

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA
DE *Helicobacter pylori* A LA AMOXICILINA MEDIANTE
LA TÉCNICA MOLECULAR REACCIÓN EN CADENA
DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR) A
PARTIR DE BIOPSIAS GÁSTRICAS.**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MICHELLE ELIZABETH YÉPEZ CROW

SANGOLQUÍ, MAYO DE 2011

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

Michelle Elizabeth Yépez Crow.

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas.

SECRETARIO ACADÉMICO

Dr. Mario Lozada Paredes.

Lugar y fecha: Sangolquí, Mayo de 2011.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. MICHELLE ELIZABETH YÉPEZ CROW como requerimiento parcial a la obtención del título de **INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.**

Fecha

Dr. Marcelo Grijalva

Ing. Pedro Sacker

DEDICATORIA

Los grandes esfuerzos siempre rinden frutos, hoy es el fin de algo muy bueno, pero es el comienzo de algo mejor.

Al culminar esta meta tan anhelada dedico este trabajo:

A MIS QUERIDOS PADRES, **Hugo Leonidas e Isabel Leonor**, por su sacrificio que con amor, esmero y paciencia lograron iluminarme y llenarme de sabiduría y así poder llegar a la culminación de mis estudios y convertirme en un profesional.

A MI HERMANO Hugo Santiago.

Con mucho cariño por su confianza y apoyo en todo momento a lo largo del desarrollo de mi formación profesional y a lo largo de toda la experiencia de mi vida. Eres el mejor gran hermano que una hermana puede tener. Gracias.

MICHELLE

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por haberme permitido culminar satisfactoriamente y con éxitos mis metas profesionales y dado la fortaleza y la sabiduría necesaria.

Mis mas sinceros agradecimientos al **Dr. Oswaldo Rodríguez Mora** y a la **Dra. Lenis Ortiz**, por la ayuda y apoyo no sólo con su conocimiento y durante la realización de este proyecto.

Un agradecimiento especial al **Dr. Marcelo Grijalva** y al **Ing. Pedro Sacker**, por ser unos grandes maestros y grandes personas que con sus conocimientos y paciencia han contribuido grandemente a mi formación profesional.

A la **Ing. Cecilia Cruz Betancourt** y la **Lic. María José Tamariz** por su espíritu investigativo, su tiempo y disponibilidad que me han brindado para la realización de este trabajo y por ofrecerme la confianza y la amistad de unas verdaderas amigas.

Agradezco también la confianza y el apoyo de mis padres **Dr. Hugo Yépez** e **Isabelita Crow** y mi gran ejemplo y orgullo mi hermano **Hugo Santiago**, que son los forjadores de mi vida, porque han contribuido positivamente para llevar a cabo esta difícil jornada.

A mis grandes amigas y compañeras en la carrera, en especial para **Carolina Tufiño** y **Fernanda Jiménez** que siempre estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos, en el famoso dicho de “no se aprende, pero se goza” mil gracias por su amistad.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en dónde estén o si alguna vez llegan a leer esta dedicatoria quiero darles las gracias por formar parte de mi, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS</i>	<i>ii</i>
<i>CERTIFICACIÓN</i>	<i>iii</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>iv</i>
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>v</i>
<i>ÍNDICE DE CONTENIDOS</i>	<i>vi</i>
<i>LISTADO DE TABLAS</i>	<i>ix</i>
<i>LISTADO DE CUADROS</i>	<i>ix</i>
<i>LISTADO DE FIGURAS</i>	<i>xi</i>
<i>LISTADO DE ANEXOS</i>	<i>xii</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>xiii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xiv</i>
<i>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1.1. <i>Formulación del problema</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Justificación del problema</i>	<i>5</i>
1.3. <i>Objetivos de la Investigación</i>	<i>8</i>
1.3.1. <i>Objetivo General</i>	<i>8</i>
1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	<i>8</i>
1.4. <i>Marco Teórico</i>	<i>8</i>
1.4.1. <i>Helicobacter pylori</i>	<i>8</i>
1.4.2. <i>Características microbiológicas</i>	<i>10</i>
1.4.3. <i>Genoma</i>	<i>11</i>
1.4.4. <i>Epidemiología</i>	<i>12</i>
1.4.5. <i>Diagnóstico</i>	<i>13</i>
1.4.6. <i>Tratamiento</i>	<i>14</i>
1.4.7. <i>Resistencia a los antimicrobianos</i>	<i>16</i>
1.4.8. <i>Resistencia a la Amoxicilina</i>	<i>18</i>
1.4.9. <i>Detección de la resistencia a los antimicrobianos</i>	<i>20</i>
1.5. <i>Hipótesis</i>	<i>22</i>
<i>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>23</i>
2.1. <i>Participantes</i>	<i>23</i>
2.1.1. <i>Instituciones</i>	<i>23</i>
2.1.2. <i>Personas cooperantes</i>	<i>23</i>

