

Evaluación de las mutaciones en el gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori*, que confieren resistencia a amoxicilina



Paola Leonor Betancourt Ruiz

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Microbióloga Industrial-Bacterióloga**

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Carrera de Microbiología Industrial

Bogotá D. C.

2013

Evaluación de las mutaciones en el gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori*, que confieren resistencia a amoxicilina



Paola Leonor Betancourt Ruiz

Ingrid Schuler Ph.D

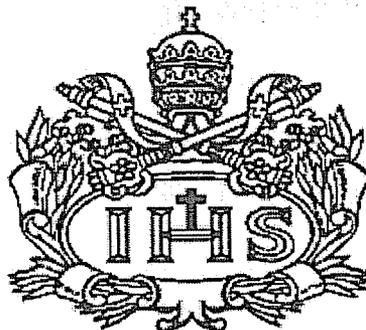
Decana Académica

Facultad de Ciencias

Janeth Arias Palacios M.Sc-M.Ed

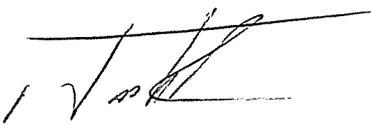
Directora Carrera Microbiología

Evaluación de las mutaciones en el gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori*, que confieren resistencia a amoxicilina

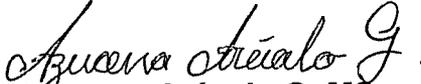


Paola Leonor Betancourt Ruiz

APROBADO


Alba Alicia Trespalacios MSc; Ph.D

Directora


Azucena Arévalo G. MSc.

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

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

Artículo 23 de la Resolución Nº 13 de julio de 1946.

AGRADECIMIENTOS

Mientras el río corra, los montes hagan sombra y en el cielo haya estrellas, debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre agradecido

Virgilio...

Agradezco a Dios, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia única y no permitirme desfallecer jamás

A mis padres Santiago Betancourt y Jackeline Ruiz, a mis hermanos Oscar, Edwin, Santiago y Stephanie por la compañía incondicional, el amor y la seguridad que me brindan a diario, y a Gabriela por enseñarme a sonreír sin temor.

A la Pontificia Universidad Javeriana, por ser cuna de mi formación profesional

A la Dra. Alba Alicia Trespacios por el apoyo, la confianza y sobre todo por los conocimientos brindados a mi carrera profesional

A la Dra. Azucena Arévalo, por el apoyo incondicional y las enseñanzas ofrecidas a lo largo del proyecto

A Milena Sánchez, Carolina Gonzales, Jenny Ávila, Lizeth Córdoba, Sandra Bustos, Viviana Alvarado y todos los integrantes del laboratorio de Bacteriología Especial, por los consejos y el apoyo brindados

A Luis García, por ser mi fuente de paz, por el amor y la felicidad que me brinda a diario.

A todos aquellos que me acompañaron a culminar con éxito este proceso y que de una u otra manera, fortalecieron mi camino

*Con todo mi amor, dedico este logro a Dios
por ser mi guía en el camino, a mi Padre por
darme la fuerza de seguir siempre adelante, a
mis hermanos por motivarme siempre, por
creer en mí, a Gabriela por darme la
oportunidad de amar a alguien sin medida,
de aprender a ser la mejor tía y sobre todo al
ser más especial del mundo a quien siempre
ha creído en mí... A ti mamita*

INDICE GENERAL

Capítulo 1. RESUMEN

Capítulo 2. INTRODUCCION

Capítulo 3. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Capítulo 4. PREGUNTA DE INVESTIGACION

Capítulo 5. MARCO TEÓRICO

- 5.1 *Helicobacter pylori*
- 5.1.1 Morfología
- 5.1.2 Factores de virulencia
- 5.2 Tratamiento
- 5.3 Amoxicilina
- 5.4 Resistencia Antimicrobiana
- 5.5 Proteínas de Unión a Penicilina (PBP)

Capítulo 6. OBJETIVOS

Capítulo 7: METODOLOGÍA

- 7.1 Muestra
- 7.2 Procedimiento por objetivos
- 7.2.1. Determinar la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina en cepas de *H. pylori*.
- 7.2.1.1 Reactivación de cepas
- 7.2.1.2 Preparación del inóculo
- 7.2.1.3 Dilución en Agar
- 7.2.2 Estandarización PCR gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori*
- 7.2.2.1 Extracción de ADN a partir de cultivos bacterianos.

- 7.2.2.2 Selección de Cebadores
- 7.2.2.3 Estandarización PCR para gen *pbp1A*
 - 7.2.2.3.1 Protocolo por Termociclador S1000 Bio-Rad
 - 7.2.2.3.2 Enzimas utilizadas para la estandarización de protocolos de PCR
 - 7.2.2.3.2.1 Master Mix Promega
 - 7.2.2.3.2.2 Enzima Paq5000HotStar DNA Polimerase (STRATAGENE)
 - 7.2.2.3.2.3 Enzima KAPA HiFi™ HotStar Ready Mix (2x)
 - 7.2.2.3.2.4 Enzima Go Hot Star Promega
- 7.2.3. Analizar bioinformáticamente el gen *pbp1A* y determinar la o las mutaciones generadas.
 - 7.2.3.1 Blastn
 - 7.2.3.2 Blastx

Capítulo 8: RESULTADOS

- 8.1 Dilución en Agar
- 8.2 Estandarización PCR para amplificación del gen *pbp1A* de *H. pylori*
- 8.3 Análisis bioinformático del gen *pbp1A*.

Capítulo 9: DISCUSIÓN

Capitulo 10: CONCLUSIONES

Capitulo 11: RECOMENDACIONES

Capitulo 12: BIBLIOGRAFIA

INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.** Proteína de Unión a Penicilina
- Figura 2.** Selección de cebadores
- Figura 3.** Prueba de Ureasa
- Figura 4.** Prueba de Catalasa
- Figura 5.** Prueba de Oxidasa
- Figura 6.** Coloración de Gram
- Figura 7.** Colonias de *Helicobacter pylori* en agar Brucella.
- Figura 8.** Montaje de dilución en agar
- Figura 9.** Gel de Electroforesis. Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega (Concentraciones de Cebadores)
- Figura 10.** Gel de Electroforesis. Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega, gradiente de temperatura, concentraciones de cebadores y volumen de ADN
- Figura 11.** Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega (Concentraciones de Cebadores, Gradiente de temperatura, (a) NCTC 11637, (b) NCTC 11638)
- Figura 12.** Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega (Concentraciones de cebadores y T_m 56°C)
- Figura 13.** Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega (Muestras Resistentes a Amoxicilina)
- Figura 14.** Amplificación gen *pbp1A*: Enzimas de alta fidelidad

Figura 15. Amplificación gen *pbp1A*: Go Hot Star Promega, Tm 60°C (Muestras Resistentes a Amoxicilina)

Figura 16. Amplificación gen *pbp1A*: Enzima Go Hot Star Promega Tm 56°C

Figura 17. Secuencia del gen *pbp1A* reportado por Matteo *et al.* 2008

Figura 18. Secuencia de la proteína *pbp1A* reportada por Matteo *et al.* 2008

Figura 19. Secuencia del gen *pbp1A* reportada por Gerrits *et al.* 2008

Figura 20. Secuencia de la proteína *pbp1A* reportada por Gerrits *et al.* 2006

Figura 21. Mutaciones presentes en las cepas reportadas por Matteo *et al.*

Figura 22A. Mutaciones presentes en las cepas reportadas por Gerrits *et al.* En rojo: Cambio en la secuencia de nucleótidos, en verde: Cambio de aminoácidos en la proteína

Figura 22B. Mutaciones presentes en las cepas reportadas por Gerrits *et al.*

Figura 22C. Mutaciones presentes en las cepas reportadas por Gerrits *et al.*

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Condiciones de PCR: Protocolo sugerido por el termociclador

Tabla 2: Enzimas de alta fidelidad utilizadas para la amplificación del gen *pbp1A*:
Paq5000HotStar DNA Polimerase, Enzima KAPA HiFi™ HotStar Ready Mix
(2x), Enzima Go Hot Star Promega

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de amoxicilina en cepas resistentes

Tabla 4: PCR Master Mix Promega, Volúmenes de reactivos utilizados para
amplificación del gen

Tabla 5. Concentración de ADN de las muestras analizadas. (Qubit®)

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Componentes Caldo Brucella® (BD)

ANEXO B. Componentes Agar Brucella® (BD),

ANEXO C. Isovitalax® BD

ANEXO D. DENT ® BD

ANEXO E. Agar Mueller Hinton

ANEXO E. Caldo urea (Prueba de ureasa)

ANEXO F. DNAzol®:

1. RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, asociada al desarrollo de diversas enfermedades gastroduodenales: gastritis crónica, úlceras gástricas, cáncer gástrico entre otras. Desde su descubrimiento el tratamiento de estas enfermedades se ha basado en la erradicación de la infección, usando diferentes estrategias terapéuticas; actualmente la triple terapia estándar es la más utilizada, se basa en la administración de amoxicilina + claritromicina o metronidazol y un inhibidor de la bomba de protones.

Diversos autores sugieren que el aumento en el número de fallas terapéuticas se encuentra asociado a la adquisición de mecanismos de resistencia a amoxicilina por *H. pylori*, dicha resistencia ha sido atribuida a la mutación en diferentes puntos del gen que codifica la proteína de unión a penicilina 1, es por esto que se analizaron 7 cepas resistentes a amoxicilina de un banco de 416 cepas aisladas de biopsias de pacientes obtenidas entre enero de 2009 y abril de 2013 que se encontraban conservadas en el Laboratorio de Bacteriología Especial, se obtuvieron 7 cepas resistentes CMI ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ por el método de dilución en agar.

Para la amplificación del gen *pbp1A* se busco estandarizar la PCR, sin embargo la reproducibilidad de los ensayos reportados en la literatura es baja, y no se lograron las condiciones optimas para la obtención de dicho producto, usando diferentes enzimas de alta fidelidad, diferentes concentraciones de cebadores, de ADN y variación en la Tm y los tiempos de denaturación, razón por la que no se lograron obtener las secuencias de las cepas aisladas, sin embargo con el fin de conocer las mutaciones más comunes y la presencia de polimorfismos que no confieren resistencia a amoxicilina en cepas de *H. pylori* se realizo un análisis bioinformatico de las secuencias reportadas en la literatura, identificando la mutaciones S414R y F126L como principales responsables de la resistencia a amoxicilina en las cepas reportadas en la literatura.

2. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H.pylori*) ha sido asociado al desarrollo de enfermedades gastroduodenales como: gastritis crónica, úlceras pépticas, y con el aumento del riesgo de desarrollar cáncer gástrico. (1, 2, 3) La infección está presente en aproximadamente el 80% de la población mundial, (2, 4) esto debido a sus diversas formas de transmisión entre las que se encuentran: contacto persona-persona o ingesta de agua contaminada.

El tratamiento suministrado al paciente para la erradicación de la enfermedad, se basa en la administración de 2 antibióticos: amoxicilina y claritromicina o metronidazol y un inhibidor de la bomba de protones (IBP), (5) sin embargo los mecanismos de resistencia adquiridos por este agente etiológico, han generado un alto porcentaje de fallas terapéuticas en la población, por lo que se requiere determinar el patrón de susceptibilidad microbiana y los mecanismos moleculares de resistencia de *H.pylori* a amoxicilina.

En este proyecto de investigación se busca determinar la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina para cepas de *H. pylori*, por el método dilución en agar, de tal manera que se seleccionen las cepas resistentes y se determine en estas el cambio en la secuencia de nucleótidos del gen *pbp1A*, debido a que es la proteína con mayor afinidad a la amoxicilina, dicha mutación se produce cuando *H. pylori* genera resistencia a este antibiótico. Para esto se utilizará la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el gen de interés, secuenciarlo, y determinar el cambio de la secuencia de nucleótidos.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Helicobacter pylori, es el principal agente causal de gastritis crónica, úlceras pépticas y duodenales, (1, 2) y se asocia con aumento del riesgo de padecer linfoma tipo MALT y cáncer gástrico (2, 3,4), por lo que fue declarado por la Organización Mundial de la Salud como agente carcinogénico de tipo I para el hombre en 1994 (1).

Debido a la gravedad de las enfermedades causadas por este microorganismo, se sugiere como tratamiento, la erradicación de la infección. (3) El tratamiento de preferencia para combatir infecciones por *H. pylori* se fundamenta en la administración de un inhibidor de la bomba de protones, que aumente el pH estomacal y permita la acción óptima de dos antibióticos suministrados como amoxicilina con claritromicina o metronidazol. (2, 5). En diferentes países del mundo se ha evidenciado un aumento en la falla terapéutica de los pacientes con infección por *H. pylori* debido posiblemente a la adquisición de mecanismos de resistencia bacteriana, evidenciada en el incremento de la concentración mínima inhibitoria a diferentes antimicrobianos (2, 6).

La amoxicilina es uno de los antimicrobianos más usados en la terapia de erradicación (4), con bajos porcentajes de resistencia a nivel mundial entre el 0.8% y el 1.4%, excepto en países como Taiwán y Brasil, donde dichos porcentajes son del 20% al 30%, (6) la literatura reporta un creciente aumento a nivel mundial, que genera un mayor número de fallas terapéuticas (4,6). La adquisición de mecanismos de resistencia a dicho antibiótico por *H. pylori* se atribuye a mutaciones en diferentes puntos del gen que codifica la proteína de unión a penicilina 1A (*pbp1A*) (6), en cepas aisladas de pacientes provenientes de distintas regiones del mundo, por lo que se hace importante identificar las mutaciones

puntuales en el gen, que generan resistencia a amoxicilina en cepas aisladas de pacientes colombianos.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el cambio en la secuencia de aminoácidos del gen *pbp1A* que se produce en cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a amoxicilina?

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Características Generales *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori fue descubierto cuando se encontró la presencia de microorganismos espirilados en la mucosa gástrica hace aproximadamente 100 años, sin embargo su importancia se evidenció en la década 1982 cuando Barry Warren y Robin Marshall notaron su presencia en un cultivo de mucosa gástrica. (7), descubrimiento que les dió el premio Nobel de Medicina en el 2005. Posterior a su hallazgo, los investigadores inician estudios acerca de la asociación de este agente etiológico con infecciones gastrointestinales, ya que el estómago representa la denominada "barrera ácida", responsable de la eliminación de muchos de los posibles agentes infecciosos que se ingieren con los alimentos.

Morfológicamente *H. pylori* es un bacilo Gram negativo, espirilado y microaerófilico con temperatura óptima de crecimiento de 37°C que mide de 2,5-5 μm de largo y 0,5 a 1 μm de grosor, posee extremos redondeados y entre 2-6 flagelos polares que le permiten penetrar la mucosa gástrica y soportar el movimiento peristáltico del sistema digestivo, para su caracterización

morfológica es importante tener en cuenta que su crecimiento es lento (entre 48 y 72 horas), en medio sólido crece en colonias pequeñas, puntiformes, traslucidas y bioquímicamente es catalasa, oxidasa y ureasa positivo (8,9). Sus características bioquímicas le permiten un óptimo desarrollo en el ambiente estomacal. (10).

