

Comparación de las pruebas de dilución en Agar y PCR para determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori*. Revisión sistemática de la literatura

Comparison of Agar dilution test with Polymerase Chain Reaction (PCR) to determinate antimicrobial susceptibility of *Helicobacter Pylori*. A systematic literature review

Jenny Mireya Ávila Coy,¹ Marcela Rey Arévalo,² Marcela María Mercado Reyes, MSc,² Olga Raquel Villamizar Beltrán,² William Otero Regno,³ Alba Alicia Trespalacios, MSc.⁴

RESUMEN

Objetivo: determinar las características operativas de la prueba RFLP-PCR frente a la prueba dilución en agar para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana a claritromicina en aislamientos clínicos de *H. pylori*.

Metodología: la búsqueda de estudios de pruebas diagnósticas sobre resistencia antimicrobiana de *H. pylori* a claritromicina con técnicas de dilución en agar y RFLP-PCR se realizó en Medline, Science direct, Ovid y Cochrane. Se elaboraron tablas de contingencia para calcular las características operativas, en el programa RevMan 5. La heterogeneidad fue evaluada por la gráfica Forest Plot y el estadístico de Q. La presencia de sesgos de publicación se evaluó con Funnel Plot.

Resultados: doce artículos cumplieron con los criterios de inclusión. El overall de especificidad fue 100% (IC 95% 91-

100), demostrando baja probabilidad de falsos positivos. Para sensibilidad el valor fue de 91% (IC 95% 88-94) indicando una mayor probabilidad de resultados falsamente negativos. En la gráfica de "Funnel Plot" se observó asimetría para ambas características demostrando sesgo de publicación.

Conclusiones: la técnica RFLP-PCR no presentó características operativas iguales o superiores al 95%, comparada con el estándar de referencia dilución en agar. Por lo anterior esta técnica de se debe considerar la prueba de elección cuando se estudie la susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori*.

Palabras clave

RFLP-PCR, dilución en agar, susceptibilidad antimicrobiana, *Helicobacter pylori*, revisión sistemática de la literatura, claritromicina, amoxicilina.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), por Marshall y Warren en 1983, ha sido uno de los fenómenos científicos de mayor importancia en la

literatura biomédica mundial (1, 2). Esta bacteria es el principal agente causal de gastritis crónica, úlceras pépticas, carcinoma gástrico y linfoma gástrico tipo MALT de bajo grado de malignidad (2).

¹ Estudiante de Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

² Profesor Asistente. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

³ MD. Profesor Asociado de Medicina. Coordinador de Gastroenterología. Universidad Nacional de Colombia,

Gastroenterólogo Clínica Fundadores. Bogotá Colombia.

⁴ Profesora Asociada. Directora Especialización Microbiología Médica. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Fecha recibido: 07-10-08/ Fecha aceptado: 26-03-09

SUMMARY

Aim: Establish the available scientific evidence of the operational characteristics of PCR-RFLP test with Agar Dilution for the determination of antimicrobial susceptibility in clarithromycin clinical isolates of *Helicobacter pylori*.

Methods: We have performed the search bibliography about diagnostic tests on antimicrobial resistance of *H. pylori* to clarithromycin by using Agar Dilution and PCR-RFLP techniques over Medline, Science direct, Ovid and Cochrane of studies. The information was validated by two observers who checked the inclusion criteria and quality. We obtained the operational characteristics of the studies on contingency tables; analysis was performed on the RevMan 5 program.

Results: A total of 50 references were tested from those 12 has been chosen in accord with the inclusion criteria and analyzed as summary measures. The specificity "overall"

was a 100 % (CI 95% 91-100) that demonstrate a low probability of positive false. The projected overall sensitivity was 91% (CI 95% 88-94%) which indicated a high probability of negative results. The test showed heterogeneity studies homogeneous in sensitivity and specificity ($p = 0.78$) ($p = 0.99$). The graphics of "Funnel Plot" revealed asymmetry for both of those characteristics that showed a publications bias. In the group analysis have not found antibiotics different from clarithromycin and was evident that the continent was more publications Europe, followed by Asia and Latin America.

Conclusion: The sensitivity and specificity of PCR-RFLP technique for clarithromycin not have values equal to or higher than 95% compared proof Agar Dilution.

Key Words

RFLP-PCR, Agar Dilution, antimicrobial susceptibility, *Helicobacter pylori*, Systematic review.

Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por esta bacteria, pero existen diferencias según la ubicación geográfica y el nivel económico (1, 2). En países desarrollados la infección se encuentra aproximadamente en el 10% de las personas de 20 años y aumenta gradualmente con la edad entre el 50% y 60% a los 60 años, mientras que en países en desarrollo las tasas de infección alcanzan el 95% (3).

En Colombia se ha descrito su ocurrencia en material de biopsias gástricas y se han llevado a cabo estudios seroepidemiológicos. Las zonas montañosas de Colombia como Pasto y Medellín, ofrecen altas tasas de prevalencia con 93% y 67,1% respectivamente, en comparación con las tasas medias de las zonas planas como San Gil y algunos municipios del Meta con 48% y 61,2% respectivamente (4). Sin embargo en Colombia no se han hecho estudios de prevalencia general sobre *Helicobacter pylori*, razón por la cual no se tienen datos precisos.

Actualmente, la estrategia de erradicación más difundida consiste en la triple terapia que consta de un inhibidor de bomba de protones, amoxicilina y claritromicina o metronidazol durante 7, 10 ó 14 días (1). Más recientemente, se ha empezado a utilizar levofloxacina, una quinolona, como parte de nuevos esquemas de erradicación primera línea combinada con amoxicilina y un inhibidor de bomba de protones durante diez días (1).

