

NUEVOS CONOCIMIENTOS SOBRE EL DIAGNÓSTICO Y LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE HELICOBACTER PYLORI EN CUBA

Autoría principal: Rafael Llanes Caballero

Otros autores: Onelkis Feliciano Sarmiento, Oderay Gutiérrez González, Ángela Gala González, Lidunka Valdés Alonso, Virginia Capó de Paz, Alina Llop Hernández, Leslie Millán Álvarez y Anelys Rodríguez Chávez

Colaboradores: Claudia Soria, Armando Orellana, Denis Verdasquera, Amílcar Duquesne, Milay Bello, Caridad Castroman, María del Pilar Escobar, Trini Fragoso, Luz Marina Calderín, Mayra Pérez, Janet Valdés, Migdalia Reimond, Erick Chang, Osmara Lemagne, Aroldo Ruíz, María E. Ricardo y Juan J. Langaney

Entidad ejecutora principal: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK)

Otra entidad participante: Hospital Iván Portuondo, San Antonio de los Baños. Prov. Artemisa

Autor para la correspondencia: Dr. Rafael Llanes Caballero
Vice-dirección de Bacteriología y Micología, IPK. Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, La Habana, Cuba, PO Box: 601, Marianao 13. Teléfono: 255-3532. Fax: 204-6051. Correo electrónico: llanes@ipk.sld.cu

Dr. Rafael Llanes Caballero (15%). Participó en la concepción y diseño de los trabajos, en la ejecución de los mismos, en el análisis de los resultados obtenidos y redactó 3 de los 4 los manuscritos de las publicaciones.

Lic. Onelkis Feliciano Sarmiento (14%). Participó en la ejecución de los trabajos, en el análisis de los resultados obtenidos y en la revisión de los manuscritos publicados.

Lic. Oderay Gutiérrez González (14%). Contribuyó con las tareas experimentales. Participó en el análisis de los resultados obtenidos y en la revisión de los manuscritos publicados.

Dra. Ángela Gala González (14%). Realizó el análisis estadístico de los resultados y participó en la revisión de los manuscritos publicados.

Dra. Lidunka Valdés Alonso (14%). Realizó el diagnóstico endoscópico en pacientes adultos del hospital del IPK. Participó en el análisis de los resultados obtenidos y en la revisión de los manuscritos publicados.

Dra. Virginia Capó de Paz (14%). Realizó el diagnóstico histopatológico en pacientes adultos del hospital del IPK y de la atención primaria de salud. Participó en el análisis de los resultados obtenidos y en la revisión de los manuscritos publicados.

Dra. Alina Llop Hernández (8%). Participó en la concepción y diseño de algunos trabajos y en el análisis de los resultados obtenidos.

Dra. Leslie Millán Álvarez (4%). Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo y en el análisis de los resultados obtenidos.

Dra. Anelys Rodríguez Chávez (3%). Contribuyó con algunas tareas de la fase experimental del trabajo y redactó el manuscrito de una de las 4 publicaciones

RESUMEN

Problema a resolver: La enfermedad gastroduodenal por *Helicobacter pylori* es un problema de salud en Cuba, con una elevada incidencia de cáncer gástrico en pacientes mayores de 60 años, lo que provocó 846 fallecidos por esta enfermedad en el año 2012. Hasta el momento pocas instituciones de salud del país realizaban el diagnóstico de laboratorio de *H. pylori* y se carecía de datos de la resistencia fenotípica y genotípica de los aislamientos cubanos de *H. pylori*.

Objetivos: Evaluar el desempeño de diferentes pruebas diagnósticas invasivas y no invasivas de la infección por *H. pylori*, investigar la susceptibilidad a 5 antimicrobianos y las bases genéticas de la resistencia valorando sus implicaciones clínico-epidemiológicas.

