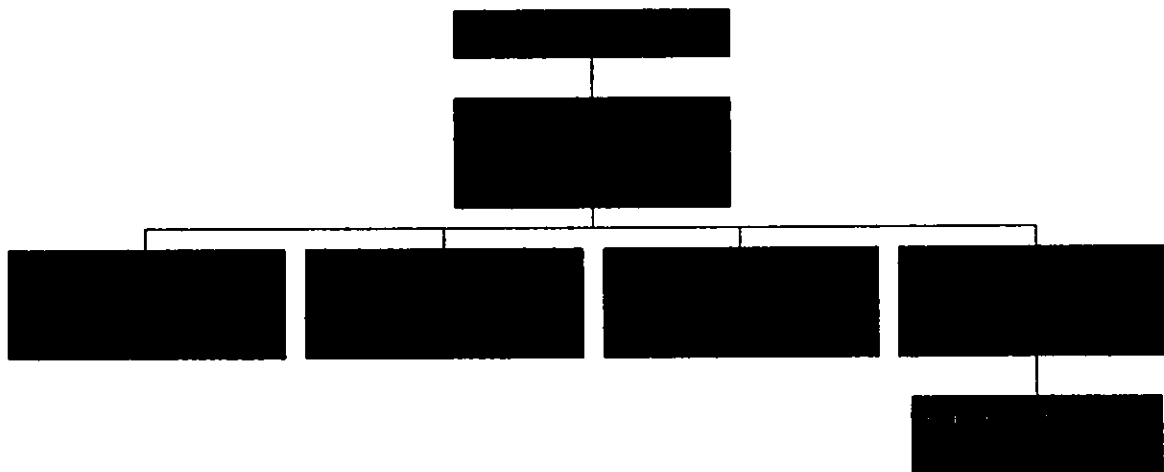


En el paciente pediátrico, la manifestación habitual es dolor abdominal y con frecuencia éste es crónico recurrente. El dolor abdominal crónico recurrente (DACR) definido por Appley, tradicionalmente se ha considerado como un trastorno funcional y se le ha comparado con síndrome de intestino irritable. En algunos estudios recientes se demostró la asociación entre DACR y *H. pylori* en proporción significativa<sup>(12)</sup>.

### **PATOGENESIS :**

Se ha puesto atención en los factores relacionados con *H. pylori* y que pueden causar inflamación y posterior muerte celular. Los cambios degenerativos que se han observado son atribuibles a la inflamación celular sobre la lamina propia, lo que hace sospechar la presencia de productos que participan en la patogénesis y en su colonización como se indica en la siguiente tabla 2<sup>(8,23,31,41,51)</sup>:

## CONSECUENCIAS CLINICAS DE INFECCION POR *Helicobacter pylori*:



En el paciente pediátrico, la manifestación habitual es dolor abdominal y con frecuencia éste es crónico recurrente. El dolor abdominal crónico recurrente (DACR) definido por Appley, tradicionalmente se ha considerado como un trastorno funcional y se le ha comparado con síndrome de intestino irritable. En algunos estudios recientes se demostró la asociación entre DACR y *H. pylori* en proporción significativa<sub>(12)</sub>.

### **PATOGENESIS :**

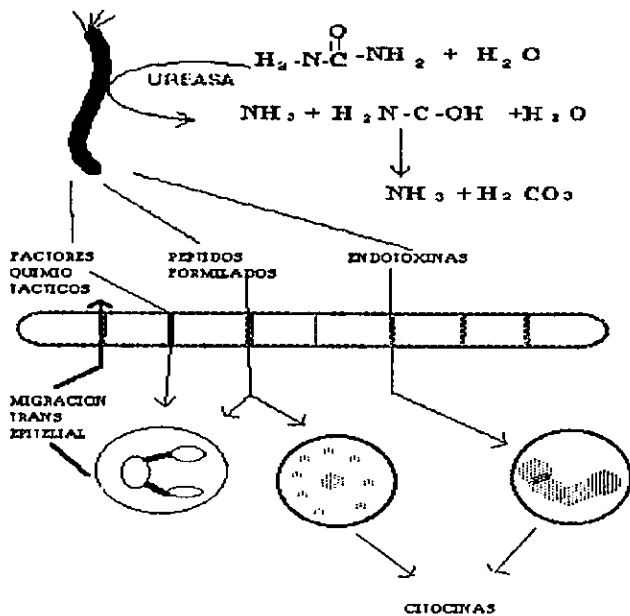
Se ha puesto atención en los factores relacionados con *H. pylori* y que pueden causar inflamación y posterior muerte celular. Los cambios degenerativos que se han observado son atribuibles a la inflamación celular sobre la lamina propia, lo que hace sospechar la presencia de productos que participan en la patogénesis y en su colonización como se indica en la siguiente tabla 2<sub>(8,23,31,41,51)</sub>:

PRODUCTO	GENES	PRESENCIA DEL GENE EN TODAS LAS CEPAS	FUNCIONES
UREASA	ure o perum	+	neutralizar el ácido, proveer nitrógeno, inducción de inflamación
FLAGELO	fla A y fla B	+	motilidad
ADHESINAS	hpa A y otras	+	adherencia a células epiteliales
SUPER OXIDO DISMUTASA	sod	+	resistencia a fagocitos asesinos
CATALASA	kat A	+	resistencia a fagocitos asesinos
CITOTOXINA VACUOLIZANTE	Vac A	+	daño en células epiteliales
Cag A	Cag A	-	desconocido

Se tiene la sospecha de que la mucosa proporciona a la bacteria la capacidad para la ulceración debido a que el moco puede retardar la difusión de ácido clorhídrico. La abundante ureasa en el citosol que se localiza en la membrana plasmática de la bacteria, tiene la capacidad de producir amoníaco lo cual genera un microambiente de aumento relativo de pH que ocasiona daño directo a células epiteliales. La bacteria puede llevar a cabo la liberación de endotoxinas y péptidos formilados que participan en la iniciación de una respuesta inflamatoria<sup>(3,23,26,31)</sup>.

## MECANISMO DE PATOGENICIDAD:

Después de que la bacteria a llegado a la lamina propia del estomago esta comienza a liberar endotoxinas y péptidos formilados que llevan a la estimulación de macrófagos ocasionando la liberación de citocinas (factor necrótico tumoral  $\alpha$  é interleucinas ) contribuyendo a la inflamación y degeneración de la mucosa acompañada de infección. Factores quimiotácticos como FAP(factor activador de plaquetas) y peptidos formilados como el f-metiionil-leucil-phenilalanina(FMLP)son quimiotácticos para granulocitos estimulando la liberación de derivados oxigenados,radicales libres y proteasas de granulocitos. Algunos péptidos formilados pueden también activar células cebadas dando como resultado la liberación de mediadores proinflamatorios y citocinas .Un panorama general del mecanismo de patogenicidad puede observarse en la siguiente figura 4(3,9,31):



Durante la colonización del epitelio gástrico se ha propuesto que la bacteria reconoce una región fucosilada del antígeno del grupo sanguíneo conocido como H y Lewis B expresados sobre la superficie de la célula huésped<sub>(18)</sub>.

## **EPIDEMIOLOGIA:**

Se ha encontrado en diferentes estudios que la prevalencia de infección por *H.pylori* en personas asintomáticas incrementan la prevalencia de gastritis que a su vez se incrementa a medida en que avanza la edad.<sub>(2,5,19)</sub>

La prevalencia de *H. pylori* depende en gran parte de el nivel socio-económico, la raza y condiciones higieno-sanitarias. En países del primer mundo la correlación con la edad es significativa de tal manera que la prevalencia de 1 a 20 años es del 20% y del 80% a partir de los 40 años<sub>(1,2)</sub>. En países del tercer mundo (como la India) la prevalencia de infección es del 60 % en personas de 1 a 20 años y del 80 % a partir de los 20 años<sub>(10)</sub>. Se ha sugerido que la manipulación de secreciones del tracto digestivo superior puede ser un mecanismo de transmisión ,dicha transmisión persona a persona esta apoyada por trabajos en diferentes instituciones<sub>(11,36)</sub>. Se menciona también una posibilidad de transmisión intrafamiliar persona a persona y por especies distintas a la humana es decir una posible zoonosis<sub>(15,41)</sub>. El reservorio de *H.pylori* aun se desconoce, aun cuando se ha demostrado la viabilidad de el organismo durante largo tiempo en el agua. La prevalencia de la infección según diferentes patologías y su distribución en función de la edad se muestran en la figura 5<sub>(1)</sub>:



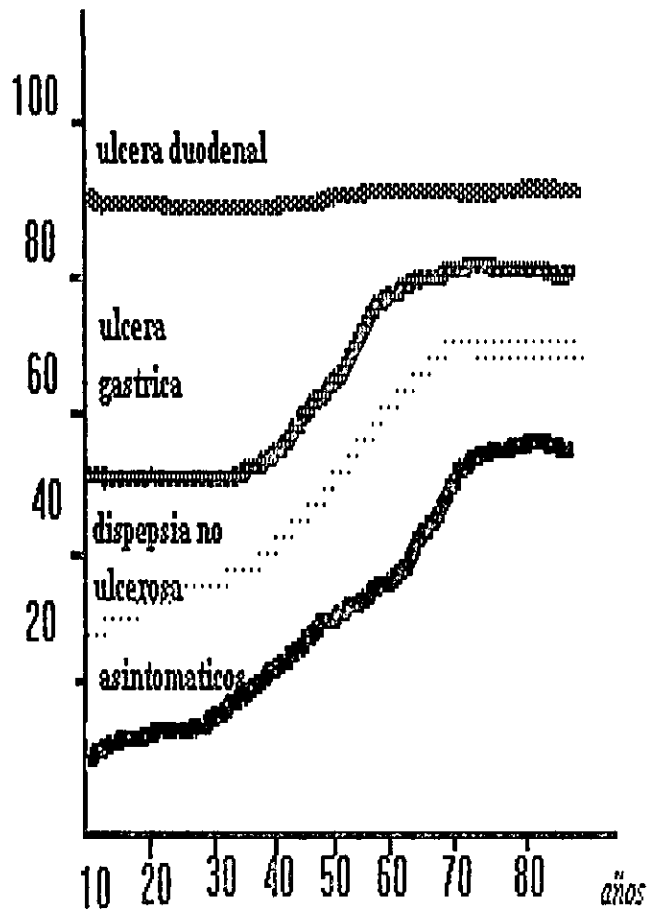
Durante la colonización del epitelio gástrico se ha propuesto que la bacteria reconoce una región fucosilada del antígeno del grupo sanguíneo conocido como H y Lewis B expresados sobre la superficie de la célula huésped<sub>(18)</sub>.

## **EPIDEMIOLOGIA:**

Se ha encontrado en diferentes estudios que la prevalencia de infección por *H.pylori* en personas asintomáticas incrementan la prevalencia de gastritis que a su vez se incrementa a medida en que avanza la edad.<sub>(2,5,19)</sub>

La prevalencia de *H. pylori* depende en gran parte de el nivel socio-económico, la raza y condiciones higieno-sanitarias. En países del primer mundo la correlación con la edad es significativa de tal manera que la prevalencia de 1 a 20 años es del 20% y del 80% a partir de los 40 años<sub>(1,2)</sub>. En países del tercer mundo (como la india) la prevalencia de infección es del 60 % en personas de 1 a 20 años y del 80 % a partir de los 20 años<sub>(10)</sub>. Se ha sugerido que la manipulación de secreciones del tracto digestivo superior puede ser un mecanismo de transmisión ,dicha transmisión persona a persona esta apoyada por trabajos en diferentes instituciones<sub>(11,36)</sub>. Se menciona también una posibilidad de transmisión intrafamiliar persona a persona y por especies distintas a la humana es decir una posible zoonosis<sub>(15,41)</sub>. El reservorio de *H.pylori* aun se desconoce, aun cuando se ha demostrado la viabilidad de el organismo durante largo tiempo en el agua. La prevalencia de la infección según diferentes patologías y su distribución en función de la edad se muestran en la figura 5<sub>(1)</sub>:

% *H. pylori*



## DIAGNOSTICO:

Dentro de los métodos que permiten el diagnóstico de la infección por *H.pylori* se clasifican en dos grupos :los que requieren endoscopia y toma de biopsia de la mucosa gástrica (métodos invasivos) y los métodos no invasivos (no requieren endoscopia) fundamentalmente técnicas serológicas y prueba del aliento<sup>(1,6,7,8,13,14,29,32,35,41)</sup>. La clasificación de los métodos de diagnóstico así como su sensibilidad y especificidad pueden resumirse como se indica en la siguiente figura 6:

	METODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
<b>INVASIVOS</b>	HISTOLOGIA	93-96%	95-99%
	CULTIVO	77-95%	100%
	PBA RAPIDA		
	UREASA	89-98%	93-98%
	FROTIS	95%	60%
	PCR (BIOPSIA)	85-96%	90-100%
<b>NO INVASIVOS</b>	PBA ALIENTO	90-95%	90-95%
	SEROCLOGIA	88-95%	86-95%
	PCR(OTROS FLUIDOS)	85-96%	90-100%

La elección de una prueba va a depender sobre todo de la situación clínica del paciente . En pacientes asintomáticos la endoscopia es una herramienta importante para el diagnóstico de úlcera péptica u otras lesiones gastroesofágicas<sup>(41)</sup>.El sistema de detección de *H.pylori*

basado en biopsia, tal como ensayo rápido de ureasa, microscopía o cultivo de el organismo es también apropiado. La sensibilidad de el diagnostico se incrementa si más de una prueba de éstas es realizada<sub>(13)</sub>. En pacientes asintomáticos una prueba no invasiva puede realizarse y una titulación serológica lo cual se recomienda en ésta situación .Si el resultado obtenido es positivo, se recomienda una confirmación de *H.pylori* utilizando el ensayo del aliento<sub>(41)</sub>. Pacientes que tienen previos antecedentes de terapia de erradicación y que presentan una recurrencia de síntomas puede considerarse una nueva terapia de erradicación si aún sigue siendo *H.pylori* positivo. En un mismo plano si no hay anormalidades endoscópicas ,una prueba no invasiva se recomienda y la prueba del aliento es la mejor opción ,ya que la serología no es recomendable en un periodo comprendido de 6 a 12 meses después de la terapia de erradicación<sub>(5,10,14)</sub>. La evaluación de la terapia de erradicación de *H.pylori* se recomienda un método no invasivo, la prueba del aliento es recomendable. La prueba del aliento puede realizarse de 4 a 8 semanas después del final de tratamiento para evitar falsos negativos, causados por una supresión temporal de la infección<sub>(41,53)</sub>. Si la prueba del aliento no es disponible, una titulación serológica o una prueba basada en biopsia puede realizarse después de 6 a 12 meses de culminado el tratamiento<sub>(5,10,14,41)</sub>.

