

**DETECCIÓN BIOINFORMÁTICA DE MUTACIONES EN LOS GENES *gyrA*,
pbp1a Y 23S rRNA DE *Helicobacter pylori* EN PACIENTES DE LA CIUDAD
DE MONTERÍA.**

CARLOS ANDRÉS VERGARA MORELO

MAYRA RACINY ALEMÁN. M.Sc

Directora

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
MONTERÍA- COLOMBIA**

2017

**DETECCIÓN BIOINFORMÁTICA DE MUTACIONES EN LOS GENES *gyrA*,
pbp1a Y 23S rRNA DE *Helicobacter pylori* EN PACIENTES DE LA CIUDAD
DE MONTERÍA.**

CARLOS ANDRÉS VERGARA MORELO

MAYRA RACINY ALEMÁN. M.Sc

Directora

WILLIAN SEGUNDO HOYOS MORALES. M.Sc

Co-director

Trabajo de grado como requisito para obtener el título de Bacteriólogo

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
MONTERÍA- COLOMBIA**

2017

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del proyecto, serán responsabilidad de los autores.

Artículo 61, acuerdo N° 093 del 26 de Noviembre del 2002 del Consejo Superior.

El Jurado calificador del trabajo no será responsable de las ideas emitidas por los autores (Artículo 46, acuerdo 006 de Mayo de 1979)

(Consejo Directivo)

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Montería, Mayo de 2017

DEDICATORIA

A DIOS, por su fidelidad y fortaleza para continuar dando lo mejor de mí, sin esperar nada a cambio.

A mis padres Ariela María Morelo Solera Y Carlos Briceño Vergara Pérez por ser más que un ejemplo a seguir, son seres con un valor incalculable, quienes siempre han dado de ellos lo mejor en mi formación personal, la esencia de mis principios están basados en su enseñanza para la vida.

A mis hermanas Sandra, Ana Paola Vergara y demás familiares por su apoyo a cada momento.

AGRADECIMIENTO

A los docentes Mayra Raciny Alemán y Willian Segundo Hoyos Morales por su dirección y asesoría
en el presente trabajo investigativo.

Al grupo de Grupo de Investigaciones microbiológicas y biomédicas de Córdoba (GIMBIC) por su
apoyo metodológico en este proceso.

A todas y cada una de las personas que hicieron esto posible, incluyendo al resto de docentes de la
Universidad de Córdoba por su dedicación y entrega indispensables para mi formación
profesional, como también a los compañeros de estudio por sus contribuciones en la academia y
contexto personal.

*Si quieres triunfar, no te quedes mirando la escalera. Empieza a
subir, escalón por escalón, hasta que llegues arriba.*

- Anónimo

RESUMEN

La prevalencia de *H. pylori* en la población es alta. Se estima que el 60% de la población mundial está infectada por el *H. pylori* (1), se encuentra asociado al origen de patologías gastroduodenales como: gastritis crónica, úlceras gástricas, cáncer gástrico, entre otras (2). Las infecciones por esta bacteria son frecuentes en los individuos de clase socioeconómica baja y/o en los países subdesarrollados como Colombia (1). Consecuentemente en estos países es donde más se produce el fenómeno de la automedicación (3), siendo este problema un factor importante para el origen de resistencia bacteriana (4). La resistencia a los antibióticos es una de las principales causas del fracaso del tratamiento para *H. pylori* (5). La presencia de mutaciones en algunos sitios de los genes *gyrA*, PBP-1A y 23S rRNA puede provocar resistencia a la **Levofloxacin**, **Amoxicilina** y **Claritromicina** respectivamente. A nivel nacional se han realizado contados estudios para puntualizar el porcentaje de resistencia en sus regiones. Es necesario conocer la **incidencia** de mutaciones genéticas de resistencia antibiótica en las cepas de *H. pylori* presentes en **Montería**. La determinación fenotípica de estas mutaciones es tortuosa y de baja sensibilidad (6), Lo que hace necesario establecer la existencia o no de dichas mutaciones por medio de métodos genotípicos utilizando técnicas de la biología molecular y bioinformática. Con este estudio se buscó conocer la frecuencia de mutaciones en *H. pylori* responsables de la resistencia a claritromicina, amoxicilina y levofloxacin de pacientes de la ciudad de Montería, en el cual fueron procesadas 27 pares de cromatogramas, 9 por cada gen, provenientes de 9 biopsias gástricas positivas para *H. pylori* de pacientes de la ciudad de Montería. Se logró determinar la presencia de resistencia a levofloxacin 50% (4/8), a amoxicilina 50% (4/8) y no se detectó resistencia a levofloxacin. Lo cual brinda información que pueda ayudar a establecer un protocolo terapéutico eficaz y más acorde a la susceptibilidad de este microorganismo en la región.

Palabras clave: Biología molecular, Bioinformática, Genes, Mutación, Resistencia antibiótica, *Helicobacter pylori*, PCR, Secuenciación, Alineamiento.

ABSTRACT

It is estimated that 60% of the world population is infected by *H. pylori* (1). It is associated with pathologies such as chronic gastritis, gastric ulcers, gastric cancer, among others (2). Resistance to antibiotics is one of the main causes of treatment failure for *H. pylori* (5). The presence of mutations at some sites of the *gyrA*, PBP-1A and 23S rRNA genes may provoke resistance to **Levofloxacin**, **Amoxicillin** and **Clarithromycin** respectively. In Colombia, few studies have been done to indicate the percentage of resistance in their regions. It is necessary to know the incidence of genetic mutations of antibiotic resistance in the strains of *H. pylori* present in Monteria. This study sought to know the frequency of mutations in *H. pylori* responsible for resistance to clarithromycin, amoxicillin and levofloxacin in patients from the city of Monteria; 27 of chromatograms, 9 per gene, were processed from 9 *H. pylori* positive gastric biopsies from patients in the city of Montería. The presence of resistance to levofloxacin 50% (4/8), amoxicillin 50% (4/8) and no resistance to levofloxacin was detected. This provides information that may help to establish an effective therapeutic protocol more in line with the susceptibility of this microorganism in the region.

Key words: Molecular biology, Bioinformatics, Genes, Mutation, Antibiotic resistance, *Helicobacter pylori*, PCR, Sequencing, Alignment.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABLAS.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	16
1.1 GENERALIDADES DE <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>).....	16
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	16
1.3 RUTAS DE TRANSMISIÓN.....	17
1.4 GENOMA Y FACTORES DE VIRULENCIA.....	18
1.4.2 GEN <i>babA</i>	18
1.4.3 GEN <i>vacA</i>	19
1.4.4 GEN <i>cagA</i>	19
1.5 DIAGNÓSTICO.....	19
1.5.1 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	20
1.7 TRATAMIENTO.....	20
1.7.1 RESISTENCIA AL TRATAMIENTO De <i>H. pylori</i>	21
1.8 DETECCIÓN DE MUTACIONES GENÉTICAS.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
3. METODOLOGÍA.....	32
3.1 TIPO DE ESTUDIO.....	32
3.2 ZONA DE ESTUDIO.....	32
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	32
3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	32
3.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	32
3.6 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	33
3.6.1 VALIDACIÓN DE INICIADORES Y SECUENCIAS.....	33
3.6.2 ENSAMBLAJE DE SECUENCIAS.....	34
3.6.3 VALIDACIÓN DE SECUENCIAS CONTIG.....	34

3.6.4 BÚSQUEDA DEL MARCO ABIERTO DE LECTURA (ORF) DE LOS GENES <i>gyrA</i> y <i>PBP1A</i>	35
3.6.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN 23s rRNA	36
3.6.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES <i>gyrA</i> y <i>PBP1A</i>	36
3.6.7 ANÁLISIS DE DATOS	37
3.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS	37
4. RESULTADOS	39
4.1 Validación de los iniciadores y secuencias contig.....	39
4.2 dETECCIÓN de las mutaciones del gen <i>gyrA</i> relacionadas con resistencia a levofloxacina en <i>Helicobacter pylori</i>	39
4.2 Medición de la frecuencia de las mutaciones del gen <i>PBP1A</i> relacionadas con resistencia a amoxicilina en <i>Helicobacter pylori</i>	39
4.3 Medición de la frecuencia de las mutaciones del gen 23s rRNA relacionadas con resistencia a claritromicina en <i>Helicobacter pylori</i>	41
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSION.....	45
7. Recomendaciones.....	46
8. REFERENCIAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estados oscilantes de replicación (sensible a antibióticos) y no replicación (resistente a antibióticos) de <i>H. pylori</i> acorde al pH de su microambiente.....	22
Figura 2. Estructura del peptidoglicano.....	23
Figura 3. Mecanismo de acción de la levofloxacina.....	25
Figura 4. Esquema simplificado de la formación de un polipéptido en una bacteria.....	28
Figura 5. Selección del ORF de mayor longitud (ORF1) de una secuencia contig.	36
Figura 6. Alineamiento múltiple entre la secuencia de referencia y los ORF del gen PBP1A.....	37
Figura 7. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia <i>gyrA</i> y ORFs con mutaciones D91T/G/N.	39
Figura 8. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia PBP1A y ORFs con mutación I35V.	40
Figura 9. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia PBP1A y ORFs con mutación G44S.	40
Figura 10. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia PBP1A y ORFs con mutación A69V.....	41
Figura 11. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia PBP1A y ORFs con mutación F125L.	41
Figura 12. Resistencia antibiótica de <i>H. pylori</i>	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Código genético.....	27
Tabla 2. Iniciadores para la amplificación de los genes responsables de resistencia a antibióticos.....	33
Tabla 3. Ejemplo de verificación de la especificidad de iniciador del gen gyrA (F: AGCTTATTCCATGAGCGTGA).	34
Tabla 4. Ejemplo de verificación de la especificidad de la secuencia del contig de los cromatogramas F y R del gen 23s rRNA de la muestra 1. ...	35

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de *H. pylori* en la población es alta. Se estima que el 60% de la población mundial está infectada por el *H. pylori* (1), además, se encuentra asociado al origen de patologías gastroduodenales como: gastritis crónica, úlceras gástricas, cáncer gástrico, y además se encuentra relacionado con afecciones no digestivas como púrpura trombopénico idiopático, anemia idiopática por deficiencia de hierro, deficiencia de vitamina B12 (2)(7)(8). Las infecciones por esta bacteria son frecuentes en los individuos de clase socioeconómica baja y/o en los países subdesarrollados como Colombia (1). Consecuentemente en estos países es donde más se produce el fenómeno de la automedicación (3), siendo este problema un factor importante para el origen de resistencia bacteriana (4). La resistencia a los antibióticos es una de las principales causas del fracaso del tratamiento para *H. pylori* (5).

El aumento de casos de “superbacterias” resistentes a numerosos antibióticos es un gran problema tanto en materia de salud como económico. Anualmente se registran en el mundo unas 700.000 muertes por estos agentes y en los países en vía de desarrollo se estima que esta magnitud aumente exponencialmente, en la actualidad, a nivel mundial se está invirtiendo cerca de 100 billones de dólares al año para lidiar con este problema y se pronostica que para el 2050, 10 millones de personas morirán a causa de bacterias multiresistentes (9). Por lo que se hace necesario establecer protocolos terapéuticos apropiados para tratar este patógeno de acuerdo a su perfil de resistencia.