El desarrollo de enfermedades gástricas inducidas por la infección de *H. pylori*, es un problema que afecta millones de personas en el mundo, sin embargo el desarrollo de las enfermedades está dado por diversas causas entre las que se encuentran: los factores de virulencia del microorganismo, la susceptibilidad genética del hospedero, y los factores ambientales en los que se desarrolla el hospedero; siendo los primeros unos de los más importantes (11). Los factores de virulencia más importantes de *H. pylori* son la ureasa, el flagelo, la citotoxina VacA y la proteína CagA. (12). La ureasa es una enzima que causa la hidrólisis de la urea en dióxido de carbono y amoníaco produciendo neutralización del pH gástrico y facilitando la supervivencia del microorganismo, además de ser tóxica para las células epiteliales (10), La citotoxina VacA es codificada por el gen *vacA* que se encuentra en todas las cepas de *H. pylori*, sin embargo la citotoxicidad de esta proteína, puede ser diferente en distintas cepas de *H. pylori*, esta se encuentra determinada por diferentes variaciones en los alelos que forman el gen.(13) La proteína CagA, que se encuentra codificada por el gen *cagA*, puede encontrarse o no en diversas cepas de *H. pylori*, estudios han asociado la presencia de esta proteína con el aumento de la virulencia de la cepa, ya que es un marcador de la presencia de la isla de patogenicidad PAI (14)

5.2. Tratamiento

La erradicación de *H. pylori* es un reto en gastroenterología debido al alto porcentaje de personas que afecta a nivel mundial y a las formas de protección

que usa este microorganismo para evitar la acción del antibiótico como encontrarse inmerso en la capa de moco para evitar el contacto con el antibiótico (5). La estrategia terapéutica más usada para erradicar el microorganismo es: la administración de un inhibidor de la bomba de protones con dos antibióticos: amoxicilina (bactericida) con claritromicina (bacteriostático) o metronidazol. Debido a que la mayoría de los antibióticos utilizados para la erradicación de la infección son lábiles a pH ácido, es necesario el uso de inhibidor de la bomba de protones, que disminuye la secreción de HCl, y genera el consecuente aumento en la concentración del antibiótico, además de favorecer su acción en el estómago, antes de ser transportado rápidamente al intestino. *H.pylori* es capaz de soportar el ácido estomacal, sin embargo no puede replicarse en este, el aumento del pH permite que su proliferación sea adecuada y la acción de los antibióticos se pueda dar de manera exitosa generando la muerte celular. (2, 5, 15)

5.3. Amoxicilina

La amoxicilina es un antibiótico bactericida que actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, su característica de penicilina semi-sintética la hace sensible a beta-lactamasas. Entre sus características farmacocinéticas se encuentra que es absorbida en un 72% en el tracto digestivo y que alcanza su pico máximo de concentración en sangre aproximadamente 1.5 horas después de la ingesta, al finalizar su acción, su eliminación es renal, por lo que las dosis deben ser ajustadas en pacientes con insuficiencia renal. (16)

5.4. Resistencia Antimicrobiana

Los mecanismos de resistencia microbiana, pueden estar dados por diferentes causas bioquímicas o moleculares del microorganismo entre las que se encuentran:

1. La inactivación del antibiótico por enzimas, como beta-lactamasas,
2. Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana, como porinas que bloquean su ingreso o bombas de expulsión
3. Mutaciones en el sitio de acción del antimicrobiano como:
 - ADN girasa: resistencia de quinolonas
 - ARNr 23S: resistencia a macrólidos
 - PBP's: resistencia a betalactámicos. (15,17)

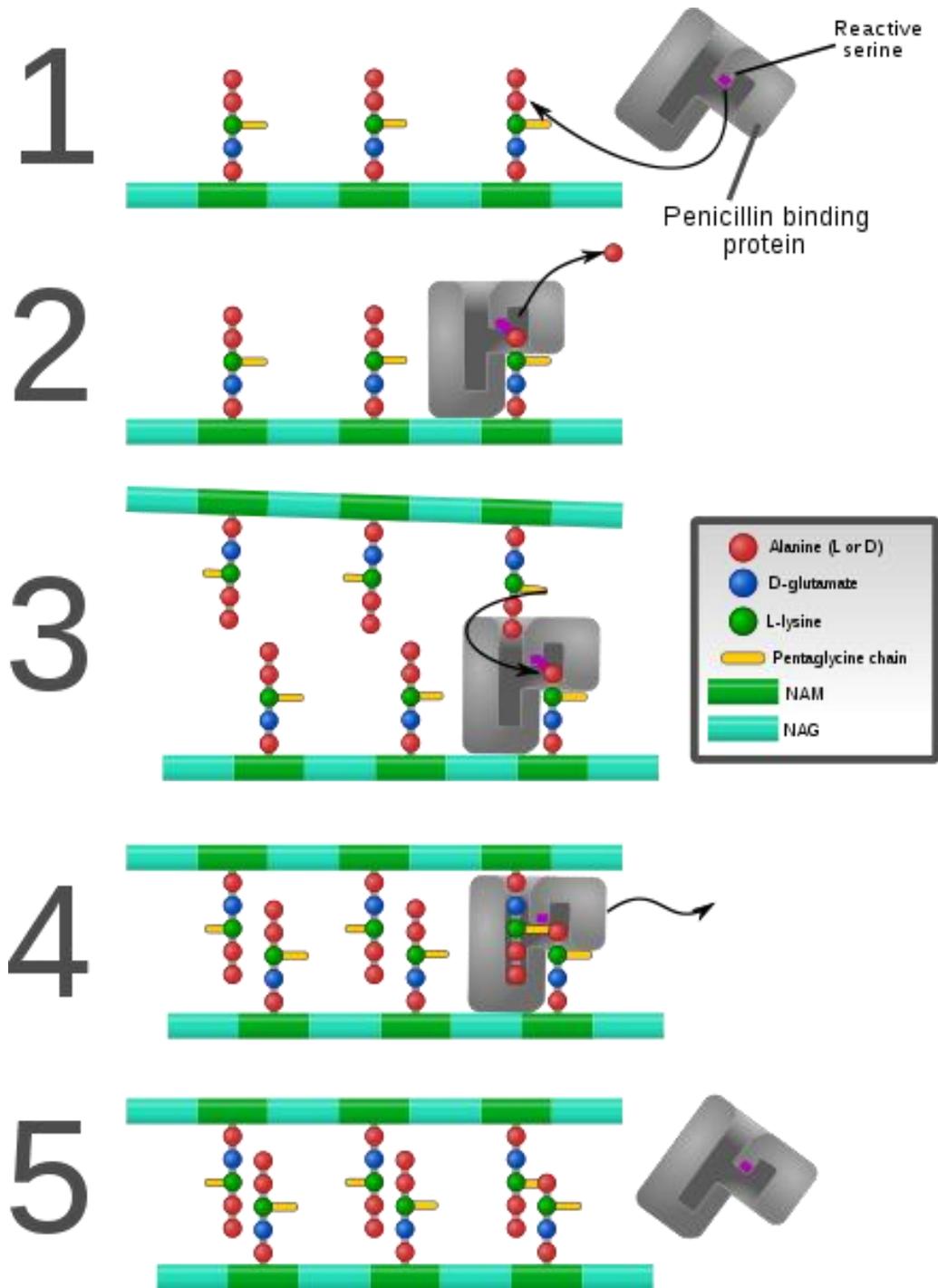
La adquisición de uno o varios de estos factores, generan complicaciones en la administración de un tratamiento adecuado para la erradicación de la infección, ya que esto conduce que se puedan presentar mecanismos de resistencia a varios antibióticos a la vez (17).

5.5. PBP (Proteína de Unión a la Penicilina)

Las PBP son proteínas catalizadoras de la síntesis de pared bacteriana, en la que el componente principal es el peptidoglicano, un polímero de N-acetil murámico y N-acetil glucosamina, unido por cadenas de aminoácidos; la función principal de las PBP está dada en los procesos de transpeptidación, y carboxipeptidación de la formación de la pared, durante los cuales se encarga de eliminar la D-alanina de los precursores de peptidoglicano y generar uniones estables entre los mismos. **(Figura 1)**.

Los antibióticos beta-lactámicos se caracterizan por tener cierta similitud en la estructura de la D-alanina, razón por la que se unen a la PBP e inhiben los procesos de transpeptidación y carboxipeptidación durante la síntesis de la pared, lo que conduce a una pérdida en la permeabilidad selectiva, y un desequilibrio osmótico de la membrana causando la muerte celular. (18)

Fig. 1



Tomado de: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PBP_catalysis.svg. Tomado el 24 de mayo, 22:10 pm

Figura 1. Proteína de Unión a penicilina

En cada microorganismo se pueden encontrar varias PBP, en el caso específico de *H. pylori* se ha reportado la presencia de tres PBP's de alto peso molecular PBP1A, PBP2, y PBP3, y dos de bajo peso molecular PBP y PBP4. La PBP1A es codificada por el gen *pbp1A*, en el que la literatura reporta un alto número de mutaciones que pueden conferir resistencia a amoxicilina (2, 20), dichas mutaciones conducen un cambio en la estructura de la proteína que no permite el anclaje del antibiótico y genera así los procesos de resistencia. (2)

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Identificar las mutaciones en el gen *pbp1A*, en cepas resistentes a amoxicilina.

6.2. Objetivos Específicos

- 6.2.1.** Confirmar la concentración mínima inhibitoria de aislamientos clínicos de *H. pylori* resistentes a amoxicilina
- 6.2.2.** Estandarizar la amplificación del gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori* por PCR
- 6.2.3.** Analizar bioinformáticamente el gen *pbp1A* y determinar la o las mutaciones generadas.

7. METODOLOGIA

7.1. Muestra

Se estudiaron 7 aislamientos de un banco de 416 cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas de pacientes, recolectadas entre Enero de 2009 y Abril de

2013, conservadas en el laboratorio de enfermedades infecciosas, con concentración mínima inhibitoria de amoxicilina desconocida.

7.2. Procedimiento por objetivos.

7.2.1. Confirmación de la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina en cepas de *H. pylori*.

Se realizó la determinación de la CMI de amoxicilina en cepas de *Helicobacter pylori*, utilizando la técnica de dilución en agar, descrita por "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2010" que se encuentra validada en el Laboratorio de Bacteriología Especial

Inicialmente se realizó la activación de las cepas que se encontraban conservadas en el laboratorio de Bacteriología Especial a -80°C en Caldo Brucella® (BD) (ANEXO A) con glicerol al 20% sembrando 100µL del contenido del vial, de forma masiva en Agar Brucella® (BD), (ANEXO B) suplementado con sangre de caballo al 7%, enriquecido con Isovitalex® (ANEXO C) y suplemento antibiótico DENT® (ANEXO D), fueron incubadas a 37 °C a una atmosfera de 11% CO₂ durante 48-72 horas, una vez obtenido el crecimiento se verificaron las pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa y ureasa) y la coloración de Gram

Para llevar a cabo la técnica sugerida por el CLSI, fue necesario preparar una suspensión de la cepa; a partir de cultivos de *H.pylori* de 72 horas de crecimiento, se preparó una suspensión en solución salina al patrón 2 de McFarland, es decir de aproximadamente 1×10^7 - 1×10^8 UFC/mL, para ser inoculado (21)

Para el montaje de la técnica de dilución en agar inicialmente se preparó una solución Stock de amoxicilina 5120 mg/L, a partir de la cual se realizaron las diluciones para la elaboración de las diferentes concentraciones de antibiótico (0.016 mg/L, 0.031 mg/L, 0.062 mg/L, 0.125 mg/L, 0.25 mg/L, 0.50 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L, 64 mg/L) en las cajas de agar teniendo en cuenta las especificaciones del “CLSI 2010”; las muestras se sembraron en agar Muellen Hinton (ANEXO E) suplementado con sangre de caballo al 5% y enriquecido con Isovitalex®

Siguiendo la norma, para la validación de la técnica y una correcta lectura de la misma, adicional a las cajas con diferentes concentraciones de antibiótico, se utilizó una caja de agar Mueller Hinton suplementado con sangre de caballo al 5% y enriquecido con Isovitalex® sin alguna concentración de antibiótico como caja control, de la viabilidad del microorganismo, de tal manera que en todas las cajas incluida esta, se sembraron 3 µL cada inóculo preparado, las cajas fueron incubadas a 37°C, durante 72 horas, a una atmósfera de CO₂ de 11%. (21).

Para la lectura se revisó el crecimiento de todas las cepas sembradas en la caja control, y se utilizó como punto de corte para este antibiótico 1mg/L, teniendo así, las cepas resistentes una MIC ≥ 1 mg/L

7.2.2. Estandarización de la PCR para la amplificación del gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori*

7.2.2.1. Extracción de ADN a partir de cultivos bacterianos.

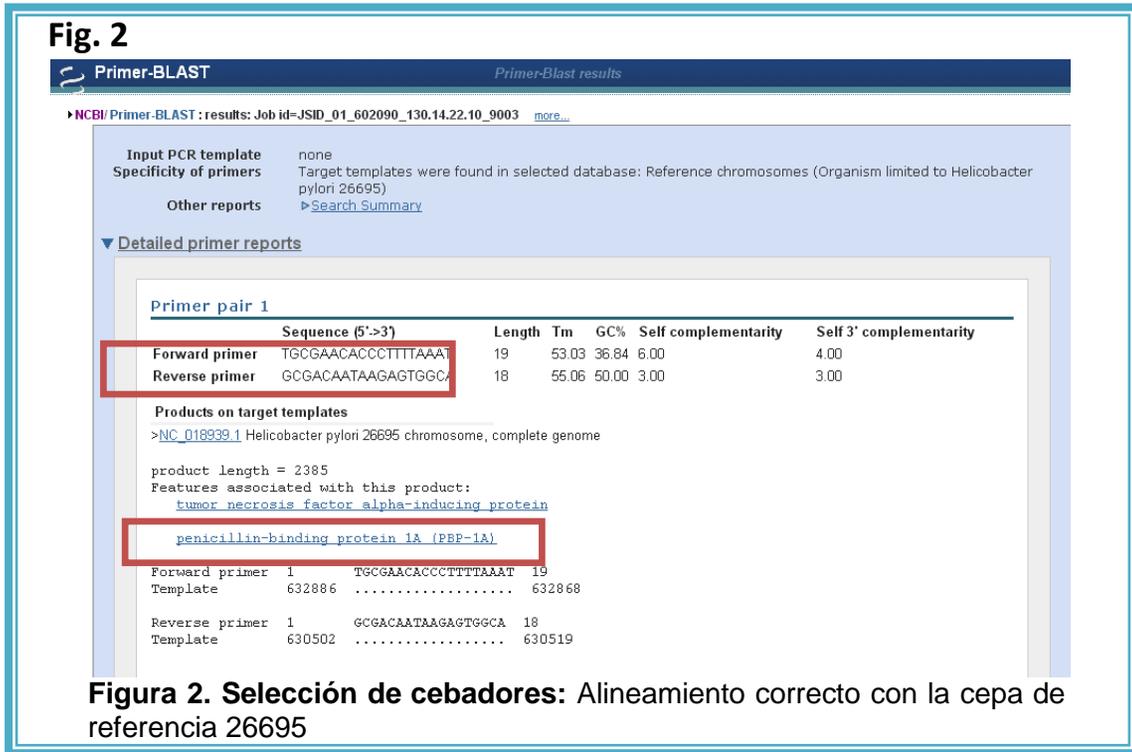
A partir de cultivos puros de las cepas de *H.pylori* resistentes a amoxicilina, se realizó una suspensión de cada cepa en agua grado molecular para

iniciar el proceso de extracción de ADN genómico por el método de DNAzol (ANEXO F), estandarizado en el Laboratorio de Bacteriología Especial.

