

## Original

# Actividad *in vitro* de claritromicina y metronidazol frente a *Helicobacter pylori* en diferentes atmósferas de incubación

T. Alarcón, D. Domingo, N. Prieto, P. de la Obra y M. López-Brea

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad *in vitro* de claritromicina y metronidazol mediante un método de dilución en agar, comparando los resultados tras incubación en estufa de CO<sub>2</sub> o en jarra con sistema de generación de gas. Se incluyeron los antibióticos en placas como diluciones dobles seriadas desde 128 a 0,064 mg/l en Mueller-Hinton suplementado con un 7% de sangre de caballo. Se estudiaron 31 aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* que se inocularon usando un replicador de Steers. Los resultados se observaron a los 3 y 5 días y se determinó la CMI como la concentración más baja de antibiótico que inhibía el crecimiento visible. Se prepararon dos lotes simultáneamente en las mismas condiciones y se utilizaron dos atmósferas de incubación: un incubador de CO<sub>2</sub> ajustado a una humedad del 95% y a una concentración del 10% de CO<sub>2</sub>, y una jarra con un sistema de generación de gas que produce un 7% a 10% de O<sub>2</sub> y un 14% de CO<sub>2</sub> (BioMerieux). Se detectó un porcentaje de resistencia a la claritromicina del 19%, tanto al incubar en estufa de CO<sub>2</sub> como en jarra. Para el metronidazol el porcentaje de resistencia fue del 23% en las dos atmósferas. En el 100% de las cepas la CMI de claritromicina en las dos atmósferas tuvo dos diluciones de diferencia, siendo ligeramente más alta en la jarra. Las CMI del metronidazol fueron generalmente más altas en el incubador de CO<sub>2</sub>, y en un 86,7% de las cepas las CMI tuvieron 2 diluciones de diferencia. No hubo discrepancias importantes para claritromicina ni para metronidazol utilizando los dos métodos.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori* - Claritromicina - Metronidazol - Sensibilidad

## In vitro activity of clarithromycin and metronidazole against *Helicobacter pylori* in different incubation atmospheres

### SUMMARY

The aim of this study was to determine the *in vitro* activity of clarithromycin and metronidazole using an agar dilution method to compare two different incubation atmospheres: a CO<sub>2</sub> incubator and a jar with a microaerobic gas-generating system. Antibiotics were placed on plates in twofold dilutions ranging from 128 to 0.064 mg/l in Mueller-Hinton agar supplemented with 7% horse blood. The inoculum was prepared from 31 *Helicobacter pylori* isolates and was inoculated using a Steers replicator. Plates were incubated for 3 to 5 days and MICs were recorded as the lowest concentration of antibiotic inhibiting visible growth. Two different incubation atmospheres were used: a CO<sub>2</sub> incubator set at 95% humidity and 10% CO<sub>2</sub>, and a jar with a gas-generating envelope that produces 7-10% O<sub>2</sub> and 14% CO<sub>2</sub> (BioMerieux). Clarithromycin resistance was found in 19% of strains both in the gas-generating system and the CO<sub>2</sub> incubator. Metronidazole resistance was 23% in both atmospheres. MICs for clarithromycin in both atmospheres showed two dilutions of difference for 100% of the strains, and were slightly higher in the jar with a gas-generating envelope. However, MICs for metronidazole were higher when it was incubated in the CO<sub>2</sub> incubator, and in 86.7% of strains the MICs showed 2 dilutions of difference. No great discrepancies were found for either metronidazole or clarithromycin using the two methods.

**Key words:** *Helicobacter pylori* - Clarithromycin - Metronidazole - Susceptibility

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es un bacilo gramnegativo que se encuentra en la mucosa gástrica humana asociado a enfermedades digestivas como gastritis, úlcera duodenal o gástrica y linfomas tipo MALT, y se considera un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (1, 2). Los antibióticos más utilizados en el tratamiento de las infecciones producidas por *H. pylori* son claritromicina, amoxicilina, tetraciclina y metronidazol (3). Mientras que la resistencia a tetraciclina y amoxicilina es muy poco frecuente, la resistencia a claritromicina y a metronidazol es un problema creciente y depende de la población estudiada (4, 5).