En los últimos años, y debido al uso indiscriminado de antibióticos, se ha incrementado la resistencia de la bacteria a los antimicrobianos más comúnmente usados en su tratamiento, por ello se han empezado a implementar pruebas que permitan detectar la susceptibilidad de *H. pylori* frente a los antibióticos de uso rutinario, para poder establecer la efectividad de los tratamientos y aplicar nuevas terapias de erradicación.

Dentro de los mecanismos genéticos de resistencia a los antibióticos, solo uno concierne a *H. pylori*, la presencia de puntos de mutación. El sitio blanco en los macrólidos (claritromicina) es el 23S rRNA, especialmente el dominio V donde los antibióticos se unen e interrumpen la síntesis de proteínas. Los primeros puntos de mutación asociados con resistencia a macrólidos fueron 2142 (A2142G) y 2143 (A2143G) (5).

La amoxicilina es el único β -lactámico usado para el tratamiento de infecciones por *H. pylori* y un posible sitio blanco de su acción pueden ser las proteínas de unión a la penicilina (PBPs), involucradas en la síntesis de péptido glucano (6) y por lo tanto, en estas PBPs pueden afectar la unión de los β -lactámicos y conferir resistencia a los mismos (6).

La mutación asociada a la resistencia en fluoroquinolonas (levofloxacina) ocurre en la región (QRDR) del gen *gyrA*, que codifica la DNA girasa la cual tiene una función principal en la replicación, relajando el DNA superenrollado (6).

El método diagnóstico de referencia definido por Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), que evalúa la resistencia antimicrobiana es la dilución en agar (DA) de *H. pylori* en el que se determina la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos comúnmente usados en la terapia de erradicación. Este método, aunque es de elección, no se realiza rutinariamente en el diagnóstico de resistencia del *H. pylori* por su compleja metodología y porque requiere de un elevado flujo de muestras para realizar, por lo tanto, solo se utiliza en laboratorios de referencia (4).

En la técnica de DA el agente antimicrobiano es incorporado en un medio (Mueller-Hinton) que contiene diferentes concentraciones por medio de diluciones seriadas dobles (Ej.: diluciones entre 0,008-64 µg/ml de un antibiótico determinado) (7). Los inóculos pueden ser aplicados rápida y simultáneamente a las superficies de agar utilizando un aparato de replicación del inóculo. La mayoría de replicadores disponibles transfieren de 32 a 36 inóculos a cada placa (8). Esta técnica se interpreta como Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R).

Recientemente se han desarrollado técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), basadas en ácidos nucleicos las cuales detectan las mutaciones que causan resistencia de la bacteria a los antibióticos (2). Este es un método simple, en el que se detecta la presencia o ausencia de un sitio de restricción con fragmentos de DNA amplificado (2, 9, 10). Esta técnica se usa generalmente para detectar mutaciones en blancos pequeños de secuencias conocidas, principalmente puntos de mutación de uno o pocos pares de bases y pequeñas inserciones o deleciones. Esta técnica puede detectar puntos de mutación tan poco frecuentes como de 10^{-6} hasta 10^{-8} por base (11).

La utilidad de esta técnica asociada a resistencia antimicrobiana en *H. pylori*, se describió por primera vez en 1996 con el antibiótico claritromicina (12). En este ensayo, se amplificó la región que contenía la o las mutaciones y luego los fragmentos sintetizados fueron tratados con endonucleasas de restricción que reconocieron sitios específicos creados por las

mutaciones. El tamaño de los fragmentos resultantes indicó la presencia o ausencia de la mutación (12).

Una forma de hacer una evaluación crítica y exacta sobre un tema de estudio es por medio de una revisión sistemática, en el que se pretende recopilar toda la información publicada sobre un tema determinado, para evaluarla críticamente y obtener conclusiones que resuman el efecto de una intervención clínica o diagnóstica; para llevar a cabo una revisión sistemática, se deben realizar los pasos que se muestran en la tabla 1 (13). Una revisión sistemática puede o no incluir metanálisis. Un metanálisis es un análisis estadístico de los resultados de estudios clínicos controlados aleatorizados e independientes con objetivos generales para producir una estimación del efecto para un tratamiento (14).

Tabla 1. Pasos para realizar una revisión sistemática de la literatura.

1. Definir pregunta de investigación
2. Definir los criterios de inclusión y exclusión
 - Participantes
 - Intervenciones y comparaciones
 - Información externa
 - Diseño del estudio y metodología
3. Localización de los estudios
 - Registros
 - Bases electrónicas
 - Listas de chequeo y verificación
 - Información personal de expertos acreditados en el tema
4. Selección de los estudios
 - Deben poderse verificar por más de un observador.
 - Deben resolver desacuerdos como desarrollo de estrategias.
 - Deben retirarse estudios por razón de exclusión.
5. Evaluación de la calidad de los estudios: formatos predeterminados o listas de chequeo.
6. Extracción de datos: gráfica de efectividad clínica "forest plot".
7. Análisis estadístico: exploración de heterogeneidad, determinación de características operativas y tipos de sesgos mediante "funnel plot" entre otros.
8. Interpretación de resultados: publicaciones incluidas y sesgos relacionados con el tema, implicaciones económicas y posibles estudios futuros (Egger et al, 2001).

Por lo anteriormente expuesto, este trabajo pretende, mediante una revisión sistemática de la literatura, establecer si las características operativas de sensibilidad y especificidad de la prueba RFLP-PCR, son superiores al 95% en al menos el 90% de los artículos seleccionados en la revisión. Esto con el fin de

sugerir como técnica de rutina la RFLP-PCR ya que es sencilla, no requiere de equipos sofisticados y es la mejor alternativa para identificar mutaciones que confieran resistencia a claritromicina, frente a métodos que requieren una infraestructura más compleja como PCR en tiempo real y secuenciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de artículos. Para la selección de artículos, se llevó a cabo una estrategia de búsqueda en las bases de datos en la que se incluyeron estudios de pruebas diagnósticas publicados entre 1998 y 2008, en donde se utilizaban pruebas de dilución en agar y RLFP-PCR para determinar la susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos (claritromicina, levofloxacina, amoxicilina) y donde fueran descritas las características operativas de estas pruebas. No hubo restricción en cuanto a las edades, tratamientos y patologías de los participantes así como de las concentraciones y combinaciones de los antibióticos en estudio.