La resistencia de *H. pylori* está arrojando un número de fracasos al tratamiento estándar cada vez mayor a causa de variados índices de resistencia **diferentes** en cada país y región. En Brasil un estudio realizado a pacientes pediátricos, y adolescentes, obtuvo una resistencia global de 49.3%, donde el 40% de las cepas fueron resistentes a metronidazol, y un 19,5% a claritromicina (6). Otro estudio realizado a niños japoneses demostró que existe resistencia a claritromicina, y metronidazol en un porcentaje de 36.1%, y 14.8%, respectivamente (6). La prevalencia de la resistencia a la amoxicilina, afortunadamente, se ha mantenido baja, donde la mayoría de los estudios han reportado menos del 2% en todos los países europeos incluyendo Alemania y

los países bajos (10), excepto en Kenia y Bangladesh dónde arrojó un 4,6% y 6,6% respectivamente (11). En Asia y sur-américa la resistencia a amoxicilina ha sido reportado por encima de 38% (10). La resistencia primaria de *H. pylori* a las fluoroquinolonas (Levofloxacin) se ha informado en altas tasas en países como China e Italia con 34,5% y 22,1% correspondientemente, mientras que recientes estudios en Estados Unidos han demostrado un 31,9% de resistencia y en Portugal también se ha notificado una alta tasa de resistencia: 20,9% (10).

A nivel nacional se han realizado contados estudios para puntualizar el porcentaje de resistencia a amoxicilina, claritromicina, y levofloxacin en sus regiones. En cuanto a la resistencia a amoxicilina, en Cali se ha demostrado que existe una resistencia del 5,4% (8/147) (12), en Bogotá 7% (6/84) (13), mientras que en el eje cafetero (Armenia y Pereira) no se presentó resistencia (14). Respecto a claritromicina, en Bogotá se han publicado resistencias de 17,72% y 15% (11,12), mientras que en el centro occidente del país se ha obtenido un 3,8% (11). En cuanto a la levofloxacin, En Bogotá se ha observado una resistencia de (15,6%) entre 2009 y 2011. (13,4%) para 2009. (23,2%) en el 2010 y en el 2011(14,85%) (15).

Nuestro departamento de Córdoba, a pesar de haber experimentado en los últimos años un marcado crecimiento económico con una reducción de la desigualdad (16), aún presenta grandes poblaciones con un nivel socioeconómico bajo (17). Lo cual conjugándolo con la alta incidencia infecciosa de este patógeno, la automedicación y el abandono del tratamiento, da lugar a una presión selectiva aún mayor, lo cual promueve la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes a antibióticos.

La presencia de mutaciones en algunos sitios de los genes *gyrA*, *pbp1A* y 23S rRNA puede provocar resistencia a la Levofloxacin, Amoxicilina y Claritromicina respectivamente (18). La determinación fenotípica de estas mutaciones en estos genes es complicada y de baja sensibilidad. Debido a que para el cultivo, la identificación bioquímica del género y especie, y la obtención del perfil de resistencia antibiótica se requiere una serie de condiciones estrictas y difíciles de obtener (6). Lo que hace necesario establecer la existencia o no de dichas mutaciones por medio de métodos genotípicos utilizando métodos de biología molecular y la bioinformática. Éste método es

frecuentemente utilizado a nivel mundial para determinar la existencia de mutaciones en *H. pylori* y otros microorganismos (19), cobrando especial relevancia en muestras donde no es viable el cultivo por diferentes causas.

Es importante conocer la incidencia de mutaciones genéticas de resistencia antibiótica en las cepas de *H. pylori* presentes en Montería, para brindar información que pueda ayudar a establecer un protocolo terapéutico eficaz y más acorde a la susceptibilidad de este microorganismo en la región. Por con este estudio se buscó conocer la frecuencia de mutaciones en *H. pylori* responsables de la resistencia hacia claritromicina, amoxicilina y levofloxacina de pacientes de la ciudad de Montería, por medio de técnicas mucho más eficientes y eficaces como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación y posterior análisis del producto de la secuenciación por medio de diferentes herramientas bioinformáticas.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 GENERALIDADES DE *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

La historia del descubrimiento de *H. pylori* inicia hace más de 100 años cuando fueron observadas en muestras estomacales de personas que padecían ulcera gástrica (20) lo que llevó a que varios autores sugirieran que la infección por este microorganismo podría ser causal de úlceras estomacales (21). Sin embargo, este hallazgo fue anulado por la creencia de que el estómago era un órgano estéril debido a que ninguna bacteria podría crecer a un pH tan ácido y por lo tanto las bacterias encontradas en él eran producto de la contaminación con la flora de la cavidad oral (22). No fue hasta 1983 cuando Barry Marshall y Robin Warren publicaron en Lancet (23) el hallazgo de un bacilo curvo no identificado en el epitelio gástrico de personas con gastritis crónica activa, denominado en ese entonces: *Campylobacter pylori* y en la actualidad: *Helicobacter pylori* (20).

Es una bacteria gram negativa en forma de espiral. Puede poseer forma en espiral, cocoide o en "U" cuando está en la conversión de una forma a otra. La acción de 2 a 6 flagelos unipolares le confiere gran motilidad para moverse rápido en soluciones viscosas tales como la capa de moco presente sobre las células epiteliales gástricas (20). La presencia de fimbrias o cápsulas no ha sido reportada. Se ha asociado a gastritis, úlceras pépticas, adenocarcinoma gástrico y linfomas de linfocitos B del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT) (2)(7) y además se encuentra relacionado con afecciones no digestivas como púrpura trombocitopénica idiopática, anemia idiopática por deficiencia de hierro, deficiencia de vitamina B12 (8).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Actualmente se encuentra colonizando a más de la mitad de la población mundial (24). La prevalencia global y regional varía desde niveles bajos en los países altamente industrializados de Occidente, elevándose en los países subdesarrollados de África los cuales poseen la predominancia más alta de

infección por *H. pylori* con un 70,1%, mientras que en Oceanía es mucho más baja con 24,4%. Entre los países, la prevalencia de infección por *H. pylori* varió desde un 18.9% en Suiza a 87.7% en Nigeria (25). Las tasas de incidencia son generalmente altas durante la infancia y la prevalencia aumenta abruptamente en este período, mientras que en los países más desarrollados las tasas de infección son más bajas y la proporción de personas infectadas aumenta de forma gradual a lo largo de la vida (26).

Las infecciones por esta bacteria son frecuentes, especialmente en los individuos de clase socioeconómica baja o en los países en desarrollo como Colombia (27). Es un microorganismo ubicuo y de amplia distribución. Sólo una fracción de los individuos colonizados desarrolla úlcera péptica y cáncer gástrico, cuyos factores determinantes son los polimorfismos genéticos del huésped y su interacción con una cepa en particular durante décadas de infección (28).

La infección por *H. pylori* es el factor de riesgo más importante para el cáncer gástrico, y se estima que representan aproximadamente el 80% de todos los casos en el mundo (29). El cáncer gástrico es dos veces más frecuente entre los hombres que en las mujeres (30) del mismo modo el sexo masculino posee una mayor prevalencia de infección por *H. pylori* tanto en niños como en adultos (31).

1.3 RUTAS DE TRANSMISIÓN

Los humanos son el principal reservorio (1) y Existen múltiples vías de diseminación para *H. pylori*. La transmisión por vía oral-oral a través de la saliva, vomito tiene una dosis infecciosa se ha estimado en 104 UFC (Unidades Formadoras de Colonia) por mL (32). Otras vías son la fecal-oral, ingestión de alimentos y agua contaminados (10); Y la transmisión por moscas, la cual está respaldada por datos epidemiológicos y de laboratorio (32). Por lo tanto, las mejoras en la higiene y las condiciones de vida son factores importantes para disminuir la prevalencia de la infección.

1.4 GENOMA Y FACTORES DE VIRULENCIA

H. pylori tiene un solo cromosoma circular el cual varía de tamaño entre las cepas. Hace dos décadas, Taylor et al. (33) analizaron los cromosomas de 30 cepas y encontraron un rango de 1608-1727 kb (1.000 pares de bases) con un valor medio de 1670 kb.

La presencia o ausencia de factores de virulencia está regida por diversas variables como la organización cromosómica, mutaciones puntuales en genes altamente conservados, la presencia de formas no conservadas en el mosaico de genes (28), sin dejar de lado factores ambientales (como el tabaquismo, el alto consumo de sal, la desnutrición, la deficiencia de vitaminas y antioxidantes) (34).

Los principales factores de virulencia comprende la ureasa, adhesina (BabA), la citotoxina vacuolizante (*vacA*) y los productos de islas de patogenicidad *cag* (*cag PAI*) (35).

1.4.1 Ureasa

El principal mecanismo utilizado *H. pylori* para colonizar el epitelio gástrico tiene como protagonista la enzima ureasa, la cual al hidrolizar la urea en dióxido de carbono y amoníaco produciendo neutralización del pH gástrico el cual es extremadamente ácido (33). Permitiéndole así crear un “microclima” con todas las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de esta bacteria (8).

1.4.2 GEN *babA*

Las adhesinas de *H. pylori* facilitan la colonización, la persistencia de la infección, el suministro de factores de virulencia a las células del epitelio gástrico y la remoción por acción del movimiento peristáltico del estómago (34) (36).

BabA (blood antigen binding adhesion) es una proteína de 75 KDa que presenta tropismo por los antígenos del grupo sanguíneo Lewisb (Leb) expresados en las células del epitelio gástrico del huésped (36). La estructura

del receptor de BabA es similar al antígeno de sangre tipo O. Se ha demostrado epidemiológicamente la relación que existe entre las personas con tipo de sangre O y las enfermedades gástricas (34).

1.4.3 GEN *vacA*

El gen que codifica la citotoxina vacuolizante A (*vacA*) está presente en todas las cepas, es una proteína de 87 kD que induce la vacuolización y apoptosis de las células del epitelio gástrico (34) (35). Adicionalmente la toxina VacA produce múltiples efectos inmunológicos, debido a que interfiere con la fagocitosis y la presentación de antígenos. Además inhibe la activación de las células T y su proliferación (20).

1.4.4 GEN *cagA*

La prevalencia epidemiológica de la infección por *H. pylori* con CagA-positivo en los países occidentales es de casi el 60% (37)(38), y la prevalencia es de alrededor del 90% en los países asiáticos (39)(40).

La infección con cepas CagA-positivas se asocia a mayor grado de daño epitelial, inflamación crónica y actividad neutrofílica en la mucosa gástrica, así como un mayor riesgo de atrofia gástrica y metaplasia intestinal, en comparación con las cepas CagA-negativas (34). Varios estudios indicaron que las cepas CagA-positivas están directamente asociadas con gastritis aguda, úlcera gástrica y desarrollo del cáncer gástrico (34). Como resultado, la virulencia de los aislados individuales de *H. pylori* se ha medido por su capacidad para producir CagA.