2.2.	<i>Zona de Estudio</i>	23
2.2.1.	<i>Trabajo de Campo</i>	23
2.2.2.	<i>Trabajo de Laboratorio</i>	24
2.3.	<i>Período de tiempo de investigación</i>	24
2.4.	<i>Diseño Experimental</i>	24
2.4.1.	<i>Cálculo del tamaño de la muestra</i>	24
2.4.2.	<i>Muestra para el estudio</i>	25
2.5.	<i>Procedimientos</i>	25
2.5.1.	<i>Recolección de muestras y almacenamiento</i>	25
2.5.2.	<i>Aislamiento de ADN</i>	26
2.5.2.1.	<i>Aislamiento de ADN de cepa control</i>	26
2.5.2.2.	<i>Aislamiento de ADN de Helicobacter pylori a partir de muestras de biopsias</i> 27	
2.5.3.	<i>Detección de las mutaciones (Ser414Arg) en el gen pbp1A que confiere resistencia a la amoxicilina por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)</i> 28	
2.5.3.1.	<i>Primers para la detección del gen pbp1A</i>	29
2.5.3.2.	<i>Sondas para la detección del gen pbp1A</i>	29
2.5.3.3.	<i>Programa utilizado para la detección del gen pbp1A</i>	30
2.6.	<i>Análisis de datos</i>	32
2.6.1.	<i>Detección del gen pbp1A, mutación Ser414Arg</i>	32
2.6.2.	<i>Análisis estadístico entre la presencia de la mutación Ser414Arg de H. pylori y las variables edad y sexo</i>	32
CAPÍTULO 3: RESULTADOS		34
3.1.	<i>Pacientes</i>	34
3.2.	<i>Edad</i>	34
3.3.	<i>Detección de la resistencia antimicrobiana de Helicobacter pylori a la amoxicilina de la mutación Ser414Arg por medio de qPCR</i>	35
3.4.	<i>Detección de la resistencia antimicrobiana de Helicobacter pylori a la amoxicilina de la mutación Ser414Arg por medio de qPCR según sexo</i>	35
3.5.	<i>Detección de la resistencia antimicrobiana de Helicobacter pylori a la amoxicilina de la mutación Ser414Arg por medio de qPCR según edad</i>	37
3.6.	<i>Detección de la resistencia antimicrobiana de Helicobacter pylori a la amoxicilina de la mutación Ser414Arg por medio de qPCR según el lugar de recolección de la muestra</i>	38
3.7.	<i>Análisis estadístico</i>	39

<i>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN</i>	42
<i>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES</i>	47
<i>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES</i>	48
<i>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA</i>	49
<i>ANEXOS</i>	60

LISTADO DE TABLAS

<i>Tabla 2.1. Muestras positivas de H. pylori de los hospitales Eugenio Espejo, Pedro Vicente Maldonado y Policía N°1 utilizadas en el estudio.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 2.2. Concentraciones y volúmenes de los componentes del coctel de la qPCR para la detección del gen pbp1A</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 2.3. Características de los primers pbp1A de la cepa susceptible y de la cepa mutante de H. pylori resistente a la amoxicilina.</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 2.4. Nombres, secuencias, temperatura de melting y posición de los primers de la cepa Helicobacter pylori 1061 penicillin-binding protein 1A (pbp1A) gene.</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 2.5. Programa para la amplificación del gen pbp1A de Helicobacter pylori resistencia a la amoxicilina.</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 2.6. Tabla de contingencia de variables, para la estimación inferencial por intervalo de confianza.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 3.1. Porcentaje de detección de la resistencia a amoxicilina de Helicobacter pylori según sexo.</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 3.2. Porcentaje de detección de la resistencia a amoxicilina de Helicobacter pylori según edad de los pacientes.</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 3.3. Tabla de contingencia del Chi cuadrado de frecuencias de pacientes de H. pylori que presentan la mutación Ser414Arg del gen pbp1A.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 3.4. Estimación inferencial por intervalo de confianza de la proporción a nivel de los pacientes que presentan la mutación Ser414Arg del gen pbp1A de H. pylori.</i>	<i>41</i>