Resultados: Las pruebas diagnósticas evaluadas tuvieron un desempeño de bueno a excelente, detectándose una elevada prevalencia de la infección. El 85,7% de las cepas de *H. pylori* eran resistentes al metronidazol, y tetraciclina y amoxicilina mostraron una potente actividad *in vitro*. Se detectó por primera vez en el mundo 8 nuevas mutaciones en el gen *rdxA* relacionadas con la resistencia al metronidazol.

Conclusiones: La combinación de métodos diagnósticos invasivos y no invasivos y el uso de la definición de casos aumenta la confiabilidad del diagnóstico de *H. pylori* en nuestro país; la demostración fenotípica y genotípica de la resistencia a metronidazol y la excelente actividad de tetraciclina y amoxicilina en aislamientos cubanos de *H. pylori* tiene implicaciones terapéuticas. Este representa el primer estudio en el mundo que utiliza una muestra de biopsia para realizar el diagnóstico por 3 métodos.

COMUNICACIÓN CORTA

Helicobacter pylori es una bacteria que causa cuadros clínicos diversos que van desde una infección asintomática hasta el adenocarcinoma gástrico (Yoo *et al*, 2007). La enfermedad gastroduodenal por *H. pylori* es un problema de salud en Cuba, con una elevada incidencia de cáncer gástrico en pacientes mayores de 60 años y 846 fallecidos por esta enfermedad en el año 2012 (Anuario Estadístico Salud Cuba 2013).

Para diagnosticar la infección por *H. pylori* se emplean dos tipos de pruebas 1) invasivas, que requieren de un estudio endoscópico para su realización, como la prueba rápida de ureasa (PRU) el cultivo, la histopatología y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 2) no invasivas, que incluyen la prueba de urea espirada, la detección de antígenos en heces y la serología. En la actualidad no existe un método único que garantice el diagnóstico confiable de la infección activa por esta bacteria; las pruebas diagnósticas disponibles en la actualidad tienen ventajas y limitaciones, por lo que se recomienda la combinación de métodos y la inclusión de pruebas de referencia como el cultivo y la histopatología (McNulty *et al*, 2011).

Hasta el año 2005, existían escasos reportes en Cuba sobre el diagnóstico de laboratorio de *H. pylori*, que se realizaba generalmente mediante la PRU y la histología (Mandado *et al*, 2003, Mulet *et al*, 2005); la susceptibilidad de esta bacteria a los antimicrobianos apenas había sido estudiada y se desconocían las bases genéticas de la resistencia a los antibióticos. Ese mismo año, el Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología (LNRN) del IPK incorporó el estudio de la temática de *H. pylori* a las actividades del servicio diagnóstico, las investigaciones y la docencia. Se presentan en este artículo 1) los resultados de la evaluación del desempeño de diferentes pruebas diagnósticas invasivas y no invasivas en los 3 niveles de atención de salud 2) la investigación de la susceptibilidad antimicrobiana a metronidazol, claritromicina, tetraciclina, amoxicilina y ciprofloxacino en aislamientos clínicos de *H. pylori* 3) el estudio por primera vez en Cuba de las bases genéticas de la resistencia a metronidazol y claritromicina en esta bacteria 4) la descripción del comportamiento de la infección por *H. pylori* según variables demográficas, manifestaciones clínicas y hallazgos endoscópicos e histopatológicos.

Breve descripción de los principales resultados alcanzados:

I. Evaluación del desempeño de pruebas diagnósticas invasivas y no invasivas de *H. pylori*. Asociación entre factores demográficos, variables clínicas y lesiones histológicas con la infección por esta bacteria

Estudio IA. Evaluación de 2 sistemas de PCR (ARNr 16S y ureA) y la PRU en pacientes adultos en el hospital del IPK

Los valores de sensibilidad y especificidad del PCR ARNr 16S, el PCR ureA y la PRU fueron de 100%, 90,5% y 85,7% y de 81%, 85,7% y 90,5%, respectivamente.