#### HISTOLOGIA:

La observación de microorganismos espirales en los cortes histológicos de biopsias endoscópicas de la mucosa gástrica, es un método sencillo de diagnóstico de la infección por *H.pylori* . Es característica su localización en intimo contacto con el epitelio de

superficie en plena barrera mucosa<sub>(1,2,13,33)</sub>. La tinción de plata de Warthin-Starry es el ideal para evidenciar los bacilos; en general las tinciones habituales, hematoxilina-eosina y Giemsa son suficientes para obtener una correcta visualización<sub>(2,20,35,41)</sub>. La especificidad de la prueba histológica y probablemente la sensibilidad dependen de la experiencia de el patólogo, ya que puede ser difícil la identificación de *H.pylori* donde haya pocas bacterias o que presenten morfología atípica. La limitación principal de el uso de histología es la calidad de la biopsia, si la biopsia es pequeña se tiene una recuperación pobre o es inapropiada para fijarse o teñirse<sub>(13,41)</sub>. Con el estudio histológico se llega a tener de un 93 a un 98 % de sensibilidad y de 95 a 98 % de especificidad<sub>(13,41)</sub>.

#### CULTIVO:

Es el método de elección, aunque presenta ciertas dificultades técnicas, las muestras han de ser procesadas con cierta rapidéz en el laboratorio de microbiología, requiriendo para el cultivo una atmosfera microaerofílica y medios enriquecidos, como agar sangre o Skirrow (medio selectivo con antibioticos)<sup>(70)</sup>. El crecimiento es lento apareciendo pequeñas colonias entre el tercero y septimo día de incubación.<sup>(1,6)</sup>

Una variedad de medios de cultivo selectivos y no selectivos son disponibles comercialmente para cultivar *H.pylori* <sub>(13,35)</sub>; el uso de multiples medios incrementa la sensibilidad *H.pylori* requiere un medio ambiente microaerofílico, elevada humedad e incubación de 35 a 37°C por un máximo de 7 a 10 días ; generalmente los cultivos positivos son detectados después de 3 a 5 días de incubación<sub>(41)</sub>.

*H.pylori* es identificado en base a características morfológicas coloniales, (colonias translucidas, de 1 a 3 mm , con borde regular y en forma de gotas de rocío) las colonias microscópicamente se observan como bacilos Gram negativos helicoidales, en forma de "U" o cocoides, bioquímicamente son ureasa, catalasa y oxidasa positivas. La adición de sales de tetrazonio ayudan en la identificación de colonias de *H.pylori* cultivadas sobre placas de medio de agar<sup>(35)</sup>.

Durante el transporte es esencialmente mantener el espécimen de biopsia a 4°C, evitando la desecación y el contacto entre el espécimen y el aire<sup>(41)</sup>. Cuando las condiciones son satisfactorias la biopsia tiene que ser sembrada dentro de las primeras 24 horas .Una de las alternativas de transporte es congelar la biopsia a -70°C en nitrógeno líquido y posteriormente descongelarse antes de realizar el cultivo<sup>(13)</sup>. Para la transportación de biopsias la solución salina es recomendable por periodos cortos (<6 horas); si la realización de cultivo demora demasiado se recomiendan medios más complejos como el medio Stuart o caldo infusión cerebro-corazón suplementado; los medios pueden contener glicerol siempre y cuando los especímenes de biopsia sean transportados por un periodo muy prolongado o que tengan inmediatamente que ser congeladas a -70 ° C dentro de un medio fluido. (41)

La sensibilidad del cultivo de biopsia se encuentra entre el 77 y 95 % en tanto la especificidad es del 100%.<sup>(41)</sup>

## PRUEBA RAPIDA DE UREASA:

*Helicobacter pylori* posee una intensa actividad ureasica (conversión enzimática de la urea en amonio y CO<sub>2</sub>). Esta característica se ha aprovechado para diseñar un sistema de diagnóstico rápido que consiste en introducir una biopsia endoscópica en un caldo de urea de Christensen; si la actividad ureasica es elevada se produce un cambio cromático del amarillo al rosa. Para facilitar la prueba, se han confeccionado diversas pruebas comerciales de fácil manejo; en el CLO-test y HUT-test, el uso de rojo de fenol se usa como un indicador de pH; el retraso en el cambio de color puede deberse a la cantidad de bacterias presentes en la biopsia. La sensibilidad de la prueba rápida de ureasa depende sobre todo de el número de bacterias presentes en el espécimen de biopsia; 10<sup>4</sup> organismos son requeridos para un resultado positivo. La especificidad de la prueba disminuye debido a que puede haber contaminantes bacterianos que desdoblan a la ureasa dando un resultado falso-positivo, este mismo caso se puede dar en la interpretación de la prueba cuando la muestra presenta trazas de sangre. (13)

Actualmente se dispone del método Hpfast que utiliza un indicador que provee un gradiente de colores que ayudan en la cuantificación de el número de organismos presentes. La sensibilidad de la prueba rápida de ureasa se encuentra entre el 89 al 98 % y la especificidad es del 93 al 98%.

## TINCION DE GRAM:

Mediante una extensión y tinción de Gram se puede diagnosticar de una forma sencilla, rápida y económica la presencia de *H.pylori* en la biopsia endoscópica.(1)

El ácido graso bacteriano puede ser detectado en especímenes utilizando la tinción de Ziehl-Nielsen .(13)

La sensibilidad y especificidad de el método es del 95% y 60 % respectivamente.(1)

## REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

### (PCR)

Esta nueva técnica en repunte es extremadamente sensible y específica para detección de *H.pylori* a partir de material genético (DNA).(13) La principal ventaja potencial de la PCR es que puede permitir el diagnóstico de *H.pylori* mediante un método no invasivo de fluidos no gástricos como saliva ya que algunos autores sugieren que la cavidad oral es el sitio inicial de la infección.(40)Un camino para incrementar la sensibilidad de la técnica es la realización de una segunda PCR sobre los productos de amplificación con los primers internos para la primera secuencia amplificada existiendo un elevado riesgo de contaminación.(13)

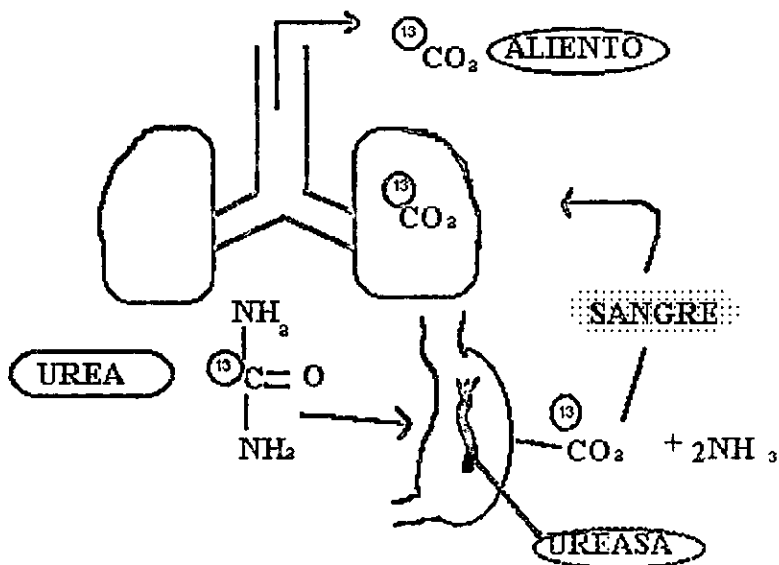
La sensibilidad de la técnica PCR es del 85 al 96% y la especificidad se encuentra entre el 90 y 100%.(40)

## PRUEBA DEL ALIENTO:

Es particularmente utilizada en la detección de *H.pylori* en el huesped.(6) Debido a que el organismo posee una potente actividad ureasica, es posible que sea detectado mediante carbono 13 o carbono 14 marcado presente en urea. El sujeto ingiere urea radiomarcada, la cual en presencia de ureasa da como resultado la formación de amonio y bicarbonato radiomarcado. Este bicarbonato es facilmente absorbido en el torrente sanguineo y



posteriormente excretado por la espiración pulmonar en dióxido de carbono tal como lo indica la figura 7:



En la prueba respiratoria con carbono 14 se detecta con un contador de centelleo, en tanto que para carbono 13 es necesario la utilización de un espectrofotómetro de masas. (6) La sensibilidad y especificidad de la prueba del aliento es del 90 % y 95% respectivamente; (1,40) sin embargo la especificidad es también muy buena para otras bacterias ureasa positivas, que pueden estar presentes en el estómago incluyendo bacterias entericas como *Proteus sp* lo que da como resultado un falso-positivo. Teóricamente es posible estos casos en pacientes dañados por hipoclorhidria. (13) En un estudio reciente se observó que en personas que fuman y la excreción elevada de  $\text{CO}_2$  no guardan ninguna relación con una reducción en la infección por *H. pylori*. (44).

## SEROLOGIA:

El diagnóstico de estudio via serología es posible a través de la detección de la producción de anticuerpos contra proteínas celulares que se encuentran en la membrana externa de el microorganismo (*H.pylori*)<sub>(17)</sub>. Los ensayos serológicos son recomendados después de terapia de erradicación. La infección de la mucosa gástrica por *H.pylori* da como resultado una respuesta inmune tanto local como sistémica, incluyendo lo que es la elevación de niveles de IgG é IgA en suero y elevación de IgA secretora é IgM en estomago.<sub>(30,40)</sub> Suscesivamente la erradicación de el organismo da como resultado una progresiva caída en el titulo de anticuerpos. (6) La especificidad de la serología es generalmente satisfactoria ya que *H.pylori* es la única bacteria que no comparte antígenos con otras bacterias excepto para flagelina de *Campylobacters*<sub>(17)</sub>.

Para la realización de la prueba se dispone de preparación cruda de antígenos por sonicado ó extracción con glicina. (6,13) El problema con la serología es que después del tratamiento de erradicación de la bacteria la IgG disminuye lentamente y unicamente después de aproximadamente 6 meses comienza un descenso del 50% en los titulos de anticuerpos.<sub>(42,6)</sub> La sensibilidad de la prueba se encuentra entre el 88 y 95 % y la especificidad del 86 al 95 %.<sub>(13,40)</sub>

## TRATAMIENTO:

*H.pylori* es sensible in vitro a un gran número de antibióticos (penicilinas, amoxicilina, cefalosporinas, macrólidos, quinolonas, etc.), pero no se conoce con exactitud la efectividad de dichos antimicrobianos in vivo<sup>(34)</sup>. En los últimos años se ha podido comprobar que los antibióticos son más eficaces in vivo si se establece una inhibición intensa de la acidez gástrica<sup>(1,27,41)</sup>. Presenta una intrínseca resistencia a bloqueadores de los receptores  $H_2$  (por ejemplo cimetidina y ranitidina), polimixina y trimetopim.<sup>(24,25,41)</sup>

El metronidazol es una base débil con un pKa de 2.52, se encuentra en su forma ionizada a un pH de 7.4 incrementando su ionización a medida que disminuye el pH. Únicamente en su forma ionizada el metronidazol puede difundirse fácilmente a través de la membrana lipídica. Bajo circunstancias normales el metronidazol puede difundirse fácilmente a sangre y jugo gástrico.<sup>(16)</sup> La prevalencia de resistencia a metronidazol es elevada en países desarrollados va del 11 al 70%, mientras en países en vías de desarrollo se encuentra alrededor del 95% de resistencia.<sup>(38,41,63)</sup>

La amoxicilina contiene 3 grupos ionizables con valores de pKa de 2.68, 7.49 y 9.63, la amoxicilina existe en una forma ionizable en el rango de pH entérico, sin embargo éste existe como un zwitterion con una carga neta de 0 entre pH 3 y 6. La lipofiliidad de amoxicilina es relativamente baja, además de difusión pasiva a través de las membranas biológicas suele ser también baja. Se ha observado una mayor tolerancia a amoxicilina utilizada en los regímenes de terapia anti-*H.pylori*.<sup>(16)</sup> Recientemente se encontró que no

hay una interacción farmacocinética entre amoxicilina y omeprazole en sujetos positivos para *H. pylori* (43).

