



**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A
LA FURAZOLIDONA**

**CESAR RICARDO GAMBOA MARÍN
NORMA ALEXANDRA QUEVEDO BERNAL**

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

BACTERIÓLOGO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

Bogotá D.C.

Noviembre de 2009

**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A
LA FURAZOLIDONA**

Presentado por:

CESAR RICARDO GAMBOA MARÍN

NORMA ALEXANDRA QUEVEDO BERNAL

Directora: ALBA ALICIA TRESPALACIOS RANGEL

Codirectora: MARCELA MERCADO REYES

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

Bogotá D.C.

Noviembre de 2009

**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A
LA FURAZOLIDONA**

CESAR RICARDO GAMBOA MARÍN

NORMA ALEXANDRA QUEVEDO BERNAL

APROBADO

Ingrid Schuler, PhD

Decana Académica

Facultad de Ciencias

Luz Amparo Maldonado, M. Ed

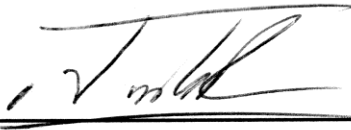
Directora Carrera

Bacteriología

**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A LA
FURAZOLIDONA**

**CESAR RICARDO GAMBOA MARÍN
NORMA ALEXANDRA QUEVEDO BERNAL**

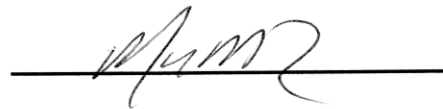
APROBADO



Dra. Alba Alicia Trespalcios Rangel

Bacterióloga MSc. Candidata a PhD.

DIRECTOR



Dra. Marcela Mercado Reyes

Bacterióloga MSc.

CODIRECTOR



Dr. Hugo Diez.

Bacteriólogo. MSc. PhD.

JURADO

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. MARCO TEORICO	5
4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	4
4.1 Formulación del problema	11
4.2 Justificación.....	11
5. OBJETIVOS.....	12
5.1 Objetivo general	12
5.2 Objetivo especifico	12
6. HIPÓTESIS.....	12
7. MATERIALES Y METODOS.....	12
7.1 Procedimiento	12
7.2 Recolección de la información.....	14
7.3 Análisis de la información.....	14
8. RESULTADOS	15
9. DISCUSIÓN.....	17
10. CONCLUSIONES	18
11. RECOMENDACIONES	19
12. BIBLIOGRAFÍA.....	19

1. RESUMEN

Ante la elevada tasa de resistencia presentada al metronidazol, un antibiótico empleado en los esquemas de tratamiento para la infección por *Helicobacter pylori* en Colombia, hoy en día es preciso buscar nuevas alternativas y variaciones en el manejo de esta infección, como ejemplo de esto se encuentra la implantación de las terapias secuenciales acompañadas de el uso de nuevos agentes antimicrobianos; con esta idea, en algunas regiones del mundo a sido ensayado con éxito incluir en estos esquemas a la furazolidona, un nitrofurano con amplio espectro de acción usado contra protozoos y bacterias, que ha mostrado excelentes resultados en tratamientos de erradicación de *H. pylori* de primera línea y en terapias de rescate. Es por esto que el objetivo de este estudio es determinar la actividad *in-vitro* de 62 cepas provenientes de pacientes colombianos infectados con *H. pylori* mediante el método de dilución en agar y posteriormente analizar su tasa de resistencia. Se encontró un porcentaje del 4,8 de resistencia, indicando una buena actividad *in-vitro* del antimicrobiano lo que ratifica la posibilidad de incluir a la furazolidona como parte de un tratamiento de rescate ante la falla terapéutica o como parte de un tratamiento de primera línea en poblaciones con pocos recursos económicos.

2. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo que tiene la capacidad de invadir la mucosa gástrica humana y cuya infección puede evolucionar a múltiples trastornos de carácter crónico como los son gastritis crónica, úlcera péptica, linfomas MALT hasta desencadenar finalmente un adenocarcinoma gástrico, su gran importancia a nivel mundial se debe a que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente la mitad de la población mundial está infectada con *Helicobacter pylori* (Fennerty *et al* 2005, Moncayo *et al* 2006) y en mayor proporción en los países subdesarrollados como Colombia.

La resistencia que se presenta a nivel de los antimicrobianos es una de las causas más importantes en el fracaso del tratamiento de las enfermedades infecciosas (OMS, 2000). En el caso de la infección por *H. pylori* el panorama no

es muy alentador, ya que se han presentado casos de resistencia a algunos fármacos usados en los diferentes tratamientos para erradicar dicho microorganismo, como el metronidazol con un porcentaje de resistencia estimado alrededor del 80% (Gutiérrez *et al* 1998) y a la claritromicina en un 21% (Muñoz *et al* 2007).

Una de las alternativas que se ha planteado al respecto de la resistencia a los antibióticos es el uso de la furazolidona como una nueva opción para el tratamiento de la infección, ya que estudios anteriores han demostrado una baja resistencia y fácil accesibilidad a este medicamento en regiones de bajos recursos.

Con este trabajo que fue un estudio de tipo observacional, prospectivo de corte transversal, se determinó la tasa de resistencia de *H. pylori* a la furazolidona en cepas de pacientes colombianos por medio del método de dilución en agar y hallar la concentración más baja del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento (CMI) en cada una de las cepas con el fin de estimar un grado de susceptibilidad en la población que nos indique el comportamiento de estas cepas al medicamento.

3. MARCO TEORICO

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo, espiroidal y flagelado que tiene la capacidad de sobrevivir a la acidez gástrica por la acción de una enzima específica llamada ureasa, cuya acción es metabolizar la urea presente en el lumen gástrico generando amonio, lo que aumenta el pH alrededor de la bacteria y le permite sobrevivir en el ambiente ácido (Weitz *et al* 2002, Kusters *et al* 2006).