Para la búsqueda de los artículos se utilizaron bases de datos de Medline, Science direct, Ovid y Librería Cochrane (CCTR) desde 1998 hasta el 2008. Se realizó también una búsqueda manual en revistas de gastroenterología desde 1998. La búsqueda se realizó en idioma inglés y español. Para la búsqueda se utilizó una combinación de encabezados temáticos y palabras de texto relacionadas con la detección de pruebas basadas en ácidos nucleicos para susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori* (tabla 2).

Extracción de datos. Una vez seleccionados los artículos se extrajeron de forma independiente los datos en un formato previamente estandarizado y revisado por expertos. Se obtuvieron los datos para el cálculo de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo mediante el uso de tablas de contingencia en caso de que no fueran expuestos por los autores. La medida de resumen “overall” fue calculada con un intervalo de confianza del 95% para cada una de las características operativas de las pruebas. Los resultados de cada estudio fueron ingresados al programa RevMan 5.

Tabla 2. Estrategia de búsqueda en Science direct, Medline y Medline (ebscot)-(ovid) y Cochrane.

#1. RFLP-PCR
#2. Agar Dilution
#3. Molecular test
#4. Molecular testing of <i>Helicobacter pylori</i>
#5. Antimicrobial susceptibility
#6. Antimicrobial resistance
#7. Gastric biopsies
#8. Clinical isolates
#9. Clarithromycin
#10. Amoxicillin
#11. Levofloxacin
#12. Comparative- Study-Trial
#13. #1 or #2 or #3 or #4 or #5 or #6 or #7 or #8 or #9 or #10 or #11 or #12 or #13
#14. #1 AND #2
Operador boleado: AND
Age group: all the groups (Egger et al, 2003).

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA

Para evaluar la calidad de los artículos se realizó una lista de chequeo basándose en los parámetros de la guía para usuarios de la literatura médica (15). Los ítems de evaluación de la calidad se muestran en la tabla 3. Dos observadores realizaron de forma independiente y ciega la evaluación de calidad de los artículos, asignándole un puntaje final a cada artículo.

Tabla 3. Ítems para evaluación de la calidad metodológica de los artículos.

Ítem 1.	¿Son válidos los resultados del estudio?
Ítem 2.	¿Existió una comparación de la prueba en estudio con el estándar de referencia?
Ítem 3.	¿Se describieron los métodos para realizar el examen con el suficiente detalle para su reproducción?
Ítem 4.	¿Los resultados de las pruebas modifican el tratamiento de un paciente?
Ítem 5.	¿Se ha descrito claramente la metodología de la prueba?
Ítem 6.	¿Cuál fue el tamaño de la muestra de cada uno de los estudios?
Ítem 7.	¿Se han establecido la susceptibilidad y la resistencia de cada una de las pruebas para <i>Helicobacter pylori</i> ?
Ítem 8.	¿Se han establecido la sensibilidad y la especificidad de las pruebas a estudio o datos que permitan calcularlos?
Ítem 9.	¿Se evitaron sesgos en la selección de estudios?
Ítem 10.	¿Fueron reportadas las conclusiones hechas por el autor con los datos y/o análisis reportados en la revisión?

Análisis estadístico. Para cada estudio se calcularon los parámetros diagnósticos de RFLP-PCR y dilución en agar. La posibilidad de variación entre los resultados de diferentes estudios se determinó con la gráfica de Forest Plot y el test de heterogeneidad mediante el modelo de efectos aleatorios con un alfa de 0,05 utilizando una prueba de chi cuadrado. Para evaluar si los estudios seleccionados cumplieron el requisito de homogeneidad se calculó el estadístico Q con la siguiente fórmula: (16, 17).

$$Q = \sum_{i=1}^k W_i (\bar{Ef}_i - Ef)^2$$

Donde:

\bar{Ef}_i es el estimador del tamaño del efecto del *i*ésimo ensayo.

Ef es el promedio de los estimadores del tamaño del efecto de los *k* ensayos y

W es el inverso de la varianza del tamaño del efecto de cada *i* ensayo clínico (varianza de cada Ef_i).

El estadístico Q se distribuye como una función de distribución χ^2 con *k*-1 grados de libertad. Para la evaluación de las características operativas se elaboró una curva ROC con sensibilidad vs. 1 - especificidad y para la exploración de sesgo de publicación se utilizó el método gráfico del embudo "Funnel Plot".

RESULTADOS

Extracción de datos

La búsqueda de literatura electrónica arrojó un total de 50 artículos los cuales fueron sometidos a evaluación por parte de expertos. De estos, 32 cumplieron los criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos. Se excluyeron aquellos artículos en los que solo se utilizaba una de las dos técnicas evaluadas y en los que no se evaluó ninguno de los tres antibióticos en estudio. Finalmente, el total de artículos utilizados para el análisis seleccionados con base a

su título y resumen teniendo de nuevo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión fueron 12; sin embargo de estos 12 solo 8 presentaron datos para el cálculo de especificidad (figura 1).