LISTADO DE CUADROS

<i>Cuadro 1.1 Especies de Helicobacter y microorganismos relacionados.....</i>	<i>9</i>
<i>Cuadro 1.2. Métodos de detección de H. pylori.</i>	<i>14</i>
<i>Cuadro 2.1. Fórmula para el cálculo del tamaño de muestra dependiendo de la frecuencia esperada y del error permisible.....</i>	<i>24</i>

LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Helicobacter pylori en la fase experimental de crecimiento.</i>	<i>10</i>
<i>Figura 1.2. Representación circular del cromosoma de Helicobacter pylori 26695.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 1.3. Porcentaje de resistencia de amoxicilina a nivel mundial.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 1.4. Mecanismo general de acción de la amoxicilina en su adhesión a las proteínas de unión a penicilina PBP</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2.5. Fragmento de la cepa control de H. pylori donde se encuentran los primers, sondas y mutaciones.</i>	<i>30</i>
<i>Figura 3.1. Porcentaje de los rangos de edad de los pacientes enrolados en el estudio</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3.2. Porcentaje de pacientes con resistencia antimicrobiana de H. pylori a amoxicilina.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3.3. Número de pacientes con resistencia antimicrobiana de H. pylori a amoxicilina según el sexo</i>	<i>36</i>
<i>Figura 3.4. Porcentaje de pacientes con resistencia antimicrobiana de H. pylori a amoxicilina según la edad</i>	<i>38</i>
<i>Figura 3.5. Porcentaje de pacientes con resistencia antimicrobiana de H. pylori a amoxicilina según el lugar de recolección de la muestra</i>	<i>39</i>

LISTADO DE ANEXOS

<i>Anexo A. Cepa Silvestre Helicobacter pylori 1061 penicillin-binding protein 1A (pbp1A) gene, complete cds.....</i>	<i>60</i>
<i>Anexo B. Cepa mutante Helicobacter pylori Hardenberg penicillin-binding protein 1A (pbp1A) gene, complete cds.....</i>	<i>62</i>
<i>Anexo C. Alineación de primers mediante el programa de base de datos BLAST de la secuencia de genes: Helicobacter pylori 1061 penicillin-binding protein 1A (pbp1A) gene y la cepa mutante: Helicobacter pylori Hardenberg penicillin-binding protein 1A (pbp1A) gene.....</i>	<i>64</i>
<i>Anexo D. Alineamiento secuencias FASTA de las cepas control silvestre y mutante mediante el programa Clustalw para identificación de la mutación</i>	<i>65</i>
<i>Anexo E. Nucleótidos y aminoácidos de las cepas control silvestre y mutante.....</i>	<i>66</i>
<i>Anexo F. Ecuaciones del análisis estadístico Chi cuadrado, e inferencia por intervalo de confianza.....</i>	<i>67</i>
<i>Anexo G. Construcción de sonda de anclaje y sonda sensor para la mutación Ser414Arg que presenta resistencia de Helicobacter pylori a la amoxicilina.....</i>	<i>68</i>
<i>Anexo H. Productos de la amplificación del fragmento de 135 pb del gen pbp1A por la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....</i>	<i>69</i>
<i>Anexo I. Productos de la amplificación del fragmento de 135 pb del gen pbp1A por la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....</i>	<i>70</i>
<i>Anexo J. Curvas de melting de la cepa susceptible de Helicobacter pylori mediante la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....</i>	<i>71</i>
<i>Anexo K. Curvas de melting donde se localiza la mutación Ser414Arg del gen pbp1A de Helicobacter pylori, mediante la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....</i>	<i>72</i>
<i>Anexo L. Productos de la curva de melting donde se localiza la mutación extra del gen pbp1A de Helicobacter pylori, la cepa susceptible y el control negativo, mediante la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).....</i>	<i>73</i>
<i>Anexo M. Base de datos de los pacientes de los hospitales: Eugenio Espejo, Pedro Vicente Maldonado y hospital de la Policía Nacional N° 1</i>	<i>74</i>

RESUMEN

El mecanismo de resistencia que *Helicobacter pylori* ha creado contra la amoxicilina consiste en mutaciones en las PBPs (penicillin binding proteins). Particularmente, mutaciones en la PBP1A, que presenta mayor afinidad por la amoxicilina que las proteínas restantes de la familia. Esta resistencia está ligada aparentemente a que una sola mutación en el gen que codifica la *pbp1A* (Ser 414 Arg) puede aumentar la CMI de la amoxicilina, por lo que conduce a una disminución de la afinidad por los β -lactámicos.