Todas las pruebas evaluadas con el cultivo tuvieron valores predictivos positivos (VPP) por encima del 90% y excelente razón de verosimilitud positiva (RV+ [por encima de 5]) y razón de verosimilitud negativa (RV- [0]). El PCR ARNr 16S y la PRU exhibieron valores predictivos negativos (VPN) del 100% y 76%, respectivamente. Según la definición de caso, el 66,7% resultaron positivos a *H. pylori*. La presente investigación exploró la factibilidad de utilizar un fragmento de biopsia gástrica previamente empleado en el cultivo para su uso en el diagnóstico molecular de esta bacteria, con el propósito de reducir el número de biopsias a estudiar, el trabajo del endoscopista, así como el riesgo de complicaciones en el paciente relacionadas con este proceder, sin comprometer la certeza del diagnóstico. Representa el primer estudio que emplea un mismo fragmento de biopsia gástrica para realizar el diagnóstico de *H. pylori* por 3 pruebas. Por otra parte, al establecer la relación entre las diferentes pruebas de laboratorio con las formas clínicas de la enfermedad gastroduodenal, hubo asociación estadística significativa entre la úlcera péptica y la infección por *H. pylori* ($p < 0.05$) (Llanes, et al., 2010).

Estudio IB. Evaluación del cultivo y la PRU en 133 niños sintomáticos, Instituto de Gastroenterología

El cultivo tuvo un 100% de especificidad y la PRU un 100% de sensibilidad con relación a la histología; mientras que los VPN estuvieron por encima del 90% y ambos métodos mostraron excelentes valores de concordancia: índice de Kappa (IK) de 0,94 y 0,85 y de RV+ (10,2) y RV- (0,07 y 0), para el cultivo y la PRU, respectivamente. Se encontró asociación estadística significativa de la infección por *H. pylori* en los pacientes con sangramiento digestivo alto ($p = 0,003$), y en los que la biopsia gástrica reveló una gastritis crónica moderada ($p = 0.04$). Este representa el primer estudio realizado en pacientes pediátricos cubanos que emplea una combinación de pruebas invasivas (PRU, cultivo e histopatología) en el diagnóstico de *H. pylori*, y permitió detectar una prevalencia de la infección del 30.8%, según la definición de caso. (Llanes, et al., 2011).

Estudio IC. Evaluación de la PRU en 153 pacientes adultos del hospital de San Antonio de los Baños

La PRU con relación al cultivo tuvo una sensibilidad del 100%, 82,8% de especificidad, con un IK de 0,7906; con respecto a la histología, la PRU mostró valores de sensibilidad, especificidad e IK de 98,5%, 88,3% y 0,8561, respectivamente. Se encontró una asociación estadística significativa de la infección por *H. pylori* en los pacientes mestizos (RP: 1,60), con nivel escolar bajo (pacientes iletrados RP: 2,17), o con secundaria básica terminada (RP: 1,57) y que vivían en condiciones de hacinamiento (RP: 1,94). Los síntomas asociados significativamente con esta infección fueron: epigastralgia (RP: 1,89); acidez (RP: 1,71), halitosis (RP: 1,75), vómitos (RP: 1,58) y sangramiento digestivo alto tipo melena (RP: 1,74). Asimismo, fue encontrada una asociación estadística significativa de la infección con la gastritis crónica activa leve (RP: 6,07), gastritis crónica activa moderada (RP: 10,13) y gastritis crónica activa severa (RP: 4,50). El presente estudio es el primero realizado en el territorio de la antigua provincia La

Habana (hoy Artemisa y Mayabeque), en que se diagnostica la infección por *H. pylori* por 3 pruebas invasivas y su relación con variables demográficas, clínicas, endoscópicas e histológicas, con una prevalencia de la infección del 47,1%. (Rodríguez, *et al.*, 2013).

