

Original

Detección de resistencia a claritromicina en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* de niños y adultos

A.E. Vega^{1,2}, T. Alarcón¹, D. Domingo¹, M.J. Martínez³ y M. López-Brea¹

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, España; ²Área de Microbiología, Universidad Nacional de San Luis, San Luis, Argentina; ³Unidad de Gastroenterología, Hospital del Niño Jesús, Madrid, España

RESUMEN

Se han desarrollado diversos métodos para detectar la resistencia a la claritromicina. La dilución en agar es el recomendado por el NCCLS (sensible: CMI $\leq 0,25$ mg/l; intermedio: CMI = 0,5 mg/l; resistente: CMI ≥ 1 mg/l), pero la detección de mutaciones concretas involucradas en la resistencia se utiliza en muchos laboratorios. Se estudiaron 36 cepas resistentes aisladas de niños y 30 cepas aisladas de adultos. La sensibilidad in vitro a la claritromicina se determinó por el método de dilución en agar. El DNA de los aislamientos se extrajo por el método de Ge y Taylor. Las mutaciones A2142G y A2143G se determinaron siguiendo el método PCR-RFLP descrito por Versalovic y cols. (1996). Un fragmento de 1,4 Kpb del gen RNAr 23S fue amplificado y digerido con las enzimas de restricción MbolI o BsaI para detectar una u otra mutación. La mutación por transición A-G en la posición 2143 fue más común en los niños (80,55%) que en los adultos (46,66%; $p < 0.05$), mientras que la mutación en la posición 2142 se detectó más en los adultos que en los niños (36,66% vs. 5,55%; $p < 0.05$). Se observaron CMI elevadas (2-64 mg/l) en las cepas procedentes de niños cuando se detectó la mutación A-G en la posición 2143. Sin embargo, en los adultos las CMI más altas se hallaron cuando estaba presente la mutación en 2142 (A-G).

Palabras clave: *Helicobacter pylori* - Resistencia - Claritromicina - PCR-RFLP

Detection of resistance to clarithromycin in clinical isolates of *Helicobacter pylori* from children and adults

SUMMARY

Several methods have been used to detect clarithromycin resistance. Agar dilution is now recommended by the NCCLS (susceptible to clarithromycin: MIC ≤ 0.25 mg/l; intermediate resistance: MIC = 0.5 mg/l; resistant: MIC ≥ 1 mg/l), and the detection of mutations involved in resistance is used in many laboratories. We analyzed 36 clarithromycin-resistant strains isolated from children and 30 from adults. In vitro susceptibility to clarithromycin was determined by an agar dilution method. DNA from the isolates was extracted using the method published by Ge and Taylor. A2142G and A2143G mutations were identified by PCR-RFLP. A 1.4 Kpb of the 23S rRNA gene was amplified and digested using MbolI or BsaI restriction enzymes to detect mutations. The prevalence of the A-G transition mutation at position 2143 was higher in the children (80.55%) than in the adult patients (46.66%) ($p < 0.05$); however, the prevalence of the mutation at position 2142 was higher in adults than in children (36.66% vs. 5.55%; $p < 0.05$). In children, a higher MIC (2-64 mg/l) was observed when the A-G mutation was detected at position 2143. However, in adult patients higher MICs were observed when the A-G mutation was detected at position 2142.