Claritromicina es una base débil con un pKa de 9.20, se encuentra en su forma ionizable en plasma y jugo gástrico, presenta una elevada lipofilia a un pH de 7.4 en donde expresa su mayor concentración en tejido, la secreción activa de jugo gástrico con una elevada concentración de claritromicina explica este efecto. La prevalencia de resistencia a claritromicina generalmente no es mayor del 10 %.(39,41)

Diferentes estudios se han realizado tratando de verificar la efectividad de variados esquemas de tratamiento por ejemplo :

Lanzoprazol+amoxicilina + metronidazol daba buenos resultados de erradicación superior al 93 %<sub>(45,47)</sub>. En algunos casos en donde se cuenta con un alto número de cepas resistentes a metronidazol, se ha utilizado una combinación de un inhibidor de la bomba de protones + claritromicina + tinidazol, consiguiéndose una erradicación menor al 8%<sub>(46)</sub>. En un estudio se propuso la sustitución del macrolido (claritromicina) por Roxithromicina + amoxicilina + lanzoprazol el % de erradicación fue mayor al 80%<sub>(48)</sub>. En el instituto de investigaciones clínicas en Houston Texas se realizó un estudio en donde se evaluó la combinación de ranitidina, citrato de bismuto y claritromicina, presentando una efectividad en la erradicación de un 86% en pacientes con úlcera duodenal e infección por *H. pylori* (49). Se ha observado que la aplicación por periodos cortos de tiempo hace más tolerante el esquema de tratamiento reduciendo notablemente las recurrencias de infección<sub>(50,52)</sub>.

La FDA aprobó un régimen a pacientes con enfermedad úlcero péptica que incluía la triple terapia, dispensada en un blister consistente de:

Subsalicilato de bismuto( 262g / 2 tabletas )

Metronidazol (259 mg) y

Tetraciclina (500 mg)

Todas tomadas en 4 tiempos por día durante 14 días (40,41).

La sustitución de amoxicilina por tetraciclina da como resultado una disminución en la cura y no es recomendable excepto en niños pequeños en donde las tetraciclinas son contraindicadas, el porcentaje de erradicación con la utilización de ésta triple terapia es del 85%.(41)

La cuadruple terapia (en donde la triple terapia se combina con el uso de un inhibidor de la bomba de protones) ha sido descrita por ser la más eficiente. Estudios en Suiza reportaron que el régimen por 7 días con la cuadruple terapia fue extraordinariamente efectiva obteniéndose un 98% de erradicación.(41)

**INHIBIDOR DE LA BOMBA DE PROTONES :** Existen en el mercado variados productos con estas características pero en general el mecanismo de acción consiste en la unión del fármaco con la  $H^+ K^+ -ATPasa$ . inactivándola<sup>(54,55,62,64)</sup>.

#### **PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD:**

Los resultados más significativos que un laboratorio clínico puede proporcionar, son aquellos que orientan al médico acerca de la terapéutica con antimicrobianos que se hayan de administrar al paciente<sup>(56)</sup>.

Subsalicilato de bismuto( 262g / 2 tabletas )

Metronidazol (259 mg) y

Tetraciclina (500 mg)

Todas tomadas en 4 tiempos por día durante 14 días (40,41).

La sustitución de amoxicilina por tetraciclina da como resultado una disminución en la cura y no es recomendable excepto en niños pequeños en donde las tetraciclinas son contraindicadas, el porcentaje de erradicación con la utilización de ésta triple terapia es del 85%.(41)

La cuadruple terapia (en donde la triple terapia se combina con el uso de un inhibidor de la bomba de protones) ha sido descrita por ser la más eficiente. Estudios en Suiza reportaron que el régimen por 7 días con la cuadruple terapia fue extraordinariamente efectiva obteniéndose un 98% de erradicación.(41)

**INHIBIDOR DE LA BOMBA DE PROTONES :** Existen en el mercado variados productos con estas características pero en general el mecanismo de acción consiste en la unión del fármaco con la  $H^+ K^+$ -ATPasa. inactivandola<sup>(54,55,62,64)</sup>.

#### **PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD:**

Los resultados más significativos que un laboratorio clínico puede proporcionar, son aquellos que orientan al médico acerca de la terapéutica con antimicrobianos que se hayan de administrar al paciente<sub>(56)</sub>.

## METODO DE BAUER-KIRBY

Es una prueba de difusión en disco único. Las pruebas de difusión en disco utilizan discos de papel embebidos en cierta concentración de solución de antibióticos, y que subsecuentemente se han dejado secar. Cuando se siembra una placa o disco de agar en forma uniforme con un cultivo particular de bacterias, y se colocan discos con antibióticos sobre la superficie de la placa, el antibiótico se difundirá desde el disco hacia el medio. En donde el cultivo sea resistente al antibiótico, ocurrirá el crecimiento hasta llegar al disco, y aun por debajo de éste<sup>(4, 21, 56, 57, 58)</sup>.

**TIPO DE MEDIO USADO** :Debe usarse un medio que permita un crecimiento rápido y fuerte y que no inhiba la difusión del antibiótico o interfiera con ella. El medio más adecuado parece ser el agar de Mueller-Hinton. Este medio permite el buen crecimiento de casi todos los patógenos. y puede complementársele con sangre al 5 % para aislados exigentes. El pH del medio de cultivo debe de permanecer a 20°C entre 7.2 y 7.4 <sup>(57)</sup>.

**PROFUNDIDAD DEL MEDIO** :Se ha establecido que la profundidad promedio del medio debe de ser de 4 mm. Esto se obtiene colocando 25 ml del medio de cultivo en una caja de 90 mm de diámetro, o 60 ml en una caja con 150 mm de diámetro<sup>(57)</sup>.

**TAMAÑO DEL INOCULO** :Un inculo estándar puede obtenerse “levantando “ de tres a 10 colonias de los cultivos que se estudien, y haciéndolas crecer de dos a cinco horas en caldo de fosfato de triptosa. Luego habrá de diluir el cultivo de ser necesario, con agua estéril o con solución salina, para compararlo con un estándar que contenga 0.5 ml de BaCl<sub>2</sub> al 1 % en 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 % . El estándar y el microorganismo en suspensión

se colocan en tubos iguales y se comparan entre ellos, utilizando una buena fuente de iluminación contra un fondo blanco que tenga una línea negra ancha a lo largo del fondo. No deben usarse cultivos del día anterior ya que estos contendrán una gran cantidad de bacterias muertas<sup>(57, 68)</sup>.

**APLICACIÓN DEL INOCULO:** Debe extenderse uniformemente el inóculo sobre toda la superficie del disco o placa ligeramente húmedo. Habrá que hacer esto con un hisopo estéril mojado en el inóculo estándar. El hisopeo no debe estar demasiado mojado, y no debe dejar marca sobre la superficie del agar<sup>(57, 58, 60)</sup>.

**APLICACIÓN DE LOS DISCOS:** Los discos tendrán que ser aplicados muy pronto después de haber sembrado el inóculo. El retraso provocará un periodo de crecimiento de los organismos antes de que los antibióticos tengan oportunidad de difundirse en el medio. Los discos tendrán, naturalmente que ser aplicados asépticamente, mediante el uso de fórceps flameados o de aplicadores especiales de discos. Los discos se colocarán de modo que queden aproximadamente a 24 mm del centro y a 15 mm del borde de la caja<sup>(57)</sup>.

**ELECCION DE DISCOS:** Nunca se debe de utilizar discos cuya fecha de caducidad se haya vencido y tratar de almacenarlos adecuadamente para evitar que se deterioren en su concentración. Para las bacterias Gram negativas se sugieren los siguientes: ampicilina, colimicina, cefalotina, nitrofurantoina, cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina, carbenicilina, gentamicina y sulfametoxazol-prim. En el caso de las bacterias Gram positivas, los discos serán: ampicilina, cefalotina, estreptomina, eritromicina, tetraciclina, penicilina, meticilina, clindamicina, gentamicina, nitrofurantoina y sulfametoxazol-prim<sup>(56, 57)</sup>.



**PERIODO DE INCUBACION:** Deben incubarse las placas a poco de haberles aplicado los discos. El retraso puede dar por resultado zonas de inhibición mayores de las normales, a causa de la difusión del antibiótico antes de que se haya iniciado el crecimiento bacteriano<sup>(57, 58)</sup>.

**INTERPRETACION:** Mida los halos de inhibición en torno a cada disco. La medida se hace en mm y es la del diámetro del halo, incluido el disco. La medición se debe hacer a las 24 horas de la inoculación y sólo incluye las áreas de inhibición completa. Para medir con mayor facilidad se recomienda un calibrador (Vernier) o una reglilla transparente especialmente grabada para tales lecturas. Cuando los discos se corren sobre la superficie del agar, se obtendrán zonas ovaladas; los discos que quedan muy cerca del borde externo de la caja, producen zonas excéntricas. En ambos casos, mida el diámetro menor<sup>(56, 57)</sup>.

#### **METODO DE DILUCION EN DISCO:**

Puede lograrse esto por incubación de las diluciones de antibiótico y de los inóculos de cultivo durante un tiempo predeterminado, y anotando en el resultado si hay presencia o no de crecimiento. El método de dilución en tubo es útil para conocer la susceptibilidad de microorganismos que requieren CO<sub>2</sub>, atmósferas estrictamente anaerobias o medios enriquecidos, que no pueden ser probados por el método de la difusión en agar<sup>(8,56, 57, 58)</sup>.

Debe tenerse muy presente que la concentración inhibitoria mínima (MIC) no es necesariamente la bactericida mínima(MLC)<sup>(56)</sup>.

- A) De las soluciones concentradas, mantenidas en congelación, haga las diluciones apropiadas de cada antimicrobiano hasta obtener una concentración de 200 µg o unidades por ml.
- B) De la solución anterior continúe haciendo diluciones hasta obtener las que se usarán según su plan establecido. Empleése técnica aséptica y tubos de ensayo estériles, con tapón o caperuza, en número de 10. Los tubos de ensayo deben ser de tamaño pequeño, de 13 por 100 mm las diluciones deben ser en serie y en volúmenes de 0.5 ml para que la gama o límites sean: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.1, 1.5, 0.75 y 0.37. El último tubo no debe contener nada de antibiótico y servirá como control de crecimiento.
- C) Se ponen en cada tubo 0.5 ml de cultivo de la prueba, diluido para que contengan aproximadamente  $10^5$  organismos viables por ml. Para la mayoría de cultivos esta concentración se obtiene diluyendo un cultivo en caldo (hecho de un día para otro) hasta 1:1000, en caldo fresco.
- D) Incúbense hasta 37°C durante 18 horas, o hasta que el último tubo crezca.
- E) Se informa de los resultados tomando la cantidad menor de antibiótico requerida para inhibir el crecimiento del cultivo. por ejemplo, si el sexto tubo es el primero que haya mostrado crecimiento, la concentración inhibitoria mínima para ese antibiótico será la del tubo inmediato anterior, que está a 6.25µg por 0.5 ml o 3.1 µg por ml<sub>(57, 58)</sub>.

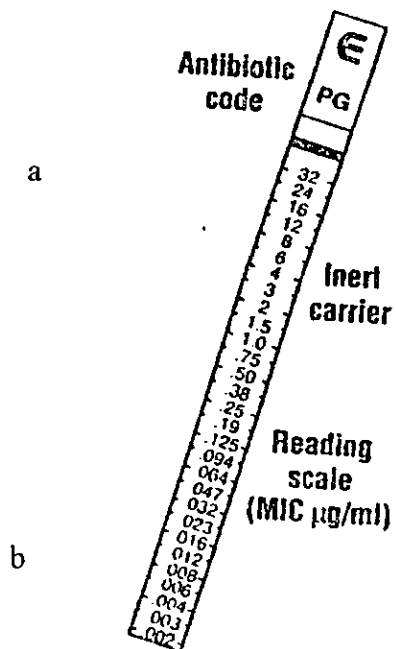
#### PRUEBA DE SENSIBILIDAD "E TEST":

Se ha encontrado una correlación entre el método de dilución en disco y la prueba "E TEST" que va del 86 al 99.5%.<sub>(4)</sub>

Es una técnica cuantitativa para determinar la sensibilidad antimicrobiana para ambos tipos de bacterias, Gram positivas y Gram negativas. El sistema comprende un gradiente predefinido antimicrobiano el cual es usado para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), en  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , de los agentes individuales contra microorganismos para probarse en medio de agar(4, 22, 60).