Estudio ID. Evaluación del diagnóstico serológico en 163 pacientes adultos en el policlínico 19 de Abril

Se realizó un estudio caso-control anidado donde fueron seleccionados aleatoriamente 92 de los 163 pacientes, divididos en 2 grupos de estudio (46 casos, positivos por los métodos invasivos y 46 controles, negativos por los métodos invasivos). Para el diagnóstico serológico de la infección por *H. pylori* se utilizó un sistema ELISA comercial (IBL, Alemania), que detecta cuantitativa y cualitativamente anticuerpos IgG, IgA e IgM. La evaluación de la serología reveló que los mejores parámetros estuvieron representados por la sensibilidad (97,83%) y el VPN (92,73%). El índice de validez fue considerado bueno (80,43%) y el índice de Youden (0,61) aceptable, pero la especificidad fue de 63,04%. En los pacientes positivos a *H. pylori*, la IgG arrojó valores de positividad de 97,8%, la IgM no mostró resultados positivos, mientras que para la IgA, este valor fue de 15,2 %. La disminución en la tasa de detección de *H. pylori* por métodos invasivos pudiera deberse a la distribución parcheada de la bacteria en el estómago y al ambiente desfavorable a nivel de la mucosa gástrica que generan las lesiones premalignas como la atrofia gástrica y la metaplasia intestinal (Yoo *et al.*, 2007). En nuestro estudio 4 de los 6 pacientes con serología positiva/pruebas invasivas negativas tenían metaplasia intestinal y adenocarcinoma gástrico difuso. En estos pacientes las técnicas serológicas pueden resultar de utilidad para realizar el diagnóstico de *H. pylori* (Zhang *et al.*, 2005). Este constituye el primer estudio en nuestro país realizado en la APS en que se emplea la combinación de métodos diagnósticos invasivos y no invasivos.

En resumen, la evaluación de diferentes pruebas diagnósticas en 4 estudios en los 3 niveles de atención de salud, en pacientes adultos y niños, mostró un desempeño general de bueno a excelente. La combinación de métodos invasivos y no invasivos de diagnóstico, el uso de pruebas de referencia y de una definición de caso, aumentan la confiabilidad diagnóstica de esta infección. Particularmente las ventajas de la PRU la convierten en un método útil en los diferentes niveles de atención de salud.

Descentralización del diagnóstico de la infección por *H. pylori* en los tres niveles de atención de salud

El LNRM del IPK ha garantizado el recurso microbiológico para el diagnóstico rápido de la infección por *H. pylori*, mediante la PRU, en todos los niveles de atención de salud. En la APS, en 1332 pacientes atendidos en 5 policlínicos de la provincia La Habana entre los años 2007-2012, el 55,8% resultaron positivos a *H. pylori*. En el caso de la atención secundaria y terciaria de salud, se realizó el diagnóstico a 4580 pacientes en el hospitales del IPK, el hospital Iván Portuondo de San Antonio de los Baños y el Instituto de Gastroenterología, y se detectó un

41,4% de casos positivos a esta bacteria (Avaes de los Jefes de Depto de Atención Primaria de Salud y de Hospitales, MINSAP, 2013).

II. Susceptibilidad antimicrobiana en 70 cepas de *H. pylori*

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de difusión en agar con tiras de Etest (CLSI M100-S17, 2007) en 70 cepas, 40 aisladas de pacientes adultos y 30 recuperadas de niños. Se detectó una elevada resistencia al metronidazol en el 85,7% de las cepas, siendo la CIM₉₀ de 256 µg/ml, lo que pudiera tener una importante repercusión clínica, ya que valores superiores a 32 µg/ml se asocian con un mayor fallo terapéutico (Gatta *et al*, 2013). La resistencia *in vitro* a claritromicina fue de 11,4%, lo que tiene gran importancia, ya que se ha demostrado que su aparición puede reducir hasta en un 60% las tasas de erradicación de esta infección (Trespalcios *et al*, 2013). El estudio de la susceptibilidad a ciprofloxacino reveló un 14,3% de cepas resistentes. La tetraciclina y la amoxicilina fueron los antimicrobianos que mostraron la mejor actividad *in vitro* frente a *H. pylori*, con el 100% y el 98,6% de las cepas susceptibles, respectivamente, lo cual resulta halagüeño pues ambas drogas están incluidas en los esquemas terapéuticos de primera línea empleados en el tratamiento de las infecciones por *H. pylori* (Gatta *et al*, 2013). Las cifras de resistencia observadas pudieran estar en relación con el amplio uso de estos antimicrobianos en el tratamiento de las ITS, las IRA, EDA y las infecciones por protozoarios en Cuba (Llanes, *et al.*, 2010b).