Uno de los factores implicados en el fallo del tratamiento es la resistencia a los antimicrobianos utilizados, por lo que es de gran importancia determinar la sensibilidad o resistencia *in vitro* (6). Desde 1999, el NCCLS dispone de unas recomendaciones para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos mediante dilución en agar (7). En ellas se recomienda utilizar una atmósfera microaerófila obtenida en una jarra y con un sistema generador de gas. Sin embargo, *H. pylori* crece bien en atmósfera con CO<sub>2</sub> obtenido en un incubador y este método se ha usado por numerosos autores, tanto para el crecimiento del microorganismo como para determinar su sensibilidad (8, 9).

El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad de aislamientos clínicos de *H. pylori* a claritromicina y metronidazol mediante un método de dilución en agar y una atmósfera de incubación obtenida con un sistema de generación de gas o con incubación en una estufa de CO<sub>2</sub>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se realizaron 31 aislamientos de *H. pylori* procedentes de muestras de biopsia gástrica obtenidas mediante endoscopia digestiva. Las muestras se transportaron en un tubo estéril con 1 ml de solución salina fisiológica al Servicio de Microbiología lo más pronto posible, se sembraron en medios selectivos y no selectivos y se incubaron de 7 a 10 días en atmósfera microaerófila. Los aislamientos se identificaron por la morfología de la colonia, la tinción de Gram y las pruebas positivas de catalasa, oxidasa y ureasa. Las cepas se conservaron a -80 °C hasta la determinación de la sensibilidad. Se utilizó la cepa *H. pylori* NCTC 11638 como control de las pruebas de sensibilidad.

### Determinación de la CMI por dilución en agar

Se prepararon diluciones dobles seriadas de cada antimicrobiano (128 a 0,064 mg/l), que se incluyeron en agar

Mueller-Hinton suplementado con un 7% a 10% de sangre de caballo. Se preparó un inóculo de 10<sup>8</sup> UFC/ml a partir de cultivos de 48 horas de los microorganismos. Las placas se inocularon con un replicador de Steers y se incubaron durante 3 a 5 días en atmósfera microaerófila. Se consideró resistencia a la claritromicina si la CMI era  $\geq 1$  mg/l (10), y resistencia al metronidazol si la CMI era  $\geq 8$  mg/l (5).

### Atmósferas utilizadas

Se prepararon dos lotes de placas, se inocularon simultáneamente con el mismo inóculo y se incubaron en diferentes condiciones: un incubador de CO<sub>2</sub> ajustado a una humedad del 95% y una concentración del 10% de CO<sub>2</sub>, y una jarra con un sistema de generación de gas que produce un 7% a 10% de O<sub>2</sub> y un 14% de CO<sub>2</sub> (BioMerieux).

### Comparación de métodos

Se compararon los valores de CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y su intervalo con los dos métodos. También se comparó el porcentaje de resistencia obtenido con cada método.

El porcentaje de acuerdo se definió como el tanto por ciento de las cepas que presentaban 0, 1 o 2 diluciones dobles de diferencia entre los resultados obtenidos en las dos atmósferas de incubación. Se definieron discrepancias menores cuando existían más de dos diluciones de diferencia entre los métodos pero el aislamiento era agrupado dentro de la misma categoría de sensible o resistente. Se consideraron discrepancias graves si el método de incubación en CO<sub>2</sub> consideraba el aislamiento resistente y la incubación en jarra (considerado de referencia) lo consideraba sensible. Las discrepancias muy graves se consideraron si la incubación en CO<sub>2</sub> lo consideraba sensible y el método de referencia lo consideraba resistente.

## RESULTADOS

La CMI<sub>50</sub>, la CMI<sub>90</sub>, el intervalo de CMI y el porcentaje de resistencia al metronidazol y la claritromicina en los dos tipos de atmósferas de incubación se detallan en la Tabla 1. El porcentaje de resistencia a la claritromicina fue del 19% (6 de las 31 cepas probadas) y al metronidazol del 23% (7 de las 30 cepas probadas). No se observaron diferencias en el porcentaje de resistencia utilizando la atmósfera de incubación recomendada por el NCCLS o el incubador con un 10% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 95%.