Se cuantificaron los ADNs de las cepas resistentes a amoxicilina por el método de Qubit® Fluorometer (Invitrogen®) para obtener concentraciones similares en todos los ADNs de las cepas a estudiar. (ANEXO G).

7.2.2.2. Selección de Cebadores

Para llevar a cabo el proceso de estandarización de la PCR, para la amplificación del gen *pbp1A* de *H. pylori* fue necesario hacer una revisión de la literatura, en la que se obtuvieron los cebadores reportados por diferentes autores y se analizó cual fue el producto obtenido con cada pareja de estos (teniendo en cuenta el tamaño del gen:1980 pb) y si cada una de las parejas de cebadores reportadas se alineaban correctamente a gen *pbp1A* de la cepa de referencia ATCC 26695 equivalente la cepa de referencia NCTC 11637 que se encuentra en el laboratorio y a las cepas que reportaban con número de acceso al GenBank. Una vez analizados los diferentes de cebadores reportados, se seleccionaron los descritos por *Rimbara et al.* *pbp1A* F (5'-TGCGAACACCCTTTTAAAT-3') y *pbp1A* R(5'-GCGACAATAAGAGTGGCA-3') (4), (Fig.2) se inició el proceso de estandarización teniendo en cuenta el tamaño del producto (2385 pb) y la temperatura de fusión de estos cebadores (Tm) (56°C).



7.2.2.3. Estandarización PCR para gen *pbp1A*

En el proceso de estandarización de la PCR, debido al tamaño del producto y su alta complejidad, fue necesario evaluar distintos parámetros, tales como: Tipos de Taq Polimerasa, concentración de cebadores, concentración de ADN y Tm, así como variaciones en los tiempos de denaturación y alineamiento.

7.2.2.3.1. Protocolo de acuerdo a recomendaciones del programa del Termociclador S1000 Bio-Rad

Para obtener una sugerencia del protocolo de la amplificación del gen, se utilizó el termociclador S1000 de Bio-Rad, en el que ingresando el tamaño del producto (2385 pb), la Tm de los cebadores (56°C) y la secuencia de los mismos, el equipo arroja un protocolo para la amplificación del gen, teniendo

en cuenta el porcentaje guanina-citosina de los cebadores y el tamaño del producto. (Tabla 1)

Tabla 1: Condiciones de PCR: Protocolo sugerido por el termociclador S1000 de Bio-Rad para la amplificación de un producto de 2385 pb, Tm: 56°C y cebadores: *pbp1A* F (5'-TGCGAACACCCTTTTAAAT-3') y *pbp1A* R(5'-GCGACAATAAGAGTGGCA-3')

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturacion Inicial	95°C	10 min	1
Denaturación	95°C	30 seg.	39
Anillamiento	56°C	30 seg.	
Extensión	72°C	2 min 24 seg.	

7.2.2.3.2. Enzimas utilizadas para la estandarización y protocolos de PCR

7.2.2.3.2.1. Master Mix Promega

Esta enzima se utilizó con el protocolo sugerido por el termociclador de Bio-Rad, descrito anteriormente (Tabla 1)

7.2.2.3.2.2. Enzima Paq5000HotStar DNA Polimerase (STRATAGENE)

Tabla 2:

Enzima Paq5000HotStar DNA Polimerase (STRATAGENE) Condiciones de PCR: Protocolo tomado del inserto

de la enzima, teniendo en cuenta las especificaciones de T_m y tiempo de extensión según el tamaño del producto

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	95°C	2 min.	1
Denaturación	95°C	20 seg.	40
Anillamiento	51°C	20 seg.	
Extensión	72°C	1 min 19 seg.	
Extensión Final	72°C	5 min.	1

7.2.2.3.3. Enzima KAPA HiFi™ HotStar Ready Mix (2x)

Tabla 3: Enzima KAPA HiFi™ HotStar Ready Mix (2x). Condiciones de PCR: Protocolo tomado del inserto de la enzima, teniendo en cuenta las especificaciones de temperatura de denaturación, T_m y tiempo de extensión según el tamaño del producto

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	95°C	5 min.	1
Denaturación	98°C	20 seg.	35
Anillamiento	65°C	15 seg.	
Extensión	72°C	2 min.	
Extensión Final	72°C	3 min.	1

7.2.2.3.4. Enzima Go Hot Star Promega

Tabla 4: Enzima Go Hot Star Promega. Condiciones de PCR: Protocolo tomado del inserto de la enzima, teniendo en cuenta las especificaciones de temperatura de denaturación, T_m y tiempo de extensión según el tamaño del producto

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	95°C	2 min.	1
Denaturación	95°C	1 min.	40
Anillamiento	60°C	1 min.	
Extensión	74°C	2 min.	
Extensión Final	74°C	5 min.	1

Adicionalmente se evaluaron en los ensayos, diferentes concentraciones de cebadores (0.1 μM , 0.3 μM , 0.5 μM , 1.0 μM y 1.5 μM), ADN (1, 3 y 5 μL) y temperaturas de anillamiento (51°C, 55.3°C, 56°C y 61°C), con el fin de obtener las condiciones específicas de amplificación del gen.

7.2.3. Analizar bioinformáticamente el gen *pbp1A* y determinar la o las mutaciones generadas.

Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos del gen *pbp1A*, se procedió a realizar la transcripción a proteína, para evaluar cuál era el cambio en la secuencia de aminoácidos que la codificaban y de esta manera conocer los cambios de aminoácidos y las posiciones en las que se confiere resistencia a amoxicilina, siendo esto comparado con lo reportado en la literatura.

Para realizar el análisis bioinformático se tuvieron en cuenta la secuencia de nucleótidos del gen, en la que se podía determinar la existencia de mutaciones que no confieren ningún cambio en la secuencia de la proteína, razón por la que no se evidencia el cambio en la CMI de amoxicilina para esta cepa, sin embargo es aquí donde también se pueden encontrar mutaciones que si sugieren un cambio de aminoácidos que confiere resistencia a dicho antibiótico, este análisis se realizó comparando la secuencia obtenida con la cepa de referencia NCTC 11637 (Acceso al GenBank: AE000511), susceptible a amoxicilina.

El alineamiento de la secuencia obtenida y la secuencia de la cepa de referencia se obtiene mediante un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) en la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), en el que se puede determinar cuáles son los cambios de la secuencia analizada con respecto a la cepa de referencia.

7.2.3.1. Blastn

Este tipo de alineamiento se utilizó, para comparar las secuencias de nucleótidos reportadas con la secuencia de nucleótidos de la cepa de referencia NCTC 11637 y determinar las mutaciones que se podían presentar sin alterar la estructura de la proteína y la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina.

7.2.3.2. Blastx

Este tipo de alineamiento se utilizó, para comparar las secuencias de proteína reportadas con la secuencia de proteína de la cepa de referencia NCTC 11637 y determinar los polimorfismos que pueden

presentarse y conferir mutaciones que generen resistencia a amoxicilina, o cambios en el marco de lectura de esta.

8. RESULTADOS

8.1. Dilución en Agar

Para iniciar el proceso de determinación de la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina por el método de dilución en agar propuesto por el CLSI en el 2010, para *H.pylori*, se confirmó bioquímicamente que las cepas reactivadas cumplieran con los resultados característicos de esta especie bacteriana, Urea positiva (Fig. 3), catasala: positivo (Fig. 4), oxidasa: positivo (Fig. 5) y observación de bacilos Gram negativos en la coloración de Gram (Fig. 6), así como las características morfológicas de las colonias: puntiformes, pequeñas y transparentes, (Fig 7), luego se procedió a realizar el montaje de dilución en agar.(Fig. 8.), en el que se obtuvieron 7 cepas resistentes a amoxicilina, es decir con una CMI ≥ 1 mg/L

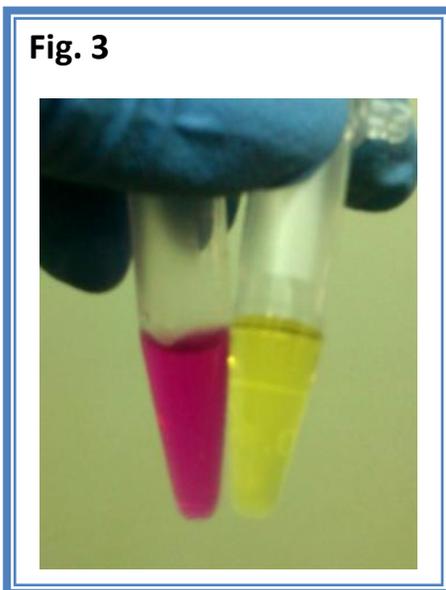


Fig. 3. Prueba de Urea
Izquierda: Prueba Positiva,
Derecha: Prueba Negativa

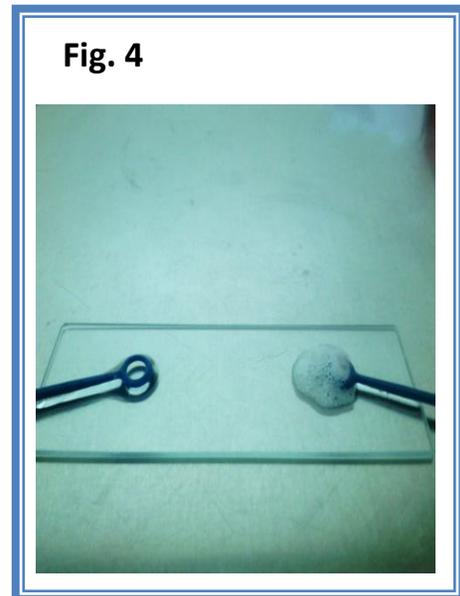


Fig. 4. Prueba de Catalasa
Izquierda: Prueba Negativa,
Derecha: Prueba Positiva

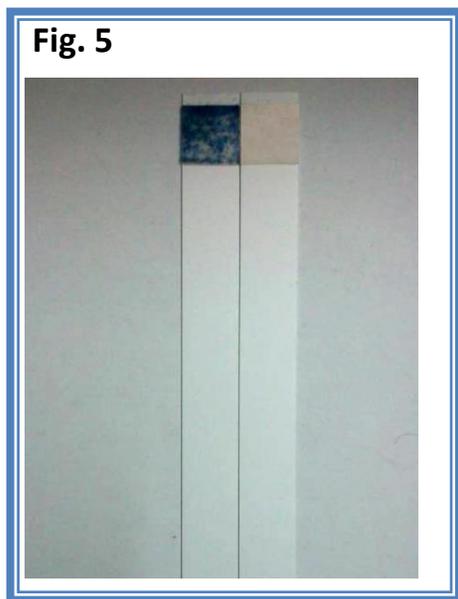


Fig. 5. Prueba de Oxidasa
Izquierda: Prueba positiva,
Derecha: Prueba Negativa

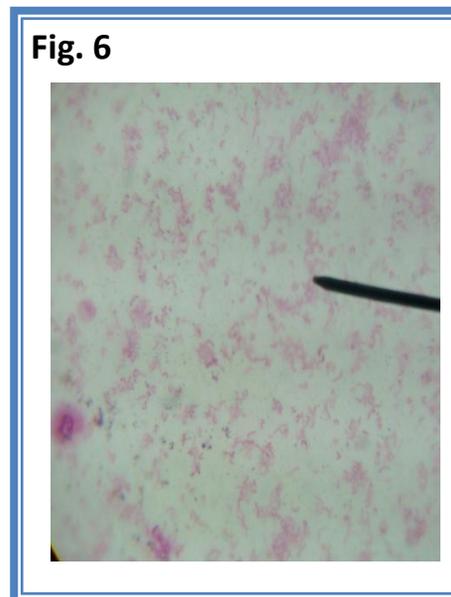


Fig. 6. Coloración de Gram
Bacilos Gram negativos
(1000x)



Fig. 7. Cultivo de *Helicobacter pylori* en agar Brucella BD

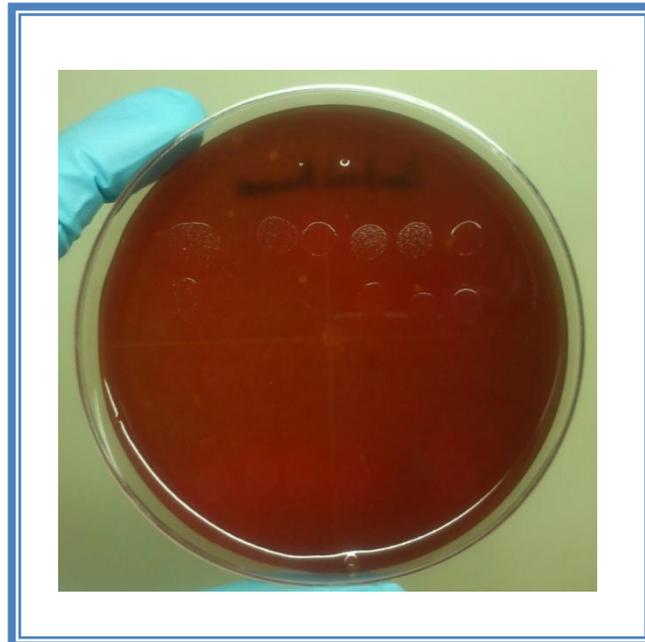


Fig. 8. Dilución en agar

Para reportar una cepa como resistente al antibiótico es importante, realizar una confirmación de la CMI obtenida en la primera prueba, es por esto que a continuación se reportan las cepas resistentes a amoxicilina con el resultado de confirmado de la prueba de dilución en agar, cabe resaltar que las cepas analizadas son provenientes de biopsias de pacientes, que han participado en diferentes estudios clínicos realizados por el Laboratorio de Bacteriología Especial, en el proyecto Erradicación de *H.pylori*: Triple terapia con levofloxacina.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de amoxicilina en cepas resistentes.

CEPA	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
15 Antro	1
31 Antro	0.5
36 Antro	2

44 Cuerpo	2
91 Antro	16
271 Antro	64
361 Antro	64

8.2. Estandarización de PCR para amplificación de gen *pbp1A* de *H.pylori*

En el proceso de estandarización de la PCR, se realizaron diferentes pruebas teniendo en cuenta, los resultados que se iban adquiriendo a lo largo del trabajo, de tal manera que se evaluaran todas las condiciones posibles para obtener la amplificación del gen de interés.

Inicialmente se realizó la PCR descrita en la Tabla 1, con la enzima Master Mix de Promega y las cepas de referencia NCTC 11637 y NCTC 11638, el resultado obtenido se evidencia en la Fig. 9, en la que únicamente se observa la presencia de una banda de 2385 pb en la cepa de referencia NCTC 1137, con una concentración de 1uM de cada uno de los cebadores y volumen final de 10 µL, como se expresa en la tabla 5.