En el presente trabajo se realizó el diagnóstico molecular de la resistencia de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina a través de la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A*, por medio de la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).

Se encontró una tasa de resistencia de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina del 6,43%, (9/140). No existieron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la correlación entre las variables edad y sexo con la mutación $p = 0,5698$. Los tres hospitales analizados presentaron diferencias de resistencia debido al año de recolección.

Estos hallazgos demuestran que se deben realizar estudios sobre *Helicobacter pylori* resistente a antimicrobianos a nivel nacional ya que si Ecuador presenta tasas altas de resistencia a los medicamentos, este podría estar fallando en su erradicación con la triple terapia de primera línea de claritromicina, amoxicilina y metronidazol de un 80% ,95% y 25% respectivamente en su eficiencia de tratamiento.

ABSTRACT

The mechanism of amoxicillin resistance of *Helicobacter pylori* is based on mutations in PBPs (penicillin binding proteins). In particular, mutations in the PBP1A, which have a higher affinity for the protein amoxicillin remaining family. This resistance mechanism is apparently tied to a point mutation in the gene encoding the pbp1A (Ser 414 Arg), which may increase the MIC of amoxicillin and therefore lead to a decrease in the affinity for the B-lactam.

In the present study we conducted molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* resistance to amoxicillin through the analysis of the gene mutation Ser414Arg pbp1A, through real-time Polymerase Chain Reaction Testing (qPCR).

We found a rate of *Helicobacter pylori* resistant to amoxicillin of 6.43% (9 / 140). No differences were found regarding patient age and gender and the presence of the above mentioned mutation $p = 0.5698$. The three hospitals analyzed showed differences in resistance rates due to year of collection.

These findings demonstrate that studies should be performed on *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance at a national level. If Ecuador showed high rates of drug resistance, this could reflect on therapeutic failure with first-line triple therapy of clarithromycin, amoxicillin and Metronidazole.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Helicobacter pylori (*H. pylori*) fue aislado por primera vez en pacientes que sufren gastritis crónica en 1982. Este experimento fue premiado en el 2005 con el premio nobel de Fisiología y Medicina (*Gerrits et al., 2006*). Además, causa una amplia gama de enfermedades, el 90% de todas las úlceras duodenales, el 75% de todas las úlceras gástricas, y dos formas de cáncer de estómago, el adenocarcinoma y el linfoma MALT. Aunque las tasas de infección muestran una amplia distribución geográfica, esta bacteria coloniza crónicamente a más del 50% de la población mundial (*Rivas & Hernández, 2000; Antelo et al., 2001*).

La alta incidencia de infección por *H. pylori* contribuye probablemente al hecho de que la mortalidad por cáncer gástrico ocupe el segundo lugar entre las muertes por cáncer en todo el mundo. Debido a la relación de causalidad entre *H. pylori* y tumores gástricos, en 1994 la International Agency for Research on Cancer (IARC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconocieron a *H. pylori* como un carcinogénico categoría I en humanos. En la actualidad, *H. pylori* es la única bacteria que ha logrado esta distinción peligrosa (*Kathleen et al., 2008*).

El Ecuador se encuentra en una zona de alto riesgo para cáncer de estómago, con una prevalencia anual de 29 casos por 100.000 habitantes y la incidencia de cáncer gástrico representa el 12,7% de todos los cánceres, situando a nuestro país en el décimo primer puesto en mujeres y en el décimo quinto puesto en hombres entre 58 países en el mundo (*Corral et al., 2004*).

La resistencia a los antimicrobianos es una de las principales causas de fracaso del tratamiento en *H. pylori* y es en gran parte responsable de la disminución de las tasas de erradicación (*Cisneros, 2009; Ávila et al., 2009*).