1.5 DIAGNÓSTICO

El examen histológico de la biopsia gástrica ha sido el método estándar para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Sin embargo, posee algunas limitaciones como la dependencia de la subjetividad del patólogo, lo que se traduce en variaciones diagnósticas derivadas de las observaciones de los distintos profesionales. Esta a su vez ostenta una sensibilidad y especificidad que varía del 53% - 90%, debido a que *H. pylori* se distribuye irregularmente en la mucosa gástrica, derivando en una no detección en muestras tomadas de

un sitio “negativo” (6). El cultivo que es actualmente uno de los métodos más aceptados comprende una sensibilidad del 69% - 98% y una especificidad del 100% (41). Siempre y cuando éste se realice en condiciones óptimas. Sin embargo, se han informado valores de sensibilidad del 85,4%, en parte a consecuencia de que *H. pylori* es una bacteria muy delicada, exigente, de crecimiento lento y requiere de un cultivo inmediato luego del muestreo para aumentar las probabilidades de crecimiento (6). Lo que supone un reto a la hora de determinar su perfil de susceptibilidad antibiótica por métodos fenotípicos. Es así como hoy por hoy no se cultiva este microorganismo en el ámbito clínico y su diagnóstico así como la detección de sus mutaciones, está indicado realizarlo por métodos moleculares.

1.5.1 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La PCR permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ADN (ácido desoxirribonucleico) (42) fundamentándose en el mismo proceso utilizado por las células para la replicación del ADN, en el cual se usan dos hebras de ADN como molde para tal fin. Es la técnica más importante de la biología molecular debido a que entre otras bondades permite junto con la bioinformática detectar mutaciones puntuales relacionadas con cambios fenotípicos específicos (43). Es un método frecuentemente utilizado para identificar a *H. pylori* en muestras pequeñas y que además contiene pocas bacterias (44). Admite el transporte de la muestra para su procesamiento y no requiere de la utilización de materiales y suministros especiales para el traslado (6). Es una prueba rápida en comparación con otros métodos diagnósticos, igualmente cobra relevancia en aquellas muestras que no pueden ser cultivadas debido a un transporte prolongado o en casos donde no es viable el cultivo por contaminación de la biopsia gástrica.

1.7 TRATAMIENTO

La elección del tratamiento de primera línea en cada caso dependerá principalmente de la tasa de resistencia de *H. pylori* a los antibióticos prescritos. Todas las guías de práctica clínica actuales aconsejan el uso de la

triple terapia estándar (inhibidor de la bomba de protones [PPI], claritromicina y amoxicilina) (45).

Para pacientes alérgicos a la penicilina se ha recomendado una triple terapia clásica (PPI, claritromicina y metronidazol). Sin embargo, varios estudios han demostrado que esta combinación alcanza tasas de erradicación inaceptables (46). La terapia cuádruple clásica de bismuto (PPI, bismuto, tetraciclina y metronidazol) ha logrado mejores resultados (46) y por lo tanto debe ser el tratamiento de elección en pacientes alérgicos a la penicilina. Cuando el tratamiento triple estándar o el tratamiento de primera línea falla se recomienda el tratamiento de rescate cuádruple.

Varias investigaciones han demostrado que un régimen triple de segunda línea que involucre levofloxacina obtiene una eficacia similar o superior con una menor incidencia de efectos adversos, en comparación con una terapia cuádruple de bismuto (47). Se ha sugerido que la adición de bismuto y un tratamiento más prolongado podrían mejorar la eficacia de la terapia triple con levofloxacina. Por lo tanto, estudios recientes han demostrado que la adición de bismuto al tratamiento (amoxicilina, levofloxacina y bismuto) administrado durante 14 días logra una alta eficacia de erradicación (90% aproximadamente) después del fracaso con cualquier terapia triple o cuádruple con claritromicina (48), lo cual le suma importancia como tratamiento de rescate (49).

1.7.1 RESISTENCIA AL TRATAMIENTO De *H. pylori*

Muy frecuentemente la triple terapia estándar (IBP, amoxicilina y claritromicina o metronidazol) utilizada para erradicar a *H. pylori* es fallida por razones inciertas y aleatorias.

La acidez que posee la mucosa gástrica donde se da la infección por *H. pylori*, es un gran problema a la hora de erradicar esta bacteria, debido a que su pH ácido puede inactivar a los antibióticos (50) además, este varía durante un periodo de 24 horas y no es el mismo en las diferentes zonas donde se encuentra la bacteria (26). Además, *H. pylori* tiene la facultad de oscilar entre un estado de replicación (el organismo permanece susceptible a los

antibióticos) y un estado de no replicación (el organismo se vuelve fenotípicamente resistente a los antibióticos) dependiendo del pH de su microambiente. Por lo tanto, pueden entrar en un estado de no replicación (sin perder la viabilidad) cuando el pH de su microambiente está entre 4,0 y 6,0, haciendo aún más difícil la acción del antimicrobiano (5) (figura 1). Otra causa es el incumplimiento del paciente en las dosis y horarios para la ingestión de los medicamentos del esquema terapéutico (10).

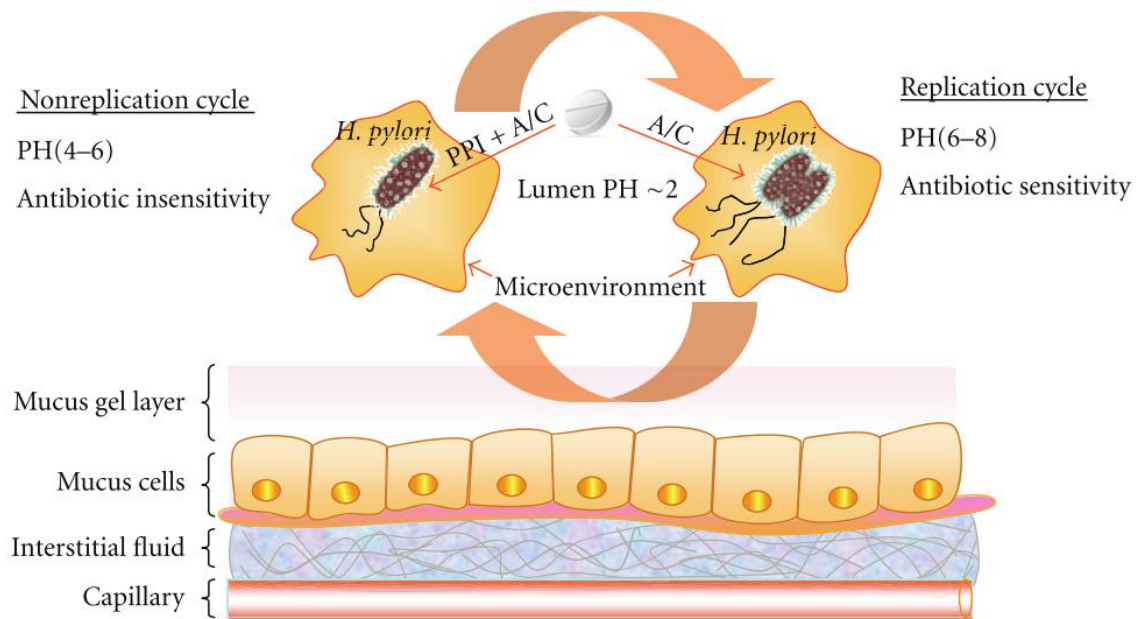


Figura 1. Estados oscilantes de replicación (sensible a antibióticos) y no replicación (resistente a antibióticos) de *H. pylori* acorde al pH de su microambiente.

Tomado de: Recent insights into antibiotic resistance in helicobacter pylori eradication. Gastroenterology Research and Practice. 2012. Los antibióticos al hacer sinergismo con el PPI tienen una mayor eficacia, debido a que cuando la PPI cambia medio ácido que favorece la infección de *H. pylori* obligándola a cambiar al ciclo de replicación, siendo en este estado sensible a antibióticos. PPI: inhibidor de la bomba de protones, A: amoxicilina, C: claritromicina.

El factor más importante para el fracaso del tratamiento es la resistencia de *H. pylori* a uno o más antimicrobianos por la presencia de mutaciones en algunos sitios de los genes *gyrA*, *pbp1A* y 23S rRNA que pueden provocar resistencia a la levofloxacina, amoxicilina y claritromicina respectivamente (18).

1.7.1.1 Mecanismo de acción de la amoxicilina: La amoxicilina siendo parte de la familia de los β -lactámicos, su mecanismo de acción tiene como principal objetivo inhibir la síntesis de la pared bacteriana (51).

La pared bacteriana es una estructura que envuelve las bacterias de todos los géneros, excepto los micoplasmas; La mayoría de las bacterias rodean su membrana citoplasmática con una capa de peptidoglicano. Las bacterias Gramnegativas tienen una pared celular más fina con respecto a las Grampositivas y las ácido alcohol resistente. Además, es más compleja y consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas, y de una capa interna pero delgada de peptidoglicano (52).

La estructura del peptidoglicano consiste en largas cadenas alternantes de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, las cuales se encuentran unidas por una cadena de tetrapéptido (51). Las cadenas vecinas de peptidoglicano están articuladas por la formación de cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí, formando una malla (53) (figura 2). Este último paso es catalizado por una serie de transpeptidasas que son los objetivos de los antibióticos β -lactámicos (por lo que reciben el nombre de proteínas de unión a la penicilina (PBPs).

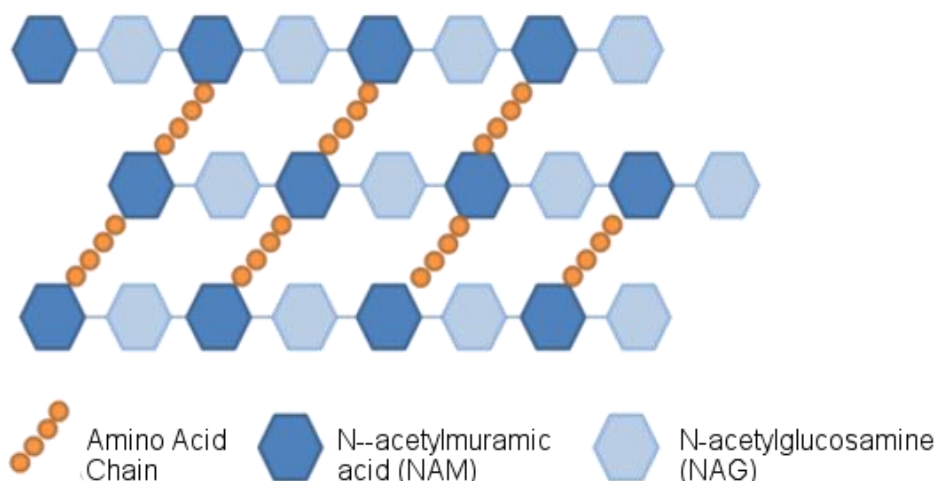


Figura 2. Estructura del peptidoglicano.

Tomado de: Peptidoglycan. Molecular Medical Microbiology. 2015. Los diferentes componentes del peptidoglicano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio periplásmico, donde se van ensamblando (53). La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos (mediante la pérdida de uno de los aminoácidos terminales), para lo que se necesita la acción de unas enzimas que se localizan en el espacio periplásmico, llamadas de forma genérica transpeptidasas o PBPs (52). El anillo β -lactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido que se une a estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a las PBPs de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular.

Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión oncótica. Por tanto, para que actúen los β -lactámicos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que éste es el momento en que se sintetiza la pared celular (51).

1.7.1.2 Resistencia de *H. pylori* a amoxicilina: La Resistencia de *H. pylori* a la amoxicilina es producto de la disminución en la capacidad de acople de este antibiótico a las PBPs (proteínas de unión a penicilina), debido a la modificación del sitio de unión al antibiótico por 10 diferentes cambios de aminoácidos contenidos en un bloque de mosaico (dominios transglicosilasa y transpeptidasa) en el gen *PBP-1A* (54).