Tabla 4: PCR Master Mix Promega, Volúmenes de reactivos utilizados para amplificación del gen

Componente	Cebadores 0.1 µM	Cebadores 0.5 µM	Cebadores 1 µM
Master Mix Promega	5 µL	5 µL	5 µL
Cebador Forward 10 µM	0.1 µL	0.5 µL	1.0 µL
Cebador Reverse 10 µM	0.1 µL	0.5 µL	1.0 µL
H ₂ O	3.8 µL	3.0 µL	2.0 µL
ADN	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL

Fig. 9:

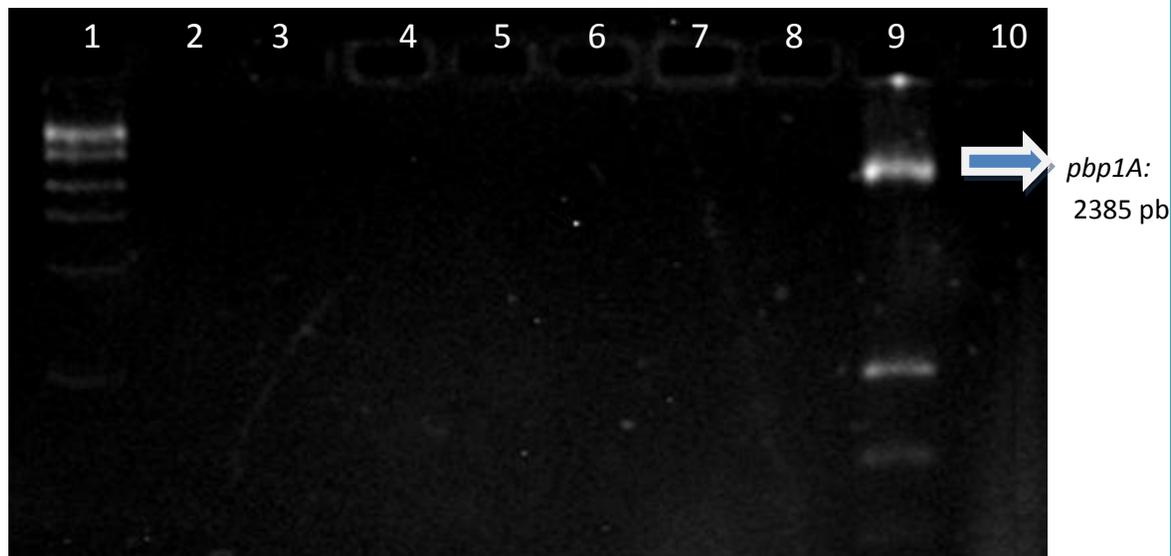


Figura 9. Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega (Concentraciones de Cebadores): Carril 1: Patrón de peso molecular, Carril 2: Blanco 0.1 uM, Carril 3: NCTC 11367 0.1 uM, carril 4: NCTC 11638 0.1 uM, Carril 5: Blanco 0.5 uM, Carril 6: NCTC 11367 0.5 uM, carril 7: NCTC 11638 0.5 uM, Carril 8: Blanco 1.0 uM, Carril 9: NCTC 11367 1.0 uM, carril 10: NCTC 11638 1.0 uM

Por los resultados obtenidos en esta PCR y la presencia de banda, se decide realizar una prueba, en la que además de las concentraciones de cebadores, se evalúen diferentes T_m y volúmenes de ADN, de tal manera que se encuentren condiciones más específicas para la amplificación del gen, en búsqueda de obtener únicamente la banda del tamaño del producto, los resultados de este ensayo se evidencian en la Figura 10.

Fig: 10:

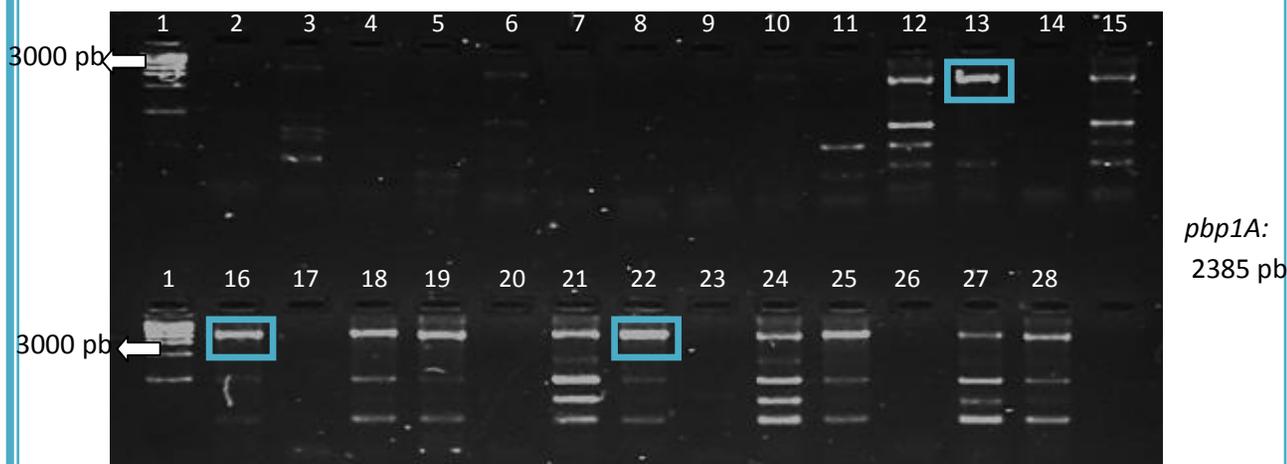


Figura 10. Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega (Concentraciones de Cebadores, Gradiente de temperatura, volumen de ADN cepa NCTC 11637) : Carril 1: Patrón de peso molecular, **Temperatura 51°C** Carril 2: Blanco 0.5 uM, Carril 3: 0.5 uM + 1 µL ADN, carril 4: 0.5 uM + 3 µL ADN, Carril 5: Blanco 1 uM, Carril 6: 1 uM + 1µL ADN, carril 7: 1 uM + 3 µL ADN, Carril 8: Blanco 1.5 uM, Carril 9: 1.5 uM + 1µL ADN, carril 10: 1.5 uM + 3µL ADN **Temperatura 55.3°C** Carril 11: Blanco 0.5 uM, Carril 12: 0.5 uM + 1 µL ADN, carril 13: 0.5 uM + 3 µL ADN, Carril 14: Blanco 1 uM, Carril 15: 1 uM + 1µL ADN, carril 16: 1 uM + 3 µL ADN, Carril 17: Blanco 1.5 uM, Carril 18: 1.5 uM + 1µL ADN, carril 19: 1.5 uM + 3µL ADN **Temperatura 60°C** Carril 20: Blanco 0.5 uM, Carril 21: 0.5 uM + 1 µL ADN, carril 22: 0.5 uM + 3 µL ADN, Carril 23: Blanco 1 uM, Carril 24: 1 uM + 1µL ADN, carril 25: 1 uM + 3 µL ADN, Carril 26: Blanco 1.5 uM, Carril 27: 1.5 uM + 1µL ADN, carril 28: 1.5 uM + 3µL ADN

Con los resultados obtenidos en la Fig. 10, y la presencia de bandas de 2385 pb, se decide repetir los ensayos que presentan mayor intensidad en esta banda, y menos número de bandas de menor tamaño, esta vez utilizando, dos cepas de referencia para evaluar si los cebadores escogidos se alinean correctamente a estas dos secuencias, ya que es necesario que se unan a todas las cepas de *H. pylori* para lograr la amplificación del gen de interés en cepas con presencia de mutaciones que confieren resistencia a amoxicilina y de esta manera elegir las condiciones de PCR más específicas. (Fig. 11).

Fig. 11:

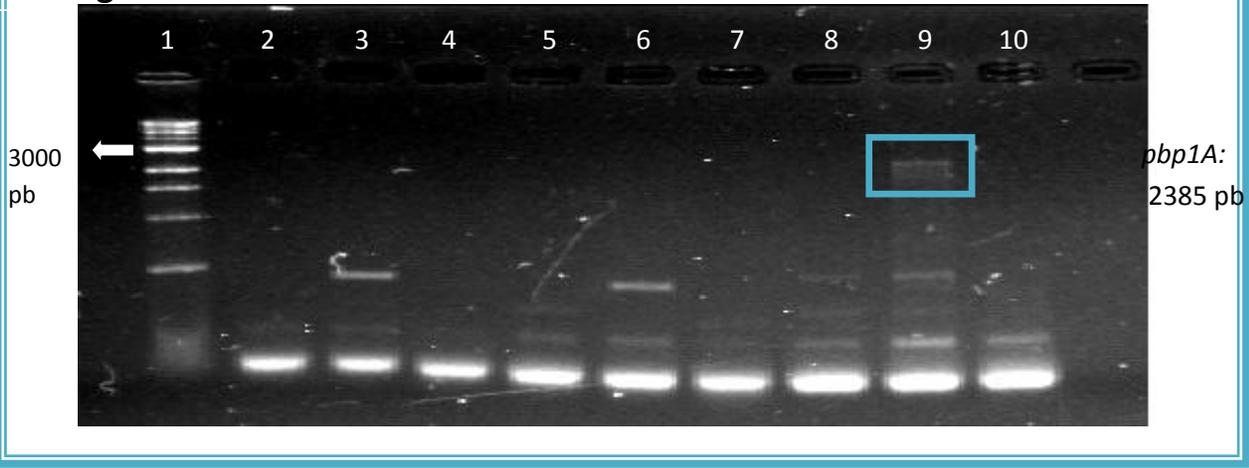


Figura 11. Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega (Concentraciones de Cebadores, Gradiente de temperatura, (a) NCTC 11637, (b) NCTC 11638) : Carril 1: Patrón de peso molecular 1 Kb, **Temperatura 55.3°C** Carril 2: Blanco 0.5 uM, Carril 3: 0.5 uM + 3 µL ADN (a), carril 4: 0.5 uM + 3 µL ADN (b), Carril 5: Blanco 1 uM, Carril 6: 1 uM + 3µL ADN (a), carril 7: 1 uM + 3 µL ADN (b), **Temperatura 61°C** Carril 8: Blanco 0.5 uM, Carril 9: 0.5 uM + 3µL ADN (a), carril 10: 0.5 uM + 3µL ADN (b)

Una vez obtenido el resultado de este ensayo y al evidenciar la baja reproducibilidad del mismo, al no obtener las bandas con la misma intensidad del ensayo anterior, se decide trabajar nuevamente las condiciones del primer ensayo (Fig. 12), en el que se obtienen bandas en las 3 concentraciones evaluadas con la cepa de referencia NCTC 11637 y la Tm original de los cebadores.

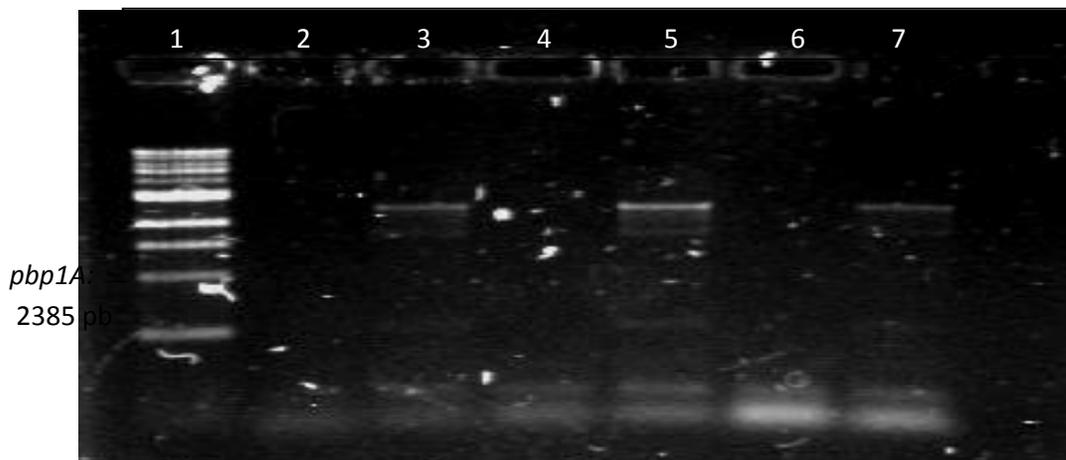


Figura 12. Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega (Concentraciones de Cebadores, Tm 56°C): Carril 1: Patrón de peso molecular, Carril 2: Blanco 0.3 uM, Carril 3: NCTC 11367 0.3 uM, Carril 4: Blanco 0.5 uM, Carril 5: NCTC 11367 0.5 uM, carril 6: Blanco 1.0 uM, Carril 7: NCTC 11367 1.0 uM

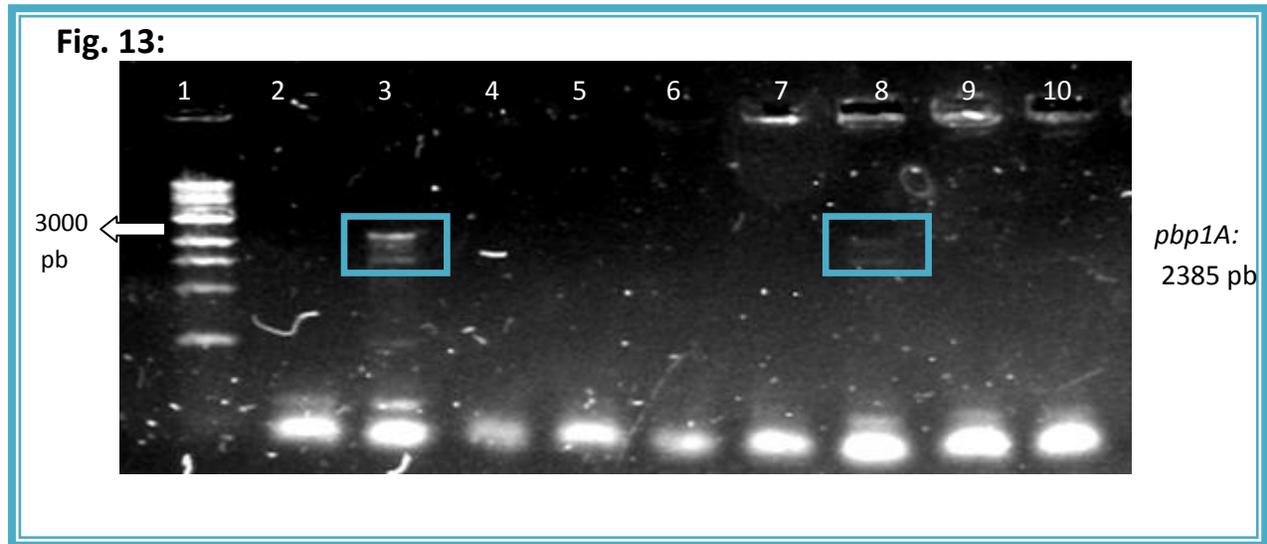


Figura 13. Amplificación gen *pbp1A*: Master Mix Promega (Muestras Resistentes a Amoxicilina): Carril 1: Patrón de peso molecular, Carril 2: Blanco 0.3 uM, Carril 3: NCTC 11367, Carril 4: 36 A, Carril 5: 44C, Carril 6: 91 A, Carril 7: 271 A, Carril 8: 361 A, Carril 9: 15 A, Carril 10: 31 A.