La prevalencia de *H. pylori* muestra diferentes variaciones en distintos lugares geográficos. En muchos de los países en vía de desarrollo, más del 80% de la población se encuentra infectada por *H. pylori*, incluyendo sujetos en edades jóvenes (Perez *et al* 2004, Malaty *et al* 2002). En gran cantidad de zonas geográficas, la prevalencia de *H. pylori* se correlaciona directamente con el nivel socioeconómico (Malaty *et al* 1996, 2001). sobre todo en lo que concierne a las condiciones de vida durante la niñez (Malaty *et al* 1994, Ramirez *et al* 2009).

Aunque la prevalencia de la infección por *H. pylori* en los países en vía de desarrollo continua siendo relativamente alta, esta está disminuyendo rápidamente en el mundo industrializado (Genta *et al* 2002). Se piensa que esto último es debido a la reducción de las probabilidades de infección durante la infancia por la mejora de las condiciones de higiene y el saneamiento, además de una disminución de la transmisión a través del uso de terapias antimicrobianas. Por lo general, los nuevos casos de infecciones se producen con más frecuencia en la infancia y tienen una duración de por vida a menos que sean tratadas.

A pesar la elevada cantidad de casos de infección por *H. pylori* registrados a nivel mundial y el conocimiento de su epidemiología, aun se desconocen las vías de transmisión de la bacteria. Se sabe que su reservorio primario es el estómago humano por lo tanto habría dos posibles rutas para su transmisión: directa de persona a persona o a través de intermediarios, tales como el agua, los insectos o animales; sin embargo existen pocas evidencias y hallazgos experimentales que demuestren estas afirmaciones, aunque se ha concluido que con los datos obtenidos en diversos estudios la transmisión puede ser principalmente familiar o a través de una fuente común de infección (Otero *et al* 2007).

Aunque la colonización por *H. pylori* induce niveles de inflamación variables de la mucosa gástrica en todas las personas infectadas, sólo una pequeña parte llega a desarrollar signos y síntomas clínicos de esta colonización. Se estima que los pacientes positivos para la infección con *H. pylori* tienen de un 10% a un 20% de riesgo a desarrollar una úlcera péptica (gástrica o duodenal) y un 1% a 2% de riesgo de desarrollar cáncer gástrico (adenocarcinoma o linfoma gástrico). El riesgo de desarrollar este tipo de trastornos por infección con *H. pylori* depende la variedad de bacterias, las características de la invasión y el ambiente gástrico (Kusters *et al* 2006).

Para el diagnóstico de la infección se han utilizado métodos no basados en el cultivo bacteriano, uno de ellos se fundamenta en la detección de urea en el aliento. Esta técnica detecta la actividad la enzima ureasa de *H. pylori* cuantificando el CO₂ etiquetado con ¹⁴C o ¹³C que se desprende en el aire exhalado por el paciente al que se le ha administrado con anterioridad urea marcada radiactivamente (Asfeldt *et al* 2004, Ohara *et al* 1998). Los métodos

serológicos comúnmente se utilizan en los pacientes sintomáticos para detectar anticuerpos frente a *H pylori*. En otros casos pueden obtenerse por biopsia muestras de tejido afectado que se examinan histológicamente mediante tinciones como la de hematoxilina y eosina o por la de Giemsa, en donde el objetivo es detectar la presencia de bacterias con la morfología típica de *H pylori* (Howden *et al* 1998, Crespo *et al* 2001). Debido a que este microorganismo metaboliza rápidamente la urea, una parte de la biopsia de tejido gástrico debe incubarse directamente en caldo de urea o en placas con agar urea, para detectar la hidrólisis de la urea entre 1 y 24 horas después. Recientemente, se encuentran disponibles ensayos inmunoenzimáticos para la detección de antígenos de *H pylori* en las heces, ya que ha demostrado ser una alternativa muy prometedora para el diagnóstico no invasivo de las infecciones causadas por esta bacteria (Henry *et al* 2007, Mègraud *et al* 2007, Andrews *et al* 2003, Asfeldt *et al* 2004).

Para el cultivo, las muestras procesadas deben inocularse en los medios de transporte y cultivo adecuados (BHI, Brucella, Columbia), enriquecidos con sangre o suero de cordero o caballo, además de ser incubados en un ambiente microaerófilo, por lo general, *H pylori* da lugar a colonias pequeñas, de color gris y translúcidas, formadas por bacilos espirales Gram negativos, cuando se observan en extensiones teñidas por el método de Gram y que dan positivas las pruebas de oxidasa, la catalasa y la ureasa (Henry *et al* 2007).

El aislamiento en cultivo de *H. pylori* es el método más específico en el diagnóstico de la infección por este microorganismo, y a pesar de ser un método complicado de difícil realización, (ya que *H. pylori* es un microorganismo considerado de crecimiento fastidioso), es de vital importancia efectuar su cultivo, lo que permite efectuar pruebas que determinen la sensibilidad a los antimicrobianos y colaborar en la identificación de factores de virulencia (Alarcón *et al* 2004).

El tratamiento estándar para la infección por *H. pylori* se compone de un régimen triple de drogas: un inhibidor de la bomba de protones, claritromicina y amoxicilina o un imidazol (metronidazol). Estos regímenes son susceptibles de variación, en algunos lugares se utiliza citrato de bismuto ranitidina en lugar de

un inhibidor de la bomba de protones. El tiempo de tratamiento suele variar entre 7, 10, o 14 días (Chey *et al* 2004, Malfertheiner *et al* 2007, Genè *et al* 2003, Vakil *et al* 2004).