En la Tabla 2 se muestra el número de cepas que con los dos métodos tuvieron idéntico valor de CMI o que con

**Tabla 1. CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, intervalo de CMI (en mg/l) y porcentaje de resistencia obtenidos con los dos antibióticos probados en las dos atmósferas de incubación.**

Antibiótico	Condiciones	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo CMI	Resistencia
Claritromicina	Jarra de aerofilia	≤0,064	32	≤0,064-64	19%
	Incubador de CO <sub>2</sub>	≤0,064	16	≤0,064-32	19%
Metronidazol	Jarra de aerofilia	1	64	0,125-64	23%
	Incubador de CO <sub>2</sub>	2	128	0,5-128	23%

**Tabla 2. Número y porcentaje de diluciones de diferencia en el valor de CMI obtenido con el sistema de incubación en una estufa de CO<sub>2</sub> y con la incubación en jarra, y porcentaje de acuerdo entre los dos métodos.**

Antibiótico	n	Número de diluciones de diferencia							Acuerdo
		-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	
Claritromicina	31	2 (6,5%)	6 (19,3%)	21 (67,7%)	2 (6,5%)				100%
Metronidazol	30			1 (3,3%)	16 (53,3%)	9 (30%)	2 (6,7%)	2 (6,7%)	86,7%

incubación en CO<sub>2</sub> mostraron CMI más altas o más bajas que cuando se incubaban en la jarra con microaerofilia. En general, las CMI de claritromicina fueron ligeramente más bajas al incubar en CO<sub>2</sub> que al realizar la incubación en jarra, y sin embargo para el metronidazol las CMI fueron más elevadas.

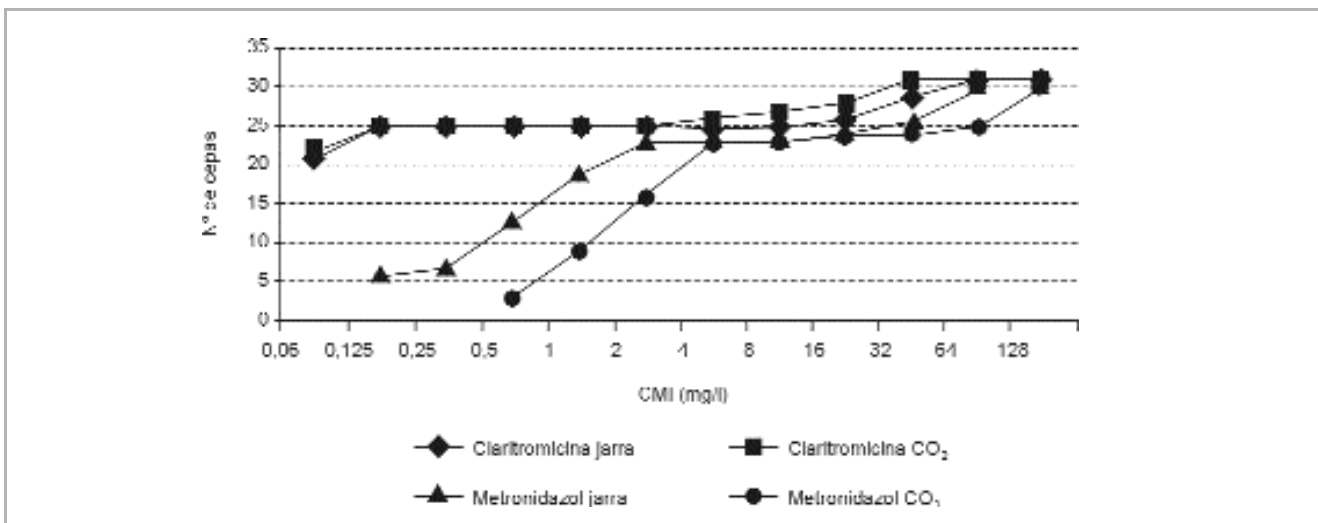
El porcentaje de acuerdo se definió como el tanto por ciento de cepas cuya CMI se encontraba dentro de dos diluciones dobles, y fue del 100% para la claritromicina y del 86,7% para el metronidazol. En un 13,3% de las cepas se observaron discrepancias leves con metronidazol. En nin-

gún caso se produjeron discrepancias importantes, ya que las cepas quedaron clasificadas dentro de la misma categoría de sensibilidad o resistencia.

En la Fig. 1 se puede observar el número y el porcentaje acumulado de cepas que eran inhibidas con cada CMI.