Estudios realizados en Colombia han arrojado que las siguientes mutaciones están implicadas a dicha resistencia, A69V, K619T, N608S, T511A, T556S, T586M, M497H, I552V, I563T, I547T, A611S, T593S, S638T, L494F, X594G, X595G, X596S y V601A. (12) S414R, F126L, F125L, I79L, G44S, I35V, T30N, I101V, A69V, G112S (55) (12). A nivel mundial otros estudios mostraron que estas mutaciones también se encuentran implicadas: S402G, E406A, S417T, T555S, N561Y, S542R, T540I e I562V que en su conjunto favorecen la aparición de resistencia (56). Sin embargo las mutaciones (S414R, T556S) son las más comunes en PBP1 relacionados la resistencia de amoxicilina (5). No obstante existen estudios que relacionan a estas otras mutaciones E406A,

S417T, M515I, D535N, S543R, N562Y, K648Gln, R649K, R656P, A369T, V374L, L423F, T593A, G595S yT438M con resistencia a amoxicilina (12).

Al no ser bloqueadas las PBP_s por la unión del β -lactámico, esta continúa con su función biológica que consiste en participar en la síntesis del peptidoglicano durante la formación de la pared celular (18).

1.7.1.3 Mecanismo de acción de la levofloxacin: La levofloxacin pertenece a la familia de las fluoroquinolonas, estos son antibióticos bactericidas sintéticos, que inhiben selectivamente la replicación y síntesis proteica de la bacteria, bloqueando la topoisomerasa IV y al ADN-girasa (topoisomerasa II) (57). Estas topoisomerasas participan en el desenrollamiento, enrollamiento y posterior separación de las hebras de ADN tras la replicación (58).

Para las bacterias Gramnegativas las fluoroquinolonas (levofloxacin) participa principalmente en la inhibición de la subunidad A de la ADN-girasa (59). La cual participa en desenrollamiento del ADN bicatenario en una estructura monocatenaria, lo que permite el apareamiento de bases complementarias. Al ser esta molécula bloqueada la bacteria es incapaz de replicar su ADN e incluso sintetizar proteínas, causando la muerte rápida de la bacteria. La topoisomerasa IV es la diana en las bacterias Grampositivas, esta se encarga de separar las hebras de ADN tras cada replicación.

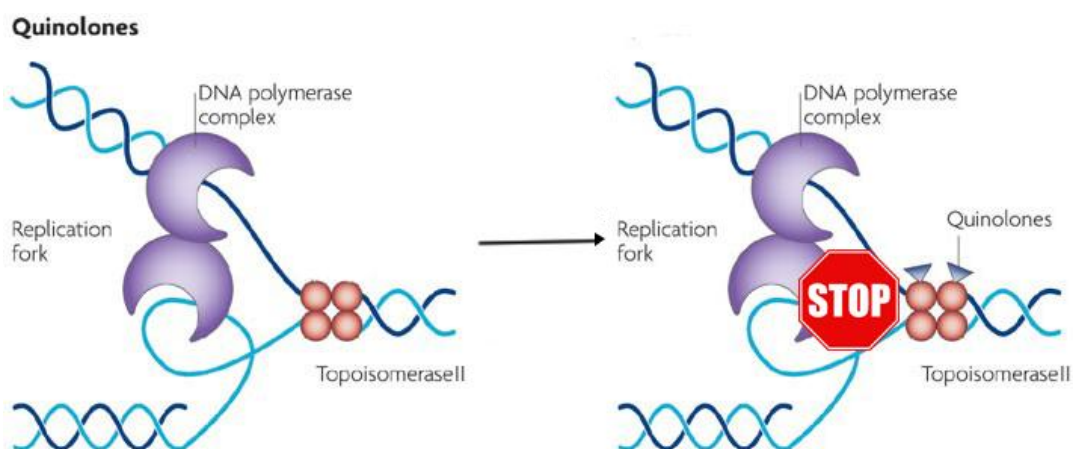


Figura 3. Mecanismo de acción de la levofloxacin.

Adaptado de: How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nat Rev Microbio. 2010. Después de que el fármaco se ha acoplado a la enzima la replicación del ADN se detiene, lo que conduce a la inhibición de la síntesis de ADN, e inmediatamente a la bacteriostasis y eventualmente a la muerte celular.

1.7.1.4 Resistencia *H. pylori* a la levofloxacin: El mecanismo de resistencia de *H. pylori* a la levofloxacin consiste en mutaciones puntuales localizadas en la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR) del gen *gyrA* (18) que codifica la girasa, responsable de la división del ADN y su recombinación (5) (18), previniendo la unión entre el antibiótico y a enzima (Figura 3).

Las mutaciones más importantes se encuentran en N87K, A88V, D91G/Y. Confiriendo resistencia a la levofloxacin y a otras quinolonas (18) (10) (5). Mutaciones en el gen *gyrB* también están conexas con cepas resistentes a levofloxacin. Esto ocurre raramente y ocurre a menudo junto con las mutaciones de *gyrA*. Esto indica que *gyrB* tiene poco impacto en la resistencia primaria a la levofloxacin (5). Estas mutaciones previenen la unión entre el antibiótico y la enzima, confiriendo así la resistencia (18)

1.7.1.5 Mecanismo de acción de la claritromicina: La claritromicina pertenece a la familia de los macrólidos; La actividad antibacteriana de los macrólidos se basa en el impedimento de la síntesis de proteínas, mediante el bloqueo de una subunidad ribosomal de la bacteria atacada. Esto generalmente da como resultado un efecto bacteriostático (60).

La traducción del ARN mensajero (ARNm) en elementos catalíticos y estructurales de la célula (proteínas) implica los siguientes pasos: Transcripción, traducción y por último: Su plegamiento, modificación y ensamblaje, y terminación (57).

La traducción genética se refiere al proceso en el cual, el ARNm (por medio de los ribosomas) sirve como molde para la síntesis de proteínas. El ARNm

proviene de la transcripción del ADN el cual contienen información codificada de la secuencia específica de aminoácidos de una proteína a formar. Cuatro nucleótidos diferentes (A, G, C y U) conforman el ARNm los cuales se encuentran dispuestos en grupos de tres, designados como "codones" (Tabla 1) (61). Existen 64 codones posibles; 61 codifican los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas y 3 dan la señal de terminación de la traducción (codones de parada: UAA, UAG y UGA). Uno de los codones (AUG) tiene un doble papel: En la iniciación de la traducción y en la codificación del aminoácido metionina (62).

	<i>U</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	
U	phe	ser	tyr	cys	U
	phe	ser	tyr	cys	C
	leu	ser	stop	stop	A
	leu	ser	stop	trp	G
C	leu	pro	his	arg	U
	leu	pro	his	arg	C
	leu	pro	gln	arg	A
	leu	pro	gln	arg	G
A	ile	thr	asn	ser	U
	ile	thr	asn	ser	C
	ile	thr	lys	arg	A
	met	thr	lys	arg	G
G	val	ala	asp	gly	U
	val	ala	asp	gly	C
	val	ala	glu	gly	A
	val	ala	glu	gly	G

Tabla 1. Código genético.

Tomado de: Genetic Translation. Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2013. Las letras de la primera columna corresponden a la primera base del codón; Las letras en la fila superior corresponden a la segunda base; Y las letras en la última columna corresponden a la tercera base. Las abreviaturas estándar de tres letras se utilizan para los aminoácidos. Obsérvese que la metionina (*met*) y el triptófano (*trp*) son los únicos dos aminoácidos que tienen sólo un codón. Los 18 aminoácidos restantes tienen codones múltiples.

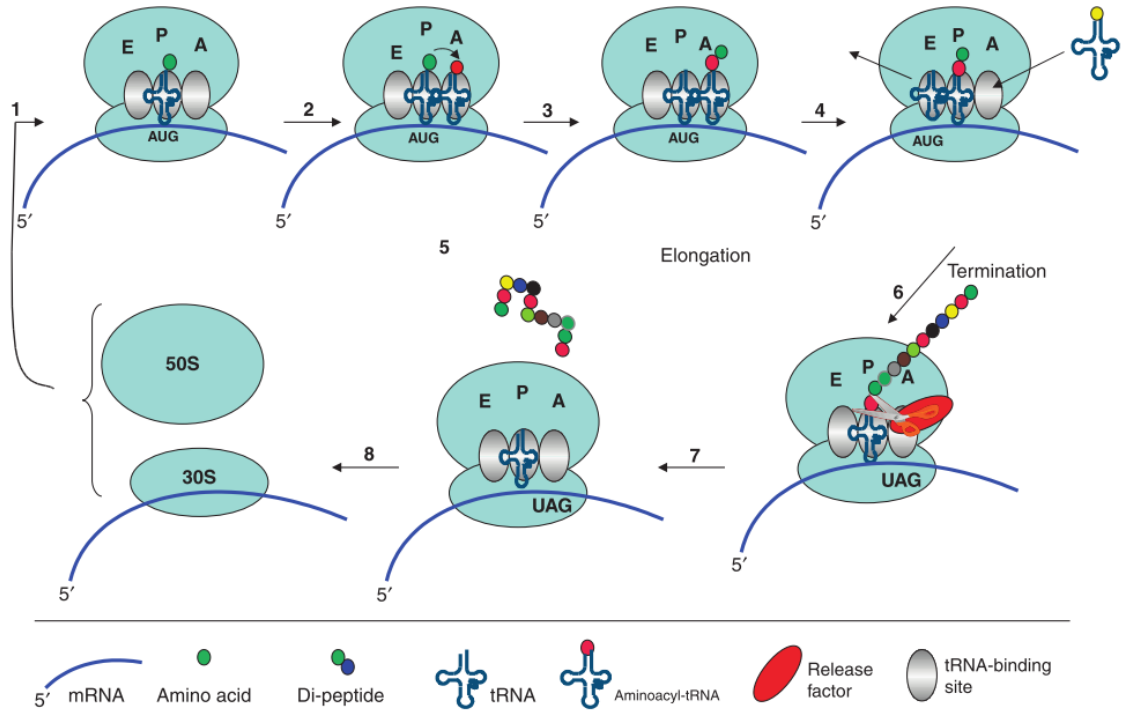


Figura 4. Esquema simplificado de la formación de un polipéptido en una bacteria.

Tomado de: Genetic Translation. Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2013.

Etapas:

Etapas 1: El proceso comienza con la unión del ARNt del iniciador en el sitio del péptido (P), permitiendo que se produzca el emparejamiento de bases entre el codón de inicio AUG presente en el ARNm y el anticodón dado por el ARNt.

Etapas 2: El aminoacil-ARNt que se cotejará con el segundo codón se une entonces al sitio (A).

Etapas 3: Mientras se forma el enlace peptídico, el aminoácido en el ARNt que está en el sitio P se transfiere al ARNt del sitio (A).

Etapas 4: El ARNm se mueve entonces en la dirección 5' que conduce a la translocación del ARNt del sitio (A) a el sitio (P), y la translocación del ARNt desacilado del sitio (P) al sitio de salida (E). Esto deja al sitio A libre para que el siguiente ARNt que reconocerá al siguiente codón pueda unirse, cuando este último ARNt se une, el ARNt desacilado que está en el sitio (E) sale.

Paso 5: Estas etapas se repiten durante el alargamiento de la cadena del péptido.