En dichos tratamientos frecuentemente se utilizan los antibióticos claritromicina, amoxicilina, tetraciclina o metronidazol, y aunque varios estudios han evidenciado que la resistencia a los antibióticos tetraciclina y amoxicilina no es muy frecuente, la dificultad se encuentra en que poco a poco ha crecido la resistencia a la claritromicina y el metronidazol, por lo tanto en estos momentos se estudian mas antimicrobianos como alternativa para la erradicación de *H. pylori* (McMahon *et al* 2003, Borody *et al* 2005, Dzierzanowska-fangrat *et al* 2001).

Ante la sospecha de altos niveles de resistencia a un antibiótico, como lo es el caso del metronidazol que en Colombia ha llegado a presentar niveles de hasta un 80% (Gutiérrez *et al* 1998), algunos autores han sugerido el uso de otros medicamentos, uno de ellos es la furazolidona que presenta bajos niveles de resistencia (Alarcón *et al* 2005, Kwon *et al* 2001, Siavoshi *et al* 2006, Mendonça *et al* 2000) y que en Colombia ya fue ensayado exitosamente con un porcentaje de erradicación del 80% en estudios diferentes (Segura *et al* 1997, Gutierrez *et al* 2003).

La furazolidona es un nitrofurano, un medicamento de la familia de las drogas nitro heterocíclicas que suele ser utilizado para combatir infecciones por protozoos y bacterias anaerobias (el mecanismo de acción aun no esta esclarecido, pero si se sabe que se puede inducir resistencia en *H. pylori* por mutaciones en algunos genes (Su *et al* 2006), aunque por pertenecer al mismo grupo de compuestos de los que hacen parte los nitroimidazoles se cree que pueden tener mecanismos de acción similares, la furazolidona a demostrado tener una elevada efectividad en la erradicación de *H. pylori* a pesar de una falla terapéutica previa por resistencia al metronidazol (Graham *et al* 2001, Arias *et al* 2008).

Aunque el uso de la furazolidona como alternativa ante la resistencia a otros medicamentos es prometedora, el interés reciente se centra en el uso racional de los antibióticos, ejemplo de esto es el uso de la terapia secuencial de 10 días,

terapia que consta de 5 días de tratamiento con un inhibidor de la bomba de protones y la administración del primero de los antibióticos (generalmente amoxicilina), seguida de 5 días de tratamiento con el inhibidor de la bomba de protones y otros 2 antibióticos (por lo general, claritromicina y un imidazol). Esto se fundamenta en que la amoxicilina debilita la pared bacteriana de las células en la fase inicial del tratamiento, esto previene el desarrollo de canales de salida de drogas lo que puede ayudar a combatir la resistencia a antibióticos como la claritromicina en la segunda fase del tratamiento (Jafri *et al* 2008, Vaira *et al* 2007), esto implicaría solo un cambio en el régimen de administración de los medicamentos sin la necesidad de buscar otras alternativas por el momento.

Aun así es importante tener en cuenta a la furazolidona en la terapia triple ya que además de su demostrada eficacia en el tratamiento, posee un costo menor que otros medicamentos usados para combatir la infección con *H. pylori*, los regímenes basados en furazolidona, tetraciclina y omeprazol han resultado efectivos casi hasta en un 90 % con costos muchos más bajos que los registrados con otros antibióticos (Machado *et al* 2008), esta ventaja hace que en los países en desarrollo represente un alivio y aumenta las posibilidades de cobertura en personas infectadas de bajos recursos (Kawakami *et al* 2006).

Por lo tanto, es importante evaluar si *Helicobacter pylori* tiene la posibilidad de resistir concentraciones significativas de este antibiótico y para esto se empleará el método más utilizado para la determinación de resistencia a antimicrobianos, el método de dilución en agar que permite el hallazgo de la concentración mínima inhibitoria (CIM) la cual es la concentración más baja del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible en una placa de agar.

El método de dilución en agar es por lo general considerado el método de referencia para determinar, como ya es conocido, la concentración de un antibiótico a la cual se inhibe el crecimiento del microorganismo y además se utiliza como método comparativo para evaluar otras técnicas, como ha sido propuesto por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards), como el método que se ha utilizado para las pruebas de sensibilidad de *H. pylori* a diversos antibióticos (Mègraud *et al* 2007, CLSI 2008).

El análisis por dilución en agar se realiza utilizando diluciones seriadas de dos en dos (que por lo general oscilan entre de 0,008 a 64 mg/ml o mas) de los agentes antimicrobianos incorporados en una preparación de agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre desfibrinada de cordero. Por lo general el inóculo se prepara en una suspensión salina equivalente al patrón de Mc Farland 2.0 que luego se siembra en la superficie de las placas de agar con un replicador Steers de modo que la concentración final de aproximadamente $1 \cdot 10^7$ a $1 \cdot 10^8$ UFC/ml por cada orificio de inoculación, esta forma de sembrar se utiliza cuando se dispone de muchas muestras y se quiere utilizar al máximo el área de la caja, pero también se puede sembrar una muestra por caja. Las placas se deben incubar a 37°C bajo condiciones de microaerofilia. Después de 72 horas de incubación, los CMI se determina de manera visual (Piccolomini *et al* 1996).

Una de las ventajas más importantes de las pruebas de dilución en agar es que ofrecen grandes posibilidades de crecimiento para la mayoría de organismos de difícil desarrollo *in-vitro* al momento de realizar la prueba y también ofrece la posibilidad que los resultados obtenidos puedan reproducirse posteriormente, sin embargo para lograrlo se debe ejecutar un protocolo minucioso y dedicado al momento de trabajar con este microorganismo. A pesar de ser un procedimiento dispendioso, la facilidad del manejo de las placas de dilución en agar, su relativo corto tiempo de almacenamiento y el fácil manejo de los reactivos hace que este método valga la pena. Por lo general las pruebas de dilución en agar no se realizan de rutina en los laboratorios clínicos, pero su utilidad es importante en laboratorios regionales de referencia y laboratorios de investigación que suelen analizar un gran número de cepas (Coyle *et al* 2005).