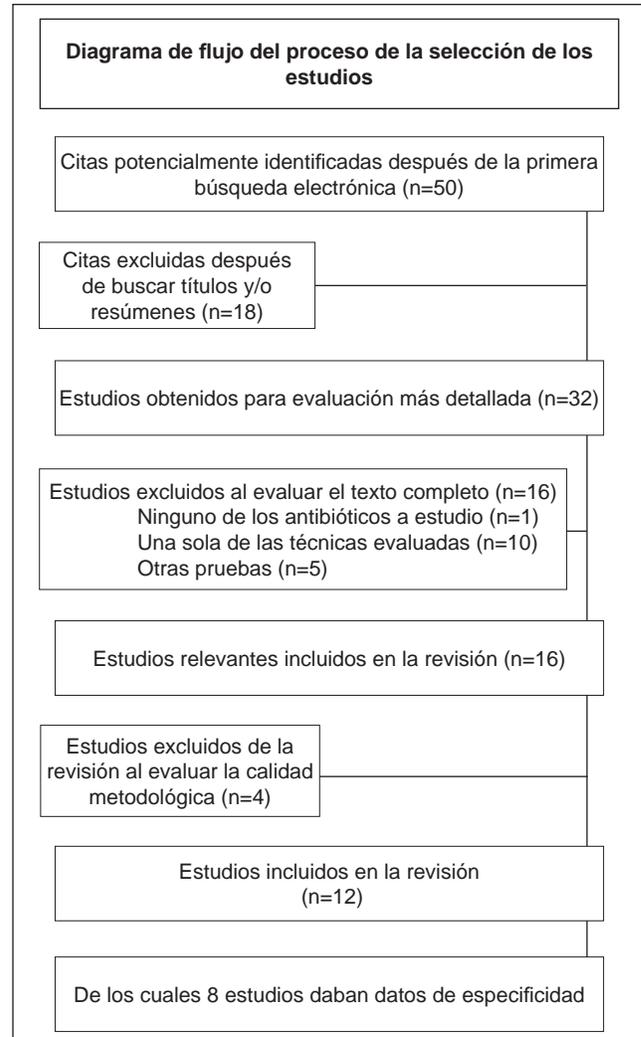


Figura 1. Selección de los estudios para la revisión sistemática de la literatura.

Los desacuerdos, como ya se mencionó en la metodología, se resolvieron por discusión entre los dos observadores y los expertos hasta llegar a un mutuo acuerdo. Los artículos seleccionados fueron: Alarcón, Baglán, Dzierzanowski, Garrido, Kobayashi, Marais, Masaoka, Mégraud, Pina, Ribeiro, Umegaki, Vega. Las características generales de estas referencias se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Características de los estudios que comparan las pruebas dilución en agar con RFLP-PCR.

Autor	Año	País de origen	Pruebas realizadas	No muestras	Tipo de muestras	Antibióticos evaluados	Características operativas			
							Sen	Esp	VPP	VPN
Alarcón <i>et al</i>	2003	España	DA, RFLP-PCR	96	Aislamientos clínicos	Claritromicina	89,30%	100%	100%	95,70%
Baglan <i>et al</i>	2006	Turkía	DA, RFLP-PCR	28	Aislamientos clínicos	Claritromicina	100%	100%	100%	100%
Dzierzanowska <i>et al</i>	2001	Polonia	DA, RFLP-PCR	33	Aislamientos clínicos	Claritromicina	86,90%	100%	100%	76,90%
Garrido <i>et al</i>	2007	Chile	DA, RFLP-PCR	10	Aislamientos clínicos	Claritromicina	100%	--	--	--
Kobayashi <i>et al</i>	2006	Japón	DA, RFLP-PCR	7	Aislamientos clínicos	Claritromicina	100%	--	--	--
Marais <i>et al</i>	1999	Francia	E-Test-DA, RFLP	47	Aislamientos clínicos	Claritromicina	87,90%	100%	100%	100%
Masaoka <i>et al</i>	2004	Japón	DA, RFLP-PCR	41	Aislamientos clínicos	Claritromicina	93,30%	90,90%	96,50%	83,30%
Mégraud <i>et al</i>	1999	Francia	E-Test-DA, RFLP	516	Aislamientos clínicos	Claritromicina	91%	100%	100%	99,70%
Pina <i>et al</i>	1998	Francia	DA, RFLP, DEIA	45	Aislamientos clínicos	Claritromicina	91,30%	100%	100%	91,60%
Ribeiro <i>et al</i>	2003	Brasil	DA, RFLP-PCR	52	Aislamientos clínicos	Claritromicina	100%	--	--	--
Umegaki <i>et al</i>	200	Japón	DA, RFLP-PCR	28	Aislamientos clínicos	Claritromicina	100%	100%	100%	100%
Vega <i>et al</i>	2003	España	DA, RFLP-PCR	66	Aislamientos clínicos	Claritromicina	84,80%	--	--	--

Sen: Sensibilidad; Esp: Especificidad; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo; DA: Dilución en agar.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA

Como se muestra en la figura 2, la calidad metodológica de los estudios fue adecuada en la mayoría de los aspectos evaluados: todos los estudios fueron ensayos clínicos de pruebas diagnósticas y estaba descrita claramente la metodología de las pruebas evaluadas; 11 estudios compararon la técnica PCR-RFLP con el estándar de referencia (dilución en agar) y reportaron las conclusiones hechas por los autores; 8 artículos proporcionaron los datos completos para determinar las características operativas. En lo que respecta al tamaño de la muestra se observó una gran variabilidad entre los estudios; ninguno mencionó específicamente cómo fue realizado el cálculo para el cumplimiento del objeto del estudio lo que indica una baja calidad para este aspecto en particular.