Con los resultados obtenidos en el último ensayo mencionado: la amplificación de bandas en las 3 concentraciones de cebadores, se decide utilizar la concentración de 0.5 μ M, la adición de 3 μ L de ADN y una Tm de 56°C, para realizar la prueba con las cepas resistentes a amoxicilina. De tal manera que de presentarse la banda de 2385 pb, se envíen los productos, para su secuenciación. (Fig. 13)

Con los resultados obtenidos en la Fig. 13, se decidió cuantificar el DNA de las muestras analizadas (Tabla 7), y realizar ensayos con las enzimas: Paq5000HotStar DNA Polimerase (STRATAGENE), Enzima KAPA HiFi™ HotStar Ready Mix (2x) utilizando las condiciones que sugiere el fabricante y realizando los ajustes en los tiempos y las temperaturas de cada uno de los procesos, y Master Mix de Promega, en la que se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de cebadores (0.3, 0.5 y 1.0 uM), y DNA (1.0, 3.0 y 4.5 μ L) (Fig. 14).

Tabla 5. Concentración de ADN de las muestras analizadas. (Qubit®)

Cepa	Concentración de ADN
NCTC 11637	307 ng/mL
NCTC 11638	371 ng/mL
15 A	10.9 ng/mL
31 A	550 ng/mL
36 A	➤ 600 ng/mL
44 C	95 ng/mL
91 A	43.3 ng/mL
271 A	40.4 ng/mL
361 A	382 ng/mL

Con los resultados del último ensayo, al evidenciar únicamente banda de amplificación de 2385 pb en la cepa de referencia NCTC 11638, en las diferentes concentraciones de cebadores y DNA, y no obtener resultados positivos en las enzimas de alta fidelidad utilizadas, se realizó un nuevo ensayo, utilizando la enzima Go Hot Star Promega y ajustando concentraciones de MgCl, Taq polimerasa, buffer, nucleótidos y cebadores a las condiciones más cercanas a las que contiene la enzima utilizada en el artículo de Rimbara *et. al* del cual se tomaron las secuencias de los cebadores (Fig. 15).

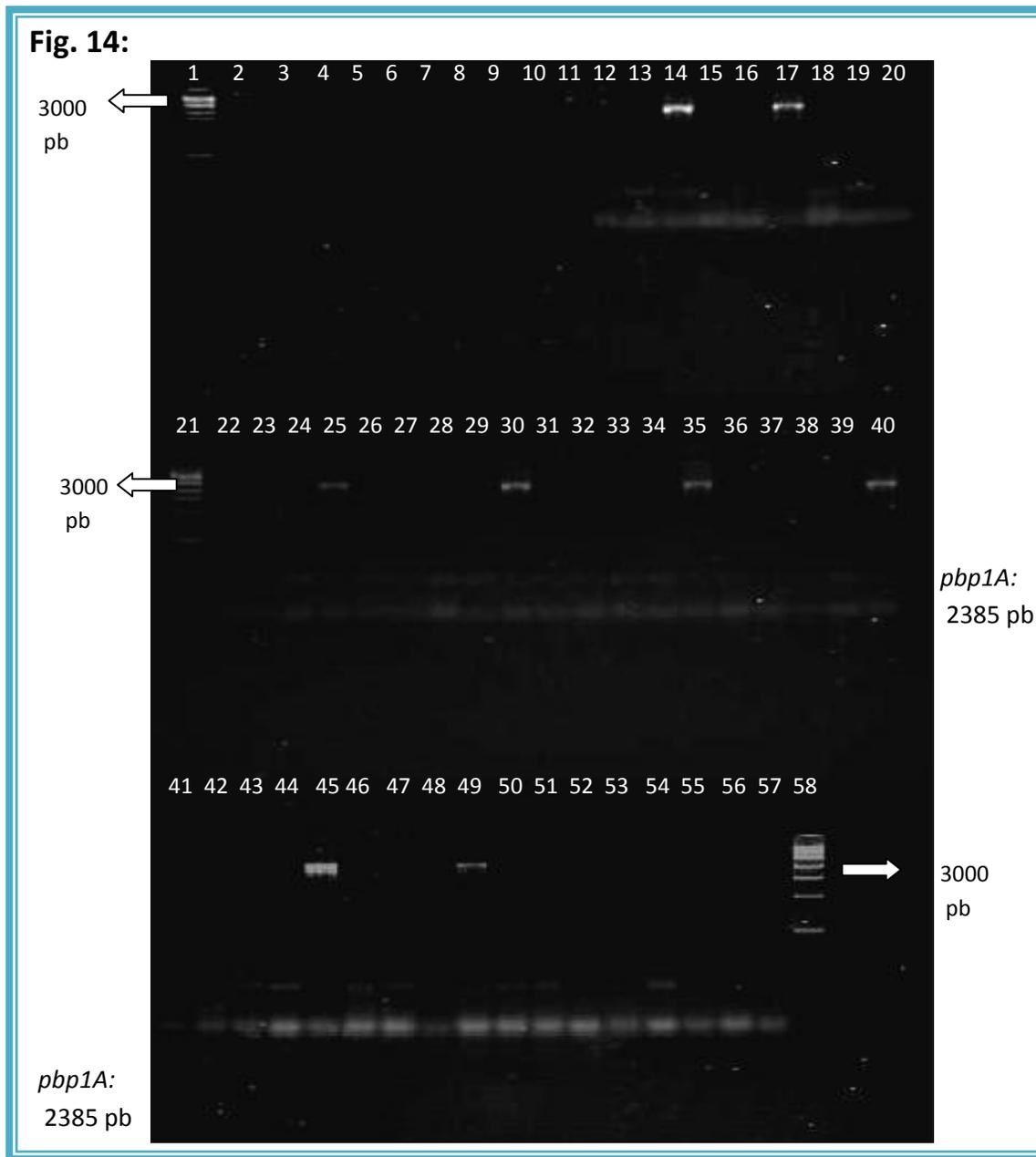


Figura 14. Amplificación gen *pbp1A*: Enzimas de alta fidelidad Carril 1, 21, 58: Patrón de peso molecular 1Kb, **KAPA HiFi Hot Star** Carril 2: Blanco, Carril 3: NCTC 11367, Carril 4: NCTC 11638, Carril 5: 31 A, Carril 6: 361 A, **HiFi STRATAGENE** Carril 7: Blanco, Carril 8: NCTC 11367, Carril 9: NCTC 11638, Carril 10: 31 A, Carril 11: 361 A, **Master Mix Promega Tm 56°C** Primer 0.3 uM + 1 uL ADN Carril 12: Blanco, Carril 13: NCTC 11367, Carril 14: NCTC 11638, Carril 15: 31 A, Carril 16: 361 A. Primer 0.3 uM + 3 uL ADN Carril 17: Blanco, Carril 18: NCTC 11367, Carril 19: NCTC 11638, Carril 20: 31 A, Carril 22: 361 A. Primer 0.3 uM + 4.7 uL ADN Carril 23: Blanco, Carril 24: NCTC 11367, Carril 25: NCTC 11638, Carril 26: 31 A, Carril 27: 361 A. Primer 0.5 uM + 1 uL ADN Carril 28: Blanco, Carril 29: NCTC 11367, Carril 30: NCTC 11638, Carril 31: 31 A, Carril 32: 361 A. Primer 0.5 uM + 3 uL ADN Carril 33: Blanco, Carril 34: NCTC 11367, Carril 35: NCTC 11638, Carril 36: 31 A, Carril 37: 361 A. Primer 0.5

uM + 4.5 *uL* ADN Carril 38: Blanco, Carril 39: NCTC 11367, Carril 40: NCTC 11638, Carril 41: 31 A, Carril 42: 361 A. *Primer 1.0 uM* + 1 *uL* ADN Carril 43: Blanco, Carril 44: NCTC 11367, Carril 45: NCTC 11638, Carril 46: 31 A, Carril 47: 361 A *Primer 1.0 uM* + 3 *uL* ADN Carril 48: Blanco, Carril 49: NCTC 11367, Carril 50: NCTC 11638, Carril 51: 31 A, Carril 52: 361 A *Primer 1.0 uM* + 3 *uL* ADN Carril 53: Blanco, Carril 54: NCTC 11367, Carril 55: NCTC 11638, Carril 56: 31 A, Carril 57: 361 A



Figura 15. Amplificación gen *pbp1A*: Go Hot Star Promega, Tm 60°C (Muestras Resistentes a Amoxicilina): Carril 1: Patrón de peso molecular, Carril 2: Blanco 0.5 *uM*, Carril 3: NCTC 11367, Carril 4: NCTC 11638, Carril 5: 36 A, Carril 6: 44C, Carril 7: 91 A, Carril 8: 271 A, Carril 9: 361 A, Carril 10: 15 A, Carril 11: 31 A.

Debido a que no se obtuvieron bandas en este ensayo, con las concentraciones de todos los componentes de la Master Mix ajustados, así como el protocolo de PCR realizado para obtener el gen de interés, se realizó el último ensayo, variando las concentraciones de los cebadores y el volumen de DNA. (Fig. 16).

Fig. 16:

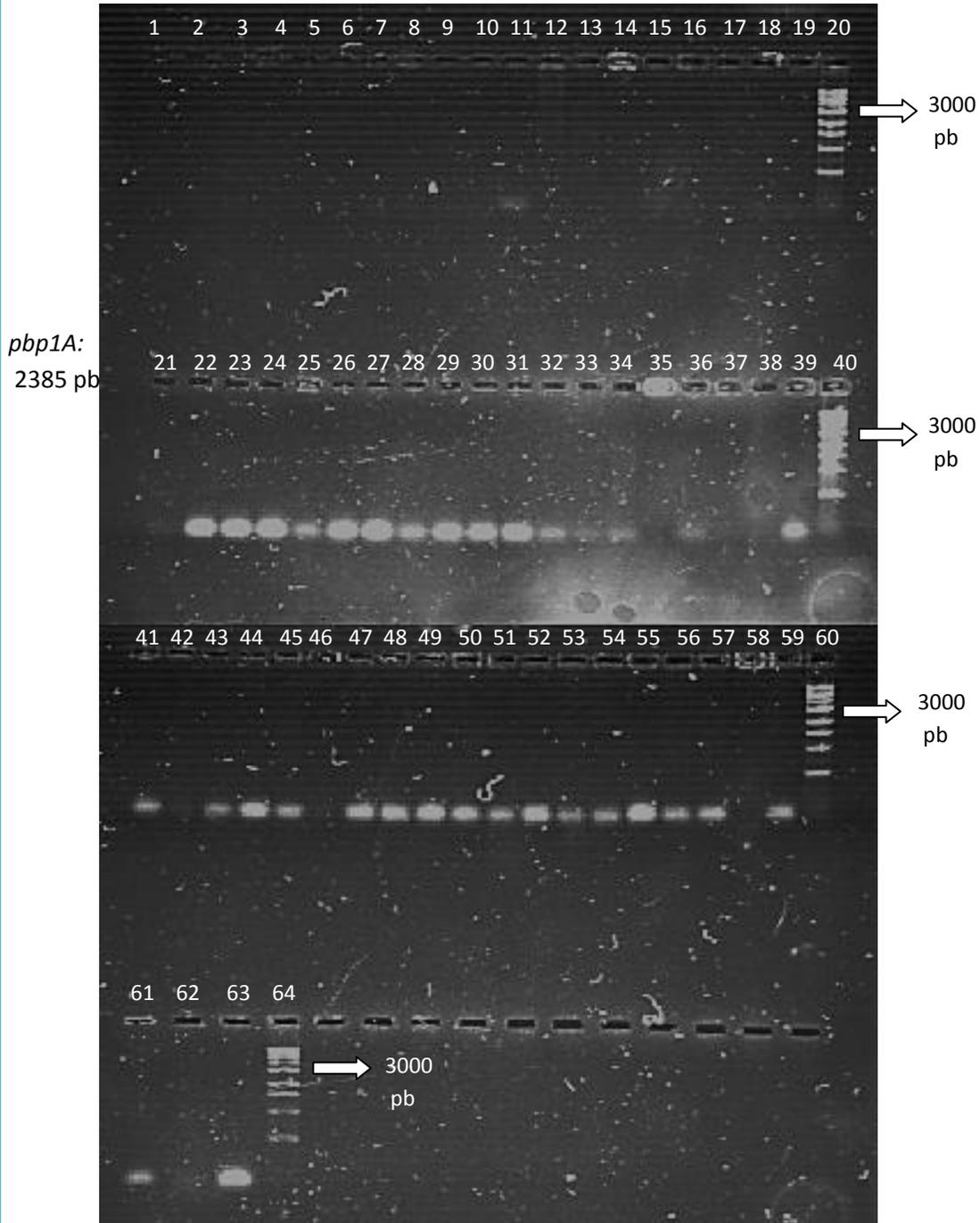


Figura 16. Amplificación gen *pbp1A*: Enzima Go Hot Star Promega Tm 56°C Carril 20, 40, 60 y 64: Patrón de peso molecular 1Kb, Cebadores 0.1 μ M +1 μ L ADN Carril 1: Blanco, Carril 2: NCTC 11637, Carril 3: NCTC 11638,

Carril 4: 15 A, Carril 5: 31 A, Carril 6: 36 A, Carril 7: 44C, Carril 8: 91 A, Carril 9: 271 A, Carril 10: 361 A Cebadores 0.1 μM + 3 μL ADN Carril 11: Blanco, Carril 12: NCTC 11637, Carril 13: NCTC 11638, Carril 14: 15 A, Carril 15: 31 A, Carril 16: 36 A, Carril 17: 44C, Carril 18: 91 A, Carril 19: 271 A, Carril 21: 361 A. Cebadores 0.3 μM + 1 μL ADN Carril 22: Blanco, Carril 23: NCTC 11637, Carril 24: NCTC 11638, Carril 25: 15 A, Carril 26: 31 A, Carril 27: 36 A, Carril 28: 44C, Carril 29: 91 A, Carril 30: 271 A, Carril 31: 361 A. Cebadores 0.3 μM + 3 μL ADN Carril 32: Blanco, Carril 33: NCTC 11637, Carril 34: NCTC 11638, Carril 35: 15 A, Carril 36: 31 A, Carril 37: 36 A, Carril 38: 44C, Carril 39: 91 A, Carril 41: 271 A, Carril 42: 361 A. Cebadores 0.8 μM + 1 μL ADN Carril 43: Blanco, Carril 44: NCTC 11637, Carril 45: NCTC 11638, Carril 46: 15 A, Carril 47: 31 A, Carril 48: 36 A, Carril 49: 44C, Carril 50: 91 A, Carril 51: 271 A, Carril 52: 361 A. Cebadores 0.8 μM + 3 μL ADN Carril 53: Blanco, Carril 54: NCTC 11637, Carril 55: NCTC 11638, Carril 56: 15 A, Carril 57: 31 A, Carril 58: 36 A, Carril 59: 44C, Carril 61: 91 A, Carril 62: 271 A, Carril 63: 361 A

8.3. Análisis bioinformático del gen *pbp1A*

A pesar de las pruebas realizadas y de las variables evaluadas, no fue posible obtener las condiciones específicas de PCR para amplificar el gen *pbp1A* de *H. pylori*, por lo tanto no se lograron obtener las secuencias de las cepas resistentes a amoxicilina. Es por esto que se realizó un análisis bioinformático de las secuencias reportadas en la literatura, en las que se evidenciarán las mutaciones más comunes que confieren resistencia a dicho antibiótico, así como los polimorfismos del gen que no generan cambios en la secuencia de la proteína, o en la CMI. En las figuras 17 y 18 se observan las secuencias del gen *pbp1A* de las cepas reportadas por Matteo *et al.* en el 2008 en las que se presentan cambios en la secuencia de nucleótidos que confieren o no cambios en la proteína, que pueden desencadenar resistencia a amoxicilina.