Finalmente hay que tener en cuenta que existen diferentes medios por el cual puede existir una falla terapéutica la más común es la alta tasa de resistencia que se ha presentado con antibióticos como la claritromicina y el metronidazol, resistencia que se presenta con frecuencia en los países subdesarrollados, por lo que no es recomendable utilizarlos juntos en el mismo régimen, en especial en un tratamiento de primera línea (Gisbert *et al* 2002); además de esto la falla terapéutica no solo se debe a la resistencia sino también al incumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes.

Sin embargo existen terapias de rescate en las cuales es utilizado nuestro antibiótico de interés, estas consisten en una combinación de furazolidona, amoxicilina, tetraciclina o levofloxacin, compuestos de bismuto y un medicamento de la bomba inhibidora de protones y representan esquemas terapéuticos eficaces para el tratamiento por la resistencia que existe en *H. pylori* (Abbas *et al* 2008, Treiber *et al* 2002, Eisig *et al* 2005-2009, Fakheri *et al* 2001).

4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

4.1 Formulación del problema

¿Cuál es la tasa de resistencia a la furazolidona de cepas de aislamientos provenientes de pacientes colombianos infectados con *Helicobacter pylori*?

4.2 Justificación

Al ser la infección por *Helicobacter pylori* un problema de salud pública a nivel mundial debido a la alta prevalencia en la población y por desarrollar en algunos casos cáncer gástrico, es preciso llevar a cabo un tratamiento oportuno, adecuado y eficaz para la erradicación de esta bacteria con el fin de evitar las complicaciones de la cronicidad de la infección.

Es por esto que esta investigación se fundamenta en conocer el nivel de resistencia que existe en cepas aisladas de pacientes infectados con *H. pylori* a la furazolidona, ya que en un futuro sería factible administrarla en vez de medicamentos que han presentado resistencia; esto basado en estudios que señalan la alta susceptibilidad de la bacteria al antibiótico y si a esto se suman los beneficios económicos que tiene la furazolidona, permitiría una mayor y mejor cobertura en personas de bajos recursos.

El método de elección más adecuado para determinar la resistencia al antibiótico es la dilución en agar ya que es considerado de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos, cualquier diferencia en las variables (microorganismo, medio de cultivo, inóculo) pueden

influir de manera drástica en el procedimiento y presentar grandes variaciones en el resultado final, por lo tanto es necesario realizarlo de manera estandarizada como aparece en el documento M7-A7 del CLSI (2006).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Determinar la tasa de resistencia a furazolidona de cepas provenientes de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* mediante el método de dilución en agar.

5.2 Objetivo específico

- Estandarizar la dilución en agar para el antibiótico furazolidona.

6. HIPÓTESIS

- **Hipótesis:** La resistencia de *H. pylori* a furazolidona por el método de dilución en agar se encuentra por debajo del 2%.
- **Hipótesis Nula:** La resistencia a furazolidona por el método de dilución en agar en cepas de pacientes infectados es mayor o igual a 2 %.
- **Hipótesis Alternativa:** La resistencia a furazolidona por el método de dilución en agar en cepas de pacientes infectados es menor a 2 %.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Procedimiento

- **Recuperación de la cepa:** Como primer paso se realizó la recuperación de cepas tomadas anteriormente de pacientes infectados, que se encontraban en viales de caldo brucella con glicerol al 20% almacenados a – 70 °C, posteriormente sembradas en medio sólido (Agar Wilkins Chalgren modificado).
- **Identificación de *H. pylori*:** Luego de obtener crecimiento en el medio sólido se realizó la identificación de las cepas, lo cual se llevó a cabo con las pruebas de oxidasa, catalasa, ureasa y la coloración de Gram para

establecer si es el microorganismo buscado (*H. pylori*) u otro que pueda alterar este estudio.

- **Dilución en agar:** Primero se realizaron los cálculos correspondientes para la solución madre de furazolidona (SIGMA) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potencia del ATB } (\mu\text{g/mg)}}$$

Para ello se tuvo en cuenta la concentración que debía ser de 10.000 $\mu\text{g/ml}$, el volumen de 10 ml y finalmente la potencia del antibiótico de 99% (990 $\mu\text{g/mg}$).

Una vez obtenido el peso del antibiótico para la **solución madre** se diluyó en 10 ml N,N-dimetilformamida, luego fue mezclado y posteriormente envasado en crioviales para almacenarlo a -70°C .

Preparación de la solución de trabajo: A partir de la solución madre se realizó una dilución 1/10 para lograr una concentración final de 1.000 $\mu\text{g/ml}$

En base a esta solución de trabajo se prepara la dilución con mayor concentración 4 $\mu\text{g/ml}$ de la siguiente manera:

$$V_f = \frac{1000 \mu\text{g/ml} \times 0.1 \text{ ml}}{4 \mu\text{g/ml}} = 25 \text{ ml}$$

En un volumen de 0.1 ml de la solución de trabajo se necesitó agregar 25 ml de diluyente para lograr una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$

Esta solución se empleará como la primera dilución (la más concentrada) y a partir de ella se realizarán las diluciones que van desde 4 $\mu\text{g/ml}$ a 0.03125 $\mu\text{g/ml}$.

Posteriormente, se incorporó a cada caja de petri un volumen de 20 ml de agar Mueller Hinton con sangre de cordero al 7%, suero de caballo al 7% y el antibiótico, finalmente se marco la caja con la dilución seleccionada.