Paso 6: La elongación se termina cuando se alcanza el primer codón de parada.

Paso 7: El polipéptido completado se escinde y se libera del ARNt del sitio (P).

Paso 8: Después de la unión de los factores de liberación. El ribosoma libera al RNAm y al ARNt desacilado que está en el sitio (P). Disociándose posteriormente las subunidades ribosómicas.

1.7.1.6 Resistencia de *H. pylori* a la claritromicina: El dominio V de la molécula de ARN ribosomal 23s es la diana de la claritromicina. Mutaciones específicas en este dominio del gen 23S rRNA son responsables de la resistencia, estas mutaciones impiden la unión de este antibiótico con su sitio blanco, dando lugar a resistencia (10).

En Colombia se han descrito las alteraciones T2183C, C2196T, A2144G, A1593T, A1653G, C1770T, C1954T y G1827C (12). En un estudio realizado a pacientes uruguayos, se encontró que todas las cepas resistentes a claritromicina presentaron mutaciones puntuales en la posición 2143 (sustitución de A por G), en concordancia con los resultados del estudio de otras cepas estudiadas en algunos países en desarrollo en todo el mundo. Esta mutación junto con A2144G y A2142G/C se asocian con mayor frecuencia a la resistencia a claritromicina en cepas naturales de *H. pylori* en Europa, Asia, América del Sur, Norteamérica y África, mientras que A2144G, también es frecuente en algunos países de Asia y América del Norte (63).

Otras mutaciones relacionadas con la resistencia a claritromicina, pero, menos frecuentes se encuentran en las posiciones A2115G, T2117C, G2141A, G2224A, C2245T, T2289C, C2611A, T2717C T2182C, T2717C y T2243C (18) (63). Se ha demostrado que mutaciones en C2147G, T2190C, C2195T, A2223G y C2694A han estado implicadas en el desarrollo de la resistencia a claritromicina, aunque su función precisa en el mecanismo de resistencia permanece incierta (10).

1.8 DETECCIÓN DE MUTACIONES GENÉTICAS

El ADN codifica la información genética mediante la combinación de sus bases nitrogenadas: Adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Las cuales se encuentran unidas individualmente a un azúcar (desoxirribosa) más a un grupo fosfato, conformando el nucleótido. Cada una de estas 4 bases tiene complementariedad definida, la A se acopla con T y G con C (61). Un grupo de 3 nucleótidos se denomina codón, donde uno o más codifica un aminoácido, por ejemplo: El codón ATG origina la metionina, mientras que la glicina es codificada por 4 codones diferentes, y la arginina por 6 codones. Posterior a la

síntesis del aminoácido, éste se ensambla al resto, conforme a la secuencia relativa de codones de un gen, dando lugar a una proteína (62). Cualquier cambio que se produzca en la secuencia de las bases, puede modificar el código del ADN y alterar la expresión de la proteína (64).

Estas mutaciones pueden ser conservadoras o no conservadoras, las conservadoras se caracterizan por cambios que no afectan la función de la proteína, por ejemplo: Si en el triplete (TCA), que codifica la serina, cambia la (T) por (A) produciendo: (ACA), el aminoácido resultante es la treonina, que es muy similar a la serina y si la (A) cambia por (C) el resultado es: (TCC) que produce el mismo aminoácido, en ambos casos la función de la proteína permanece intacta. Si por el contrario, se produce el cambio de la T por una C dando lugar a: (CCA), se traduce en el aminoácido prolina, que es muy diferente de la serina, alterando la proteína, por lo que se trataría de una mutación no conservadora (64).

Estos cambios pueden ser detectados por un proceso de detección computarizada de mutaciones. Las secuencias biológicas (ADN o aminoácidos) obtenidas por técnicas de biología molecular, al ser comparadas con secuencias de referencia existentes en bases de datos virtuales, por medio de la bioinformática, brinda información útil sobre las relaciones evolutivas, funcionales y / o estructurales que posee la secuencia en cuestión (65).

El proceso por el cual se determina la homología o el grado de similitud entre dos secuencias biológicas se denomina alineamiento pareado, donde el algoritmo estándar para este tipo de comparación es el de Smith–Waterman (66). Éste se encarga de organizar las secuencias de tal forma que se maximice sus similitudes para luego hacer la comparación de cada residuo, sean idénticos o no, arroja un puntaje positivo o negativo respectivamente. Además de revelar la posición exacta y puntual de los residuos no alineados y alineados (67). Para las secuencias de ADN, la puntuación de la similitud es simple, debido a que se usan para la comparación sólo los nucleótidos contenidos en la secuencia. En contraste a lo que pasa con las secuencias de aminoácidos (a.a), donde para una puntuación positiva (a.a idénticos) es cotejado además entre a.a que muestren propiedades fisicoquímicas similares (por ejemplo Serina y Treonina) (68).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar bioinformáticamente mutaciones en los genes: *gyrA*, *pbp1a* y 23S rRNA de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas de pacientes de la ciudad de Montería.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar las secuencias obtenidas de los genes de *gyrA*, *PBP1a* y 23S rRNA de *Helicobacter pylori* con la base de datos de nucleótidos de GenBank.
- Correlacionar las mutaciones encontradas en los genes *gyrA*, *pbp1a* y 23S rRNA de *Helicobacter pylori* con las reportadas por la literatura como relacionadas con la resistencia a levofloxacina, amoxicilina y claritromicina respectivamente.
- Medir la frecuencia de las mutaciones de los genes *gyrA*, *PBP1A* y 23s rRNA relacionadas con resistencia a levofloxacina, amoxicilina y claritromicina respectivamente en *Helicobacter pylori*.

3. METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Prospectivo, descriptivo

3.2 ZONA DE ESTUDIO

La ciudad de montería, capital del departamento de Córdoba, se sitúa al norte del país, cuyas coordenadas son Latitud: 8.75, Longitud: -75.883 y 8° 45' 0" Norte, 75° 52' 59" Oeste. Donde la ciudad más cercana es el municipio de Cereté.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

27 pares de cromatogramas producto de la secuenciación de los genes *PBP1A* (9), *gyrA* (9) y 23s rRNA (9) por la empresa MacroGen® (69). Provenientes de 9 biopsias positivas para *H. pylori* procedentes de un macroproyecto financiado por una convocatoria interna de la universidad de Córdoba en el año 2008, el cual tuvo como objetivo detectar la resistencia molecular de *H. pylori* a amoxicilina, levofloxacina y claritromicina en la Universidad de Córdoba (70).

3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Cromatogramas con formato SCF o ABI
- Sin ambigüedades
- Sin ruido
- Picos muy bien espaciados
- Cada base debe tener un QV (puntaje de confianza) mayor de 15.
- Muestras Reverse y Forward idénticas en un 80% o mayor
- Tamaño de 20 bases o más.

3.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Cromatogramas con formato FASTA, SEQ, TXT o sin formato
- Con algunas ambigüedades

- Diferencia entre ruido y señal muy baja
- Amplitud de señal baja
- Picos superpuestos
- QV inferior a 15
- Muestras Reverse y Forward idénticas en un porcentaje inferior a 80%
- Tamaño inferior a 20 bases.

3.6 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

3.6.1 VALIDACIÓN DE INICIADORES Y SECUENCIAS

Antes de proceder a procesar los cromatogramas de los genes *gyrA*, *pbp1a* y 23S rRNA de *H. pylori*, se comprobó en cada iniciador (tabla 2) empleado para la amplificación de los anteriores genes, la calidad y especificidad que posee con la secuencia del gen diana. La especificidad se corroboró mediante un alineamiento de nucleótidos (Tabla 3) en Blastn (71).

Iniciador	Secuencia 5'—3'	Ubicación del gen	Referencia
23S rRNA	F: CCACAGCGATGTGGTCTCAG	1823-2752 (Dominio V)	Sonia Agudo Pena (72)
	R: CTCTCGTACTAGGGACAGCTC		
<i>gyrA</i>	F: AGCTTATTCCATGAGCGTGA	78-659 (QRDR)	Wang et al. (73)
	R: TCAGGCCCTTTGACAAATTC		
<i>pbp1a</i>	F: GGCGACTAGCATGGTGATTT	1378-1934 (Dominios transglicosilasa y transpeptidasa)	Matteo et al. (74)
	R: TCATGGGGTTATTAGCCATTC		

Tabla 2. Iniciadores para la amplificación de los genes responsables de resistencia a antibióticos.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori strain L7, complete genome	40.1	40.1	100%	0.24	100%	CP011482.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori J166, complete genome	40.1	40.1	100%	0.24	100%	CP007603.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori B38 complete genome, strain B38	40.1	40.1	100%	0.24	100%	FM991728.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori strain Bronsdon T81213-NTBT DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.24	100%	KT198994.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori strain 26695-1MET, complete genome	40.1	40.1	100%	0.24	100%	CP010436.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori 26695-1CL DNA, complete genome	40.1	40.1	100%	0.24	100%	AP013356.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori 26695-1CH DNA, complete genome	40.1	40.1	100%	0.24	100%	AP013355.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori 26695-1 DNA, complete genome	40.1	40.1	100%	0.24	100%	AP013354.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori Rif2, complete genome	40.1	40.1	100%	0.24	100%	CP003906.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori Rif1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.24	100%	CP003905.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori 26695, complete genome	40.1	40.1	100%	0.24	100%	CP003904.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori strain Sh-33 DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.24	100%	JQ323587.1
<input type="checkbox"/>	Helicobacter pylori strain Sh-31 DNA gyrase subunit A (gyrA) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.24	100%	JQ323585.1

Tabla 3. Ejemplo de verificación de la especificidad de iniciador del gen *gyrA* (F: AGCTTATTCCATGAGCGTGA).

3.6.2 ENSAMBLAJE DE SECUENCIAS

De los cromatogramas Forward y Reverse de cada gen secuenciado, se procedió a obtener una secuencia “contig” por medio del software DNA Baser (75). Esta secuencia resultante del ensamblaje es más larga y parecida a la originalmente secuenciada.

Se estableció dentro de los parámetros del software que las bases situadas en los extremos del cromatograma con puntuaciones de confianza inferiores a 15 en un rango de 13 bases sean ignoradas para el ensamblaje. Así mismo se activó la eliminación de las bases pertenecientes a vectores, mientras que el motor de recorte automático eliminó las bases altamente repetidas y contaminantes.

El software se encargó de originar la cadena complementaria de la secuencia reverse, de la cual se procedió al ensamblaje con la secuencia forward obteniéndose así la secuencia contig.