ANÁLISIS DE HETEROGENEIDAD

Basados en el análisis del gráfico de “Forest Plot” se observó una sensibilidad del 100% en 5 de 12 referencias y una especificidad de 100% en 7 de 8 referencias; recordemos que para esta última característica solo se tuvieron en cuenta 8 artículos que fueron los que tenían datos para el cálculo. Esta gráfica también mostró intervalos de confianza muy variados entre las características operativas, debido probablemente al número de falsos positivos y falsos negativos presentes en cada estudio. Con respecto a la medida de resumen “overall” se calculó el valor global de la sensibilidad y especificidad y sus intervalos de confianza (S = 0,91 IC 95% 0,88-0,94) y (E = 0,99 IC 95% 0,91; 1) $p < 0,0001$ (figura 3).

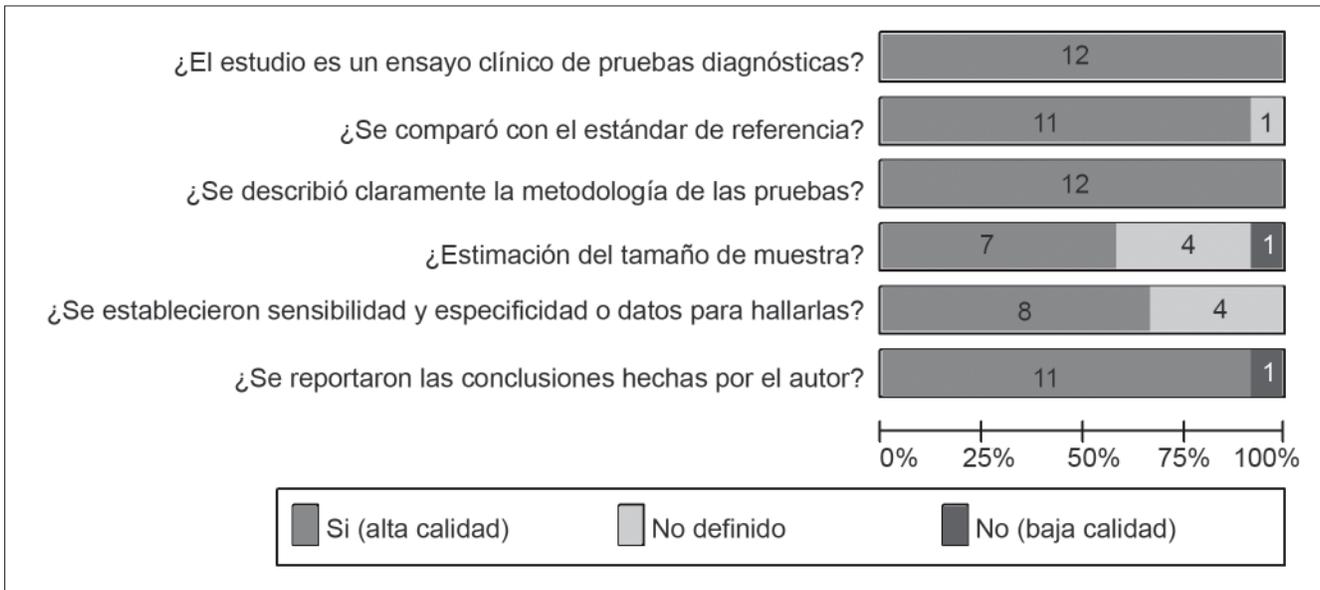


Figura 2. Evaluación de la calidad de los estudios incluidos en la revisión sistemática de la literatura.

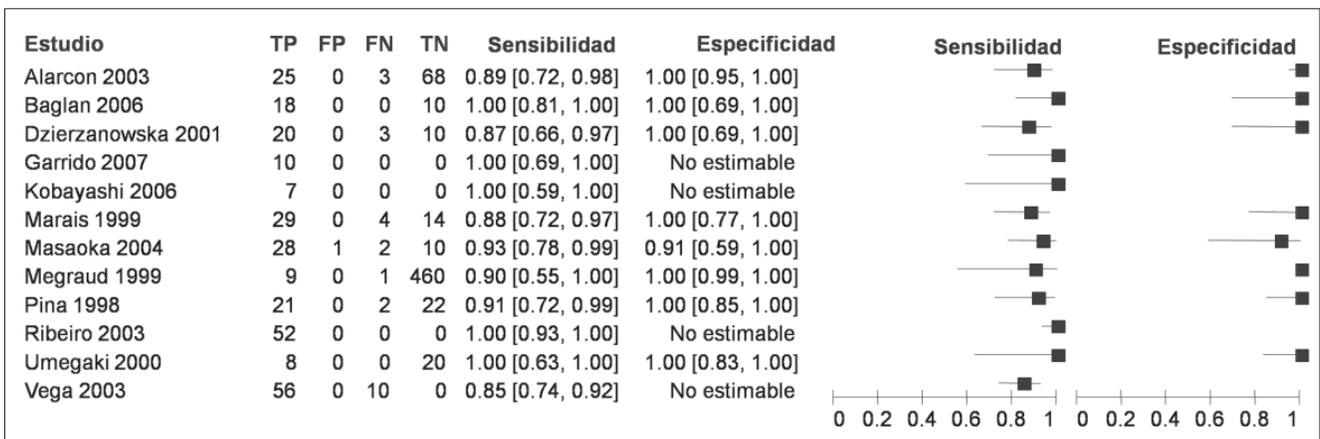


Figura 3. Características operativas de RFLP-PCR vs. dilución en agar para todos los estudios.

Adicionalmente el cálculo del estadístico de Q estimó el grado de heterogeneidad para sensibilidad y especificidad, concluyendo que los estudios no son heterogéneos ($p = 0,78$) y ($p = 0,99$) respectivamente.

EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS POR MEDIO DE CURVAS ROC

Con respecto a la curva ROC, se observó que los estudios que tuvieron mayor área bajo la curva fue-

ron Umegaki y Baglán, puesto que ambos artículos presentaron una sensibilidad y una especificidad del 100%; el estudio que presentó la menor área bajo la curva fue el de Masaoka, ya que su sensibilidad fue del 93,3% y su especificidad del 90,9%. Los demás estudios presentaron diferentes porcentajes de sensibilidad, mientras que la especificidad estuvo alrededor del 100% (figura 4).