III. Bases genéticas de la resistencia antimicrobiana de *H. pylori* en Cuba

Se analizaron los cambios en la secuencia aminoacídica y nucleotídica en cepas de *H. pylori* altamente resistentes y susceptibles al metronidazol y se compararon con las secuencias de las cepas de referencia de *H. pylori* J99 y 26695. Se observaron mutaciones en el 78.6% de las secuencias del gen *rdxA* en las cepas resistentes al metronidazol y en el 66.7% de las susceptibles a esta droga. Ninguna de las mutaciones en las cepas susceptibles fue similar a las identificadas en las cepas resistentes, por lo que inferimos que no son esenciales para causar resistencia. La no ocurrencia de una mutación única que explique la resistencia al metronidazol en los aislamientos cubanos ha sido descrito por Chisholm *et al*, 2004. Un resultado interesante de nuestro estudio fue la detección de nuevas mutaciones en el gen *rdxA* **no descritas previamente en la literatura internacional** y responsables de la resistencia: Glu (139)→Stop codon; Pro(106)→Ser; Val(111)→Ala; Thr(208)→Ala; Asn(14)→Thr; Glu(171)→Lys; Met(56)→Val; Arg(191)→Lys] y en el gen *frxA* Glu(199)→codon de parada; codón de parada en la posición 83. Aun cuando el truncamiento en la estructura aminoacídica de la proteína FrxA reduce significativamente la actividad de esta enzima, las mutaciones que conllevan a la formación de codones de parada, fueron observadas por igual en las cepas susceptibles (66.7%) y resistentes (80%) al metronidazol y por tanto no son esenciales para producir resistencia a esta droga, lo cual fue descrito por Matteo *et al*, 2006. Se demuestra que la resistencia

clínicamente significativa al metronidazol está relacionada con las mutaciones en el gen de la *rdxA* nitroreductasa y que los cambios en los niveles de resistencia que exhiben las cepas de *H. pylori* pueden ser incrementados por la presencia de mutaciones en el gen *frxA*; pero generalmente solo si han ocurrido mutaciones en el gen *rdxA*.

El análisis del gen *23S ARNr* asociado a la resistencia a claritromicina arrojó que, dos (66.7%) de las 3 cepas resistentes presentaron mutaciones puntuales en las posiciones A2142G (n=1) y en A2142 y A2143 (n=1). Estas cepas tenían como característica fenotípica una elevada resistencia a esta droga (CIM >257 ug/mL). En cambio, 2 cepas sensibles y otra moderadamente resistente con una CIM de 8 ug/mL, no presentaron alteraciones en el dominio V del gen *23S ARNr*. Estudios previos sobre resistencia genética a los macrólidos en cepas de *H. pylori* han demostrado que ambas mutaciones en el gen *23S ARNr*, son las más frecuentemente asociadas con la resistencia de alto nivel a este antibiótico (Trespalcios, *et al.*, 2013).

Referencias consultadas

- Anuario Estadístico de Salud de Cuba. Datos del 2012. Ministerio de Salud Pública de Cuba. 2013.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007: 134 (M100-S17).
- Chisholm SA, Owen RJ. Frameshift mutations in *frxA* occur frequently and do not provide a reliable marker for metronidazole resistance in UK isolates of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 2004; 53, 135–140.
- Gatta L, Vakil N, Vaira D, et al. Global eradication rates for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of sequential therapy. BMJ 2013; 347: 1-14.
- **Llanes R**, Feliciano O, Guzmán D, et al. Use of a single biopsy specimen for diagnosing *Helicobacter pylori* infection by culture and two different PCR methods. Trop Gastroenterol 2010, 31(2): 111-112.
- **Llanes R**, Millán LM, Escobar MP, et al. Low Prevalence of *Helicobacter pylori* among symptomatic children from a Hospital in Havana, Cuba. J Trop Pediatrics. 2011; 58(3):231-234.
- **Llanes R**, Soria C, Nagashima S. *et al.* High level metronidazole and ciprofloxacin resistance and elevated susceptibility to other drugs characterizes Cuban isolates of *Helicobacter pylori*. J Health Popul & Nutr 2010b; 28 (2): 135-140.