3.6.3 VALIDACIÓN DE SECUENCIAS CONTIG

A cada secuencia contig de los genes *gyrA*, *pbp1a* y 23S rRNA de *H. pylori* se le hizo un alineamiento con las presentes en la base de datos de nucleótidos de GenBank (76) por medio de Blastn (71). Para verificar si lo amplificado y

secuenciado correspondía al gen, a la región y al organismo para el que fue utilizado cada iniciador (Tabla 4).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1408	1408	98%	0.0	96%	AY056595.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori SS1, complete genome	1402	2805	97%	0.0	96%	CP009259.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori strain PMSS1 complete genome	1402	2805	96%	0.0	96%	CP018823.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori DNA, nearly complete genome, strain: F209	1402	2805	96%	0.0	96%	AP017332.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori gene for 23S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: Surabaya137	1402	1402	97%	0.0	96%	LC175236.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori strain CC33C, complete genome	1402	1402	97%	0.0	96%	CP011484.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori strain 7C, complete sequence	1402	2799	96%	0.0	96%	CP012905.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori strain 29CaP, complete genome	1402	2799	96%	0.0	96%	CP012907.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori J99, complete genome	1402	2805	97%	0.0	96%	CP011330.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori DNA, complete genome, strain: ML2	1402	2805	97%	0.0	96%	AP014711.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori strain 26695-1MET, complete genome	1402	2801	97%	0.0	96%	CP010436.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori strain Hp238, complete genome	1402	2805	96%	0.0	96%	CP010013.1
<input type="checkbox"/> Helicobacter pylori NY40 DNA, complete genome	1402	2805	96%	0.0	96%	AP014523.1

Tabla 4. Ejemplo de verificación de la especificidad de la secuencia del contig de los cromatogramas F y R del gen 23s rRNA de la muestra 1.

3.6.4 BÚSQUEDA DEL MARCO ABIERTO DE LECTURA (ORF) DE LOS GENES *gyrA* y *PBP1A*

A esta secuencia contig resultante se le identificó la porción codificante por medio de la detección del marco abierto de lectura, llamado en inglés “ORF”. Mediante la identificación del fragmento de secuencia delimitada por un codón de inicio (AUG) y otro de terminación mediante la plataforma web ORFfinder (77). Esta herramienta se encarga de traducir la secuencia de ADN en aminoácidos automáticamente antes de la búsqueda de los ORF. En caso de presentarse diferentes fragmentos codificantes, se escogerá el de mayor longitud (Figura 5).

consentimiento para la realización de este estudio. El análisis y publicación de los resultados, se realizó sin ningún dato referente a la identidad del participante o información que pueda comprometer su integridad.

4. RESULTADOS

4.1 VALIDACIÓN DE LOS INICIADORES Y SECUENCIAS CONTIG

- Todos los iniciadores utilizados para amplificar los genes *gyrA*, *PB1A* y *23s rRNA* obtuvieron un 100% de alineamiento con sus genes respectivos de *H. pylori*.
- Las secuencias contig de los genes *gyrA*, *PB1A* y *23s rRNA*, lograron el 100% de alineamiento con los genes *gyrA*, *PB1A* y *23s rRNA* de *Helicobacter pylori* respectivamente.

4.2 DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES DEL GEN *gyrA* RELACIONADAS CON RESISTENCIA A LEVOFLOXACINA EN *Helicobacter pylori*

Se encontró un total de 4 mutaciones concernientes a la resistencia a levofloxacina tras el análisis de 8 muestras, es decir, 4 muestras contenían cepas susceptibles a levofloxacina y otras 4 ostentaban cepas resistentes. No pudo ser procesada una de las muestras debido a la baja calidad de sus cromatogramas (forward y reverse).

Protein Sequences	
Species/Abbrv	▽ G
1. sp P48370 GYRA	D V I G K Y H P H G D N A V Y D A L V R M A Q D F S M R L E L V D G
2. Muestra_gyrA-1	N F G S I D G D N A A A M R Y T E A R M T K A S E E I L R D I D K D
3. Muestra_gyrA-2	D G Q G N F G S I D G D N A A A M R Y T E A R M T K A S E E I L R D
4. Muestra_gyrA-4	S M R L E L V D G Q G N F G S I D G D N A A A M R Y T E A R M T K A
5. Muestra_gyrA-5	R L E L V D G Q G N F G S F D G D D A A P M R Y I E A R M T K A S E
6. Muestra_gyrA-6	E L V D G Q G N F G S I D G D N A A A M R Y T E A R M T K A S E E I
7. Muestra_gyrA-7	M R L E L V D G Q G N F G S I D G D N A A A M R Y T E A R M T K A S
8. Muestra_gyrA-8	R L E L V D G Q G N F G S I D G D N A A A M R Y T E A R M T K A S E
9. Muestra_gyrA-9	C R Y V V C V V I V R R E Q D F F L S F E I L D G Q G H F G C F D G

Figura 7. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia *gyrA* y ORFs con mutaciones D91T/G/N.

La primera fila corresponde a la secuencia de referencia y el resto, a las muestras. Nótese que en la posición 91 con respecto a la primera fila, se presentan mutaciones importantes en las filas 2, 5, 6 y 8. En la fila 2 se encuentra la mutación D91T, en la 5 D91G, en la 6 D91N y en la 8 D91G. Estas mutaciones están relacionadas con la resistencia a la levofloxacina (5).

4.2 Medición de la frecuencia de las mutaciones del gen *PBP1A* relacionadas con resistencia a amoxicilina en *Helicobacter pylori*

Se descubrió un total de 4 mutaciones afines a la resistencia a amoxicilina de 8 pares de cromatogramas procesados. Por lo tanto la otra mitad (4) de las muestras tenían cepas susceptibles a amoxicilina. Por la mala calidad de un

par de cromatogramas concernientes a una muestra, no pudo ser analizada y mucho menos alineada una de ellas.

Protein Sequences																																
Species/Abbrv	G																															
1. gi 15645222 ref NP_		L	L	A	I	L	I	A	Q	V	V	T	T	D	K	D	I	A	K	I	K	D	Y	R	P	G	V	A	S	Q	I	
2. Muestra_PBP1A-1		R	K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F	R	F	Y	A	R	F	E	E	I	P	P	R	F	F	E	S	L
3. Muestra_PBP1A-2		L	D	R	K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F	R	F	Y	A	H	F	E	E	I	P	P	R	F	I	E
4. Muestra_PBP1A-3		P	G	V	A	S	Q	I	L	D	R	K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F	R	F	Y	A	H	F	E	E
5. Muestra_PBP1A-4		K	I	K	D	Y	R	P	G	V	A	S	Q	I	L	D	R	K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F	R	F
6. Muestra_PBP1A-6		I	K	K	K	F	T	G	F	K	P	F	L	S	V	K	V	G	Q	G	R	I	G	Y	C	*	D	*	G	L	S	
7. Muestra_PBP1A-7		I	A	K	I	K	D	Y	R	P	G	V	A	S	Q	I	L	D	R	K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F
8. Muestra_PBP1A-8		L	L	K	L	I	I	A	R	A	S	L	H	R	F	*	T	E	K	G	V	*	S	L	I	S	M	*	R	I	P	
9. Muestra_PBP1A-9		V	Y	R	P	G	T	A	S	Q	I	F	D	R	K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F	R	F	Y	A	R

Figura 8. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia PBP1A y ORFs con mutación I35V.

La primera fila corresponde a la secuencia de referencia y el resto, a las muestras. En la posición 35 a la altura de la fila 6 se encuentra la mutación I35V, la cual se encuentra reportada en la literatura como causante de resistencia a la amoxicilina (12).

Protein Sequences																															
Species/Abbrv	G																														
1. gi 15645222 ref NP_		V	T	T	D	K	D	I	A	K	I	K	D	Y	R	P	G	V	A	S	Q	I	L	D	R	K	G	R	L	I	A
2. Muestra_PBP1A-1		D	K	E	F	R	F	Y	A	R	F	E	E	I	P	P	R	F	F	E	S	L	F	A	V	E	D	T	L	F	F
3. Muestra_PBP1A-2		I	Y	D	K	E	F	R	F	Y	A	H	F	E	E	I	P	P	R	F	I	E	S	L	L	A	V	E	D	T	L
4. Muestra_PBP1A-3		K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F	R	F	Y	A	H	F	E	E	I	P	P	R	F	I	E	S	L
5. Muestra_PBP1A-4		S	Q	I	L	D	R	K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F	R	F	Y	A	R	F	E	E	I	P	P
6. Muestra_PBP1A-6		P	F	L	S	V	K	V	G	Q	G	R	I	G	Y	C	*	D	*	G	L	S	P	G	R	R	F	T	D	F	R
7. Muestra_PBP1A-7		V	A	S	Q	I	L	D	R	K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F	R	F	Y	A	H	F	E	E	I
8. Muestra_PBP1A-8		S	L	H	R	F	*	T	E	K	G	V	*	S	L	I	S	M	*	R	I	P	F	L	C	A	F	*	R	N	P
9. Muestra_PBP1A-9		F	D	R	K	G	R	L	I	A	N	I	Y	D	K	E	F	R	F	Y	A	R	F	E	E	I	P	P	R	F	I

Figura 9. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia PBP1A y ORFs con mutación G44S.

La primera fila corresponde a la secuencia de referencia y el resto, a las muestras. En la posición 44 a la altura de la fila 8 se encuentra la mutación G44S, la cual se encuentra reportada en la literatura como causante de resistencia a la amoxicilina (12).

Protein Sequences		
Species/Abbrv	G	
1. gi 15645222 ref NP_	R L I A N I Y D K E F R F Y A R F E E I P P R F I E S L L A	69
2. Muestra_PBP1A-1	T L F F E H G G I N L D A I M R A M I K N A K S G R Y T E G	
3. Muestra_PBP1A-2	E D T L F F E H G G I N L D A I M R A M I K N A K S G R Y T	
4. Muestra_PBP1A-3	I E S L F A V E D T L F F E H G G I N L D A I M R A M I K N	
5. Muestra_PBP1A-4	E I P P R F I E S L F A V E D T L F F E H G G I N L D A I M	
6. Muestra_PBP1A-6	T D F R P K R A F D R * Y L * * R I P F L W A F E E I P P R	
7. Muestra_PBP1A-7	F E E I P P R F I E S L L A V E D T L F F E H G G I N L D A	
8. Muestra_PBP1A-8	* R N P P T I Y * K P F C G R R H P L F * T W G D Q F R R Y	
9. Muestra_PBP1A-9	P R F I E S L L A V E D T L F F E H G G I N L D A I M R A M	

Figura 10. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia PBP1A y ORFs con mutación A69V.

La primera fila corresponde a la secuencia de referencia y el resto, a las muestras. En la fila 7 se observa la mutación A69V, Esta alteración se encuentra clasificada como promotora de resistencia a la amoxicilina (12).

Protein Sequences		
Species/Abbrv	G	
1. gi 15645222 ref NP_	S G R Y T E G G S T L T Q Q F V K N M V L T R E K T L T R K	125
2. Muestra_PBP1A-1	A I I S L R I E K V L S K E E I L E R Y L N Q T F F G H G Y	
3. Muestra_PBP1A-2	K E A I I S I R I E K V L S K E E I L E R Y L N Q T F F G H	
4. Muestra_PBP1A-3	K T L T R K L K E A I I S I R I E K V L S K E E I L E R Y L	
5. Muestra_PBP1A-4	M V L T R E K T L T R K L K E A I I S L R I E K V L S K E E	
6. Muestra_PBP1A-6	A M I K N A K S G R Y T E G G S T L T P Q L V K N M V L T R	
7. Muestra_PBP1A-7	K N M V L T R E K T L T R K L K E A I I S I R I E K V L S K	
8. Muestra_PBP1A-8	N M V L S R E K T L T R K L K E A I I S L R I E K V L S K E	
9. Muestra_PBP1A-9	H T R K N P Y Q K P Q R S Y H F F T H * K S F K Q R R N F R	

Figura 11. Alineamiento múltiple entre secuencia de referencia PBP1A y ORFs con mutación F125L.