Figura 17. Secuencia del gen *pbp1A* reportado por Matteo et al. 2008 Resistente a amoxicilina: Acceso al GenBank EF583173, Sensible a amoxicilina: Acceso al GenBank EF583174. En verde: Algunos de los polimorfismos presentes en las cepas sensibles y resistentes. En azul: Mutaciones presentes en la cepa resistente a amoxicilina.

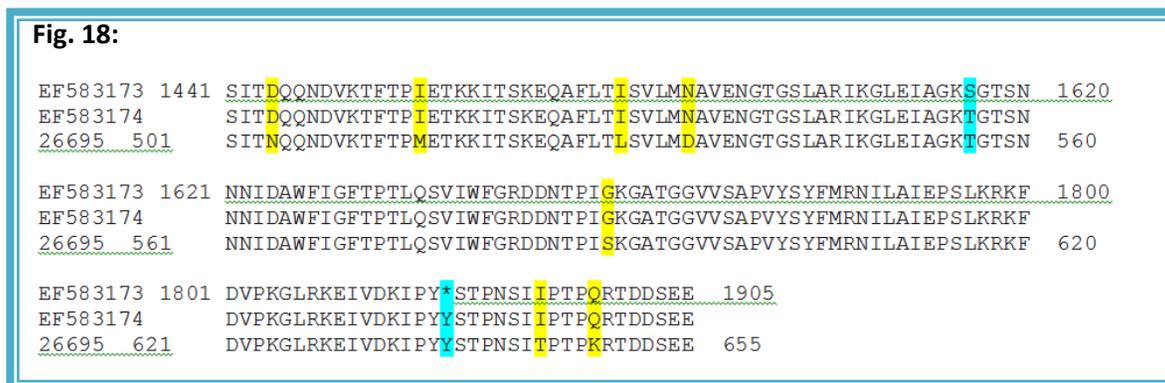


Figura 18. Secuencia de la proteína *pbp1A* reportada por Matteo et al. 2008 Se presentan las secuencias de la proteína de una cepa resistente a amoxicilina y una sensible, con números de acceso al GenBank EF583173 y EF583174 respectivamente. En amarillo: Polimorfismos presentes en las cepas sensibles y resistentes. En azul: Mutaciones presentes en la cepa resistente a amoxicilina.

En las figuras 19 y 20 se observan las secuencias del gen *pbp1A* de las cepas reportadas por Gerrits et al. en el 2006 en las que se presentan cambios en la secuencia de nucleótidos que confieren o no cambios en la proteína, que pueden desencadenar resistencia a amoxicilina



Figura 19. Secuencia del gen *pbp1A* reportada por Gerrits et al. 2008. En esta figura, se presentan los polimorfismos más frecuentes del gen de las secuencias resistentes a amoxicilina.

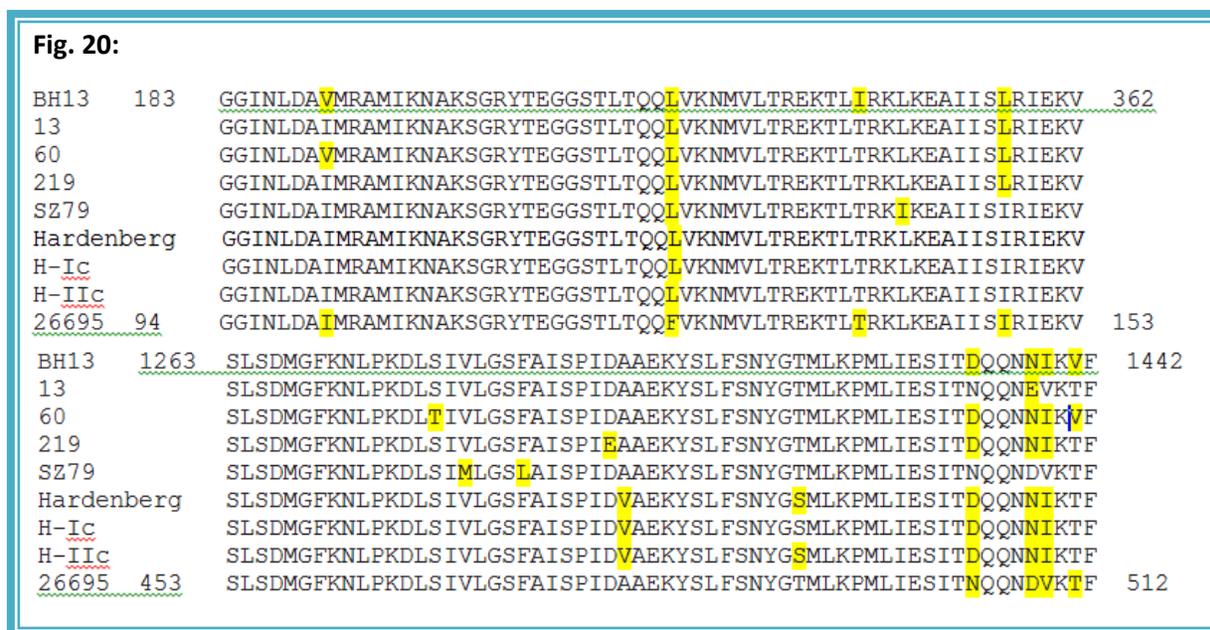


Figura 20. Secuencia de la proteína *pbp1A* reportada por Gerrits et al. 2006 Se presentan las mutaciones más frecuentes reportadas en cepas resistentes a amoxicilina.

A continuación se presentan en las figuras 21 y 22, los polimorfismos y las mutaciones que confieren o no resistencia a amoxicilina, en las cepas reportadas en la literatura con número de acceso al Gen Bank.

Fig. 21:

Matteo <i>et al.</i>	Cepa	Gen	Proteína																		
		69	23	129	43	135	45	249	83	260	87	273	91	285	95	288	96	312	104	313	105
	ATCC 26695	CCA	A	AAG	K	TTT	F	CGC	R	AAA	K	AGT	S	CCA	T	GAG	E	CAA	Q	TTC	F
	EF583174 Sen	CCG	A	AAA	K	TTC	F	CGT	R	AGA	R	AGC	S	CCG	T	GAA	E	CAG	Q	CTC	L
	EF583173 Res	CCG	A	AAA	K	TTC	F	CGT	R	AGA	R	AGC	S	CCG	T	GAA	E	CAG	Q	CTC	L
	Cepa	Gen	Proteína																		
		336	112	372	124	381	127	426	142	468	156	535	179	639	213	687	229	690	230	702	234
	ATCC 26695	ACA	T	GCG	A	TCT	S	CGT	R	GTG	V	CTA	L	GGC	G	ATT	I	GTT	V	ACC	T
	EF583174 Sen	ACG	T	GCT	A	TCC	S	CGC	R	GTC	V	TTA	L	GGT	G	ATC	I	GTC	V	ACT	T
	EF583173 Res	ACG	T	GCT	A	TCC	S	CGC	R	GTC	V	TTA	L	GGT	G	ATC	I	GTC	V	ACT	T
	Cepa	Gen	Proteína																		
		714	238	729	243	732	244	822	274	951	317	993	331	1035	345	1068	356	1095	365	1119	373
	ATCC 26695	AAC	N	GTC	V	GTA	V	CGC	R	ACG	T	TAT	Y	CAG	Q	CAG	Q	ACG	T	GCG	A
	EF583174 Sen	AAT	N	GTT	V	GTG	V	CGA	R	ACC	T	TAC	Y	CAA	Q	CAA	Q	ACC	T	GCA	A
	EF583173 Res	AAT	N	GTT	V	GTG	V	CGA	R	ACC	T	TAC	Y	CAA	Q	CAA	Q	ACC	T	GCA	A
	Cepa	Gen	Proteína																		
		1125	375	1146	382	1155	385	1227	409	1335	445	1336	446	1353	451	1450	484	1485	495	1491	497
	ATCC 26695	AAC	N	AGT	S	AGT	S	GCC	A	GAC	D	TTG	L	GGG	G	AAC	N	ATG	M	ACC	T
	EF583174 Sen	AAT	N	AGC	S	AGC	S	GCT	A	GAT	D	CTG	L	GGA	G	GAC	D	ATT	I	ACT	T
	EF583173 Res	AAT	N	AGC	S	AGC	S	GCT	A	GAT	D	CTG	L	GGA	G	GAC	D	ATT	I	ACT	T
	Cepa	Gen	Proteína																		
		1506	502	1527	509	1542	514	1563	521	1607	536	1632	544	1662	554	1683	561	1686	562	1705	569
	ATCC 26695	TCC	S	CCC	P	GAT	D	ACA	T	ACC	S	GAT	D	TTG	L	GGG	G	AGG	R	AGC	S
	EF583174 Sen	TCT	S	CCA	P	AAT	N	ACG	T	ACC	S	GAC	D	TTA	L	GGA	G	AGA	R	GGC	G
EF583173 Res	TCT	S	CCA	P	AAT	N	ACG	T	AGC	T	GAC	D	TTA	L	GGA	G	AGA	R	GGC	G	
Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	
	1722	574	1725	575	1776	592	1851	617	1860	620	1871	624									
ATCC 26695	GGG	G	GGT	G	ATT	I	TAT	Y	CCC	P	ACC	T									
EF583174 Sen	GGA	G	GGC	G	ATC	I	TAC	Y	CCT	P	ATC	I									
EF583173 Res	GGA	G	GGC	G	ATC	I	TAG	STOP	CCT	P	ATC	I									

Figura 21. Mutaciones presentes en las cepas reportadas por Matteo *et al.* En rojo: Cambio en la secuencia de nucleótidos, En Azul: Cambio en la secuencia de la proteína que no confiere resistencia. En verde: Cambio en la secuencia de nucleótidos que confiere cambio en la proteína y genera resistencia a amoxicilina.

Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína										
	108	36	114	38	126	42	129	43	132	44	144	48	154	52	180	60	183	61	189	63
ATCC 26695	GCT	A	ATT	I	CGC	R	CCA	P	GGC	G	CAG	Q	CGA	R	ATC	I	TAT	Y	AAG	K
BH13	GCT	A	ATC	I	CGT	R	CCC	P	AGT	S	CAG	Q	CGA	R	ATT	I	TAT	Y	AAG	K
13	GCT	A	ATC	I	CGC	R	CCC	P	AGT	S	CAG	Q	AGA	R	ATC	I	TAT	Y	AAG	K
60	GCT	A	ATC	I	CGC	R	CCC	P	AGT	S	CAG	Q	CGA	R	ATC	I	TAT	Y	AAG	K
219	GCC	A	ATT	I	CGC	R	CCG	P	GGC	G	CAG	Q	AGA	R	ATC	I	TAC	Y	AAG	K
SZ79	GCT	A	ATT	I	CGC	R	CCG	P	GGC	G	CAA	Q	AGA	R	ATC	I	TAT	Y	AAA	K
Hardenberg	GCT	A	ATT	I	CGC	R	CCG	P	GGC	G	CAG	Q	CGA	R	ATT	I	TAT	Y	AAG	K
H-Ic	GCC	A	ATT	I	CGC	R	CCG	P	GGC	G	CAG	Q	CGA	R	ATT	I	TAT	Y	AAG	K
H-IIc	GCT	A	ATC	I	CGT	R	CCC	P	AGT	S	CAG	Q	CGA	R	ATT	I	TAT	Y	AAG	K
Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína										
	195	65	209	70	235	79	247	83	264	88	276	92	294	98	301	101	309	103	339	113
ATCC 26695	TTT	F	CGT	R	ATT	I	TTA	L	ACC	T	GAA	E	TTA	L	ATC	I	CGC	R	CGT	R
BH13	TTT	F	CAT	H	GTT	V	CTA	L	ACC	T	GAG	E	TTA	L	GTC	V	CGC	R	CGT	R
13	TTC	F	CGT	R	GTT	V	TTA	L	ACT	T	GAA	E	TTA	L	ATC	I	CGC	R	CGC	R
60	TTT	F	CGT	R	ATT	I	TTA	L	ACC	T	GAG	E	TTA	L	GTC	V	CGT	R	CGT	R
219	TTC	F	CGT	R	ATT	I	TTA	L	ACC	T	GAA	E	TTA	L	ATC	I	CGC	R	CGT	R
SZ79	TTC	F	CGT	R	ATT	I	TTA	L	ACC	T	GAA	E	TTA	L	ATC	I	CGC	R	CGT	R
Hardenberg	TTT	F	CGT	R	ATT	I	TTA	L	ACC	T	GAG	E	TTG	L	ATC	I	CGC	R	CGT	R
H-Ic	TTT	F	CGT	R	ATT	I	TTA	L	ACC	T	GAA	E	TTG	L	ATC	I	CGC	R	CGT	R
H-IIc	TTT	F	CGT	R	ATT	I	TTA	L	ACC	T	GAG	E	TTG	L	ATC	I	CGC	R	CGT	R
Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína										
	345	115	348	116	360	120	373	125	396	132	399	133	409/411	137	413	138	420	140	421	141
ATCC 26695	ACC	T	GAG	E	ACC	T	TTC	F	ACA	T	CGA	R	CTA	L	ACC	T	AAA	K	CTC	L
BH13	ACC	T	GAA	E	ACT	T	CTC	L	ACG	T	CGA	R	CTG	L	ATC	I	AAG	K	CTC	L
13	ACT	T	GAA	E	ACC	T	CTC	L	ACA	T	CGG	R	TTG	L	ACC	T	AAA	K	CTC	L
60	ACT	T	GAA	E	ACT	T	CTC	L	ACA	T	CGA	R	CTA	L	ACC	T	AAG	K	CTC	L
219	ACC	T	GAG	E	ACC	T	CTC	L	ACA	T	CGA	R	TTA	L	ACC	T	AAA	K	CTC	L
SZ79	ACC	T	GAG	E	ACC	T	CTC	L	ACA	T	CGA	R	CTA	L	ACC	T	AAA	K	ATC	I
Hardenberg	ACC	T	GAA	E	ACT	T	CTC	L	ACA	T	CGA	R	CTG	L	ACC	T	AAG	K	CTC	L
H-Ic	ACC	T	GAA	E	ACT	T	CTC	L	ACA	T	CGA	R	CTG	L	ACC	T	AAG	K	CTC	L
H-IIc	ACC	T	GAA	E	ACT	T	CTC	L	ACA	T	CGA	R	CTG	L	ACC	T	AAG	K	CTC	L

Gerrits *et al.*

Figura 22A. Mutaciones presentes en las cepas reportadas por Gerrits *et al.* En rojo: Cambio en la secuencia de nucleótidos, en verde: Cambio de aminoácidos en la proteína.