**PRINCIPIO DE USO:**

La prueba “E TEST “ esta basada sobre la combinación de los conceptos de la técnica de dilución en caldo y la de difusión. La prueba “E TEST” consiste de una tira plástica inerte no porosa de 5 mm de ancho y 60 mm de longitud. Por un lado de la tira se encuentra la escala de lectura calibrada en  $\mu\text{g} / \text{ml}$  para la MIC. Un predefinido gradiente de concentración exponencial seco y estabilizado se encuentra inmovilizado sobre la otra superficie de la tira con la concentración máxima en a y la concentración mínima en b como se observa en la figura :



El rango del gradiente de concentración continuo va de 0.002 a 32  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , de 0.016 a 256  $\mu\text{g} / \text{ml}$  ó 0.064 a 1024  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , dependiendo del antibiótico<sup>(60)</sup>.

#### CONSERVACION:

Todas las tiras "E TEST" deben ser conservadas en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La vida media de todos los antibióticos es de 2 a 5 años desde el momento de su manufactura. Están disponibles contenedores que contienen sílica gel, además contienen una etiqueta que indica la fecha de expiración y las recomendaciones para su mejor conservación<sup>(4, 60)</sup>.

#### MEDIO:

El medio a utilizar debe de contener de  $4 \pm 0.5$  mm de medio enriquecido y suplementado dependiendo de el tipo de bacteria que se va a probar. En todas las pruebas de susceptibilidad el cambio de medio puede afectar la concentración mínima inhibitoria (MIC). El medio con altos niveles de antagonistas como Timidina y timina, los cuales afectan los resultados para sulfonamidas y trimetroprim. Cambios significativos debidos a la osmolaridad y nivel catiónico influye en los valores de MIC para  $\beta$ -lactamicos, aminoglicosidos y tetraciclinas. En tanto los cambios en el pH pueden afectar la actividad de Lincosamidas, estreptograminas, macrólidos, aminogluocosidos y quinolonas<sup>(4, 22, 60)</sup>. La

incubación con CO<sub>2</sub> disminuye el pH del medio para drogas sensibles al pH, los valores de MIC bajo condiciones de CO<sub>2</sub> pueden diferir los resultados que a temperatura ambiente<sup>(69)</sup>.

#### PREPARACION DEL INOCULO:

Emulsionar un número apropiado de colonias aisladas de cultivo de la noche anterior, ajustar la correcta turbidez del inóculo utilizando el estándar de turbidez de McFarland N° 1, es preciso recordar que el estándar de McFarland no garantiza un conteo correcto de colonias de células viables (ufc/ml)<sup>(4, 60, 68)</sup>. Al momento de aplicar, la tira no debe moverse la tira una vez colocada en la placa de agar<sup>(60)</sup>.

#### INCUBACION:

Las placas de agar deben de ser incubadas inmediatamente para evitar efectos adversos.

Recomendaciones para incubación:

AEROBIOS: 35°C /16 a 18 horas en atmósfera ambiental para aeróbios de no difícil crecimiento y anaerobios facultativos.

BACTERIAS DE DIFÍCIL CRECIMIENTO: 35°C /18 a 24 horas en atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub>.

ANAEROBIOS: 35°C/ 24-48-72 horas en atmósfera anaerobio, de 80 a 85 % de nitrógeno, del 5 al 10 % de CO<sub>2</sub> y 10 % de H<sub>2</sub>(60).

#### INTERPRETACION:

La lectura se realizara en el punto de completa inhibición de crecimiento, se recomienda leer el valor de MIC en el punto de intersección de la elipse de inhibición(4, 22, 60).

#### JUSTIFICACION TEORICA :

El incremento de la incidencia en problemas ácido pépticos relacionados con la presencia de *H.pylori* en la mucosa gástrica se ha vuelto importante hoy en día, por lo que son necesarios estudios que estén encaminados a disponer de información de resistencia a los antibióticos recomendados en el esquema de tratamiento aprobado por la FDA (Administration of Drugs and Food en 1997) para contar con alternativas de tratamiento cuando se fracasa en un primer intento.

ANAEROBIOS: 35°C/ 24-48-72 horas en atmósfera anaerobio, de 80 a 85 % de nitrógeno, del 5 al 10 % de CO<sub>2</sub> y 10 % de H<sub>2</sub>(60).

#### INTERPRETACION:

La lectura se realizara en el punto de completa inhibición de crecimiento, se recomienda leer el valor de MIC en el punto de intersección de la elipse de inhibición(4, 22, 60).

#### JUSTIFICACION TEORICA :

El incremento de la incidencia en problemas ácido pépticos relacionados con la presencia de *H.pylori* en la mucosa gástrica se ha vuelto importante hoy en día, por lo que son necesarios estudios que estén encaminados a disponer de información de resistencia a los antibióticos recomendados en el esquema de tratamiento aprobado por la FDA (Administration of Drugs and Food en 1997) para contar con alternativas de tratamiento cuando se fracasa en un primer intento.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA :**

Frente a los datos seroepidemiológicos en México que revelan una infección por *H.pylori* en el 20 % de los niños menores de un año, del 50 % a los 10 años y del 80 % a los 25 años y ante la escasez de información en nuestro país con relación al estudio de sensibilidad antimicrobiana de *H.pylori*, éste estudio pretende esclarecer la sensibilidad a los antibióticos de elección para tratamiento por medio de una prueba comercial de sensibilidad conocida como “E TEST” en biopsias de estómago de antro y cuerpo tanto en niños como en adultos con enfermedad ácido péptica que acuden al hospital de Pediatría y de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI.

## **OBJETIVOS:**

- 1.- Determinar la sensibilidad de *H.pylori* a los agentes antimicrobianos (claritromicina, metronidazol y amoxicilina ) recomendados en el esquema de tratamiento aprobado por la FDA tanto para niños como en adultos con enfermedad ácido péptica .
- 2.- Estudiar y comparar el patrón de sensibilidad de las cepas de *H. pylori* de antro y cuerpo de estómago, en niños y adultos con enfermedad ácido péptica.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA :**

Frente a los datos seroepidemiológicos en México que revelan una infección por *H.pylori* en el 20 % de los niños menores de un año, del 50 % a los 10 años y del 80 % a los 25 años y ante la escasez de información en nuestro país con relación al estudio de sensibilidad antimicrobiana de *H.pylori*, éste estudio pretende esclarecer la sensibilidad a los antibióticos de elección para tratamiento por medio de una prueba comercial de sensibilidad conocida como "E TEST" en biopsias de estómago de antro y cuerpo tanto en niños como en adultos con enfermedad ácido péptica que acuden al hospital de Pediatría y de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI.

## **OBJETIVOS:**

- 1.- Determinar la sensibilidad de *H.pylori* a los agentes antimicrobianos (claritromicina, metronidazol y amoxicilina ) recomendados en el esquema de tratamiento aprobado por la FDA tanto para niños como en adultos con enfermedad ácido péptica .
- 2.-Estudiar y comparar el patrón de sensibilidad de las cepas de *H. pylori* de antro y cuerpo de estómago, en niños y adultos con enfermedad ácido péptica.

## **HIPOTESIS :**

Ante la asociación de *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedad ácido péptica en México y considerando que no se han reportado estudios relacionados con la sensibilidad de cepas a los antibióticos recomendados en la triple terapia aprobada por la FDA, se espera obtener una resistencia de cepas a metronidazol superior al 50 %, una resistencia no mayor al 10 % en claritromicina y ausencia de resistencia para amoxicilina en ambas poblaciones de estudio, verificando si en México el comportamiento de resistencia es igual al encontrado en países en vías de desarrollo

Con relación a lo hallado por Atherthon y Kyi se espera un mayor patrón de resistencia en la región del antro del estómago en ambas poblaciones de estudio .

## **PROGRAMA DE TRABAJO :**

Diseño de estudio :Transversal,prospectivo descriptivo y observacional..

Descripción del estudio : Se incluyó un grupo de niños con dolor abdominal crónico recurrente para búsqueda de infección por *H.pylori* y que estuvieron dispuestos a recibir terapia de erradicación; así mismo un grupo de adultos con pronóstico de enfermedad ácido péptica y que estuvieron dispuestos a recibir terapia de erradicación que fueron captados durante el periodo comprendido de septiembre de 1996 a septiembre de 1997.

## **HIPOTESIS :**

Ante la asociación de *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedad ácido péptica en México y considerando que no se han reportado estudios relacionados con la sensibilidad de cepas a los antibióticos recomendados en la triple terapia aprobada por la FDA, se espera obtener una resistencia de cepas a metronidazol superior al 50 %, una resistencia no mayor al 10 % en claritromicina y ausencia de resistencia para amoxicilina en ambas poblaciones de estudio, verificando si en México el comportamiento de resistencia es igual al encontrado en países en vías de desarrollo

Con relación a lo hallado por Atherthon y Kyi se espera un mayor patrón de resistencia en la región del antro del estómago en ambas poblaciones de estudio .

## **PROGRAMA DE TRABAJO :**

Diseño de estudio :Transversal,prospectivo descriptivo y observacional..

Descripción del estudio : Se incluyó un grupo de niños con dolor abdominal crónico recurrente para búsqueda de infección por *H.pylori* y que estuvieron dispuestos a recibir terapia de erradicación; así mismo un grupo de adultos con pronóstico de enfermedad ácido péptica y que estuvieron dispuestos a recibir terapia de erradicación que fueron captados durante el periodo comprendido de septiembre de 1996 a septiembre de 1997.

## POBLACIONES DE ESTUDIO:

### (ADULTOS)

criterios de inclusión y exclusión : Para el caso de los adultos se estudiaron pacientes con enfermedad ácido péptica atendidos en el servicio de Gastroenterología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS; se incluyeron pacientes mayores de 18 años sin importar sexo.

No se incluyeron mujeres embarazadas, ni pacientes con enfermedad crónica degenerativa o hematológica, ni pacientes con úlcera complicada. Tampoco fueron incluidos pacientes que hubieran recibido antibióticos o inhibidores de la bomba de protones en los últimos 30 días ni pacientes con HIV.

### (NIÑOS)

Criterios de inclusión y exclusión : Se estudiaron niños con dolor abdominal crónico recurrente atendidos en el servicio de gastroenterología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI. Se incluyeron niños de 2 a 17 años de edad (de acuerdo a la clasificación propuesta en la enciclopedia médica moderna ) sin importar el sexo sometidos a endoscopia de tubo digestivo alto por dolor abdominal crónico y que fueron captados durante el periodo de septiembre de 1996 a septiembre de 1997 .

No se incluyeron pacientes que hubieran ingerido antibióticos o inhibidores de la bomba de protones en los últimos 30 días, ni pacientes con infección por HIV.

## **MATERIAL**

tubos ependorff 1.0-.5ml (Elkay)

puntas para micropipeta (Labsystems)

contenedor de transporte

criotubos 1.0-1.5ml(Nunc)

hisopos

tubos de 13X100 con rosca(Pyrex)

matraz erlenmeyer 125ml y 2000(Pyrex)

pipeta graduada de 10 ml(Pyrex)

portaobjetos (Corning)

cajas para refrigeración

asas bacteriológicas

mechero bunsen

cajas petri de plástico 8.5cm(Corning)

pinzas

cinta testigo

boligrafo de tinta indeleble

guantes (Exam-Tex)

bata

probeta graduada de 1000ml(Pyrex)

agitador magnético

espatula

## **EQUIPO**

Micropipetas(Labsystems)

campana de flujo laminar(Nuair)

homogenizadores de vidrio

incubadora de CO<sub>2</sub>

microscópio (Nikon)

balanza analítica (Sartorius)

refrigerador 4°C

congelador a -20°C

plancha de agitación (Lab-line)

sistema de autoclave (Fehlmex)

computadora

impresora.

## REACTIVOS

solución salina 0.85%

tiras impregnadas de :

-metronidazol

-amoxicilina

-claritromicina

base de agar sangre

caldo bruscella

glicerol

sangre desfibrinada de caballo

peroxido de hidrógeno 3%

caldo urea con rojo de fenol

prueba comercial para oxidasa

tinción de gram

-cristal violeta

-lugol

-mezcla alcohol-acetona

-safranina

aceite de inmersión

nefelómetro Mc Farland

mezcla de antibióticos

-acido nalidixico

-anfotericina B

-sulfametoxazol-trimetropim

-vancomicina



## **METODOLOGIA :**

1.-Toma de la muestra: Se practicó endoscopia tomando 2 biopsias tanto de la región antral como del cuerpo trasladándose en tubos ependorff con 300 µl de solución salina sobre hielo frappe (aproximadamente a 4°C ).

2.-Procesamiento: Cada biopsia fue macerada con homogenizadores de vidrio esmerilado y se inocularon en placas de agar sangre de caballo al 10 % con y sin antibióticos. Se incubaron a 37°C en una atmósfera microaerofílica con generación de CO<sub>2</sub> (Campy pak plus ) de 3 a 10 días.

3.-Identificación: Para el caso de observación de desarrollo colonial puntiforme con borde regular en forma de gotas de rocío y presencia de β hemolisis en agar sangre de caballo al 10 %, se realizaron pruebas confirmatorias de ureasa, catalasa y tinción de Gram (bacilos cortos delgados, Gram negativos en forma espiral o en forma de “U” ).