La primera fila corresponde a la secuencia de referencia y el resto, a las muestras. En la fila 7 se observa la mutación F125L, Esta alteración se encuentra clasificada como promotora de resistencia a la amoxicilina (12).

4.3 Medición de la frecuencia de las mutaciones del gen 23s rRNA relacionadas con resistencia a claritromicina en *Helicobacter pylori*

Un par de cromatogramas referentes a una muestra no pudieron ser ensamblados por no cumplir con los criterios mínimos de inclusión. Del alineamiento de la secuencia de referencia de este gen con las secuencias

contig de cada muestra, no se detectó la presencia de mutaciones reportadas en la literatura como implicadas en la resistencia a la claritromicina.

En total se procesaron 24 pares de cromatogramas (8 del gen *gyrA*, 8 del gen *PBP1A* y 8 del gen *23s rRNA*). Luego de la fase de alineamiento se obtuvieron 4 muestras con cepas resistentes a amoxicilina 50% (4/8) y 4 con cepas resistentes a amoxicilina 50% (4/8).

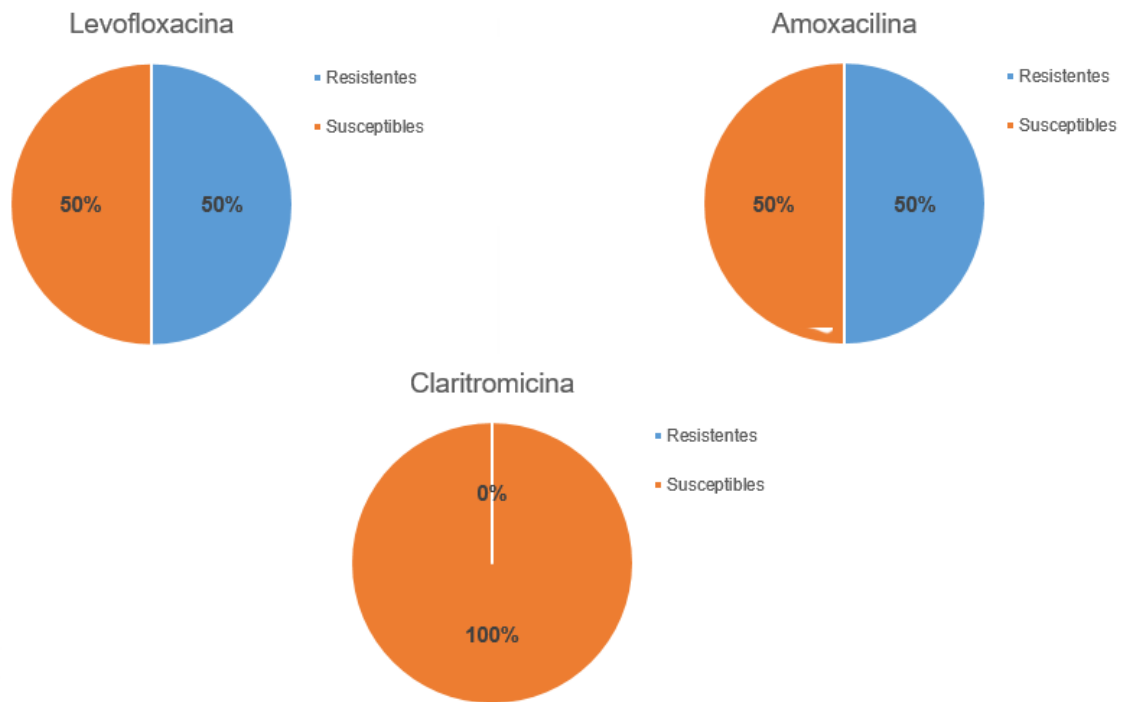


Figura 12. Resistencia antibiótica de *H. pylori*.

5. DISCUSIÓN

En nuestro estudio *In silico* se encontró una alta resistencia de *H. pylori* a amoxicilina y a levofloxacina, en contraste con claritromicina de la cual no se obtuvo resistencia alguna. La resistencia de 50% a la amoxicilina encontrada se diferencia a lo encontrado en Bogotá, donde arrojó un 3,8%, y en Pereira y Armenia donde no hubo resistencia (14). La prevalencia de la resistencia a la amoxicilina en el mundo, se ha mantenido baja, con menos del 2% en todos los países europeos incluyendo Alemania y los países bajos (10), excepto en Kenia y Bangladesh donde arrojó un 4,6% y 6,6% respectivamente (11). En Asia y sur-américa la resistencia a amoxicilina ha sido reportado por encima de 38% (10).

Por otro lado no se encontró en las muestras estudiadas, mutaciones relacionadas con cepas resistentes a claritromicina, contrastando con estudios realizados en Bogotá que arrojan resistencias de 63,1% y 17,72% (13) (11). En el mundo la resistencia a la claritromicina ha aumentado rápidamente en muchos países durante la última década, con índices de resistencia cercana al 30% en Japón e Italia, 50% en China y 40% en Turquía. Mientras que las tasas de resistencia son mucho más bajas en Suecia y Taiwán, con un 15% de resistencia (10). La no presencia de cepas resistentes a claritromicina es un dato positivo, dado que la resistencia a la claritromicina es uno de los principales factores para el fracaso al tratamiento con antimicrobiano, debido a que cuando *H. pylori* es sensible a claritromicina los porcentajes de erradicación rondan los 87,8%, sin embargo, esta cifra decrece a 18,3% cuando es resistente a dicho antibiótico (79).

En cuanto a la levofloxacina, En Bogotá se ha observado una resistencia de (15,6%) entre 2009 y 2011. (13,4%) para 2009. (23,2%) en el 2010 y 2011 14,85% (15). A diferencia del 50% de resistencia encontrado en este estudio. Teniendo en cuenta lo descubierto, se recomienda no emplearlo en el tratamiento de segunda y tercera línea en caso de falla terapéutica. Se han

informado altas tasas de resistencia en países como China e Italia con 34,5% y 22,1% correspondientemente, mientras que recientes estudios en Estados Unidos han demostrado un 31,9% de resistencia y en Portugal también se ha notificado una alta tasa de resistencia: 20,9%.

c

Nuestros resultados de mutaciones encontradas con relación en la resistencia a la levofloxacina (D91T/G/N) fueron muy similares a las reportadas en un estudio en Bogotá (15) Mientras que la D91G además fue hallada con anterioridad en Japón (80). Las sustituciones I35V, G44S, A69V, F125L del gen *PBP1A* que están relacionados con la resistencia a amoxicilina poseen concordancia con lo encontrado en las poblaciones de Tumaco y Túquerres (Colombia) (12).

Es posible que las altas tasas de resistencias encontradas para amoxicilina y levofloxacina estén relacionadas con el fenómeno de la automedicación presente en la región (3), siendo este problema un factor importante para el origen de resistencia bacteriana (4).

6. CONCLUSION

Por medio del análisis bioinformático de las secuencias de ADN de los especímenes de *H. pylori* presentes en biopsias gástricas se logró detectar la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a levofloxacina y amoxicilina en la mitad de los cromatogramas del gen *gyrA* y *PBP1A* estudiados. No se detectaron mutaciones concernientes a la resistencia a claritromicina en la totalidad de los pertenecientes al gen 23s rRNA.

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Se recomienda realizar docking entre los antibióticos estudiados con las proteínas con ausencia de mutaciones relacionadas con resistencia a sus fármacos respectivos (wildtype) y luego con las que presentaron mutaciones, con el fin de medir y comparar como se afecta la capacidad de acople del ligando a su proteína blanco.
- ❖ Es de suma importancia conocer si estas mutaciones de resistencia presentes en los genes *gyrA*, *PBP1A* y 23S rRNA de *Helicobacter pylori* detectadas *In silico* se expresan *In vitro*, y así medir la contribución de ellas en fallas terapéuticas.

8. REFERENCIAS

1. Domínguez RR, Huanca Poma A. Prevalencia de infección por h. pylori en una población de nivel socioeconómico medio y alto. Rev Médica La Paz. 2013;19(1):35–9.
2. De Miquel B, De Argila M. Tratamiento de la infección por Helicobacter pylori. Sis Nac Salud [Internet]. 2000 [cited 2016 Jul 27];24(6):6. Available from: <http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/200006-1.pdf>
3. Brata C, Gudka S, Schneider CR, Clifford RM. A review of the provision of appropriate advice by pharmacy staff for self-medication in developing countries. Res Soc Adm Pharm [Internet]. 2015;11(2):136–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sapharm.2014.07.003>
4. Bennadi D. Self-medication: A current challenge. J Basic Clin Pharm [Internet]. 2014 [cited 2016 Mar 10];5(1):19. Available from: <http://www.jbclinpharm.org/text.asp?2014/5/1/19/128253>
5. Wu W, Yang Y, Sun G. Recent insights into antibiotic resistance in helicobacter pylori eradication. Gastroenterol Res Pract. 2012;2012(1):1–9.
6. Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza J, Bosques-Padilla FJ, -González G, Gi P-P, et al. A review of Helicobacter pylori diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. World J Gastroenterol [Internet]. 2014 [cited 2016 May 30];20(6):13. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i6/1438.htm>
7. SÁENZ R. “Helicobacter Pylori, Hoy”. Una Historia De 30 Años.... Rev Médica Clínica Las Condes [Internet]. 2015;26(5):572–578. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864015001224>

8. Štefanić Z, Mikleušević G, Luić M, Bzowska A, Leščić Ašler I. Structural characterization of purine nucleoside phosphorylase from human pathogen *Helicobacter pylori*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;101:518–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017302337>
9. Taylor J, Hafner M, Yerushalmi E, Smith R, Bellasio J, Vardavas R, et al. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance: Model and Results [Internet]. RAND Europe. 2014. Available from: http://www.rand.org/content/dam/rand/pubs/research_reports/RR900/RR911/RAND_RR911.pdfhttp://www.rand.org/pubs/research_reports/R911.html<http://www.rand.org/randeurope/research/projects/antimicrobial-resistance-costs.html>
10. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, et al. Review article: The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(4):514–33.
11. Trespalcios AA, Otero Regino W, Mercado Reyes M. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol* [Internet]. 2010;25(1):31–8. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v25n1/v25n1a09>
12. Fernandez F. Análisis de mutaciones en los genes 23S rRNA y pbp1A de aislados de *Helicobacter pylori* resistentes a Claritromicina y Amoxicilina, provenientes de Tumaco y Túquerres. Vol. 1, PhD Proposal. Santiago de Cali; 2015.
13. Yepes CA, Rodríguez Varón A, Ruiz Morales Á, Ariza B. Antibiotics resistance of *Helicobacter pylori* at the San Ignacio University Hospital in Bogota. *Acta Medica Colomb*. 2008;33(1):11–4.
14. Álvarez A, Moncayo JI, Santacruz JJ, Corredor LF, Reinoso E, Martínez JW, et al. Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. *Rev Med Chil*. 2009;137(10):1309–14.