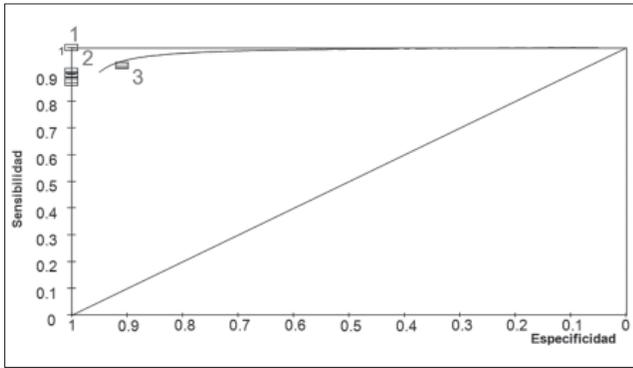


Figura 4. Curva ROC: Características operativas de RFLP-PCR vs. dilución en agar para todos los estudios. Baglan; 2. Umegaki; 3. Masaoka.

Sesgos de publicación

Para evaluar la presencia de sesgos en este estudio, se utilizó el gráfico de embudo “Funnel Plot”. En este se graficó el error estándar (precisión de la muestra) vs. la sensibilidad y la especificidad del estudios (tamaño del efecto evaluado). El gráfico de embudo mostró asimetría hacia la izquierda, lo que indica posible presencia de sesgos de publicación (figuras 5 y 6).

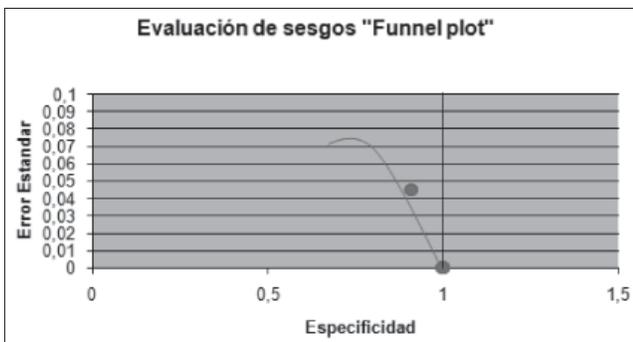


Figura 5. Funnel plot para sensibilidad.

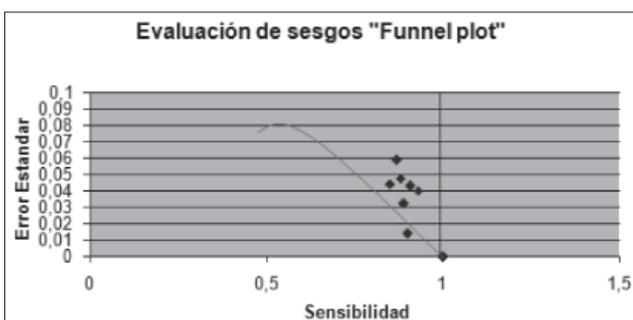


Figura 6. Funnel plot para especificidad.

Análisis de datos según región geográfica

Se clasificaron los estudios de acuerdo al lugar en donde se realizaron las pruebas. Las regiones identificadas fueron: Europa, Asia y América Latina.

El primer grupo poblacional fue el correspondiente a los estudios realizados en Europa, y el que más estudios presentó (7/12). En cuanto a sensibilidad, 6 de los 7 estudios mostraron sensibilidades entre el 85% al 91% y solo uno mostró un sensibilidad del 100%. En el artículo de Mégraud se observó un intervalo de confianza poco preciso (55%-100%) posiblemente por la presencia de un falso negativo.

El segundo grupo poblacional fue el correspondiente a Asia, con el 25% de los estudios (3/12). El estudio de Umegaki presentó sensibilidad y especificidad del 100%; el estudio de Kobayashi no proporcionó datos para calcular especificidad y los estudios de Masaoka y Kobayashi mostraron una sensibilidad del 100%. El intervalo de confianza de menor precisión fue el del estudio de Kobayashi para sensibilidad y el de Masaoka para especificidad (59%-100).

El tercer grupo poblacional fue el de América latina, al cual correspondieron el 17% de los estudios seleccionados (2/12); ambos estudios solo proporcionaron datos para calcular sensibilidad la cual fue del 100%. Con respecto al estudio de Garrido, se observó un intervalo de confianza poco preciso (69%-100%) debido a un número de muestra pequeño.

En cuanto a la hipótesis planteada se puede decir que no existe evidencia estadísticamente significativa para concluir que más del 90% de la literatura seleccionada reporte valores de sensibilidad y especificidad de RLFP-PCR frente a dilución en agar superiores al 95%, $p > 0,05$.

DISCUSIÓN

Cada vez es más frecuente la utilización de las pruebas basadas en ácidos nucleicos para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana a través de la detección de mutaciones asociadas con resistencia, debido no solo a su especificidad, sino a la rapidez en desarrollo de la prueba y la obtención de resultados.

Estas razones hacen preciso conocer las características operativas de las pruebas basadas en ácidos nucleicos más utilizadas con el fin de obtener resultados más confiables. La RS es un tipo de estudio que permite llevar a cabo este objetivo por medio de la búsqueda y exploración de estudios realizados con estas pruebas y su análisis estadístico.