4.-Sensibilidad: Las cepas aisladas se les realizó estudio de sensibilidad antimicrobiana mediante la prueba “E TEST” (modificación de la técnica de dilución en disco) para claritromicina, amoxicilina y metronidazol, observando la Concentración Mínima Inhibitoria de susceptibilidad de acuerdo a los siguientes valores de cohorte : Amoxicilina 4µg/ml, Claritromicina 8µg/ml y 32µg/ml para Metronidazol.

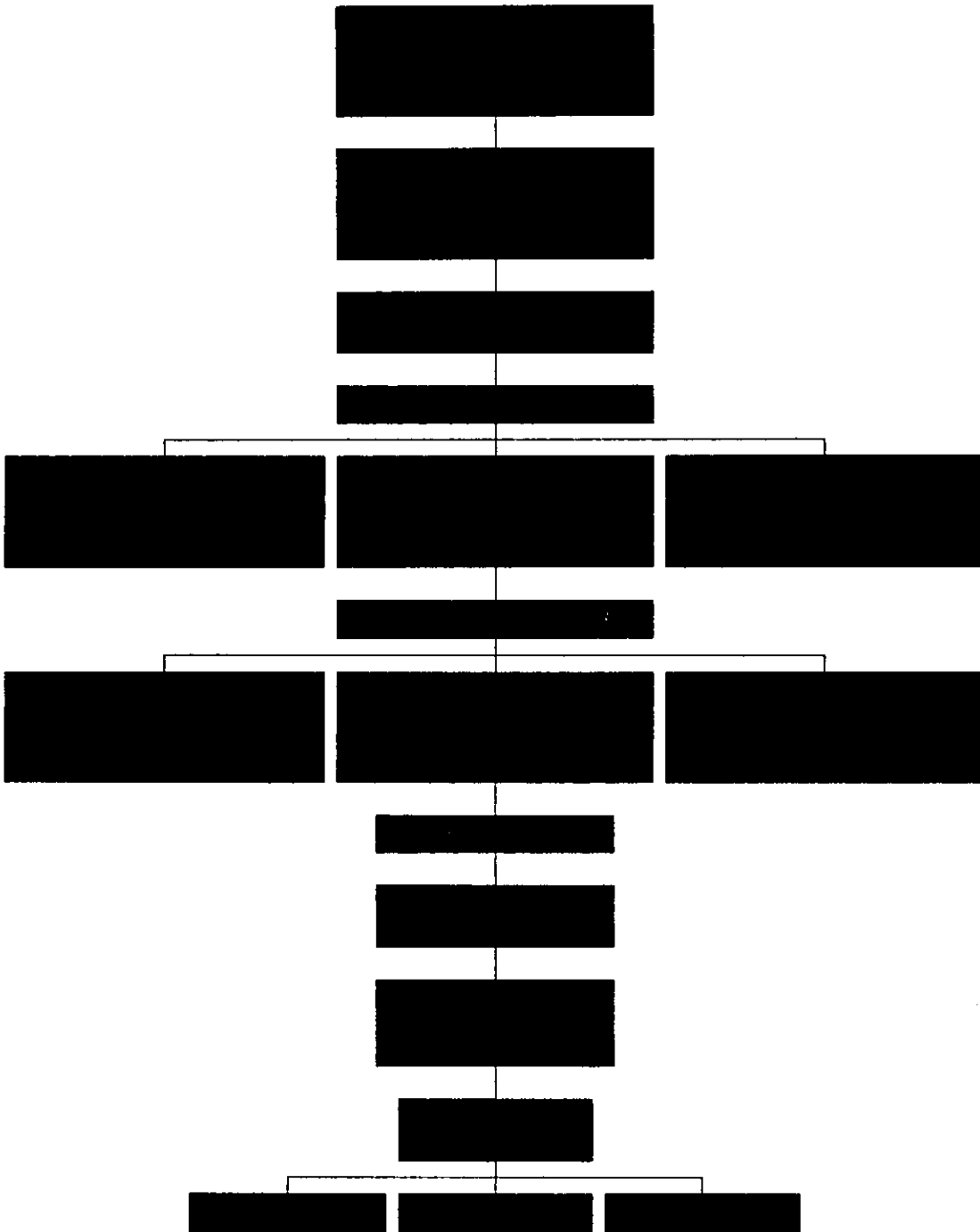
5.-Preservación: Las cepas estudiadas se suspendieron en caldo brucella más glicerol al 15 % y se conservaron a -70°C en nitrógeno líquido.

DIAGRAMA

DE

FLUJO

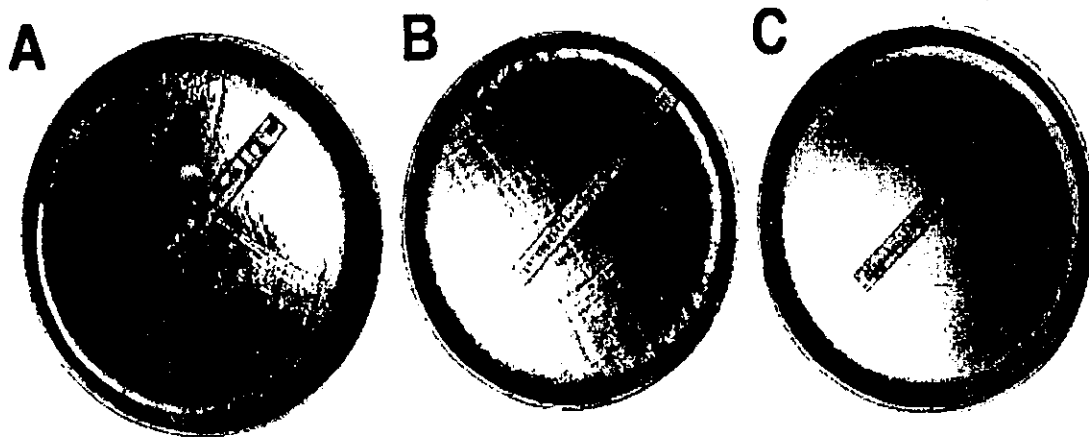
:



## RESULTADOS:

Se estudio la resistencia de 120 cepas de adultos y de 40 cepas de niños de acuerdo a la metodología descrita.

Se consiguió el aislamiento de 40 cepas de niños .



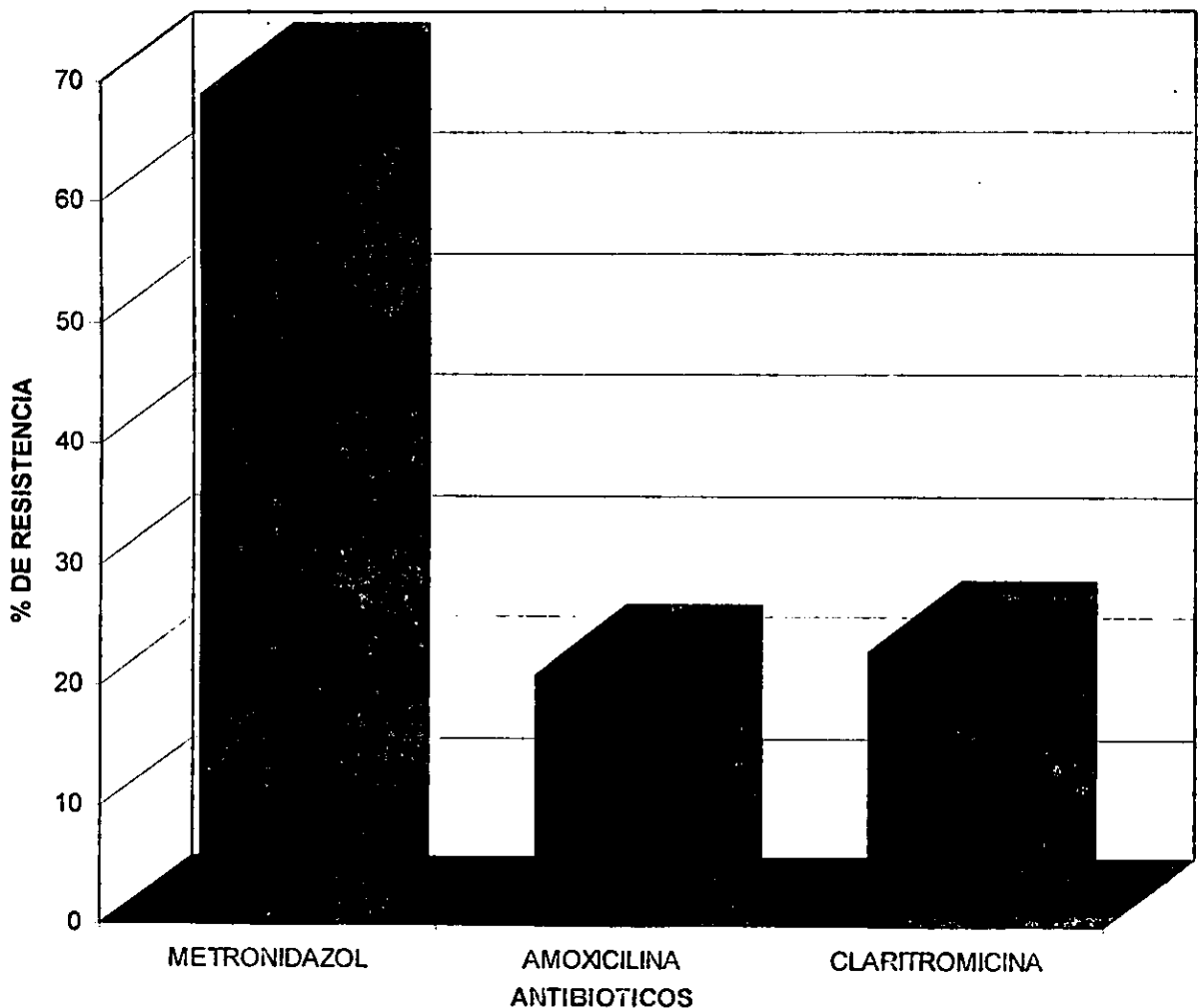
La interpretación de la prueba de sensibilidad “E TEST” se determinó de acuerdo a la zona en donde se observó la elipse de inhibición manifestada por la ausencia de colonias en la zona proxima a la tira de E TEST en el medio de cultivo .

A=Resistente

B= Escasamente sensible

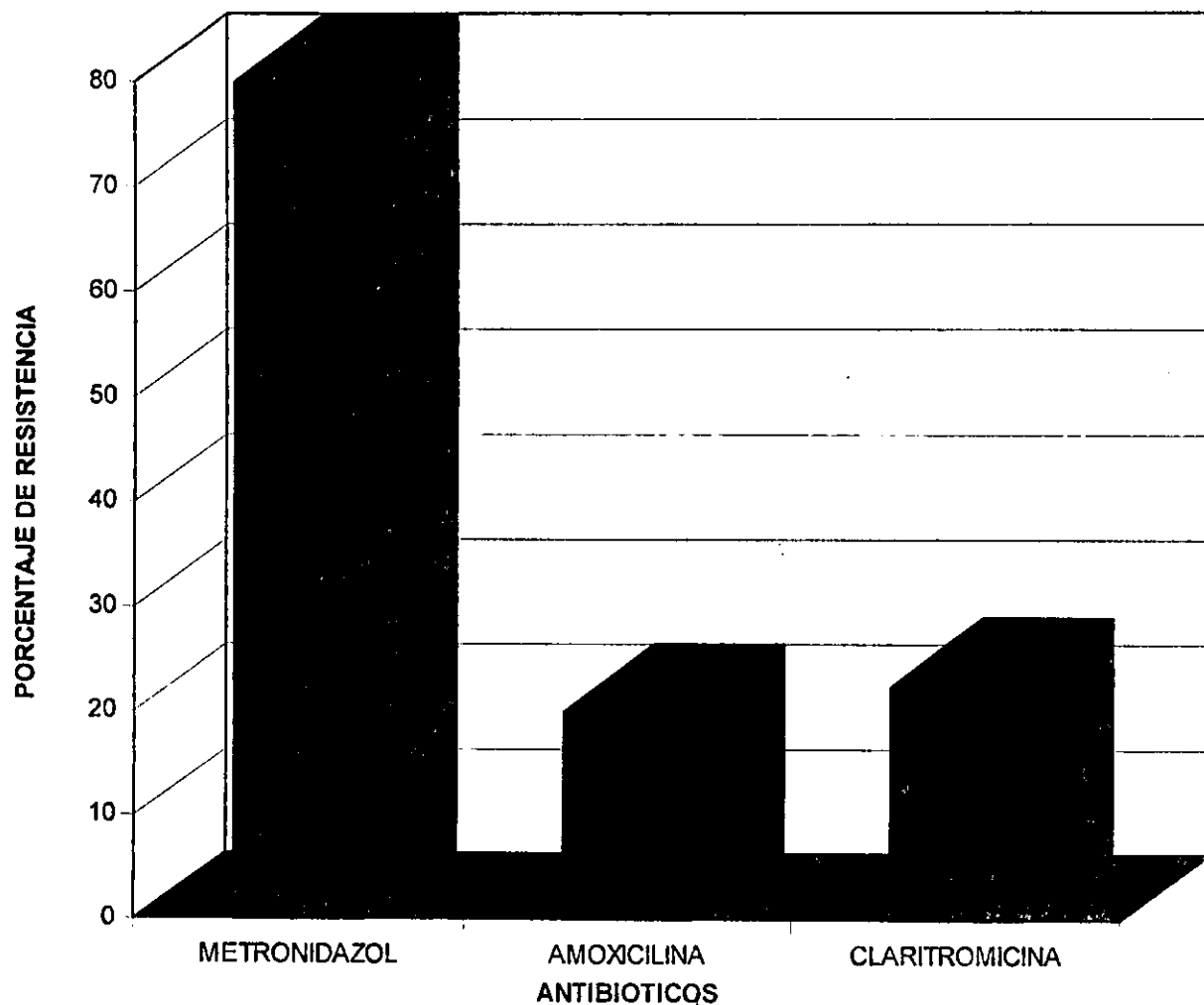
C=Sensible.