A partir de un aislamiento en un tubo que contenga solución salina 0.85% se realizó el patrón 2 de Mc Farland y de allí se sembró 5 µl de inóculo en cada una de las cajas.

- **Lectura:** Las cajas se incubaron a una temperatura de 37°C durante 36 horas, realizando seguimiento del crecimiento cada 24 horas, pasado este tiempo se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual se registró como el valor de la menor dilución que inhibió completamente el desarrollo bacteriano, esto se determinó evaluando el crecimiento por medio visual, coloración de Gram y la prueba de ureasa (punto de corte 0.5 µg/ml, valores mayores fueron considerados como cepas resistentes(Kwon *et al* 2001)).

7.2 Recolección de la información

Para la recolección de la información se elaboraron formatos de la lectura de cada montaje y se realizaron tablas generales para un control interno de los resultados de cada cepa.

7.3 Análisis de la información

Para nuestro análisis de información se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de resistencia} = \frac{\text{Numero de cepas resistentes}}{\text{Total de cepas}} \times 100$$

Con ello hallaremos el porcentaje de resistencia.

Posteriormente se realizó la prueba estadística de hipótesis Z, con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$) y un intervalo de confianza del 95 %, esta prueba

nos permitió no rechazar la hipótesis nula planteada en el trabajo, la información obtenida fue comparada en el programa estadístico STATISTIX 7.0.

8. RESULTADOS

Estandarización del método de dilución en agar para furazolidona:

Las cepas control NCTC 11637 y 11638 presentaron un crecimiento hasta la caja de concentración 0,5 µg/ml del antibiótico tanto en un montaje inicial solo con estas cepas, como en cada montaje donde se evaluaron las cepas aisladas de pacientes colombianos infectados con *H. pylori*.

Tabla No. 1 Resultados de la evaluación de las cepas provenientes de pacientes colombianos infectados con *H. pylori*:

Numero	CMI µg/ml	Interpretación
1	0,125	SENSIBLE
2	0,5	SENSIBLE
3	0,5	SENSIBLE
4	0,5	SENSIBLE
5	0,5	SENSIBLE
6	0,5	SENSIBLE
7	0,125	SENSIBLE
8	0,125	SENSIBLE
9	0,5	SENSIBLE
10	0,5	SENSIBLE
11	0,0625	SENSIBLE
12	0,5	SENSIBLE
13	4	RESISTENTE
14	0,5	SENSIBLE
15	0,25	SENSIBLE
16	0,125	SENSIBLE
17	0,03125	SENSIBLE
18	6	RESISTENTE
19	0,03125	SENSIBLE

Numero	CMI µg/ml	Interpretación
32	0,125	SENSIBLE
33	0,5	SENSIBLE
34	0,125	SENSIBLE
35	0,125	SENSIBLE
36	0,125	SENSIBLE
37	0,125	SENSIBLE
38	0,25	SENSIBLE
39	0,5	SENSIBLE
40	0,0325	SENSIBLE
41	0,0625	SENSIBLE
42	0,125	SENSIBLE
43	0,125	SENSIBLE
44	0,125	SENSIBLE
45	0,125	SENSIBLE
46	0,03125	SENSIBLE
47	0,5	SENSIBLE
48	0,5	SENSIBLE
49	0,0625	SENSIBLE
50	0.25	SENSIBLE

20	0,25	SENSIBLE	51	0,0625	SENSIBLE
21	0,125	SENSIBLE	52	0,0625	SENSIBLE
22	0,125	SENSIBLE	53	0,03125	SENSIBLE
23	0,25	SENSIBLE	54	0,0625	SENSIBLE
24	2	RESISTENTE	55	0,125	SENSIBLE
25	0,25	SENSIBLE	56	0,5	SENSIBLE
26	0,125	SENSIBLE	57	0,125	SENSIBLE
27	0,125	SENSIBLE	58	0,125	SENSIBLE
28	0,25	SENSIBLE	59	0,125	SENSIBLE
29	0,03125	SENSIBLE	60	0,5	SENSIBLE
30	0,25	SENSIBLE	61	0,03125	SENSIBLE
31	0,25	SENSIBLE	62	0,0625	SENSIBLE

El porcentaje de resistencia calculado se obtuvo como la relación entre el número de aislamientos resistentes (3 cepas) y el número total de aislamientos evaluados (62 cepas) multiplicado por 100, lo que arroja un porcentaje de 4.8 % de resistencia del total de las cepas evaluadas (IC 95 %= 0%-10%).

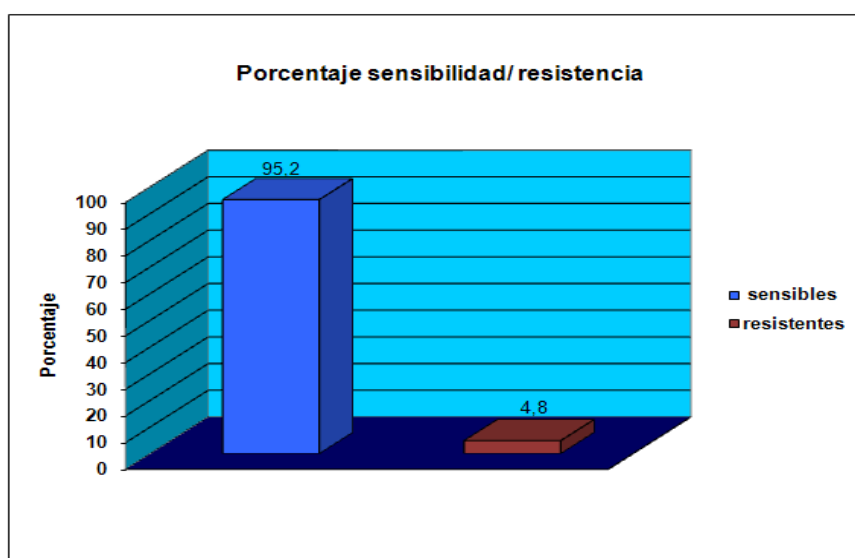


Gráfico No. 1 Comparación de porcentajes sensibles /resistentes para furazolidona.