La terapia triple, incluyendo a dos antibióticos, amoxicilina, claritromicina, y un inhibidor de la bomba de protones durante una semana, se ha recomendado como el tratamiento de elección en varias conferencias de consenso. Sin embargo, este tratamiento puede fallar por diversas razones. De hecho, la razón principal del fracaso se encontró que es la resistencia a *H. pylori* a uno de los antibióticos utilizados. Otros tratamientos también han sido propuestos, incluyendo metronidazol, un medicamento para el que la resistencia es también un problema, aunque en menor medida, así como la tetraciclina, fluoroquinolonas y rifamicinas para el que la resistencia se ha convertido en una cuestión emergente (*De Boer et al., 2000; Chi et al., 2003; Mégraud et al., 2009*).

Durante los años 1999-2003 se publicaron numerosos estudios sobre la prevalencia de la resistencia antibiótica primaria de *H. pylori*, observándose variaciones significativas entre distintos países e incluso entre distintas regiones o grupos étnicos de un mismo país (*Fernández et al., 2009*).

En Europa países como Holanda, Alemania y en Suecia existe una prevalencia baja de resistencia a la claritromicina de 1,7-2,9 % y más elevada en España, Francia y Portugal de 12-22 %. Es destacable que al norte de Italia es del 1,8% y en el centro de Italia del 23,4%. En Estados Unidos la prevalencia es del 10-12%, en México del 25%, en Brasil del 9,8% en Japón del 11-13% y en Korea del 5-6% (*Kato et al., 2002; Fernández et al., 2009*).

La prevalencia de la resistencia al metranidazol es de 15-40% en Europa, en Estados Unidos de 20-30%, México del 76%, Brasil del 53%, Japón del 9-12% y Korea de un 40%, mientras que para la amoxicilina y tetraciclina es inferior al 1% (*Fariña et al., 2007; Matteo et al., 2008*).

Sin embargo, recientemente se descubrió que la resistencia a amoxicilina está incrementada en diversas regiones geográficas. La amoxicilina es un antibiótico ampliamente usado, por lo que el desarrollo de resistencia en *H. pylori* puede tener un efecto dramático en el éxito de los tratamientos de erradicación (*Vallejos et al., 2003; Co et al., 2006*).

La resistencia a las penicilinas (amoxicilina) y tetraciclinas (tetraciclina) se presenta en menor proporción del (0,8% a 1,4%), pero en países donde los antibióticos se obtienen sin prescripción médica (por ejemplo Brasil o El Salvador), la resistencia es mucho mayor, presentándose en tasas de hasta el 72% y el 59% de amoxicilina y tetraciclina respectivamente (*Wu et al., 2000*). En el 2008 las tasas de resistencia a la amoxicilina fueron reportadas en Taiwán y Brasil, donde han alcanzado el 20% al 30% respectivamente, en unos casos disminuyendo la erradicación y en otros aumentando su prevalencia (*Matteo et al., 2008*).

En Europa, los datos disponibles a partir de dos estudios que incluían a 599 pacientes se encontraron tasas de prevalencia inferiores al 1%. Por el contrario, datos contradictorios se registraron en dos estudios realizados en África. De hecho, la resistencia a la amoxicilina estuvo ausente en un estudio realizado en Senegal, enroló a 40 pacientes, mientras que una prevalencia sorprendentemente alta se registró en Camerún 85,6%. Del mismo modo, la prevalencia de la resistencia a la amoxicilina varía ampliamente en los países asiáticos, que van desde 8,8% en Korea, y el 36,1% en Taiwán, aunque otro estudio realizado en Taiwán encontró una prevalencia baja del 0,9% (*Falsafi et al., 2004; Ndip et. al., 2008; Tanih et al., 2010*).

Un solo estudio realizado en Alaska en 352 pacientes encontró una prevalencia de 2,2% de resistencia a amoxicilina. La resistencia a la amoxicilina se detectó de manera similar en pacientes masculinos y femeninos (*De Francesco et al., 2010*).

En la India en un estudio realizado en el 2003 de 68 pacientes con úlcera péptica y dispepsia no ulcerosa, se obtuvo que el 65% de fueron resistentes a la amoxicilina (*Singh et al., 2009*).