## RESISTENCIA DE CEPAS DE H.pylori DE ADULTOS A LOS DIFERENTES ANTIBIOTICOS RECOMENDADOS EN LA TRIPLE TERAPIA



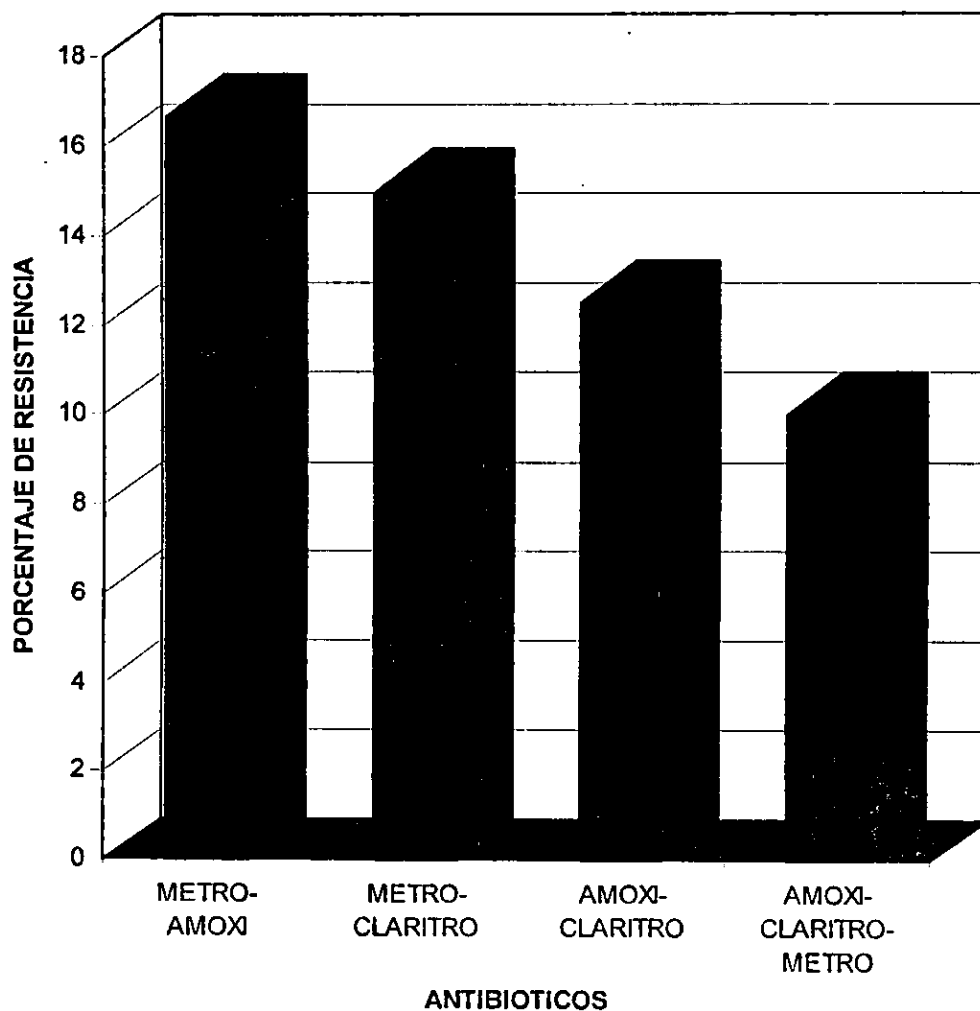
La resistencia de cepas aisladas de adultos fue más acentuada en metronidazol alcanzándose un porcentaje mayor al 60 % (69.16%) lo que pone en duda su aplicación clínica. El porcentaje es muy parecido al encontrado en países en vías de desarrollo. A la fecha no se han reportado cepas resistentes a amoxicilina, en este estudio se encontró una resistencia del 20.83 % del total de las cepas. La resistencia a claritromicina fue del 22.5% lo que da un 77.5% de cepas sensibles a éste antibiótico.

## RESISTENCIA DE CEPAS DE H.pylori DE NIÑOS A LOS ANTIBIOTICOS RECOMENDADOS EN LA TRIPLE TERAPIA



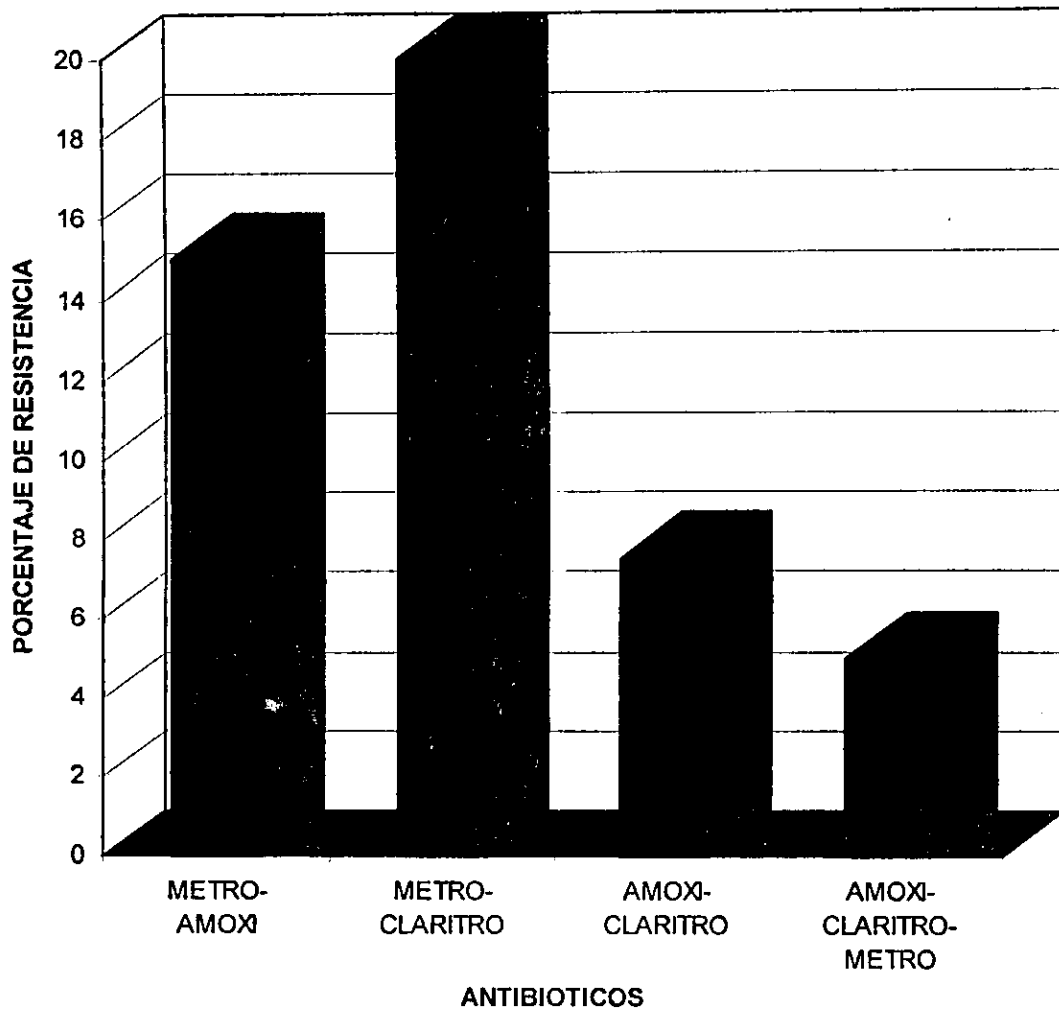
La resistencia en cepas de niños fue mayor para metronidazol (80%) poniendo en duda su aplicación clínica, se encontró un porcentaje del 20% de cepas resistentes a amoxicilina, la resistencia a claritromicina fue igual a la encontrada en las cepas de adultos del 22.5%. Claritromicina y amoxicilina son los antibióticos con menor patrón de resistencia al igual que en las cepas de adultos.

## MULTIRESISTENCIA DE CEPAS DE H.pylori DE ADULTOS A LOS DIFERENTES ANTIBIOTICOS RECOMENDADOS EN LA TRIPLE TERAPIA



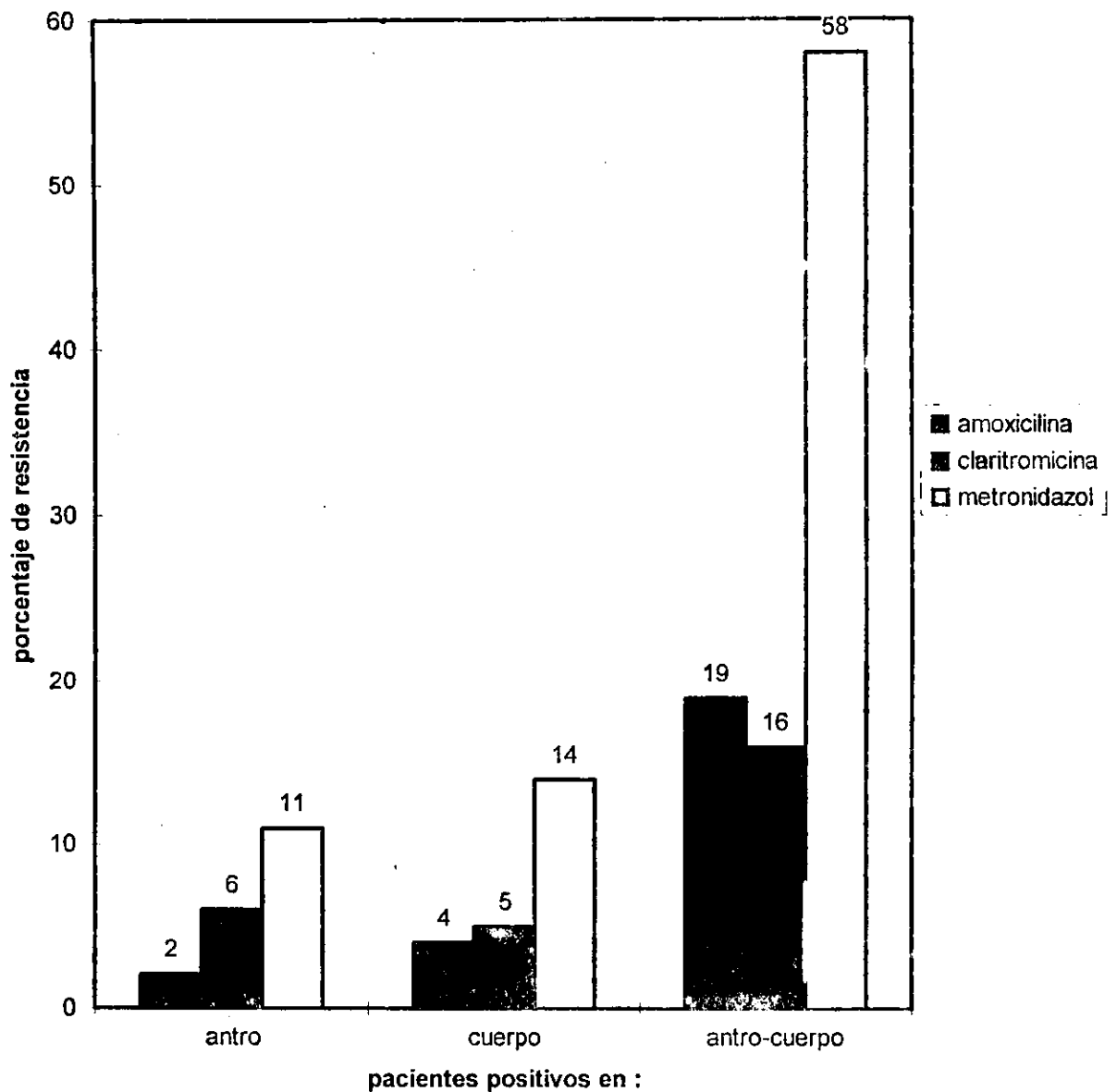
Se encontraron cepas resistentes a más de dos antibióticos (10%) siendo el pronóstico reservado en la erradicación de éstas cepas. Considerando que la triple terapia consiste en la combinación de 2 antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones, la resistencia a 2 antibióticos fue mayor en la combinación de metronidazol y amoxicilina (16.66%), para metronidazol y claritromicina fue del 15% de resistencia, la combinación que brinda una menor resistencia es amoxicilina y claritromicina (12.5%).