Gerrits <i>et al.</i>	Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína
		432	144	441	147	442	148	460	154	486	162	492	164	528	176	540	180	561	187	595	199
	ATCC 26695	GCG	A	TCT	S	ATA	I	TTA	L	CGT	R	TTG	L	GTG	V	AGT	S	CCC	P	CTA	L
	BH13	GCC	A	TCT	S	TTA	L	TTA	L	CGT	R	TTG	L	GTG	V	AGC	S	CCT	P	TTA	L
	13	GCT	A	TCT	S	TTA	L	CTA	L	CGC	R	TTA	L	GTG	V	AGT	S	CCC	P	TTA	L
	60	GCC	A	TCT	S	TTA	L	TTA	L	CGT	R	TTG	L	GTG	V	AGC	S	CCC	P	TTA	L
	219	GCT	A	TCT	S	TTA	L	TTA	L	CGC	R	TTG	L	GTC	V	AGT	S	CCC	P	TTA	L
	SZ79	GCC	A	TCC	S	ATA	I	TTA	L	CGT	R	TTG	L	GTC	V	AGT	S	CCC	P	TTA	L
	Hardenberg	GCC	A	TCT	S	ATA	I	TTA	L	CGT	R	TTG	L	GTC	V	AGT	S	CCC	P	TTA	L
	H-Ic	GCC	A	TCT	S	ATA	I	TTA	L	CGT	R	TTG	L	GTC	V	AGT	S	CCC	P	TTA	L
	H-IIc	GCC	A	TCT	S	ATA	I	TTA	L	CGT	R	TTG	L	GTC	V	AGT	S	CCC	P	TTA	L
	Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína
		606	202	609	203	612	204	615	205	618	206	620/621	207	630	210	654	218	657	219	696	232
	ATCC 26695	TTG	L	CCT	P	AGG	R	GCT	A	CCG	P	AGT	S	GAT	D	TCA	S	CTC	L	TTA	L
	BH13	TTG	L	CCA	P	AGA	R	GCT	A	CCG	P	AGT	S	GAC	D	TCG	S	CTC	L	TTA	L
	13	TTA	L	CCC	P	AGA	R	GCT	A	CCG	P	AGT	S	GAT	D	TCA	S	CTT	L	TTA	L
	60	TTA	L	CCC	P	AGA	R	GCC	A	CCA	P	AGT	S	GAC	D	TCA	S	CTC	L	TTG	L
	219	TTG	L	CCT	P	AGG	R	GCT	A	CCA	P	AGC	S	GAC	D	TCA	S	CTC	L	TTA	L
	SZ79	TTG	L	CCT	P	AGG	R	GCT	A	CCA	P	AGT	S	GAT	D	TCA	S	CTC	L	TTA	L
	Hardenberg	TTA	L	CCT	P	AGG	R	GCT	A	CCG	P	AAT	N	GAT	D	TCA	S	CTC	L	TTA	L
	H-Ic	TTA	L	CCT	P	AGG	R	GCT	A	CCG	P	AAT	N	GAT	D	TCA	S	CTC	L	TTA	L
	H-IIc	TTA	L	CCT	P	AGG	R	GCT	P	CCG	P	AAT	N	GAT	D	TCA	S	CTC	L	TTA	L
	Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína
		699	233	724/725	242	747	249	748/750	250	761	254	774	258	780	260	792	263	792	264	807	269
ATCC 26695	GGC	G	GGC	G	ATT	I	GTT	V	ACC	T	AAC	N	GCC	A	GTC	V	GTA	V	AAG	K	
BH13	GGC	G	TCC	S	ATC	I	ATC	I	ATC	I	AAC	N	GCC	A	GTC	V	GTG	V	AAG	K	
13	GGC	G	GGC	G	ATC	I	GTC	V	ATC	I	AAT	N	GCT	A	GTC	V	GTA	V	AAA	K	
60	GGC	G	TCC	S	ATC	I	GTT	V	ATC	I	AAT	N	GCT	A	GTC	V	GTG	V	AAG	K	
219	GGC	G	TCC	S	ATC	I	GTC	V	ATC	I	AAC	N	GCT	A	GTC	V	GTA	V	AGG	K	
SZ79	GGT	G	GGC	G	ATC	I	GTC	V	ATC	I	AAT	N	GCT	A	GTC	V	GTG	V	AAG	K	
Hardenberg	GGC	G	GGC	G	ATC	I	GTC	V	ATC	I	AAT	N	GCT	A	GTT	V	GTA	V	AAG	K	
H-Ic	GGC	G	GGC	G	ATC	I	GTC	V	ATC	I	AAT	N	GCT	A	GTT	V	GTA	V	AAG	K	
H-IIc	GGC	G	GGC	G	ATC	I	GTC	V	ATC	I	AAT	N	GCT	A	GTT	V	GTA	V	AAG	K	

Figura 22B. Mutaciones presentes en las cepas reportadas por Gerrits *et al.* En rojo: Cambio en la secuencia de nucleótidos, en verde: Cambio de aminoácidos en la proteína.

Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína
	275		277		284		285		295		299		314		315		320		323	
ATCC 26695	GAC	D	TTA	L	ATA	I	AAG	K	TTA	L	TCC	S	GAA	E	AAG	K	GCG	A	GAA	E
BH13	GAT	D	CTA	L	ATT	I	AAG	K	TTG	L	TCT	S	GAG	E	AAG	K	GCA	A	GAT	D
13	GAC	D	CTA	L	ATA	I	AAG	K	TTA	L	TCC	S	GAA	E	AAG	K	GCC	A	GAA	E
60	GAC	D	TTA	L	ATA	I	AAA	K	TTA	L	TCT	S	GAA	E	AAG	K	GCC	A	GAT	D
219	GAC	D	TTA	L	ATA	I	AAG	K	TTA	L	TCC	S	GAA	E	GAG	E	GCA	A	GAA	E
SZ79	GAT	D	TTA	L	ATA	I	AAG	K	TTA	L	TCC	S	GAA	E	AAG	K	GCC	A	GAA	E
Hardenberg	GAC	D	TTA	L	ATA	I	AAA	K	TTA	L	TCC	S	GAA	E	AAG	K	GCA	A	GAA	E
H-Ic	GAC	D	TTA	L	ATA	I	AAA	K	TTA	L	TCC	S	GAA	E	AAG	K	GCA	A	GAA	E
H-IIc	GAC	D	TTA	L	ATA	I	AAA	K	TTA	L	TCC	S	GAA	E	AAG	K	GCA	A	GAA	E
Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína
	324		328		370		376		385		402		405		406		413		436	
ATCC 26695	GAT	D	TTA	L	ATA	I	CAG	Q	ACG	T	AGT	S	AGT	S	GAA	E	CCC	P	CTA	L
BH13	GAT	D	TTA	L	ATC	I	CAA	Q	ACG	T	GGT	G	AGC	S	GCG	A	CCT	P	CTG	L
13	GAT	D	TTA	L	ATC	I	CAA	Q	ACC	T	GGT	G	AGC	S	GCG	A	CCT	P	CTG	L
60	GAT	D	TTA	L	ATC	I	CAA	Q	ACG	T	AGT	S	AGC	S	GTG	V	CCT	P	CTG	L
219	AAT	N	TTG	L	ATC	I	CAA	Q	ACC	T	AGT	S	AGC	S	GAA	E	CCT	P	CTA	L
SZ79	GAT	D	TTA	L	ATC	I	CAA	Q	ACC	T	AGT	S	AGC	S	GAA	E	CCC	P	CTA	L
Hardenberg	GAT	D	TTG	L	ATA	I	CAA	Q	ACG	T	AGT	S	AGC	S	GCG	A	CCC	P	CTG	L
H-Ic	GAT	D	TTG	L	ATA	I	CAA	Q	ACG	T	AGT	S	AGC	S	GCG	A	CCC	P	CTG	L
H-IIc	GAT	D	TTG	L	ATA	I	CAA	Q	ACG	T	AGT	S	AGC	S	GCG	A	CCC	P	CTG	L
Cepa	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína
	1311	437	1392	464	1440	480	1509	503	1510/1512	504	1522/1524	508	1801	601	1806	602	1809	603	1818	606
ATCC 26695	GCC	A	AAG	K	GCA	A	ACT	T	AAC	N	GAT	D	ACA	T	GGG	G	GGT	G	AGT	S
BH13	GCT	A	AAA	K	GCG	A	ACC	T	GAT	D	AAT	N	CCA	P	GGA	G	GGC	G	AGC	S
13	GCT	A	AAA	K	GCG	A	ACC	T	AAC	N	GAA	E	ACA	T	GGG	G	GGC	G	AGC	S
60	GCT	A	AAA	K	GCG	A	ACC	T	CAT	H	AAT	N	ACA	T	GGA	G	GGC	G	AGC	S
219	GCC	A	AAG	K	GCG	A	ACC	T	CAT	H	AAT	N	GCA	A	GGA	G	AGC	G	AGT	S
SZ79	GCC	A	AAA	K	GCG	A	ACT	T	AAC	N	GAT	D	ACA	T	GGA	G	AGC	G	AGT	S
Hardenberg	GCT	A	AAA	K	GTG	V	ACC	T	GAT	D	AAT	N	ACA	T	GGA	G	GGC	G	AGT	S
H-Ic	GCT	A	AAA	K	GTG	V	ACC	T	GAT	D	AAT	N	ACA	T	GGA	G	GGC	G	AGT	S
H-IIc	GCT	A	AAA	K	GTG	V	ACC	T	GAT	D	AAT	N	ACA	T	GGA	G	GGC	G	AGT	S

Figura 22C. Mutaciones presentes en las cepas reportadas por Gerrits *et al.*. En rojo: Cambio en la secuencia de nucleótidos. En verde: Cambio

de aminoácidos en la proteína

9. DISCUSIÓN

H. pylori afecta cerca de dos terceras partes de la población mundial (5), y desde su descubrimiento la terapia de erradicación se ha convertido el tratamiento para la eliminación o prevención de las enfermedades que este microorganismo puede desencadenar. En Colombia la terapia que se suministra al paciente para la eliminación de *H. pylori* es la terapia triple estándar elegida por el consenso Maastricht III que se basa en la administración de un IBP+ amoxicilina + claritromicina o metronidazol (21).

Otero *et al* 2009; resaltan que debido a la falta de pruebas de resistencia antimicrobiana pre-tratamiento, y la evaluación de la erradicación al final del mismo, (5) es difícil asociar la resistencia antimicrobiana a los altos porcentajes de falla terapéutica, sin embargo Rimbara *et al.* 2008, la reportan como la principal causa de fracaso terapéutico.

Los porcentajes de resistencia a amoxicilina son bajos (0.8-1.4%) (15). Matteo *et al.* 2008 y Gerrits *et al* 2002, reportan la baja prevalencia de está en sus ensayos, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, en el que se confirmaron 7 cepas resistentes de un banco de 416 conservadas en el Laboratorio de Bacteriología Especial recogidas durante el periodo comprendido entre enero de 2009 – abril de 2013, razón por la cual estos autores recurren a la transformación de cepas sensibles, para realizar los estudios genotípicos que determinen el cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína, Gerrits *et al* 2006, describen la resistencia a amoxicilina ligada a presencia de mutaciones en el gen *pbp1A*. Cabe resaltar que en el estudio de Matteo *et al.* 2008 el punto de corte para determinar resistencia a amoxicilina de *H. pylori* fue de 0.5 µg/mL, lo que generaría un posible aumento en la prevalencia de resistencia a amoxicilina.

En el proceso de estandarización de la PCR para amplificación del gen *pbp1A*, se utilizaron los cebadores reportados por Rimbara *et al* 2008, en los que indica que

el uso de dichas secuencias *pbp1A F* (5'-TGCGAACACCCTTTTAAAT-3') y *pbp1A R* (5'-GCGACAATAAGAGTGGCA-3') amplifican un fragmento de 2385 pb (4, 20), en el que se pueden evaluar todas las mutaciones presentes en el gen; sin embargo no reportan las condiciones de PCR utilizadas, lo que disminuyó la reproducibilidad de sus ensayos. Estudios de Gerrits *et al.* en el 2006 y Matteo *et al.* en el 2008 sugieren el uso de varias parejas de cebadores, que amplifiquen diferentes segmentos del gen de tal manera que también sea posible el análisis de todos los puntos susceptibles a mutación.

En el análisis de las secuencias del gen *pbp1A* de cepas de *H. pylori* resistentes a amoxicilina reportadas por diversos autores, se destaca la presencia de polimorfismos que no confieren cambios en la estructura de la proteína; Gerrits *et al* 2006, reportan el cambio de adenina por citosina/guanina en la posición 192 del gen, en todas las cepas analizadas, cambio que sigue codificando Prolina (P) en la proteína. Adicionalmente, en las cepas reportadas (todas resistentes para amoxicilina), se evidencio un cambio de nucleótidos en la posición 373 del gen que codifica el cambio de fenilalanina (F) por leucina (L) en la posición 125 de la proteína y que confiere resistencia a amoxicilina. (15)

En lo reportado por Matteo *et al.* 2008, también se presentan polimorfismos en las cepas susceptibles y resistentes reportadas, como el cambio de adenina por guanina en la posición 1563 del gen, en la que aunque exista un cambio en la secuencia de nucleótidos, la tripleta codifica la presencia de treonina (T), en la proteína. Sin embargo, en las cepas reportadas por el mismo autor se encontraron cambios en la secuencia de nucleótidos C1607G que codifican un cambio en la secuencia de la proteína y confieren resistencia a amoxicilina: S536T, mutaciones que generan un cambio en la secuencia de nucleótidos T1851G y modifican el marco de lectura de la proteína generan un codón de parada: Y617 Stop, en este análisis también se evidenció la presencia de cambios en la secuencia de

aminoácidos que no confieren resistencia a amoxicilina G589S, mutación que se evidenció en las cepas susceptibles y resistentes reportadas.

Cabe resaltar que Rimbara *et al* 2008, Gerrits *et al* 2002 y Paul *et al.* 2001 reportan el cambio de serina por arginina en la posición 414 en la mayoría de las cepas resistentes; lo que sugiere el análisis de este punto de mutación en las cepas resistentes a amoxicilina.

CONCLUSIONES

- Se confirmó la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina, en cepas 7 de un banco de 417 conservadas en el Laboratorio de Bacteriología Especial,
- No se logró la estandarización de la PCR para amplificar el gen *pbp1A* de *H. pylori*, por la baja reproducibilidad de los ensayos reportados en la literatura debido a la complejidad del gen.
- Se analizaron bioinformáticamente secuencias del gen *pbp1A* de cepas susceptibles y resistentes a amoxicilina, previamente reportadas encontrando que las mutaciones más frecuentes fueron: S414R y F126L como responsables de la resistencia a amoxicilina.
- Se encuentra que los polimorfismos G1542A, A260G F105L y S569G, presentes en el gen *pbp1A* de *H. pylori* no modifican la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina.

RECOMENDACIONES

- Según lo reportado por Gerrits en el 2006, se sugiere no conservar las cepas resistentes a amoxicilina a -80°C, ya que muchas de estas mutaciones no son estables y se pierden en congelación.

- Se recomienda sintetizar nuevamente los cebadores reportados por Rimbara *et al.* 2008 para retomar el proceso de estandarización de la PCR.
- Se sugiere la realización de una PCR anidada, para eliminar la unión inespecífica de los cebadores a la secuencia de ADN, y aumentar la probabilidad de amplificar el gen de interés.