Key words: *Helicobacter pylori* - Resistance - Clarithromycin - PCR-RFLP

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un bacilo gramnegativo y microaerófilo que coloniza el estómago de aproximadamente el 50% de la población mundial, y su persistencia en la mucosa gástrica está asociada principalmente a gastritis y úlceras pépticas, pero puede conducir al desarrollo de gastritis atrófica y cáncer gástrico (1-3). La erradicación de la bacteria es importante para la prevención de úlceras pépticas en pacientes pediátricos y adultos. El tratamiento consiste en la asociación de inhibidores de la bomba de protones o sales de bismuto y antibióticos tales como metronidazol, amoxicilina, claritromicina y tetraciclina, administrados en terapias triples o cuádruples (4, 5). El mecanismo de resistencia a los macrólidos se basa en la modificación del dominio V de la región peptidiltransferasa del gen RNAr 23S por mutaciones concretas consistentes en que una adenina es reemplazada por guanina o citosina (A-G o A-C) en las posiciones 2142 o 2143. En *H. pylori* existen dos copias del gen DNA ribosomal 23S y tres mutaciones principales asociadas con la resistencia natural del microorganismo a los macrólidos: A2142G, A2142C y A2143G (6-9). La prevalencia de cepas resistentes a los macrólidos varía entre los diferentes países de un 2% a un 10% (10-12), con una marcada tendencia al aumento (13-15). La resistencia a la claritromicina tiene un impacto significativo sobre la eficacia del tratamiento, disminuyendo la efectividad de la terapia antibiótica en un 55% aproximadamente (16, 17). Asimismo, Glupczynski y cols. (18) han demostrado resistencia cruzada entre antibióticos del grupo de los macrólidos, y esto representa un incremento en la prevalencia de resistencia a la claritromicina asociada con el aumento del uso de macrólidos en la práctica diaria para otras infecciones. Para determinar la resistencia a los antimicrobianos se pueden emplear métodos fenotípicos tales como difusión en agar, *E-test*[®] o dilución en agar, siendo este último el recomendado por el NCCLS (10, 19, 20), pero presentan la desventaja de ser tediosos y altamente dependientes de las condiciones experimentales, de interpretación subjetiva y no siempre reproducibles (10). Los métodos genotípicos tales como la reacción en cadena de la polimerasa y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), ofrecen un procedimiento alternativo rápido para detectar la sensibilidad a los macrólidos. Este método se basa en la amplificación por PCR de un fragmento de la región peptidiltransferasa del RNAr 23S, asociado a la digestión con enzimas de restricción *BsaI* o *MboII* del producto amplificado para detectar las mutaciones A2143G y A2142G, respectivamente (8). Los objetivos de este trabajo fueron estudiar el grado de resistencia a la claritromicina en niños, analizar las mutaciones concretas asociadas a

la resistencia al macrólido y comparar los datos con los resultados obtenidos en adultos.

MATERIAL Y MÉTODO

Cepas y condiciones de cultivo

Se analizaron 66 cepas resistentes a la claritromicina obtenidas de muestras de biopsia gástrica de 36 niños y 30 adultos. Las muestras fueron cultivadas en medios selectivos y no selectivos, incubadas a 37 °C en microaerofilia durante siete a diez días para aislamiento primario y dos o tres días para subcultivo. La identificación de las colonias se realizó por morfología típica, tinción de Gram y pruebas de la ureasa, la catalasa y la oxidasa positivas. La conservación de las cepas se realizó a -80 °C en caldo tripticasa-soja con glicerol al 20%.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La CMI se determinó por el método de dilución en agar utilizando agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo al 10% y diluciones dobles seriadas del antimicrobiano en un rango de 0,008 a 128 mg/l. Las cepas se desarrollaron en caldo de infusión cerebro-corazón con suero fetal bovino al 10% durante 48 horas. Una suspensión de 10⁹ UFC/ml fue aplicada con el replicador Steers y las placas se incubaron durante tres a cinco días. Se consideraron cepas sensibles cuando la CMI era ≤0,25 mg/l, con sensibilidad intermedia cuando la CMI era de 1 mg/l y resistentes cuando la CMI era ≥1 mg/l.