## MULTIRESISTENCIA DE CEPAS DE H.pylori DE NIÑOS A LOS ANTIBIOTICOS RECOMENDADOS EN LA TRIPLE TERAPIA



Se observó una resistencia de un 5% de cepas a más de dos antibióticos. La combinación que presenta un menor porcentaje de resistencia es amoxicilina y claritromicina (7.5%). La combinación con mayor porcentaje de resistencia fue metronidazol y claritromicina (20%). La resistencia a metronidazol y amoxicilina fue del 15%.

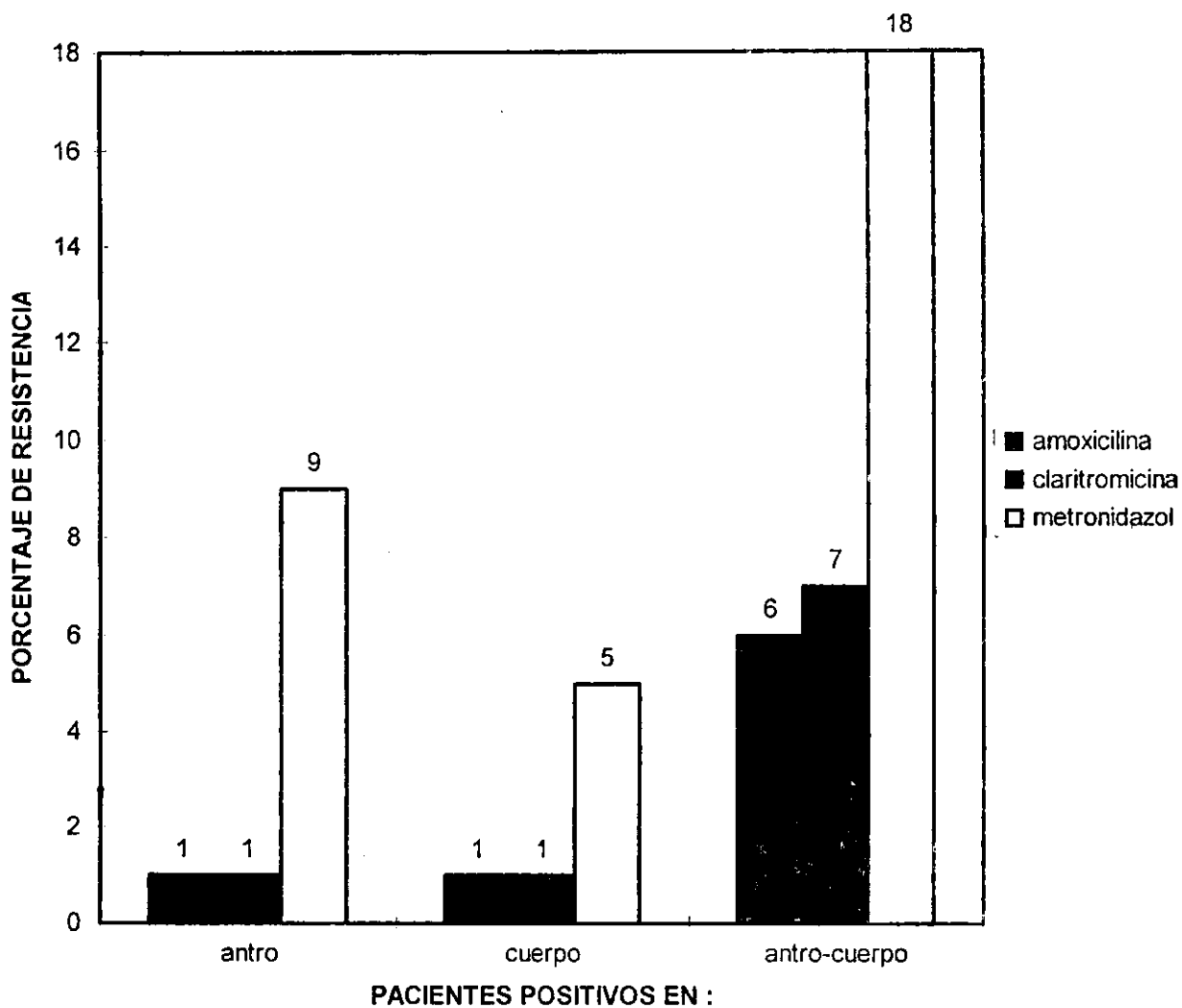
## RESISTENCIA DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* EN LAS REGIONES DEL ESTOMAGO DE PACIENTES ADULTOS (n=120)



Se encontró una mayor resistencia en la región del cuerpo para amoxicilina(4%) y metronidazol(14%)en tanto que para claritromicina se observó una mayor resistencia en la región del antro.el mayor patrón de resistencia en ambas regiones fue la de metronidazol.El comportamiento de resistencia es muy similar en ambas regiones para los tres antibióticos.



**RESISTENCIA DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* EN LAS REGIONES DEL ESTOMAGO DE NIÑOS**



La resistencia a amoxicilina y claritromicina fue la misma en ambas regiones (1%). El patrón de mayor resistencia a los antibióticos fue registrado para metronidazol, (9 y 5 %) resultando la zona del antro la más afectada. El patrón de resistencia para amoxicilina y claritromicina fue el mismo en ambas regiones.

[REDACTED] :

Diversos estudios han reportado la susceptibilidad de *H. pylori* a varios agentes antimicrobianos utilizando diferentes métodos para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria(MIC). En la actualidad no se cuenta con un método estándar de sensibilidad para *H. pylori* debido a la escasez de crecimiento y a los numerosos aditivos en el medio de cultivo y a la atmósfera microaerofílica<sup>(16,41)</sup> .En éste estudio se consiguió determinar la susceptibilidad de cepas de *H. pylori* a los tres antibióticos de mayor manejo en la triple terapia usando un nuevo método de determinación de sensibilidad a antimicrobianos conocida como E TEST.Se encontró una resistencia marcada a metronidazol(69.16 y 80% en cepas de adultos y niños respectivamente ) muy similar a los reportes encontrados por varios centros de estudio en países en vías de desarrollo en donde el porcentaje rebasó fácilmente el 50 %<sup>(1,7,13,16,41)</sup> . En un estudio realizado con niños españoles se encontró una resistencia de un 10% en 1991 y 16 % en 1994 para metronidazol que contrasta notablemente con lo encontrado en países en vías de desarrollo.<sup>(38,41)</sup>.Entre los hallazgos más sobresalientes se destaca un 10.84% de mayor resistencia a metronidazol en cepas aisladas de la población infantil que en las cepas aisladas de adultos.De acuerdo a los resultados el uso de este antibiótico se pone en duda sin embargo no se cuenta con suficientes argumentos de su efectividad in vivo ; varios autores han destacado ésta elevada resistencia atribuyéndola a situaciones en las que muchos pacientes tienen previo contacto con nitroimidazoles por otras razones terapéuticas<sup>(211,39,41)</sup> .

La resistencia a amoxicilina no ha sido reportada por lo que se considera uno de los antibióticos de elección en la triple terapia ; en este estudio se encontró una resistencia mayor al 20 % lo que puede levantar la sospecha de que su manejo en éstas poblaciones a sido inadecuado. Como puede observarse la sensibilidad a amoxicilina es del 80 por ciento por lo que puede ser recomendado como uno de los antibióticos de elección para establecerse en el esquema de triple terapia. Algunos autores han encontrado una sensibilidad mayor al 80 % de cepas de *Helicobacter pylori* utilizando amoxicilina y un inhibidor de la bomba de protones argumentando que se favorece su absorción del antibiótico al aumentar el pH del estomago<sup>(45,46)</sup>. La resistencia a claritromicina resulto ser igual en ambas poblaciones de estudio(22.5%), sin embargo al igual que amoxicilina siguen siendo recomendados en la triple terapia por su 77.5 % de sensibilidad en las cepas de *H.pylori* . En otras partes del mundo se ha reportado una resistencia cercana al 12 % a claritromicina además de que se ha obtenido una erradicación mayor del 54 % utilizando éste antibiótico como monoterapia<sup>(39,40,41,42)</sup>. Es importante mencionar que la sensibilidad a amoxicilina y claritromicina sigue siendo de importancia en las cepas de esta población de estudio tratándose de un país en vías de desarrollo.

Se encontraron cepas multirresistentes a más de dos antibióticos obteniéndose un 5 % para cepas de niños y un 10 % para cepas de adultos lo que hace complicado el implementar un esquema eficiente de erradicación con éstos tres antibióticos en éstos paciente.

Se han llevado a cabo estudios en diferentes partes del mundo en donde se ha propuesto combinaciones de antibióticos como alternativa en aquellas cepas que son difíciles de erradicar (39,40,42) Se ha propuesto por varios autores que la presencia de un inhibidor de la bomba de protones puede tener un efecto sinérgico o facilitar la absorción de algún antimicrobiano, la implementación de este dispositivo con alguna combinación de antibióticos con baja resistencia puede tener un panorama más alentador en aquellas cepas resistentes a los antibióticos de mayor manejo en la triple terapia. En este estudio la combinación de amoxicilina y claritromicina resultó ser la combinación más baja de todas las combinaciones por lo que se recomienda como primer punto en una propuesta de erradicación. La combinación más alta resultó ser amoxicilina metronidazol (16.66%) en cepas de adultos y metronidazol claritromicina (20%) en niños. Varios estudios han demostrado la existencia de una fuerte asociación en la colonización de la mucosa gástrica con *Helicobacter pylori* en la región del antro debido a la presencia de una menor cantidad de células parietales en esta zona (17,18,38,39,42). En este estudio en lo que se refiere a la resistencia en las regiones del estómago se encontró una resistencia mayor en el cuerpo (23 de 120) en las cepas de adultos y en las cepas de niños el blanco principal fue el antro (11 de 40) podría argumentarse con este resultado que la zona de mayor resistencia para *helicobacter pylori* en los adultos es la zona del cuerpo mientras que para los niños resulta ser el antro aunque el patrón de resistencia a los antibióticos fue muy similar en ambas regiones del estómago.

## CONCLUSIONES:

Una vez terminada la parte experimental se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- 1.- La resistencia metronidazol fue superior al 50% tanto para cepas de niños como para adultos.
- 2.- El porcentaje de resistencia a claritromicina fue igual tanto en cepas de niños como de adultos .
- 3.- Se encontraron cepas resistentes a amoxicilina superando un patrón de resistencia del 20 % .
- 4.-Se encontraron cepas resistentes a más de dos antibióticos 5% en cepas de niños y 10 % para cepas de adultos .
- 5.- La combinación de amoxicilina claritromicina resulto ser la de menor resistencia por lo que puede sugerirse en un esquema de tratamiento.
- 6.- La zona en la que se localizo mayor resistencia en las cepas de adultos fue el cuerpo , en tanto la zona de mayor resistencia para las cepas de niños fue el antro.

## RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS :

De acuerdo a lo encontrado en este estudio se recomienda la combinación de amoxicilina y claritromicina como antibióticos de elección en la triple terapia.

Es importante considerar que los resultados obtenidos en este estudio son de sensibilidad in vitro. La utilización de la técnica "E TEST" resulto ser de gran utilidad en la determinación de sensibilidad de las cepas de *Helicobacter pylori* a los tres antibióticos recomendados en la triple terapia, considerándose al final de la parte experimental como una técnica sencilla, confiable y reproducible. Se recomienda además correlacionar éstos resultados con otro método de sensibilidad.

## ANEXO:

### Medio de cultivo Agar sangre de caballo al 10%

Agar .....	11g
Caldo Brusella .....	28g
Sangre de Caballo .....	100ml
Agua caliente .....	1100ml

## RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS :

De acuerdo a lo encontrado en este estudio se recomienda la combinación de amoxicilina y claritromicina como antibióticos de elección en la triple terapia.

Es importante considerar que los resultados obtenidos en este estudio son de sensibilidad in vitro. La utilización de la técnica “E TEST” resulto ser de gran utilidad en la determinación de sensibilidad de las cepas de *Helicobacter pylori* a los tres antibióticos recomendados en la triple terapia, considerándose al final de la parte experimental como una técnica sencilla, confiable y reproducible. Se recomienda además correlacionar éstos resultados con otro método de sensibilidad.

## ANEXO:

### Medio de cultivo Agar sangre de caballo al 10%

Agar .....	11g
Caldo Brusella .....	28g
Sangre de Caballo .....	100ml
Agua caliente .....	1100ml

- A) En un matraz de 2 Litros se disolvió el agar y el caldo brusella , se esterilizó durante 15 min a 121°C y 15 lb.
- B) Se dejó enfriar de 40 a 45 °C
- C) Se incorporo la sangre de Caballo y se agito ligeramente evitando la formación de burbujas .
- D) Se colocó aproximadamente 10 ml de medio en cada caja y se irradiaron por 15 minutos con luz ultravioleta.

**Medio de cultivo agar sangre de Caballo al 10% con antibióticos**

Se preparó el medio de cultivo como se indico anteriormente agregando la siguiente mezcla de antibióticos después de incorporar la sangre .

- Acido nalidixico .....100mg
- Trimetropin..... 50mg
- Vancomicina .....30 mg
- Anfotericina .....20 mg

**Prueba de Ureasa para la identificación de *H.pylori***

- Urea.....0.03g
- D-PBS al 1X.....50.00ml
- Rojo de fenol.....0.10ml

A)Se disolvió la urea en D-PBS.Se filtró con membrana de 0.22 µ a un matraz estéril .