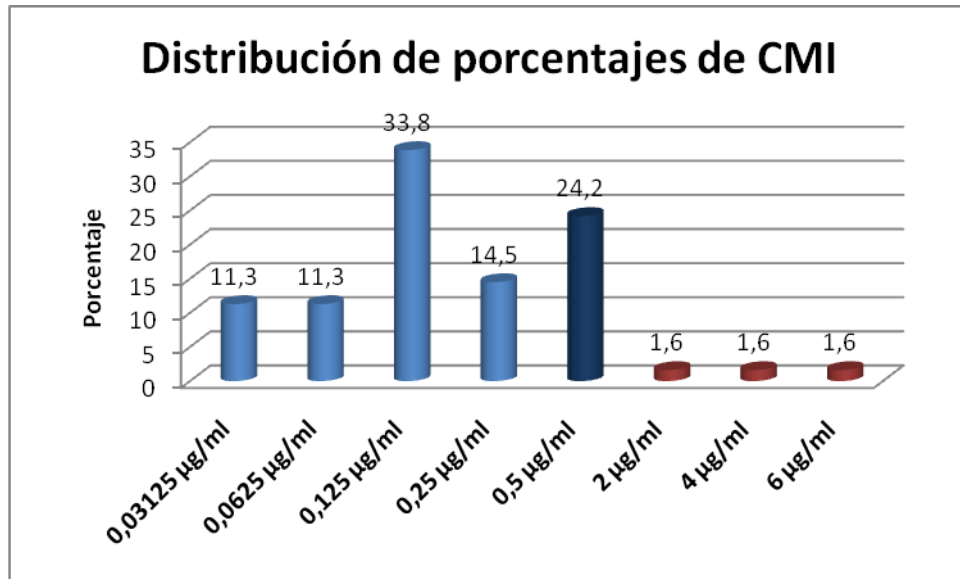


Grafico No. 2 Distribución de porcentajes de CMI en cepas de aislamientos provenientes de pacientes colombianos infectados con *Helicobacter pylori*.

9. DISCUSIÓN

La infección causada por *H. pylori* es una de las mas comunes en el mundo, se encuentra con una alta prevalencia en países en vía de desarrollo que en los países industrializados (Genta *et al* 2002). En Colombia la prevalencia de *H. pylori* muestra variaciones en distintos sitios geográficos, esta prevalencia se encuentra en rangos del 55 al 80% en niños de 2 a 8 años de edad y una prevalencia mayor del 85% en jóvenes y adultos, estos datos se correlacionan con el nivel socioeconómico (Moncayo *et al* 2006).

El resultado de la estandarización de la técnica en la que se evaluó el comportamiento de las cepas control NCTC 11637 y 11638 demostró el punto de corte establecido estipulado en 0,5 µg/ml por lo tanto las 3 cepas que crecieron por encima de esta concentración fueron consideradas resistentes, este parámetro ha sido utilizado por otros investigadores con resultados similares (Kwon *et al* 2001, Kohanteb *et al* 2007), en la presente investigación demostró

ser un control confiable en cada uno de los ensayos realizados para evaluar las cepas provenientes de aislamientos clínicos y que en su mayoría no solían sobrepasar este rango salvo las tres cepas anteriormente mencionadas, las cuales fueron sometidas a un nuevo ensayo con el fin de confirmar su CMI.

Es válido resaltar en este trabajo que se logró establecer un porcentaje de resistencia que demostró ser bajo como los registrados en estudios realizados en diversos países (Alarcón *et al* 2005, Kwon *et al* 2001, Siavoshi *et al* 2006 Mendonça *et al* 2000) en donde apoyan el uso de la furazolidona como un antibiótico alternativo de bajo costo, eficaz y que lleva años de uso con buenos resultados en algunas de estas regiones.

10. CONCLUSIONES

- Los montajes posteriores a la estandarización del método demostraron la buena actividad *in-vitro* del medicamento furazolidona inhibiendo el crecimiento de *H. pylori* desde concentraciones bajas, por esto el empleo de concentraciones mayores a 4 µg/ml fue solo necesario en aquellas cepas que registraron un crecimiento inicial hasta esta concentración.
- La tasa de resistencia de *H. pylori* a furazolidona determinada por el método de dilución en agar fue de 4,8 %, mayor a la propuesta en la hipótesis de trabajo, aun así se comprobó que la aparición de cepas resistentes fue poco común y se podría plantear la posibilidad de utilizar en un futuro este medicamento como parte de una terapia de segunda línea ante la falla terapéutica.
- Según los datos recolectados y registrados en el presente trabajo no existió evidencia estadísticamente significativa para decir que la resistencia de *H. pylori* a la furazolidona es menor al 2 %.
- Debido a los pocos estudios realizados alrededor del mundo para evaluar el nivel de resistencia a furazolidona y al uso ocasional que se le da a este antibiótico en los esquemas de erradicación de *H. pylori*, no se conocen criterios de límite de resistencia en la población para el uso de este antibiótico como los conocidos y establecidos para otros antibióticos como claritromicina y metronidazol.

11. RECOMENDACIONES

Con este trabajo se pudo estimar una baja tasa de resistencia a furazolidona en cepas provenientes de aislamientos de pacientes colombianos infectados con *H. pylori*, por esto se recomienda la continuidad del estudio, ya que promete ser una buena alternativa en terapias de segunda línea para la erradicación de esta infección en Colombia.