Caracterización genotípica de la resistencia

El DNA genómico de las cepas de *H. pylori* se extrajo por el método rápido de Ge y Taylor (21). La detección de las mutaciones concretas se realizó por el método PCR-RFLP descrito por Versalovic y cols. (8). Un fragmento de 1,4 Kpb del gen RNAr 23S fue amplificado por PCR en un volumen final de 50 µl, conteniendo 0,6 µM de cada iniciador (CLA-1 5'-AGTCGGGACCTAAGGCGAG-3' y CLA-2 5'-TTCCCGCTTAGATGCTTTCAG-3'), 200 µM desoxinucleósido trifosfato, 2,5 mM Cl₂Mg y 2,5 U Taq DNA polimerasa. La amplificación se realizó en un termociclador *DNA Thermal Cycler 2400* (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Conn., USA). Previa desnaturalización durante dos minutos a 94 °C se realizaron 38 ciclos, cada uno de un minuto, a 94 °C, un minuto a 60 °C y un minuto a 72 °C. La visualización del fragmento amplificado se realizó en gel de aga-

Tabla 1. Distribución de las CMI y tipo de mutación RNAr 23S en cepas de *H. pylori* aisladas de niños y adultos.

Pacientes	Mutación	CMI (mg/l)					
		2	4	8	16	32	64
Niños	A2143G	3	4	7	7	6	2
	A2142G	0	0	0	1	0	1
	No detectada	2	0	2	1	0	0
Adultos	A2143G	0	0	10	2	2	0
	A2142G	0	0	1	5	4	1
	No detectada	0	0	1	1	1	2

rosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. La digestión del fragmento amplificado se realizó con las enzimas de restricción *MboII* (Amersham Pharmacia) a 37 °C o *BsaI* (New England BioLabs, Beverly, Mass., USA) a 50 °C durante una hora. Los productos de restricción se analizaron sobre gel de agarosa al 2% y permitieron discriminar las mutaciones A2142G (sitio de restricción *MboII*) y A2143G (sitio de restricción *BsaI*).

Análisis de los datos

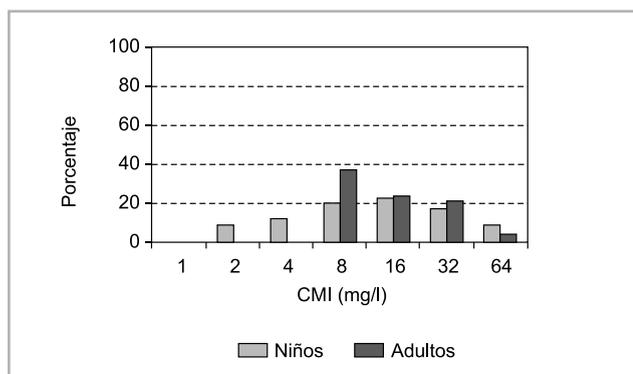
El análisis estadístico de los datos se realizó con la prueba de χ^2 utilizando el programa Epi Info, versión 6.0.

RESULTADOS

Los resultados de resistencia a la claritromicina y su asociación con el tipo de mutación concreta en RNAr 23S obtenidos con las 66 cepas de *H. pylori* aisladas de niños y adultos se muestran en la Tabla 1. La prevalencia del tipo de mutación RNAr 23S en las cepas resistentes estudiadas se muestra en la Tabla 2. El análisis de los datos obtenidos permitió determinar que la mutación por transición A-G en la posición 2143 fue más habitual en los niños (80,55%)

Tabla 2. Prevalencia del tipo de mutación RNAr 23S en cepas de *H. pylori* resistentes a la claritromicina aisladas de niños y adultos.

Pacientes	Tipo de mutación		
	A2143G n (%)	A2142G n (%)	No detectada n (%)
Niños	29 (80,55)	2 (5,55)	5 (13,88)
Adultos	14 (46,66)	11 (36,66)	5 (16,66)
Total	43 (65,15)	13 (19,69)	10 (15,15)

**Figura 1.** Porcentaje de cepas resistentes a la claritromicina en niños y adultos según la CMI.

que en los adultos (46,66%; $p < 0.05$), mientras que la mutación en la posición 2142 se halló más en los adultos (36,66%) que en los niños (5,55%; $p < 0.05$). La mayor prevalencia de la mutación A2143G respecto a la A2142G en las cepas de *H. pylori* procedentes de niños mostró diferencias estadísticamente significativas con los adultos. Asimismo se observó un alto grado de resistencia (CMI 2-64 mg/l) en los niños cuando se detectó la mutación A-G en la posición 2143 en comparación con la mutación A-G en 2142, si bien el número de cepas con esta mutación es bajo. Sin embargo, en los adultos las CMI más altas se observaron con la mutación en 2142 (A-G).