La amoxicilina tiene acción bactericida y actúa frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, inhibiendo la biosíntesis y recuperación de la pared bacteriana. Es una penicilina semisintética susceptible a la acción de las beta-lactamasas. La base principal de su elevada especificidad y potencia bacteriana es una

estructura cíclica, el anillo β -lactámico, el cual debe permanecer intacto para que la penicilina ejerza su acción. La inadecuada formación de la pared bacteriana, en las especies susceptibles, produce un desequilibrio osmótico que afecta especialmente a las bacterias en fase de crecimiento. Para que este antibiótico cumpla su función es necesaria la presencia de las proteínas de unión a penicilina (PBPs, del inglés penicillin binding proteins). Estas se encuentran localizadas en la superficie de la membrana bacteriana y es mediante ellas que se internaliza el antibiótico. Una vez que la amoxicilina entra, bloquea la síntesis de la pared por interferencia del anillo β -lactámico que propicia la lisis celular por desequilibrio osmótico (*Gisbert et al., 2000; Hernández et al., 2008; Belzer et al., 2009*).

Al igual que en otros organismos, PBP son los objetivos para los antibióticos β -lactámicos. PBP son un conjunto de enzimas que intervienen en la síntesis de la pared de peptidoglicano en la pared celular bacteriana, participando en la transpeptidasa, transglicosilasa, endopeptidasa y actividades carboxipeptidasa. Recientemente, este antibiótico se ha demostrado que se une a una de las principales proteínas PBP de 72 kDa (*Cantón et al., 2001*).

El primer *H. pylori* resistente a la amoxicilina (CIM: 8 mg/l) se describió en 1996 en Holanda. Esta resistencia estaba ligada a una mutación en el gen que codifica la PBP-1A (Ser 414 Arg), la cual conduce a una disminución de la afinidad por los β lactámicos (*Okamoto et al., 2002*).

Estudios posteriores mostraron que también podían estar comprometidas otras mutaciones como las sustituciones de serina por glicina (S402G), glutamato por alanina (E406A), serina por treonina (S417T), treonina por serina (T555S), asparagina por tirosina (N561Y), serina por arginina (S542R), treonina por isoleucina ((T540I) e isoleucina por valina (I562V) que en su conjunto favorecen la aparición de resistencia (*Gerrits et al., 2004*).

En el pasado nunca se habían aislado cepas de *H. pylori* productoras de β lactamasa, Una reciente publicación de Taiwán encontró una cepa de este tipo (CIM:

256 mg/l) con una β lactamasa del gen *bla* (*TEM 1*) (Tseng et al., 2009). La posible diseminación de esta cepa es alarmante en vista del limitado armamento que tenemos para erradicar el *H. pylori* (Mégraud et al., 2007).

1.2. Justificación del problema

La colonización por *Helicobacter pylori* es de alrededor de 30 a 50% de las personas en los países desarrollados mientras que en los países en vías de desarrollo puede exceder a 80%. Esta condición se atribuye a las pobres condiciones sanitarias existentes en estas sociedades, que determinan frecuentes exposiciones al patógeno (Vallejos, 2003).

En el Ecuador la prevalencia de la infección por *H. pylori* es mayor al 80%, a la edad de 20 años más del 50% de la población se encuentra infectada. De los individuos con una infección latente el 20% desarrollará una úlcera péptica y el 50% una gastritis crónica atrófica. *H. pylori* es considerado carcinógeno de tipo 1, puesto que incrementa en 6 veces el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (SOLCA, 2003).

En las últimas dos décadas, el tratamiento recomendado para su erradicación como esquema de primera línea es la triple terapia estándar constituida por un inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina y claritromicina o metronidazol (Argent et al., 2004). Sin embargo, la eficacia de este esquema tradicional, que inicialmente era del 90% (Graham & Shiotani, 2008), de manera progresiva ha disminuido en muchas partes del mundo y llega en la actualidad a cifras de 57-73% cuando la duración es de siete días y de 67-79% cuando la duración es de diez días (Vakil & Megraud, 2007), lo que significa que la eficacia aumenta aproximadamente 6% cuando el tratamiento dura más tiempo, pero aun así, es menor del 80% y no alcanza resultados óptimos. La declinación en la eficacia consistentemente encontrada en la actualidad, se considera que se debe fundamentalmente al progresivo aumento de la resistencia primaria de *H. pylori* a la claritromicina y al metronidazol (Megraud, 2004).

La importancia de este estudio radica en la resistencia a los antimicrobianos que ha venido desarrollando *Helicobacter pylori*, esto ha llevado a la disminución de la efectividad de los tratamientos y por tanto, a la búsqueda de nuevas alternativas. Esta resistencia es debida en gran parte al uso indiscriminado de antibióticos por parte de la población, situación que es bastante frecuente en el Ecuador (Corral et al., 2004).