Durante el desarrollo de este estudio se observó poca disponibilidad de artículos sobre el tema, pues si bien es cierto, que el uso de técnicas basadas en ácidos nucleicos es cada vez más frecuente, estas se utilizan de forma individual o directa, sin asociarse o compararse con un método de referencia como es la dilución en agar; además, en aquellos artículos en los que se utilizó una técnica basada en cultivo para determinar susceptibilidad antimicrobiana (previa a la detección de mutaciones asociadas a resistencia) fueron más comúnmente usadas técnicas como la prueba del epsilómetro (E-test) o difusión en disco, debido a que son de más fácil implementación (18).

Los análisis de una revisión sistemática dependen en gran parte del valor global obtenido "overall"; para nuestro caso el resultado global fue evaluado tanto para sensibilidad como para especificidad con respecto a la resistencia a claritromicina.

Fueron considerados como resultados positivos los aislamientos resistentes a claritromicina, ya que posteriormente se buscaba la presencia de mutaciones mediante la técnica basada en ácidos nucleicos (RFLP-PCR).

Con respecto al valor de la especificidad, no todos los estudios proporcionaron datos para determinarla, ya que algunos tomaron como número muestral solo las cepas definidas como resistentes por el método de dilución en agar. Sin embargo, dentro de los estudios que permitieron calcular especificidad, el valor global de esta fue del 100% (IC 95% 91-100), demostrando una baja probabilidad de falsos positivos. En cuanto a la sensibilidad, se observó que los valores son menos precisos $S = 91\%$ (IC 95% 88-94) lo que nos permite afirmar que existe una mayor probabilidad de tener resultados falsamente negativos. Esto debido probablemente a que las cepas resistentes por

dilución en agar sólo se les identificaron las mutaciones más frecuentes, sin embargo, el hecho de que la prueba no determine la mutación, no quiere decir que la cepa no sea resistente, pues es muy probable que presente otras menos comunes. Las mutaciones detectadas y asociadas principalmente a resistencia en *H. pylori* en los estudios fueron A2142G, A2143G y A2144G reportadas por 7, 12 y 4 artículos respectivamente (10, 18-28). Estos resultados son de gran importancia para las personas que utilizan estos métodos tanto en el área clínica como en investigación, pues aunque son bien expuestas las ventajas de estos, otra situación es la que se presenta al momento de tomar decisiones basados en sus resultados, sobre todo al momento de generalizar una medicación.

Con respecto a la calidad de los artículos es importante resaltar que todos los estudios seleccionados fueron diseñados mediante ensayos clínicos de pruebas diagnósticas, lo que permite disminuir el sesgo de selección y la aleatorización admite aumentar la precisión de los resultados. Con respecto a la comparación con un *Gold Standard* se observó que solo un artículo (23) no relacionó el total de las muestras con el estándar de referencia (dilución en agar), por tanto solo se calcularon las características operativas para el número de muestras en el que se tuvo en cuenta la comparación con el fin de disminuir el sesgo de incorporación el cual puede sobreestimar la sensibilidad y especificidad (29).

La curva ROC mostró que el artículo que presentó menor área bajo la curva fue el de Masaoka 2004, ya que mostró valores de sensibilidad y especificidad del 93% y del 91% respectivamente, debido a la presencia tanto de falsos positivos como de falsos negativos.

Los sesgos de publicación se evaluaron mediante el uso de las gráficas de embudo "Funnel Plot", que mostraron asimetría para ambas características operativas (especificidad y sensibilidad); aunque el sesgo de publicación ha sido asociado con asimetría en la gráfica de embudo, es importante recalcar que también debe ser considerado como un recurso genérico para examinar si los estudios pequeños tienden a mostrar efectos de tratamientos o de técnicas más

grandes (30). Dado que los artículos incluidos en este estudio presentaron tamaños de muestra reducidos, es posible que se hayan sobrestimado los resultados que favorezcan a las características operativas. El sesgo de publicación también pudo ser generado por la tendencia de la literatura médica de publicar estudios con resultados positivos, reduciendo la posibilidad de encontrar estudios con resultados negativos (17).

Durante la búsqueda de los artículos se encontró que la técnica de RFLP-PCR fue la más usada para detectar mutaciones asociadas a claritromicina, pero no se encontraron artículos donde refirieran esta técnica como método para detectar mutaciones en amoxicilina o levofloxacina, lo que limitó el análisis de esta prueba a solo un antibiótico.

En cuanto al análisis por regiones se encontró que la región que más estudios desarrolló fue la de Europa, presentando los mejores datos de especificidad en contraste con los datos de sensibilidad que fueron muy variados; la región de América Latina presentó mejores datos de sensibilidad (100%); sin embargo, esta región fue en la que menos publicaciones se encontraron con respecto a las otras regiones, y puede deberse a la poca exploración de técnicas basadas en ácidos nucleicos y a la falta de recursos para implementar la técnica de RFLP-PCR. Con respecto a la región de Asia, el estudio de Kobayashi mostró un tamaño de muestra pequeño, evidenciándose en un intervalo de confianza poco preciso.

Aunque la mayoría de los estudios no cumplieron con los porcentajes de las características operativas planteados en la pregunta de investigación (Sen y Esp superiores a 95%), se obtuvieron cifras buenas principalmente para especificidad, pues en el 87% de los artículos se observó que fue del 100%. Sin embargo, debido al número limitado de artículos encontrados sobre este tema, es anticipado pensar que las características operativas de esta técnica no son buenas con respecto a la prueba de referencia.

CONCLUSIONES

1. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa de los polimorfismos en la longitud de fragmentos

de restricción (RFLP-PCR) no presentó características operativas iguales o superiores al 95%, comparada con el estándar de referencia dilución en agar. Por lo tanto la técnica de dilución en agar se debe considerar la técnica de elección a pesar de que sea dispendiosa su ejecución.