Es importante tener en cuenta que se debe continuar evaluando otro tipo de antibióticos con el fin contar con mas y mejores alternativas al momento de efectuar un tratamiento de segunda línea ante una falla terapéutica, es por esto que se pretende que el presente estudio sea un modelo a seguir para futuras investigaciones.

12. BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS Z, YAKOOB J, ABID S, JAFRI W, ISLAM M, AZAM Z, HILAL I. Furazolidone, Co-amoxiclav, Colloidal Bismuth Subcitrate, and Esomeprazole for Patients Who Failed to Eradicate Helicobacter pylori with Triple Therapy. 2008, pub: Digestive Diseases and Sciences p. 1573-2568.
- ALARCÓN T, BAQUERO M, DOMINGO D, LÓPEZ-BREA M, ROYO G. Diagnóstico microbiológico de la infección por Helicobacter pylori. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC, Madrid 2004.
- ALARCON T, DE LA OBRA P, DOMINGO D, GARCIA-CAMPOS J.A., DIAZ-REGANON J, LOPEZ-BREA M. Actividad in vitro de la furazolidona y la nitrofurantoína en aislamientos clínicos de Helicobacter pylori y estudio de la tasa de mutación. Rev Esp Quimioter. 2005; 18(4):313-8.
- ANDREWS J, MARSDEN B, BROWN D, WONG V, WOOD E, KELSEY M. Comparison of three stool antigen tests for Helicobacter pylori detection. J Clin Pathol.2003; 56:769–771.
- ARIAS NÚÑEZ MC. Tratamiento de rescate de la infección por Helicobacter Pylori. Galicia Clin. 2008; 69(1):15-19.

- ASFELDT AM, LOCHEN ML, STRAUME B, STEIGEN SE, FLORHOLMEN J, GOLL R, NESTEGARD O, PAULSSEN EJ. Accuracy of a monoclonal antibody-based stool antigen test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J Gastroenterol.* 2004; 39:1073–1077.
- BORODY TJ. How effective are quadruple therapies as first-line *H. pylori* eradication therapies?. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005; 2(4):174-175.
- CHEY WD, WONG BC. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol.* 2007; 102:1808-25.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement, M100-S18 Vol. 28 N^o, Table 2J (M7–MIC), January 2008. Pag 137.
- COYLE MB. 2000. Manual de pruebas de suceptibilidad antimicrobiana. Department of laboratory medicine and microbiology. Organización panamericana de la salud, university of Washington Edit, editora coordinadora. Washington U.S.A. capitulo 5.
- CRESPO A, SUH B. *Helicobacter pylori* Infection: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapy. *Arch Pharm Res.*2001; 24(6):485-498.
- DZIERZANOWSKA-FANGRAT K, ROZYNEK E, JOZWIAK P, CELINSKA-CEDRO D, MADALINSKI K, DZIERZANOWSKA D. Primary resistance to clarithromycin in clinical strains of *Helicobacter pylori* isolated from children in Poland. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2001; 18(4):387-390.
- EISIG J N, SILVA F M, BARBUTI R C, RODRIGUEZ T N, MALFERTHEINER P , MJ PP FILHO, ZATERKA S. Efficacy of a 7-day course of furazolidone, levofloxacin, and lansoprazole after failed *Helicobacter pylori* eradication. *BMC Gastroenterology.* 2009, 9:38.
- EISIG JN, SILVA FM, RODRIGUEZ TN, HASHIMOTO CL, BARBUTI RC. A furazolidone-based quadruple therapy for *Helicobacter pylori* retreatment in patients with peptic ulcer disease. *Rev: Clinics.* 2005; 60(6):485-488.

- FAKHERI H, MALEKZADEH R, MERAT S, KHATIBIAN M, A. FAZEL , ALIZADEH BZ, MASSARRAT S. Clarithromycin vs. furazolidone in quadruple therapy regimens for the treatment of Helicobacter pylori in a population with a high metronidazole resistance rate. Aliment Pharmacol Ther. 2001; 15:411-416.
- FENNERTY MB. Helicobacter pylori: Why it still matters in 2005?. Clin J Med. 2005; 72:S1-S7.
- GEN´E E, CALVET X, AZAGRA R. Triple vs. quadruple therapy for treating Helicobacter pylori infection: A metaanalysis. Aliment Pharmacol Ther. 2003; 17:1137–1143.
- GENTA RM. Review article: after gastritis—an imaginary journey into a Helicobacter-free world. Aliment. Pharmacol. Ther. 2002; 16(Suppl. 4): 89–94.
- GISBERT J P, PAJARES JM. Review article: Helicobacter pylori rescue regimen when proton pump inhibitor-based triple therapies fail. Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16:1047–1057.
- GRAHAM D Y, SAEED MA, HOFFMAN J, EL-ZIMAITY HMT, KWON DH, OSATO MS. Nitrofurantoin quadruple therapy for Helicobacter pylori infection: effect of metronidazole resistance. Aliment Pharmacol Ther. 2001; 15:513-518.
- GUTIÉRREZ O, OTERO W, CARDONA H, QUINTERO F, OROZCO C, SÁNCHEZ L. Terapia cuádruple con furazolidona como tratamiento de rescate para la infección por Helicobacter pylori. Rev Colomb Gastroenterol. 2003;18(4):222-227.
- GUTIÉRREZ O, OTERO W. Resistencia del Helicobacter pylori al metronidazol en Colombia. Rev Col Gastroenterol. 1998; 12:31-35.
- HENRY JB. 2007. Laboratorio, 20ª edición, Editorial: Marbán. Madrid. España. p. 1106.
- HOWEN C, HUNT R. Practice guidelines: Guidelines for the management of Helicobacter pylori infection. Am J Gastroenterol. 1998; 93:2330-2338.
- JAFRI NS, HORNING CA, HOWDEN CW. Meta-analysis - Sequential Therapy Appears Superior to Standard Therapy for Helicobacter pylori Infection in Patients Naive to Treatment. Annals of Internal Medicine. 2008; 148(12):923-931.