En América latina han establecido la presencia de tasas de resistencia de hasta el 21% a la claritromicina en países como Chile y Colombia y del 10% a la amoxicilina en Colombia. El cultivo de *H. pylori* es complicado y la tasa de recuperación es baja (20 al 70%), por lo que más del 16.9% de pacientes pueden ser mal diagnosticados por un cultivo negativo (SOLCA, 2003).

En nuestro país existe poca información sobre las tasas de resistencia a antibióticos, particularmente para *H. pylori*. En el 2003, en un estudio realizado en el Hospital SOLCA de Guayaquil con una muestra de 38 pacientes se determinó una resistencia de 9.5% para claritromicina y no se encontró resistencia a la amoxicilina, esto debido a la poca cantidad de pacientes presentes en el estudio (Debets et al., 2003).

Para evaluar la sensibilidad a los antibióticos se utilizan diversas técnicas como la prueba de dilución en agar considerada el *gold standard* por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) para la identificación de cepas sensibles y resistentes a los antimicrobianos, y también está la Prueba de Difusión en agar, destacando la Prueba E-test, recomendada por British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) por su buena correlación con el método de referencia, pero aunque ha demostrado ser fiable, en el caso del Metronidazol tiende a sobreestimar la presencia de resistencia por lo que la respuesta debe ser confirmada por el método Dilución en Agar. La susceptibilidad (inhibición del crecimiento alrededor de la zona de disco) de los diferentes antibióticos varía, para la claritromicina la resistencia es < 19 mm, para el metronidazol es < 23 mm, para la amoxicilina es < 30 mm (Gómez et al., 2005; Mégraud et al., 2009).

Los métodos diagnósticos tradicionales son poco sensibles y específicos como E-test o difusión en disco, además que requieren de un largo periodo de tiempo para la obtención de resultados. Además, no funcionan en caso de que se presenten importantes problemas como la aparición de cepas en el cultivo de diversos microorganismos. Las técnicas basadas en el diagnóstico molecular son una gran alternativa para brindar un diagnóstico y tratamiento adecuado y precoz durante el curso de ciertas enfermedades, es una técnica eficiente con buena reproducibilidad para la determinación de la resistencia y así tener un balance positivo entre costo y beneficio de cada una de esta técnica basada en métodos moleculares (*Costa, 2004; Gerrits et al., 2006*).

Por lo anterior, es importante evaluar la prevalencia de resistencia primaria de *H. pylori* a estos tres antimicrobianos clave, que son la estructura de la terapia triple estándar ya que todavía se recomienda como la terapia de elección de primera línea (*Chey & Wong, 2007*), pero con la precaución de utilizar antibióticos diferentes cuando la resistencia local a los mismos esté por encima de ciertos valores que comprometerían su eficacia como son, 15-20% para claritromicina y 40% para metronidazol. Si las cepas de *H. pylori* se vuelven resistentes a amoxicilina y su propagación se hace cada vez mayor, causaría graves problemas, provocando un aumento de los fracasos de erradicación de un 0% a 29% (*Okamoto et al., 2002*).

En Ecuador no se ha implementado la prueba molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR para la determinación de la susceptibilidad o resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos como la amoxicilina utilizada en las terapias de erradicación de la infección, por tal motivo este trabajo pretende utilizar y estandarizar la prueba qPCR para detección de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina, permitiendo en un futuro implementar esta técnica para los laboratorios del país permitiendo, dar un mejor diagnóstico y estableciendo un buen tratamiento, para evitar los costos de tratamientos fallidos, evitando la posibilidad de que se induzca resistencia antibiótica, y adicionalmente, reduciendo los costos de manejo clínico de pacientes.