- McNulty CAM, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2011; 16 (Suppl. 1): 10–18.
- Mandado S, Gra B, Gonzalez-Carvajal M, et al. Diagnóstico morfológico de *Helicobacter pylori* mediante citología gástrica por cepillado. *Rev Cubana Med* 2003; 42(1): 27-33.
- Matteo MJ, Perez C, Domingo M, et al. DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from paired metronidazole-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* isolates obtained from patients with heteroresistance. *Int J Antimicrob Ag* 2006; 27: 152–158.
- Mulet AM, Gámez MM, Medina FM, et al. Gastritis Crónica Antral por *Helicobacter pylori* asociada o no a úlcera duodenal. *Correo Científico Médico de Holguín* 2005; 9(2): 1-3.
- Trespacios A, Otero W, Camino SE, et al. Phenotypic and genotypic analysis of claritromycin resistance *Helicobacter pylori* from Bogota DC, Colombia. *J Microbiol* 2013; 51(4): 448-52.
- Yoo JY, Kim N, Park YS, et al. Detection rate of *Helicobacter pylori* against a background of atrophic gastritis and/or intestinal metaplasia. *J Clin Gastroenterol*. 2007; 41:751–755.
- Zhang C, Yamada N, Wu YL, et al. *Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11(6):791-796.

Relación del Resultado con los Lineamientos Aprobados: Lineamiento 143. Con este resultado se potencia la calidad en el diagnóstico a 8 instituciones de salud de 2 provincias del país, que anteriormente no contaban con el diagnóstico de *H. pylori* o se perfeccionó. Lineamiento 147. La provisión de un nuevo diagnóstico permite al médico tratar al paciente infectado por *H. pylori*, lo que pudiera evitar la ocurrencia del cáncer gástrico, pues esta enfermedad está causada por dicha bacteria.

Novedades y aportes

1. La combinación de pruebas de laboratorio invasivas y no invasivas y el uso de la definición de casos, mejora la confiabilidad diagnóstica de la infección por *H. pylori* en Cuba.
2. Representa el primer reporte mundial en que se utiliza un solo fragmento de biopsia gástrica para diagnóstico de *H. pylori* por cultivo y 2 métodos de PCR, lo

que reduce la carga de trabajo del médico endoscopista, el tiempo de realización de la prueba y supone una disminución de los costos.

3. Se monitorea por vez primera en Cuba los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori*, demostrándose una elevada resistencia al metronidazol y una excelente actividad *in vitro* a la tetraciclina y la amoxicilina, sugiriéndose el uso de estos últimos en los pacientes infectados.

4. Primer reporte científico en Cuba sobre los mecanismos genéticos de la resistencia de *H. pylori* al metronidazol y la claritromicina. Se detectan por primera vez en el mundo, ocho mutaciones en el gen de la *rdxA*, relacionadas con la resistencia al metronidazol y dos mutaciones en el gen 23s *ARNr* para la claritromicina.

Beneficios sociales:

- Los resultados de las pruebas de susceptibilidad y del estudio de las bases genéticas de la resistencia antimicrobiana, evidencian la necesidad de trazar nuevas pautas en el tratamiento de la infección por *H. pylori* en Cuba, lo que contribuirá a la mejoría de la calidad de vida de los pacientes afectados.

- La generalización del diagnóstico de *H. pylori* a los 3 niveles de atención de salud repercute favorablemente en el manejo terapéutico del paciente, lo que pudiera reducir la ocurrencia de formas graves y complicadas de la infección como la úlcera péptica sangrante, perforada y el cáncer gástrico