En diez cepas resistentes, cinco de niños y cinco de adultos, el mecanismo de resistencia no se determinó por este método y en ambos casos las CMI estuvieron comprendidas entre 8 y 64 mg/l.

La Fig. 1 muestra el porcentaje de cepas resistentes a la claritromicina en niños y adultos. En los niños la prevalencia de cepas resistentes muestra una distribución creciente en un rango de CMI de 2 a 16 mg/l, en contraste con el mayor porcentaje observado en los adultos, con CMI de 8 a 32 mg/l.

DISCUSIÓN

La aplicación de métodos moleculares en la rápida y efectiva detección de resistencia a la claritromicina tiene un papel importante en el tratamiento de los pacientes infectados por *H. pylori*. Además, frente a los métodos convencionales (dilución en agar y *E-test*[®]) presentan la ventaja de que no dependen de la viabilidad y velocidad de crecimiento, y sus resultados son más reproducibles. El análisis de resistencia a la claritromicina permitirá conocer la distribución geográfica del tipo de mutación, las CMI asociadas y su evolución en el tiempo. El alto grado de resistencia a la claritromicina en las cepas de *H. pylori* aisladas de niños sugiere que el uso de macrólidos en esta población puede seleccionar la resistencia del microorganismo (22). Es necesario el seguimiento de la prevalencia del tipo de mutación asociada a las CMI para establecer un tratamiento apropiado para la infección por *H. pylori*. Los datos obtenidos en este trabajo respecto a la mayor prevalencia de mutaciones A-G, tanto A2142G como A2143G, en las poblaciones estudiadas (86,11% [31/36] en niños y 83,33% [25/30] en adultos), confirma lo observado por otros autores (23, 24). Una posible explicación de la asociación entre cepas resistentes y el tipo de mutación específica RNAr 23S es la existencia de un mecanismo, aún no identificado, por el cual estas mutaciones ocurren preferentemente en *H. pylori*.

La mayor prevalencia de la mutación A2143G que de la A2142G en las cepas resistentes de *H. pylori* procedentes de niños mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los aislamientos realizados en adultos. Posiblemente esas mutaciones concretas sean más estables en los niños, como ya fue demostrado por Alarcón y cols. en un estudio previo (25). Los resultados indican que en España existen diferencias en la prevalencia del tipo de mutación A-G según la población estudiada. Esta variabilidad en la frecuencia de mutación en el gen RNAr 23S podría explicarse por la gran diversidad genética ya demostrada para las cepas de *H. pylori*.

Los valores de CMI obtenidos y el tipo de mutación en la población adulta analizada coincide con lo observado por Ge y cols. (23): las CMI para la mutación A2142G (16 mg/l) son mayores que las obtenidas para las mutaciones A2143G (4 mg/l), si bien las CMI obtenidas en nuestro estudio son más altas (16-64 mg/l). Esto puede deberse a la diferencia en la sensibilidad al antimicrobiano en las cepas estudiadas o a los métodos utilizados para determinar la CMI.

La claritromicina es el agente antimicrobiano más efectivo para el tratamiento de la infección por *H. pylori*, pero el uso de macrólidos es muy frecuente en la población infantil para tratar infecciones respiratorias y ello supone

un riesgo adicional de aparición de cepas de *H. pylori* resistentes a la claritromicina.

Los resultados obtenidos en la población pediátrica estudiada, considerando la mayor estabilidad de la mutación A2143G, sugieren que este método genotípico de detección de resistencia a la claritromicina permitiría no sólo el conocimiento epidemiológico de las cepas prevalentes sino una elección más apropiada del tratamiento de la infección por *H. pylori* en los niños, debido a que las CMI de la claritromicina están asociadas con el tipo de mutación RNAr 23S en las cepas de *H. pylori*.