**DISCUSIÓN**

La infección por *H. pylori* se encuentra en todo el mundo, con una alta prevalencia en algunas poblaciones, especialmente en los países en vías de desarrollo (1). En la Con-



**Figura 1.** Número de cepas inhibidas por cada concentración (CMI en mg/l) del antibiótico en las diferentes atmósferas de incubación: jarra con sistema de generación de gas o incubador con un 10% de CO<sub>2</sub>.

ferencia de Consenso Maastricht 2, que se celebró en el año 2000, se reafirmó que el tratamiento estaba claramente indicado en casos de enfermedad ulcerosa péptica, complicada o no, y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). También se consideraron como fuertemente recomendados el tratamiento de la gastritis atrófica, después de resección de cáncer gástrico, familiares en primer grado de pacientes con cáncer gástrico y a petición del paciente (11). Los tratamientos más recomendados incluyen pautas triples con dos antibióticos y un agente antiulceroso (principalmente un inhibidor de la bomba de protones). Entre los antibióticos se han utilizado claritromicina, amoxicilina, metronidazol y tetraciclina (3, 12).

Diversos estudios han demostrado que si la infección es por una cepa resistente a los antimicrobianos disminuye de forma importante la erradicación de la bacteria con pautas que incluyan esos antimicrobianos. Los estudios encuentran que la tasa de curación es del 0% al 50% cuando la cepa es resistente a la claritromicina, mientras que es del 90% cuando es sensible. Este cambio es menos drástico en el caso de ser resistente al metronidazol (13).

La resistencia a la amoxicilina o la tetraciclina es muy poco frecuente (5). Sin embargo, la resistencia al metronidazol y la claritromicina es un problema creciente, tanto en países desarrollados como en aquéllos en desarrollo. Generalmente las tasas de resistencia son más altas en los países en vías de desarrollo. La resistencia a estos antimicrobianos puede aparecer durante el tratamiento, pero también puede que exista antes de iniciarlo porque la bacteria haya desarrollado resistencia por un contacto previo con el antimicrobiano usado en otras indicaciones, como infecciones respiratorias en el caso de los macrólidos, o para giardiasis, amebiasis o infecciones vaginales en el caso del metronidazol.

En este trabajo, el porcentaje de resistencia al metronidazol fue del 23% y a la claritromicina del 19%, lo que concuerda con datos previos, nuestros y de otros autores, según los cuales se observa un aumento en el porcentaje de resistencia a la claritromicina, mientras que para el metronidazol permanece entre el 20% y el 30% (4, 5, 14, 15).

Para determinar la sensibilidad de *H. pylori* a diferentes antimicrobianos se han utilizado diversos métodos y con condiciones variables: difusión con disco, difusión con *E-test*<sup>®</sup>, microdilución en caldo o dilución en agar (4, 5, 14-18). Además de los diferentes métodos, las condiciones en que se han realizado han sido también variadas en cuanto al medio de cultivo, la atmósfera de incubación, el tiempo de incubación y el tamaño del inóculo (5, 16). Actualmente el NCCLS recomienda el método de dilución usando agar Mueller-Hinton suplementado con un 7% de sangre de ca-

ballo, un inóculo de un cultivo de 48 horas hasta hacer una suspensión equivalente al 2 de la escala de Mac Farland en solución salina, una incubación microaerófila y tres días de incubación a 35 °C. Sin embargo, el método de dilución en agar no es práctico para su uso habitual y con frecuencia se han utilizado los métodos de difusión.

Respecto a la atmósfera de incubación, el NCCLS recomienda la incubación en jarra con sistema de generación de gas. Sin embargo, no todos los sistemas producen la misma atmósfera y es necesario disponer de jarras suficientes para la incubación de las numerosas placas. Muchos autores han utilizado un incubador con concentraciones de CO<sub>2</sub> desde el 5% al 15% para el crecimiento de los cultivos, e incluso para determinar la sensibilidad. *H. pylori* crece mejor con concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> (12% a 15%), aunque esta elevada concentración puede modificar el pH del medio y afectar al resultado de la CMI (19). En general, una concentración entre el 5% y el 10% es suficiente para obtener un crecimiento adecuado sin que los resultados se vean afectados.

Hemos hallado pocas diferencias entre los dos métodos de incubación probados en este trabajo. Para la claritromicina se observó un 100% de acuerdo, considerando valores de CMI dentro de dos diluciones de diferencia. Para el metronidazol las diferencias fueron algo mayores, con un 86,7% de acuerdo y un 13,3% de discrepancia. Sin embargo, estas discrepancias fueron menores ya que los aislamientos quedaron incluidos dentro de la misma categoría de sensibilidad o resistencia.