B)Se adicionó el rojo de fenol al 1% en condiciones de esterilidad .

C)Se conservó en refrigeración.

**Reactivo para prueba de catalasa**

Peróxido de hidrogeno.....30ml

Agua desionizada .....100ml

**Reactivo comercial para oxidasa**

Colocar una asada de la cepa sobre la superficie si se registra un cambio obscuro la prueba es positiva.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. -Monés J, Sáinz S, Sancho F J. *Helicobacter pylori* en patologías digestivas. *Medicina Integral* 1994; 8: 435-47.
- 2.-P Cornelius, Cohen H, LPatrick, Bauer M, Appleman M, Pérez Pérez G, Blaser M J. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* 1989;321:1562-6.
- 3.-Wallace J L. Possible Mechanisms and mediators of gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1991;26 Suppl 187:65-70.
- 4.-Glupczynski Y, Labbe M, Hanssen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2072-2075.
- 5.-Kreuning J, Lindeman J, Biemond I, Lamers C B H W. Relation between IgG and IgA antibody titres against *Helicobacter pylori* in serum and severity of gastritis in asymptomatic subjects. *J Clin Pathol* 1994; 47: 227-231.
- 6.-Fennerty Brian M. *Helicobacter pylori*. *Arch Intern Med* 1994; 154: 721-727.

7.-Axon R A T, Quina M.Ten- year milestones. Currents Science Ltd ISBN 1-85922-189-0.

8.-Cover T L, Blaser M J. *Helicobacter pylori* : A bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. ASM News 1995; 61:21-25.

9.-Blaser J M, Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori* -induced inflammation. Gastroenterology 1992;102: 720-725.

10.-Oliveira A M R, Queiroz D M M, Rocha G A, Mendes E N.Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in belo horizonte,Brazil. A J G 1994; 89: 2201-2204.

11.-Shimada T, OguraK, Ota S, Et al .Identification of *Helicobacter pylori* in gastric specimens, gastric juice, saliva, and faeces of japanese patients. The Lancet 1994; 343: 1636-7.

12.-Madrazo de la Garza J A . Eradicación del *Helicobacter pylori* y dolor abdominal crónico. Rev Gastroenterol Méx 1996; 61(4) : 398-399.

13.-Megraud F . Advantages and Disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori* .Scand J Gastroenterol 1996; 31 suppl 215: 57-62.

14.-Kosunen T U, Seppala K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*.

15.-Grubel P, Hoffman J S, Chong F K, Burstein N A, Mepani C, Cave D R. Vector potential of houseflies (*musca domestica* ) for *Helicobacter pylori* . J Clin Microbiol 1997; 35(6): 1300-1303.

16.-Tytgat G N J. Antimicrobial therapy for *Helicobacter pylori* infection . Helicobacter 1997; 2 (Supp 1) :81-88.

17.-Gerstenecker B, Eschweiler B; Vogele H, Koch H K, Hellerich U, Kist M. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections with an enzyme immunoassay using the chromatographically purified 120 kilodalton protein. Eu J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11(7): 595-601.

18.-Boren T, Falk P. *Helicobacter pylori* binds to blood group antigens. Science & Medicine 1994; sep-oct:28-37.

19.-Sander J O, Veldhuyzen V Z, Timothy P P, Best M L,Bezanson S G, Marrie T. Increasing prevalence of *Helicobacter pylori* infection with age : continuous risk of infection in adults rather than cohort effect. J I D 1994; 169: 434-437.

20.-Atherton C J, Tham T K, Peek M R, Cover L T, Blaser J M, Density of *Helicobacter pylori* infection in vivo as assessed by quantitative culture and histology. *J ID* 1996; 174: 552-556.

21.- Piccolomini R, Di bonaventura G, Catamo G, Carbone F, Neri M. 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* 1997; 35(7): 1842-1846.

22.-Weel J L F, Van der Hulst M R W, Gerrits Y, Tytgat J G N, Ende V A, Dankert J. Heterogeneity in susceptibility to metronidazole among *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis or peptic ulcer disease. *J Clin Microbiol* 1996; 34(9) : 2158-2162.

23.-Logan R P H. Adherence of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10(suppl1 ): 3-15.

24.-Jaskiewicz K, Louw J A, Marks I N. Local cellular and immune response by antral mucosa in patients undergoing treatment for eradication of *Helicobacter pylori*. *Digestive Diseases and Sciences* 1993; 38(5): 937-943.

25.-Isakov A V, Grigoriev Y P, Yakovenko P E, Treatment of *Helicobacter pylori* positive duodenal ulcers. *Lancet* 1990; 336: 755-756.

- 26.-Peterson L W. Helicobacter pylori y enfermedad ulcero peptica. Infectologia 1994;14(6) : 279-288.
- 27.-Lind T ,Veldhuyzen S, Unge P, Et al. The mach 1 study optimal one-week treatment for Helicobacter pylori defined? . 1996; 1: 138-144.
- 28.- Sahay P, Axon R A T. Reservoirs of Helicobacter pylori and modes of transmission. Helicobacter 1996; 1(3) : 175-182.
- 29.-Haruma K, Kawaguchi H, Kohmoto K, Okamoto S, Yoshihara M, Sumi K, Kajiyama G. Helicobacter pylori infection, serum, gastrin, and gastric acid secretion in teenage subjects with duodenal ulcer, gastritis or normal mucosa . Scand J Gastroenterol 1995; 30:322-326.
- 30.-Demagistris M T, DiTommaso A, Bugnoli M, Et al . T -lymphocyte response to Helicobacter pylori in peripheral blood and gastric mucosa of patients with gastritis. Eu J Gastroenterol Hepatol 1993; 5(suppl 2 ): S25-S26.
- 31.-Mobley T L H, Hu L T, Foxall A P. Helicobacter pylori urease: properties and role in pathogenesis. Scand J Gastroenterol 1991; Suppl 187: 39-46.

32.-Bateson M C. Gastroenterology-1 : gastroduodenal disease and *Helicobacter pylori*.  
Postgrad Med J 1994; 70: 561-567.

33.-Lynch F A D, Mapstone P N, Clarke T M A , Et al .Cell proliferation in  
*Helicobacter pylori* associated gastritis and the effect of eradication therapy. Gut 1995;  
36: 346-350.

34.-Borody J T, Andrews P, Fracchia G, Brandl S, Shortis P N, Bae H. Omeprazole  
enhances efficacy of triple therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. Gut 1995; 37:  
477-481.

35.-Murray R P, Baron J E, Pfaller A M. Manual of clinical microbiology . 6<sup>th</sup>. USA :  
ASM PRESS, 1995: 1: 492-497.

36.-Narikawa S, Kawai S, Aoshima H, Et al . Comparison of the nucleic acids of helical  
and coccoid forms of *Helicobacter pylori* . Clin Diagn Lab Immunol 1997; 4(3): 285-  
290.

37.-Kusters J G, Gerrits M M, Van Strisp G A, Vanderbroucke G. Coccoid forms of  
*Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death . Infect Immun  
1977; 65(9): 3672-3679.

38.-Walt R P, Metronidazole resistant *H.pylori* of questionable clinical importance .  
Lancet 1986; 1: 489-492.

39.-Peterson L W, Graham Y D, Marshall B , Et al. Clarithromycin as monotherapy for  
eradication of *Helicobacter pylori*: A randomized double blind trial . A J G 1993; 88(1):  
1860-1864.

40.- Treiber G, The influence of drug dosage on *Helicobacter pylori* eradication: A cost-  
effectiveness analysis . A J G 1996; 91(2) :246-257.

41.- Dunn E B, Cohen H, Blaser J M. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997;  
10(4): 720-741.

42.-Prasad M V, Santogade P, Cutler F A. H. *Pylori* IgG serology following successful  
eradication four year follow-up. Gastroenterology 1995; 108(4): A195.

43.- Pommerien W, Braun M, Idstrom P J,Wrangstadh M. No interaction between  
omeprazole and amoxicilin during combination therapy in *Helicobacter pylori* positive  
healthy subjects. Gastroenterology 1995; 108(4): A194.

44.-Bartholomeusz F, Belion M. Peak  $^{14}\text{CO}_2$  excretion smoking, syntoms and  
successful eradication of *H pylori* (Hp) in patients with duodenal ulcer (DU).  
Gastroenterology 1996;110(4):A57.

ESTA TESTE NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



45.-Lamouliatte H, Florent C, Vicari F, Megraud F, Forestier S. Effect of lansoprazole and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1996;110(4): A170.

46.-Lamouliatte H, Cayla R, Talbi P, Zerbib F, Megraud F, De Mascarel A. Randomised study comparing two seven days triple therapies with lansoprazole and low dose of clarithromycin plus amoxicillin or tinidazole for *Helicobacter pylori* eradication. *Gastroenterology* 1996 ;110(4) :A170.

47.-Lamouliatte H, Cayla R, Talbi P, Zerbib F, Megraud F, De Mascarel A. Triple therapy with ppi-amoxicillin, clarithromycin for *H. pylori* eradication the optimal regimen in 1996. *Gastroenterology* 1996; 110: A171.

48.-Lamouliatte H, Courrier A, Mion F, Megraud F, Rio Y , Reverdy E, Flejou F, Topeza M. Triple therapy with roxithromycin - amoxicillin and lansoprazole for *Helicobacter pylori* eradication results of an open multicentre study. *Gastroenterology* 1996; 110: A171.

49.-Ciociola A, Lanza F, Sykes D, Heath A, Mc sorley D, Webb D. Ranitidine bismuth citrate plus clarithromycin is effective in eradicating *H pylori* healing duodenal ulcers and preventing ulcer relapse. *Gastroenterology* 1996;110(4):A172.

50.-Lauria A, Bova F, Luvera A, Artuso D, Borrello P, Polimeni N, Polimeni F. *Helicobacter pylori* eradication and relapse rate of duodenal ulcer after combination therapy with omeprazole plus two antimicrobials :one year follow - up study .Gastroenterology 1996;110:A173.

51.-Mitami S, Takeda H, Asaka M, Possible role of urease in gastric mucosal cell injury induced by *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1996;110(4) :A198.

52.-Peitz U, Nusch A, Tillenburg B, Bewer T, Stolte M, Bursch G, Labenz J. Frequent metronidazole resistance without significant impact on the high cure rate of *Helicobacter pylori* (Hp) infection by triple therapy with omeprazole (ome) metronidazole (met) and clarithromycin (cla). Gastroenterology 1996;110(4):A226.

53.-Peitz N, Tillenburg B, Baumann M, Borsch G, Labenz J. Insufficient validity of a new rapid whole blood test for *Helicobacter pylori* (Hp) infection. Gastroenterology 1996 ; 110(4) :A226.

54.- Jonkers D, Strobberingh E, Stockbrugger R. Omeprazole inhibits growth of gram-positive and gram-negative bacteria including *Helicobacter pylori* in vitro .J Antimicrob Chemother 1996; 37:145-150.

55.-Nagat K, Satoh H, Iwahi T, Shimoyama T, Tamura T. Potent inhibitory action of the gastric proton pump inhibitor lansoprazole against urease activity of *Helicobacter pylori*

:unique action selective for *H. pylori* cell. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(4): 769-774.

56.-Jorgensen J H. Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. J Clin Microbiol 1993; 31(11) :2841-2844.

57.-Bauer A .Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.Am J Clin Path 1996; 45: 493-496.

58.-Heinz L M, Klauss M. Atlas de farmacología.Ediciones científicas y técnicas ;España:1992;244-249.

59.-Cover L T, Blaser J M. Advances in Internal Medicine.USA: Mosby, 1996;41:85-108.

60.-Bolmstrom A, Arvidson S, Ericsson M,Karlsson A. A novel Technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms.ICAAC,poster 120,Los Angeles ,1988.

61.-Catherine P A. Anatomía y fisiología. 10cd,Interamericana,México; 1984: 471-481.

62.-Blaser J M. The bacterial behind ulcers. Scientific American 1996; february : 92-97.

63.-Glupczynski Y, Burette A, De coster E, Nyst J, Deltenre M . Metronidazole resistance in Helicobacter pylori. The Lancet 1990 ; 335: 976-977.

64.- Pantomodel-pantozol,Byk Gulden

65.-Goodwin C S, Blincow E D, Warren J R, Waters T E, Sanderson C R, Easton I. Evaluation of cultural techniques for isolating Campylobacter pyloridis from endoscopic biopsies of gastric mucosa. J Clin Pathol 1985;38:1127-1131.

66.-Austin B, Priest F. Taxonomia bacteriana Moderna. Limusa ,1992; México:145-147.

67.-Romero R. Microbiología y parasitología humana. Medica Panamericana; 1994:México: 274-276.

68.-Branson D. Methods in clinical bacteriology. Springfield USA; Charles C Thomas Publisher :1972; 106.

69.-Morris G K, Patton C M. Campylobacter Manual of clinical microbiology 4th ed .American Society for Microbiology , Washington D.C.

70.-Blaser M J, Berkowitz I D, La Forse J, Cravens L B, Wang L. Campylobacter enteritis: clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med* 1979;91:179-185.