15. Alicia A, Rangel T. Estudio de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos e implicaciones en las terapias de erradicación. 2011;
16. DANE. Boletín Técnico CÓRDOBA: POBREZA MONETARIA 2015 Boletín Técnico. DANE. 2015 May 16;1–11.
17. De la Torre Galvis J. Desigualdad económica en las regiones. Revista Semana [Internet]. 2013 Sep 19;1. Available from: <http://www.semana.com/economia/articulo/crecimiento-economico-departamentos/361568-3>
18. Nishizawa T, Suzuki H. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2014;1(19):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4428472/%5Cnhttp://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2014.00019/abstract>
19. Betancor L, Gadea M, Flores K. Genética bacteriana. *Temas Bacteriol y Virol médica*. 2006;(C):59–80.
20. Marshall BJ. *Helicobacter pylori* [Internet]. Vol. 89, *American Journal of Gastroenterology*. Elsevier Ltd; 2015. 116-128 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00068-8>
21. Felicyti G, Karen S. *Vascular responses to pathogens*. 1st ed. Felicity G, Karen S, editors. Elsevier Inc; 2015. 252 p.
22. Mégraud F, Lehours P, Vale FF. The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography - from paleomicrobiology. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2016;22(11):922–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864015001224>
23. Robin Warren J, Marshall B. Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis. *Lancet*. 1983;321(8336):1273–5.
24. Posse R, Toledo R, Cabral M. HELICOBACTER PYLORI: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento. *MedUnneEduAr* [Internet]. 2006;158(1):9–12. Available from: http://www.med.unne.edu.ar/revista/revista158/3_158.htm
25. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review

- and Meta-analysis. *Gastroenterology* [Internet]. 2017; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508517355312>
26. Lunet N, Barros H. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: facing the enigmas. *Int J Cancer* [Internet]. 2003;106(6):953–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12918076>
 27. Cisneros S. Mecanismos de resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos Amoxicilina, Claritromicina, Levofloxacina y Metrodinazol. Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
 28. Kumar S, Kumar A, Kumar V. Infection , Genetics and Evolution Genetic diversity in strains of *Helicobacter pylori* from India and their relatedness to strains from other parts of the world. "Infection, Genet Evol [Internet]. 2011;11(1):242–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.09.001>
 29. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2016;4(9):e609–16. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)
 30. Ferro A, Peleteiro B, Malvezzi M, Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, et al. Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980-2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype. *Eur J Cancer*. 2014;50(7):1330–44.
 31. Ibrahim A, Morais S, Ferro A, Lunet N, Peleteiro B. Sex-differences in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in pediatric and adult populations: systematic review and meta-analysis of 244 studies. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2017; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1590865817307995>
 32. Kampfer P. *Characteristics of the Genus*. Vol. 1. Germany; 2014. 2342-2349 p.
 33. Taylor DE, Eaton M, Chang N, Salama SM. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J Bacteriol*. 1992;174(21):6800–6.
 34. Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Rafieian-Kopaei M, Rahimian G, Asadi-

- Samani M, Shirzad H. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* virulence factors in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *Microb Pathog* [Internet]. 2016;100:154–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.09.016>
35. Salimzadeh L, Bagheri N, Zamanzad B, Azadegan-Dehkordi F, Rahimian G, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Frequency of virulence factors in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis. *Microb Pathog*. 2015;80(February):67–72.
 36. Kao C-Y, Sheu B-S, Wu J-J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J* [Internet]. 2016;39(1):14–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002>
 37. Chiurillo MA, Moran Y, Cañas M, Valderrama E, Granda N, Sayegh M, et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. *Int J Infect Dis*. 2013;17(9):750–6.
 38. Rezaeifar A, Eskandari-Nasab E, Moghadampour M, Kharazi-Nejad E, Hasani S-S-A, Asadi-Saghandi A, et al. The association of interleukin-18 promoter polymorphisms and serum levels with duodenal ulcer, and their correlations with bacterial CagA and VacA virulence factors. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 2013;45(8):587–92. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L369341352%5Cnhttp://dx.doi.org/10.3109/00365548.2013.794301%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00365548&id=doi:10.3109/00365548.2013.794301&atitle=The+association+o>
 39. Shew-Meei S, Bor-Shyang S. GENES OF *HELICOBACTER PYLORI* IS ASSOCIATED WITH MORE SEVERE GASTRIC PRESENCE OF ICE A1 BUT NOT CAG A , CAG C , CAG E , CAG F , CAG N , CAG T , OR ORF 13 GENES OF *HELICOBACTER PYLORI* IS ASSOCIATED WITH MORE. 2016;(January 2015).
 40. Breurec S, Guillard B, Hem S, Papadacos KS, Brisse S, Huerre M, et al. Expansion of European *vacA* and *cagA* alleles to East-Asian *Helicobacter*

- pylori strains in Cambodia. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2011;11(8):1899–905. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.007>
41. Miftahussurur M, Yamaoka Y, Miftahussurur M, Yamaoka Y. Diagnostic Methods of *Helicobacter pylori* Infection for Epidemiological Studies: Critical Importance of Indirect Test Validation. *Biomed Res Int* [Internet]. 2016 [cited 2016 May 30];2016(1):1–14. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/4819423/>
 42. Serrato Díaz A, Flores Rentería L, Aportela Cortez J, Sierra Palacios E. PCR: reacción en cadena. *Herramientas Mol Apl en Ecol Teor y prácticos*. 2014;1(1):53–74.
 43. Dorado G, Besnard G, Unver T, Hernández P. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Ref Modul Biomed Sci* [Internet]. 2015;1–19. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383089972>
 44. Bou G, Fernández A, García C, Sáez J, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601–8.
 45. Campillo A, Amorena E, Ostiz M, Kutz M, Lalglesia M. Triple terapia 10 días con esomeprazol 40 mg/12 h vs. cuádruple concomitante sin bismuto como tratamiento de primera línea de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016;(xx):2–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0210570516300139>
 46. Gisbert JP, Barrio J, Modolell I, Molina-Infante J, Aisa AP, Castro-Fernández M, et al. *Helicobacter Pylori* First-Line and Rescue Treatments in the Presence of Penicillin Allergy. *Dig Dis Sci*. 2015;60(2):458–64.
 47. Chey WD, Wong BCY, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2007;102(8):1808–25. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1111/j.1572-0241.2007.01393.x>

48. Gisbert JP, Romano M, Gravina AG, Solís-Muñoz P, Bermejo F, Molina-Infante J, et al. Helicobacter pylori second-line rescue therapy with levofloxacin- and bismuth-containing quadruple therapy, after failure of standard triple or non-bismuth quadruple treatments. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41(8):768–75.
49. Gisbert JP, Perez-Aisa A, Rodrigo L, Molina-Infante J, Modolell I, Bermejo F, et al. Third-line rescue therapy with bismuth-containing quadruple regimen after failure of two treatments (with clarithromycin and levofloxacin) for H. pylori infection. *Dig Dis Sci.* 2014;59(2):383–9.
50. Paredes F, Roca JJ. Acción de los antibiòticos. *Ámbito Farm Farmacol* [Internet]. 2004;23(3):116–24. Available from: pps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13059414&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=144&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v23n03a13059414pdf001.pdf
51. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(2):116–29.
52. Hubschwerlen C. Beta-Lactam Antibiotics. 2007;
53. Vollmer W. Peptidoglycan [Internet]. *Molecular Medical Microbiology.* Elsevier Ltd; 2015. 105-124 p. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971692000068>
54. Mégraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2016 Mar 10];53(9):1374–84. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2003.022111>
55. Bash E. Evaluación de las mutaciones en el gen pbp1A de Helicobacter pylori, que confieren resistencia a amoxicilina. PhD Propos. 2015;1.
56. Yopez M. Detección de la resistencia antimicrobiana de Helicobacter pylori a la amoxicilina mediante la tecnica molecular reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) a partir de biopsias gastricas. Vol. Pregrado, Ciencias de la Vida. 2011.

57. Allison DG, Lambert PA. Modes of Action of Antibacterial Agents [Internet]. Molecular Medical Microbiology, Three-Volume Set. Elsevier Ltd; 2015. 583-598 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00032-9>
58. Alós J-I. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2009;27(5):290–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X09002468>
59. Fernandes P, Martens E. Antibiotics in Late Clinical Development. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2016;133:152–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025>
60. Farrington E. Macrolide antibiotics. *Pediatr Nurs*. 1998;24(5):433-434-446.
61. Vázquez-Ramos J. Reparación del ADN: Un asunto de vida.y de Premios Nobel. *Educ Quim* [Internet]. 2016;27(2):93–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2016.02.002>
62. Tobergte DR, Curtis S. Molecular medicine: genomics to penalizes healthcare. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013. 1689-1699 p.
63. Xuan SH, Wu LP, Zhou YG, Xiao MB. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in clinical specimens by molecular methods: A review. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2016;4(1):35–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2016.01.002>
64. Familia NENMDE, Martí ML. Estructura y función del ADN y de los genes . I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. 2016;36(5):273–7.
65. Vinga S, Almeida J. Alignment-free sequence comparison - A review. *Bioinformatics*. 2003;19(4):513–23.
66. Garai G, Chowdhury B. A cascaded pairwise biomolecular sequence alignment technique using evolutionary algorithm. *Inf Sci (Ny)* [Internet]. 2015;297:118–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ins.2014.11.009>

67. Iván G, Bánky D, Grolmusz V. Fast and exact sequence alignment with the Smith-Waterman algorithm: The SwissAlign webserver. *Gene Reports* [Internet]. 2016;4:26–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.genrep.2016.02.004>
68. Xia X. PhyPA: Phylogenetic method with pairwise sequence alignment outperforms likelihood methods in phylogenetics involving highly diverged sequences. *Mol Phylogenet Evol* [Internet]. 2016;102(1):331–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.07.001>
69. Macrogen inc. Macrogen [Internet]. 2016. Available from: <http://dna.macrogen.com/esp/>
70. Hoyos Morales W. Detección molecular de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas en pacientes de la ciudad de montería. Universidad de Córdoba; 2013.
71. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Jinghui Zhang Z, Zhang WM, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3389–402.
72. Sonia Agudo Pena. Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por *Helicobacter pylori*. [Internet]. Kas.Unibe.Ch. 2010. 211 p. Available from: http://www.kas.unibe.ch/logo2013/Abstracts/PrimoCano_Carlos.pdf
73. Wang LH, Cheng H, Hu FL, Li J. Distribution of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *helicobacter pylori* strains. *World J Gastroenterol*. 2010;16(18):2272–7.
74. Matteo MJ, Granados G, Olmos M, Wonaga A, Catalano M. *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(3):474–7.
75. Heracle BioSoft SRL. DNA Baser: sequence assembly software [Internet]. Romania; 2016. p. 3. Available from: <http://www.dnabaser.com/>
76. Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J. GenBank. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1997;25(1):1–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146400&tool=p>

mcentrez&rendertype=abstract

77. NCBI. ORFfinder [Internet]. 2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>
78. Kumar S, Stecher G, Peterson D, Tamura K. MEGA-CC: Computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis. *Bioinformatics*. 2012;28(20):2685–6.
79. Henao Riveros SC, Quiroga A, Martínez Marín JD, Otero Regino W. Resistencia primaria a la claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* TT - Primary resistance to Clarithromycin in *Helicobacter pylori* isolates. *Rev colomb gastroenterol* [Internet]. 2009;24(2):110–4. Available from: <http://www.gastrocol.com/file/Revista/v24n2a04.pdf>
80. Miyachi H, Miki I, Aoyama N, Shirasaka D, Matsumoto Y, Toyoda M, et al. Primary levofloxacin resistance and gyrA/B mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter*. 2006;11(4):243–9.