- KAWAKAMI E, MACHADO R, OGATA S, LANGNER M, FUKUSHIMA E, CARELLI A, BONUCCI V, PATRICIO F. Furazolidone-based triple therapy for H pylori gastritis in children. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(34):5544-5549.
- KOHANTEB J, BAZARGANI A, SABERI-FIROOZI M, MOBASSER A. Antimicrobial susceptibility testing of Helicobacter pylori to selected agents by agar dilution method in Shiraz-Iran, Indian. *J Med Microbiol.* 2007; 25(4):374-7.
- KUSTERS JG, ARNOUD HM, KUIPERS EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:449-490.
- KWON DH, LEE M, KIM JJ y col. Furazolidone- and nitrofurantoin-resistant Helicobacter pylori: Prevalence and role of genes involved in metronidazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 306-308.
- MACHADO RS, SILVA MR, VIRIATO A. Furazolidone, tetracycline and omeprazole: a low-cost alternative for Helicobacter pylori eradication in children. *Jornal de pediatria.* 2008; 84(2):160–165.
- MALATY H. Epidemiology of Helicobacter pylori infection *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology.* 2002; 21(2):205-214.
- MALATY HM, GRAHAM DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of Helicobacter pylori infection. *Gut.* 1994; 35(6):742–745.
- MALATY HM, GRAHAM DY, LOGAN ND. Helicobacter pylori infection in preschool and school age minority children attending day care centers: effect of socioeconomic indicators and breast feeding practice. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 1387-1392.
- MALATY HM, KIM JG, KIM SD. Prevalence of Helicobacter pylori infection in Korean children: inverse relation to socioeconomic status despite a uniformly high prevalence in adults. *Am J Epidemiol.* 1996; 143:257-262.
- MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN C, BAZZOLI F, EL-OMAR E, GRAHAM D. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut.* 2007; 56:772-781.

- MCMAHON BJ, HENNESSY TW, BENSLER JM, BRUDEN DL, PARKINSON AJ, MORRIS JM, REASONOVER AL, HURLBURT DA, BRUCE MG, SACCO F, BUTLER JC. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. *Ann Intern Med.* 2003; 139:463-469.
- MEGRAUD F, LEHOURS P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20:280-322.
- MENDONÇA S, ECCLISSATO C, SARTORI MS, GODOY AP, GUERZONI RA, DEGGER M, PEDRAZZOLI J JR. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter.* 2000; 5(2):79-83.
- MONCAYO J, SANTACRUZ J, ÁLVAREZ A, FRANCO B, LÓPEZ M, ÁNGEL A, GALLEGO M, SERRANO H. Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. *Colomb Med* 2006; 37: 203-212.
- MUÑOZ AB. Evaluación de la resistencia a claritromicina y metronidazol en genotipos *cagA* y *vac A* de aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2007.
- OHARA S, KATO M, ASAKA M, TOYOTA T. Studies of ¹³C-urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Japan. *J Gastroenterol.* 1998; 33:6–13.
- OTERO W, TRESPALACIOS AA, GOMEZ M. *Helicobacter pylori*: después de todo, Temas Escogidos de Gastroenterología, 2007:43-56.
- PEREZ-PEREZ GI, ROTHENBACHER D, BRENNER H, Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9(Suppl. 1):1–6.
- 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; 35:1842-1846.
- RAMÍREZ A, SÁNCHEZ R. *Helicobacter pylori* 25 años después (1983 - 2008): Epidemiología, Microbiología, Patogenia, Diagnóstico y Tratamiento. *Rev Gastroenterol Perú.* 2009; 29(2):158-170.

- SEGURA AM, GUTIERREZ O, OTERO W, ANGEL A, GENTA RM, GRAHAM DY. Furazolidone, amoxicillin, bismuth triple therapy for Helicobacter pylori infection, Aliment Pharmacol Ther. 1997; 11:529-532.
- SIAVOSHI F, SAFARI F, DORATOTAJ D, KHATAMI GR, FALLAHI GH, MIRNASERI MM. Antimicrobial resistance of Helicobacter pylori isolates from Iranian adults and children. Arch Iran Med. 2006; 9(4):308-14.
- SU Z, XU H, ZHANG C, SHAO S, LI L, WANG H, WANG H, QIU G. Mutations in Helicobacter pylori porD and oorD genes may contribute to furazolidone resistance. Croat Med J. 2006; 47(3):410-5.
- TREIBER G, AMMON S, MALFERTHEINER P, KLOTZ U. Impact of Furazolidone-Based Quadruple Therapy for Eradication of Helicobacter pylori after Previous Treatment Failures. Helicobacter. 2002; 7(4):225 – 231.
- VAIRA D y col. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for Helicobacter pylori eradication: A randomized trial. Ann Intern Med. 2007; 17:556-63.
- VAKIL N, LANZA F, SCHWATRZ H. Seven-day therapy for Helicobacter pylori in the United States. Aliment Pharmacol Ther. 2004; 20:99–107.
- WEITZ JC, BERGER Z, SABAH S, SILVA H. Diagnostico y tratamiento de enfermedades digestivas, Sociedad Chilena de Gastroenterología. 2002. Primera edición, Editorial: IKU. Impreso en santiago de chile. p. 79.