BIBLIOGRAFIA

1. Hernández M; Reyes O, Rodríguez B. La resistencia a antibióticos en *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Medicina*. 2008 **47**(4):1-13
2. Gerrits MMM, Schuijffel DD, van Zwet AAA, Kuipers EJE, Vandenbroucke-Grauls, C M J E CM, Kusters JGJ. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2002; **46**(7):2229-2233
3. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical microbiology Reviews*. 2007 **20**(2): 280–322
4. Rimbara E., Nogushi N., Kawai T., Sasatsu T. Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ; 2008: **61**, 995–99
5. Otero W., Trespacios AA., Otero E. *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual. Un importante reto en gastroenterología. *Revista Colombiana de Gastroenterología*; 2009: **24**(3):279-292
6. Matteo M. Granados G., Olmos M., Wonaga A., Catalano A., *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008 **61**, 474– 477
7. Bravo L, Cortés A., Carrascal E., Jaramillo R., García L., Bravo P., Badel A., Bravo A., *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Médica*. 2003;**34** (3): 124-131

8. Bulla P. Mercado M., Trespalacios AA., Ávila J., Otero W. Estado actual de la resistencia de *Helicobacter pylori* a tetraciclina: Revisión sistemática de la literatura. *Universitas Scientiarum*. 2012; **17**(2): 216-229
9. Hernández F., Rivera P. Historia natural de la infección por *Helicobacter pylori*, su tratamiento antimicrobiano y el empleo de plantas medicinales. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 2003. **24** (3-4):149-165
10. Hernández M. *Helicobacter pylori*: La bacteria que mas infecta al ser humano. Actualización: Instituto de nutrición e higiene de los alimentos. *Revista cubana de alimentación y nutrición*. 2001; **15**: 42-54
11. Dunn B.E. Phadnis S.H. Structure, Function and Localization of *Helicobacter pylori* Urease. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 1999; **71**: 63-73.
12. Justin T. Schwartz and Lee-Ann H. Allen. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 2006; **79**: 1214-1225.
13. Atherton J.C. *H. pylori* virulence factors. *British Medical Bulletin* 1998; **54** (1): 105-120
14. Arévalo A., Trespalacios AA., Otero W. Importancia de la proteína CagA en la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2009; **24**(4): 388-395
15. Gerrits MM, Godoy APO, Kuipers EJ, Ribeiro ML, Stoof J, Mendonça S, et al. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2006 **11**(3):181-187.
16. Albu RE. Amoxicillin: a pharmacologic description. *Clinical Excellence for Nurse Practitioners* 1998 **2**(5): 260-2
17. Droguett S. , Rossi S. Australian Medicines Handbook 2004. *Adelaide: Australian Medicines Handbook*. [ISBN 0-9578521-4-2](https://doi.org/10.1007/978-0-9578521-4-2). (2004).

18. Perez R. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 1998; **22**(3): 57-67
19. Paul, R., S. Postius, K. Melchers, and K. P. Schafer. Mutations of the *Helicobacter pylori* genes *rdxA* and *pbp1* cause resistance against metronidazole and amoxicillin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2001 **45**: 962–965.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010
21. Trespacios AA., Otero W., Mercado M. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Revista Colombiana de gastroenterología*. 2010; **25**(1):31-38
22. Rimbara E., Nogushi N., Kawai T., Sasatsu M. Correlation between substitutions in Penicillin binding Protein 1 and Amoxicillin Resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiology and Immunology*. 2007; **51** (10): 939-944
23. Paul R., Postius S., Melchers K., Schafer K. Mutations of the *Helicobacter pylori* Genes *rdxA* and *pbp1* Cause Resistance against Metronidazole and Amoxicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001 **45**(3):962-965
24. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. Bacterial cell shape. *Nature Reviews. Microbiology* 2005; **3**(8):601-610.
25. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *The Lancet Infectious Diseases* 2006;**6**(11):699-709.
26. Godoy AP, Reis FC, Ferraz LF, Gerrits MM, Mendonca S, Kusters JG, et al. Differentially expressed genes in response to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS Immunology Medical Microbiology* 2007; **50**(2):226-230.

27. Harris AG, Hazell SL, Netting AG. Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2000; **45(5)**: 591-591.
28. Joyce EA, Chan K, Salama NR, Falkow S. Redefining bacterial populations: a post-genomic reformation. *Nature Reviews. Genetics* 2002; **3(6)**:462-73.
29. Kim JM, Kim JS, Kim NN, Kim SG, Jung HC, Song IS. Comparison of primary and secondary antimicrobial minimum inhibitory concentrations for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. *International Journal Antimicrobial Agents* 2006; **28(1)**:6-13.
30. Lange RP, Locher HH, Wyss PC, Then RL. The Targets of Currently Used Antibacterial Agents: Lessons for Drug Discovery. *Curr Pharm Des* 2007; **13(30)**:3140-54.
31. Lock RL, Harry EJ. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2008; **7(4)**:324-38..
32. Muhammad A, Champeimont J, Mayr UB, Lubitz W, Kudela P. Bacterial ghosts as carriers of protein subunit and DNA-encoded antigens for vaccine applications. *Expert Review of Vaccines* 2012; **11(1)**:97-116.
33. Okamoto T, Yoshiyama H, Nakazawa T, Park I, Yanai H, Okita K, et al. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2002; **50(6)**:849-849.
34. Okamoto TT, Murakami KK. [Acquisition of the drug resistance and *Helicobacter pylori* gene mutation]. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* 2009; **67(12)**:2372-2377.
35. Silver LL. Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2007 Jan 2007; **6(1)**:41-55.
36. Tait-Kamradt AG, Cronan M, Dougherty TJ. Comparative Genome Analysis of High-Level Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance* 2009; **15(2)**:69-75.

37. Tseng Y, Wu D, Chang C, Kuo C, Yang Y, Jan C, et al. Amoxicillin resistance with beta -lactamase production in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Invest* 2009 Sep 2009; **39(9)**:807-812.
38. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 2005 **10**; **8(5)**:525-533.

Anexo A: Componentes Caldo Brucella (BBL)

• Digerido Pancreático de caseína	10.0 g
• Peptona	10.0 g
• Extracto de Levadura	5.0 g
• Dextrosa	1.0 g
• Cloruro Sódico	5.0 g
• L-Arginina	1.0 g
• Piruvato Sódico	1.0 g
• Agar	15.0 g
• Hemina	5.0 g
• Vitamina K1	0.5 g
• Caseína digerida por enzimas pancreáticas	10.0 g
• Tejido animal digerido por enzimas pépticas	10.0 g
• Dextrosa	1.0 g
• Extracto de Levadura	2.0 g
• Cloruro de sodio	5.0 g
• Bisulfito sodio	0.1 g

Preparación: Suspenda 28 g del polvo en un litro de agua destilada, y lleve a autoclave.

Anexo B: Componentes Agar Brucella BD

- Caseína digerida por enzimas pancreáticas 10.0 g
- Tejido animal digerido por enzimas pépticas 10.0 g
- Dextrosa 1.0 g
- Extracto de Levadura 2.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Bisulfito sodio 0.1 g
- Agar-Agar 15.0 g

Anexo C: Isovitalex (BD)

Suplemento enriquecido que se usa como aditivo para los medios de cultivo de microorganismos nutricionalmente exigentes.

- Adenina Sulfato 10.0g
- Acido p-aminobenzoico 13mg
- Cocarboxilasa 2.0mg
- L-Cisteina HCL 25.9 g
- L-Cisteina 1.1g
- Nicotinamina Adenina Dinucleótico 0,25mg
- Nitrato Férrico 0.02g
- L-Glutamina 10g
- Guanina HCL 0.03g
- Tiamina HCL 3.0mg
- Vitamina B12 0.01g
- Dextrosa 100g
- Tiamina pirofosfato 0,1g

Preparación: El liofilizado se reconstituye con 10 ml del diluyente, se agita la solución hasta homogenización completa. Se agrega 2ml por cada 500ml de medio.

Anexo D: Suplemento selectivo para *H.pylori* (DENT) (OXOID)

- Vancomicina 5.0mg
- Trimetropim 2.5mg
- Cefsulodin 2.5mg
- Anfotericina B 2.5mg

Preparación: El liofilizado se reconstituye con 2 ml de agua destilada estéril y se agregan 2ml por cada 500ml de medio.

Anexo E: Componentes Agar Mueller Hinton

Los componentes del Agar Mueller Hinton de BD son:

- | | |
|--------------------------------|-----------|
| • Extracto de Carne Bovina | 2.0 g/L |
| • Hidrolizado ácido de caseína | 17.5 g/L |
| • Almidón | 1.5 g/L |
| • Agar | 17.0 g/ L |

Preparación: Suspenda 38 g del polvo en un litro de agua destilada, autoclave a 121°C por 15 min.

ANEXO E. Caldo urea (Prueba de ureasa)

Suspender 1 gramo de Urea (Sigma) en 10 mL de agua destilada estéril. A parte, suspender 0.001 gramos de rojo de fenol en 10 mL de agua destilada estéril. Para 10 mL de solución de urea, agregar 1 mL de la solución de rojo de fenol. (Rojo de fenol 0.01%)

- PH 6.9 amarillo
- PH 8.2 rojo

ANEXO F. DNAzol®:

Es una solución utilizada para extraer material genético, cuyo proceso se fundamenta en el uso de detergente-guanidina que permite la precipitación selectiva del ADN de la célula lisada. Durante la obtención de ADN la muestra biológica es lisada en 1ml de DNAzol, se centrifuga (10.000 r.p.m. por 10 minutos) y el sobrenadante es transferido a un tubo Eppendorf estéril en donde se le añaden 500ul de etanol al 100% por 15 minutos a -70°C, con el fin de precipitar el ADN, se centrifuga (4.000 r.p.m. por 3 minutos), se descarta el sobrenadante y el precipitado es sometido a 2 lavados con etanol (75%), después se espera a que se evapore el etanol y se procede a agregar 500-1000ul de (NaOH 8mM) sobre el ADN obtenido

ANEXO 3

**BIBLIOTECA ALFONSO BORRERO CABAL, S.J.
DESCRIPCIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO
FORMULARIO**

TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS DOCTORAL O TRABAJO DE GRADO						
Evaluación de las mutaciones en el gen <i>pbp1A</i> de <i>Helicobacter pylori</i> , que confieren resistencia a amoxicilina						
SUBTÍTULO, SI LO TIENE						
AUTOR O AUTORES						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Betancourt Ruiz			Paola Leonor			
DIRECTOR (ES) TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Trespalacios Rangel			Alba Alicia			
FACULTAD						
Ciencias						
PROGRAMA ACADÉMICO						
Tipo de programa (seleccione con "x")						
Pregrado	Especialización	Maestría	Doctorado			
X						
Nombre del programa académico						
Microbiología Industrial.						
Nombres y apellidos del director del programa académico						
Janeth del Carmen Arias Palacios						
TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:						
Microbióloga Industrial						
PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o tener una mención especial):						
CIUDAD		AÑO DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO			NÚMERO DE PÁGINAS	
Bogotá		2013			61	
TIPO DE ILUSTRACIONES (seleccione con "x")						
Dibujos	Pinturas	Tablas, gráficos y diagramas	Planos	Mapas	Fotografías	Partituras
		X			X	
SOFTWARE REQUERIDO O ESPECIALIZADO PARA LA LECTURA DEL DOCUMENTO						
<p>Nota: En caso de que el software (programa especializado requerido) no se encuentre licenciado por la Universidad a través de la Biblioteca (previa consulta al estudiante), el texto de la Tesis o Trabajo de Grado quedará solamente en formato PDF.</p>						

MATERIAL ACOMPAÑANTE					
TIPO	DURACIÓN (minutos)	CANTIDAD	FORMATO		
			CD	DVD	Otro ¿Cuál?
Vídeo					
Audio					
Multimedia					
Producción electrónica					
Otro Cuál?					
DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL E INGLÉS					
Son los términos que definen los temas que identifican el contenido. (En caso de duda para designar estos descriptores, se recomienda consultar con la Sección de Desarrollo de Colecciones de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J en el correo biblioteca@javeriana.edu.co , donde se les orientará).					
ESPAÑOL			INGLÉS		
<i>Helicobacter pylori</i>			<i>Helicobacter pylori</i>		
Amoxicilina			Amoxicilina		
Gen <i>pbp1A</i>			Gen <i>pbp1A</i>		
Resistencia			Resistance		
RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS (Máximo 250 palabras - 1530 caracteres)					
<p><i>Helicobacter pylori</i> es una bacteria Gram negativa, asociada al desarrollo de enfermedades gastrodudodenales. Desde su descubrimiento, el tratamiento se ha basado en la erradicación de la infección, usando diferentes estrategias terapéuticas: actualmente la triple terapia estándar es la más utilizada, basada en la administración de amoxicilina + claritromicina o metronidazol y un inhibidor de la bomba de protones.</p> <p>Diversos autores sugieren el aumento en el número de fallas terapéuticas a la adquisición de mecanismos de resistencia a amoxicilina por <i>H. pylori</i>, resistencia atribuida a mutaciones en diferentes puntos del gen que codifica la proteína de unión a penicilina 1, por lo que se analizaron 7 cepas resistentes a amoxicilina de un banco de 416 cepas aisladas de biopsias de pacientes obtenidas entre enero de 2009 y abril de 2013 conservadas en el Laboratorio de Bacteriología Especial.</p> <p>Para la amplificación del gen <i>pbp1A</i> se buscó estandarizar la PCR, como la reproducibilidad de los ensayos reportados en la literatura es baja, y no se lograron condiciones óptimas para la obtención de dicho producto, usando diferentes enzimas de alta fidelidad, concentraciones de cebadores, de ADN y variación en la Tm y tiempos de denaturación, no se obtienen secuencias de las cepas aisladas; con el fin de conocer las mutaciones más comunes y la presencia de polimorfismos que no confieren resistencia a amoxicilina en cepas de <i>H. pylori</i> se realizó un análisis bioinformático de las secuencias reportadas en la literatura, identificando la mutaciones S414R y F126L como principales responsables</p>					

de la resistencia a amoxicilina.

Helicobacter pylori is a Gram negative bacteria, associated with the development of diseases gastroduodenales . Since its discovery , treatment has been based on the eradication of infection using different therapeutic strategies : standard triple therapy currently is the most used , based on amoxicillin + clarithromycin or metronidazole and an inhibitor of the proton pump.

Several authors suggest the increase in the number of treatment failure is asociated to the acquire mechanisms of resistance to amoxicillin , *H. pylori* resistance is attributed to mutations in different parts of the gene encoding penicillin binding protein 1 faults , so was analyzed 7 resistant amoxicillin strains of a bank of 416 strains isolated from patient biopsies obtained between January 2009 and April 2013, preserved in the Special Bacteriology Laboratory strains.

For the gene amplification *pbp1A* was sought standardize the PCR , as the reproducibility of those reported procededures in the literature test is low and not optimal for obtaining the product conditions were achieved , using different enzymes high fidelity primer concentrations of DNA variation in the T_m and denaturation times , no sequences of isolates obtained ; in order to know the most common mutations and the presence of polymorphisms do not confer resistance to amoxicillin in *H. pylori* strains a bioinformatic analysis of the sequences reported in the literature was performed , identifying the S414R and F126L mutations as primarily responsible for the resistance to amoxicillin.