2. La sensibilidad y especificidad global de la técnica de RFLP-PCR con respecto a la dilución en agar en claritromicina fue del 91% y 99% respectivamente.
3. No se encontró información disponible de las características de la prueba de RFLP-PCR para determinar resistencia a los antibióticos amoxicilina y levofloxacina, por lo cual no pudo ser comparada con la técnica de referencia de dilución en agar.
4. El análisis estadístico mostró que los estudios incluidos en esta revisión sistemática fueron homogéneos.
5. Hasta el momento no se han realizado estudios experimentales ni revisiones sistemáticas de la literatura que comparen las características operativas de la pruebas basadas en ácidos nucleicos (RFLP-PCR) con la dilución en agar para determinar susceptibilidad antimicrobiana para *H. pylori* en Colombia. Por lo anterior, consideramos de suma importancia iniciar este tipo de estudios dada la aparición cada vez más frecuente de cepas de *H. pylori* resistentes a los diferentes antimicrobianos, lo cual exigirá la disponibilidad de datos sobre susceptibilidad del microorganismo para proponer nuevos esquemas de erradicación.

REFERENCIAS

1. Malfertheiner P, Megraud F, O'Moraim C, Bazzoli F, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-The Masstricht III, consensus Report. Gut online. Enero 17, 2008.
2. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis 2006; 6: 699-709.
3. Kuipers E, Thijs JC, Festen H. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. Aliment Pharmacol Ther 1995; (suppl 2): 59-69.

4. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS, Bravo PE, Badel A, Bravo PA. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Médica* 2003; 34 (3): 124-131.
5. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 477-80.
6. Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment. *Drug Resistance Updates* 2001; 4: 178-186.
7. Coyle Marie B. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Capítulo 5. Department of Laboratory Medicine and Microbiology. Organización panamericana de la salud, University of Washington Edit, Editora Coordinadora. Washington-USA. 2000.
8. Piccolomini R, Bonaventura G Di, 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: 1842-6.
9. Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, et al. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 283-86.
10. Ribeiro ML, Vitiello L, Miranda MC, Benvenuto YH, Godoy AP, Mendonca S, Pedrazzoli J. Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2003; 2: 11.
11. Parsons BL, Heflich RH. Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. *Mutation Research* 1997; 387: 97-121.
12. Vallejos C, Cerda O, Valenzuela M, Toledo H. Resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*: aspectos clínicos y moleculares. *Revista Médica de Chile* 2003; 131: 1313-1320.
13. Beltrán O. Revisiones sistemáticas de la literatura. *Rev Col Gastroenterol* 2005; 20(1): 60-69.
14. Egger M, Smith GD, Altman DG. *Systematic Reviews in Health Care: Meta-Analysis in Context*. Segunda edición. Londres-Gran Bretaña. Editorial BMJ Publishing Group. 2001. p. 23-459.
15. Jaeschke R, Gordon H, Guyatt, MD y Sackett. DL. Guías para usuarios de la literatura médica, parte B ¿Cuáles son los resultados?, ¿me ayudarán a la asistencia de mis pacientes? *JAMA España* 1997. p. 703-707.
16. Dersimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986; 7: 177-188.
17. Bermúdez M, Pérez A, Morillo L. Apreciación crítica de un artículo que presenta una revisión sistemática de la literatura en salud. Programa de actualización médica permanente 2000; 52: 2-15.
18. Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E, O'Morain C, Spiller R, Unge P, Van Zanten SV, Wrangstadh M, Burman CF. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999; 43(11): 2747-2752.
19. Alarcón T, Vega AE, Domingo D, Martínez MJ, 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. *Journal of clinical Microbiology* 2003; 41(1): 486-488.
20. Baglan PH, Bozdayi G, Ozkan M, Ahmed K, Bozdayi AM, Ozden A. Clarithromycin resistance prevalence and Icea Gene status in *Helicobacter pylori* Clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. *Journal of microbiology* 2006; 44(4): 409-416.
21. Dzierzanowska-Fangrat K, Rozynek E, Józwiak 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: 387-390.
22. Garrido L, Toledo H. Novel Genotypes in *Helicobacter Pylori* involving Domain V of the 23S rRNA Gene. *Helicobacter* 2007; 12: 505-509.
23. Kobayashi I, Saika T, Muraoka H, Murakami K, Fujioka T. *Helicobacter pylori* isolated from patients who later failed H. pylori eradication triple therapy readily developed resistance to clarithromycin. *Journal of medical microbiology* 2006; 55: 737-740.
24. Marais A, Monteiro L, Occhialini A, Pina M, Lamouliatte H, Mégraud F. Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a poly-

- merase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gut* 1999; 44: 463-467.
25. Masaoka T, Suzuki H, Kurabayashi K, Kamiya AG, Ishii H. Second-line treatment of *Helicobacter pylori* infection after dilution agar and PCR-RFLP analysis. *Aliment pharmacol ther* 2004; 20: 68-73.
 26. Pina M, Occhalini A, Moteiro L, Doermann HP, Mégraud F. Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin Hybridization in liquid Phase. *Journal of clinical microbiology* 1998; 36(11): 3285-3290.
 27. Umegaki N, Shimoyama T, Nishiya D, Suto T, Fukuda S, Munakata A. Clarithromycin-resistance and point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2000; 15: 906-909.
 28. Vega AE, Alarcón T, Domingo D, Martínez MJ, López-Brea M. Detection of resistance to clarithromycin in clinical isolates of *Helicobacter pylori* from children and adults. *Revista española de quimioterapia* 2003; 16(1): 53-57.
 29. Biggerstaff BJ. Comparing diagnostic tests: a simple graphic using likelihood ratios. *Stat Med* 2000; 19 (5): 649-663.
 30. Clarke M, Oxman AD, editores. Manual de revisores Cochrane 4.1.6. Actualizado enero de 2003. <http://www.cochrane.dk/cochrane/handbook/handbook.htm> (con acceso el 29 de julio de 2008).