Podemos concluir que el porcentaje de acuerdo entre los dos métodos de incubación fue muy alto, especialmente para la claritromicina, y que en ambos casos no existieron discrepancias importantes, sólo menores. La incubación de las placas de dilución en agar en un incubador que mantenga una atmósfera del 10% de CO<sub>2</sub> es un método que puede ser utilizado para determinar la sensibilidad o resistencia de *H. pylori* a los diferentes antimicrobianos, ya que no afecta de forma importante al resultado de la CMI.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, FIS 99/0025, y la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM 08.2/0.91/1998).

---

**Correspondencia:** Teresa Alarcón, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Diego de León 62, 28006 Madrid. Tel 34 91 520 23 17. e-mail: talarcon@helicobacterspain.com

---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M.J. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 720-741.
2. World Health Organization. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human*. World Health Organization, Geneva 1994; 61: 177-240.
3. Unge, P. *Antimicrobial treatment of Helicobacter pylori infection – A pooled efficacy analysis of eradication therapies*. Eur J Surg 1998; 582 (Suppl.): 16-26.
4. Megraud, F. *Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics*. Aliment Pharmacol Therap 1997; 11 (Suppl. 1): 43-53.
5. Alarcón, T., Domingo, D., López-Brea, M. *Antibiotic resistance problems with Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agent 1999; 12: 19-26.
6. Graham, D.Y., Lew, G.M., Malaty, H.M. y cols. *Factors influencing the eradication of Helicobacter pylori with triple therapy*. Gastroenterology 1992; 102: 493-496.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth informational supplement*. NCCLS document M100-S9, Vol. 19, No. 1. Wayne, Pennsylvania 1999.
8. Torres, J., Camorlinga-Ponce, M., Pérez-Pérez, G. y cols. *Increasing multidrug resistance in Helicobacter pylori strains isolated from children and adults in Mexico*. J Clin Microbiol 2001; 39: 2677-2680.
9. 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.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tenth informational supplement (aerobic dilution)*. NCCLS document M100-S10 (M7). Wayne, Pennsylvania 2000.
11. Goh, K.L. *Update on indications for treatment of Helicobacter pylori (including Maastricht 2)*. Curr Opin Gastroenterol 2001; 17 (Suppl. 1): S43-S46.
12. de Boer, W. A., Tytgat, G.N.J. *Treatment of Helicobacter pylori infection*. BMJ 2000; 320: 31-34.
13. Broutet, N., Tchamgoué, S., Pereira, E., Mégraud, F. *Risk factors for failure of Helicobacter pylori eradication therapy*. En: Hunt, R.H., Tytgat, G.N.J. (Eds.). *Helicobacter pylori: Basic mechanisms to clinical cure 2000*. Kluwer Academic Publishers and Axcan Pharma, The Netherlands 2000; 601-607.
14. Glupczynski, Y., Megraud, F., Andersen, L.P., López-Brea, M. *Antibiotic susceptibility of H. pylori in Europe in 1998: Results of the third multicentre study*. Gut 1999; 45 (Suppl. III): A3.
15. Cabrita, J., Oleastro, M., Matos, R. y cols. *Features and trends in Helicobacter pylori antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999)*. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 1029-1031.
16. McNulty, C., PHLS Helicobacter Working Group: Owen, R., Tompkins, D., Hawtin, P., McColl, K., Price, A., Smith, G., Teare, L. *Helicobacter pylori susceptibility testing by disc diffusion*. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 601-609.
17. Alarcón, T., Domingo, D., Sánchez, I., Sanz, J.C., López-Brea, M. *Utilización del E-test para determinar la actividad in vitro de metronidazol en aislamientos clínicos de Helicobacter pylori*. Rev Esp Quimioterap 1997; 10: 49-53.
18. Hartzel, S. H., Andersen, L. P., Bremmelgaard, A. y cols. *Antimicrobial susceptibility of 230 Helicobacter pylori strains: Importance of medium, inoculum and incubation time*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2634-2639.
19. López-Brea, M., Sanz, J. C., Sánchez, S., Alarcón, T. *Influence of pH on the in vitro activity of erythromycin and azithromycin*. Rev Esp Quimioterap 1993; 6: 80-81.