Correspondencia: Teresa Alarcón, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, c/ Diego de León nº 62, 28006 Madrid, España. Tel: 34-91-520-23-17. Fax: 34-91-520-24-03.
e-mail: talarcon@helicobacterspain.com

BIBLIOGRAFÍA

- Blaser, M.J. *Ecology of Helicobacter pylori in the human stomach*. J Clin Invest 1997; 100: 759-762.
- Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M.J. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 720-741.
- Van Door, L., Debets-Ossenkopp, Y., Marais, A. y cols. *Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the Helicobacter pylori 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1779-1782.
- De Boer, W.A., Tytgat, G. *The best therapy of Helicobacter pylori infection*. Scand J Gastroenterol 1995; 30: 401-407.
- Van der Hulst, R., Keller, J., Rauws, E., Tytgat, G. *Treatment of Helicobacter pylori: Review of the world literature*. Helicobacter 1996; 1: 6-19.
- Hultén, K., Gibreel, A. Skold, O., Engstrand, L. *Macrolide resistance in Helicobacter pylori: Mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2550-2553.
- Occhialini, A., Urdaci, M., Doucet-Populaire, F., Bébear, C., Lamouliatte, H., Mégraud, F. *Macrolide resistance in Helicobacter pylori: Rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2724-2728.
- Versalovic, J., Shortridge, D., Kibbler, K. y cols. *Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 477-480.
- Van Door, L., Glupczynski, Y., Kusters, J. y cols. *Accurate prediction of macrolide resistance in Helicobacter pylori by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: Multicenter validation study*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1500-1504.
- Mégraud, F. *Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics*. Aliment Pharmacol Ther 1997; 11 (Suppl. 1): 43-53.
- Mégraud, F., Lehn, N., Lind, T. y cols. *Antimicrobial susceptibility testing of Helicobacter pylori in a large multicenter trial: The MACH 2 study*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2747-2752.
- Van Zwet, A., De Boer, W., Schneeberger, P., Weel, J., Jansz A., Thijs, J. *Prevalence of primary Helicobacter pylori resistance to metronidazole and clarithromycin in the Netherlands*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 861-864.

13. López-Brea, M., Martínez, M.J., Domingo, D., Alarcón, T. A 9 year study of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* from Spanish children. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 295-297.
14. Kato, S., Fujimura, S., Udagawa, H. y cols. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanese children. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 649-653.
15. Alarcón, T., Domingo, D., López-Brea, M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12: 19-26.
16. Dore, M., Leandro, G., Realdi, G., Sepúlveda, A., Graham, D. Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: A meta-analytical approach. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 68-76.
17. Houben, M., Van der Beek, D., Hensen, E., Craen, A., Rauws, E., Tytgat, G. A systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy. The impact of antimicrobial resistance on eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1047-1055.
18. Glupczynski, Y., Burette, A. Drug therapy for *Helicobacter pylori* infection: Problems and pitfalls. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1545-1551.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth Informational Supplement (aerobic dilution). NCCLS document M100-S10 (M7). NCCLS, Wayne, Pa. 2000.
20. Midolo, P., Bell, J., Lambert, J., Turnidge, J., Grayson, M. Antimicrobial resistance testing of *Helicobacter pylori*: A comparison of E-test and disk diffusion methods. *Pathology* 1997; 29: 411-414.
21. Taylor, D., Ge, Z., Purych, D., Lo, T., Go, G. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2621-2628.
22. Alarcón, T., Vega, A.E., Domingo, D., Martínez, M.J., López-Brea, M. Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated from children: Prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 486-488.
23. Ge, W., Sayeedur Raham, M., Zafri Humayun, M., Taylor, D. Multiple sequence analysis demonstrates the competitive growth advantage of the A to G mutants of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 683-685.
24. Ge, W., Taylor, D. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1952-1958.
25. Alarcón, T., Domingo, D., Prieto, N., López-Brea, M. Clarithromycin resistance stability in *Helicobacter pylori*: Influence of the MIC and type of mutation in the 23S rRNA. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 613-616.