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

- Detectar la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina por medio de la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) a partir de biopsias gástricas.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Detectar la mutación Ser414Arg en el gen *pbp1A* asociado a la resistencia a la amoxicilina mediante la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).
- Establecer el porcentaje de resistencia a la amoxicilina en pacientes positivos para *Helicobacter pylori* de tres hospitales de la provincia de Pichincha- Ecuador.
- Determinar si existe una relación entre la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A* resistente a la amoxicilina con la edad y el sexo de cada paciente.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) llamó la atención en el mundo científico en 1983 cuando dos investigadores, Warren y Marshall, reportaron la presencia de organismos espirales en biopsias de la mucosa de pacientes con gastritis crónica activa. En ese entonces fue conocido como *Campylobacter* (“bacilo en forma de curva”) *pylori*, pero después cuando se caracterizó la bioquímica y la genética del organismo, mostrando que no pertenecía al género *Campylobacter*, se cambió el nombre a *Helicobacter pylori*. La comunidad científica rápidamente aceptó la observación y

varios estudios subsecuentes confirmaron la hipótesis original. Sin embargo, la comunidad de gastroenterología tardó en aceptar la hipótesis de que una bacteria fuera capaz de acusar la enfermedad péptica (Dore *et al.*, 1998). Además de *H. pylori* se encuentran al menos 11 especies aisladas de la mucosa gástrica e intestinal de otros mamíferos (Cuadro 1.1) (Versalovic *et al.*, 1999).

Cuadro 1.1 Especies de *Helicobacter* y microorganismos relacionados.

MICROORGANISMO	LOCALIZACIÓN	HUESPED
<i>Helicobacter pylori</i>	Estómago	Hombre, gato y monos
<i>H. felis</i>	Estómago	Perro y gato
<i>Gastrospirillum suis</i>	Estómago	Cerdo
<i>H. heilmanii</i> (<i>G. hominis</i>)	Estómago	Hombre, gato y perro?
<i>H. mustelae</i>	Estómago	Huerón
<i>H. acinonyx</i>	Estómago	Leopardo
<i>H. nemestrinae</i>	Estómago	Monos
<i>H. cinaedi</i>	Intestino	Hombre y roedores
<i>H. fennelliae</i>	Intestino	Hombre
<i>H. canis</i>	Intestino	Perro
<i>H. muridarum</i>	Intestino	Roedores
<i>H. rappini</i>	Estómago	Hombre
	Hígado	Oveja
<i>H. hepaticus</i>	Hígado	Perros
		Roedores

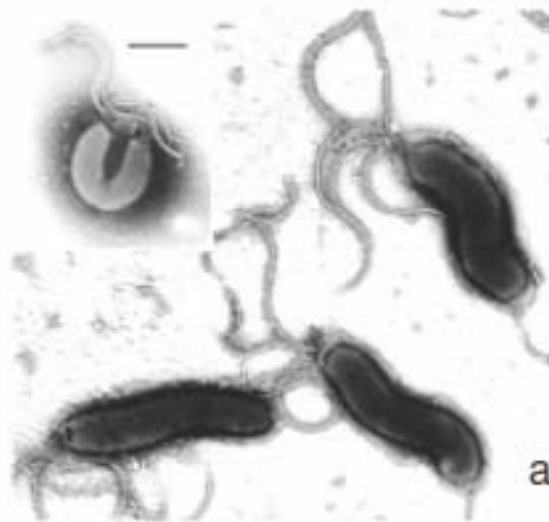
Fuente: Versalovic *et al.*, 1999.

El aislamiento revolucionó la gastroenterología y obligó a replantear muchos conceptos no sólo de la patología gastroduodenal, sino también de la fisiología gástrica. Los primeros trabajos, resultaron auténticos esfuerzos por parte de los microbiólogos en su intento de convencer a los clínicos, un tanto escépticos, del protagonismo de *H. pylori* en la patología de la gastritis y la úlcera péptica. No fue hasta 1992, con la evidencia de que la triple terapia antibiótica curaba la úlcera péptica, que se aceptó el carácter infeccioso de ésta (Sanabria, 2009).

Aunque *Helicobacter pylori* fue identificado y tipificado hace 28 años es posible considerar que este bacilo ha convivido con los seres humanos desde hace cientos de años, como lo han sugerido los hallazgos sugeridos de investigaciones realizadas por Castillo Rojas *et al.* 2008 quienes aislaron un fragmento (109 pares de bases) de ADN del bacilo, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa, en momias mexicanas que datan del año 1.350 DC (Serrano *et al.*, 2009).

1.4.2. Características microbiológicas

Helicobacter pylori es un bacilo Gram-negativo, microaerofílico, con forma espiral que mide 2,5 – 4,0 μm de largo por 0,5 – 1,0 μm de ancho, tiene una pared celular lisa, cubierta por un glucocálix de 40 nm. También, el bacilo posee de dos a seis flagelos unipolares, cada uno de 12 a 15 nm de largo y 30 nm de ancho, que culminan en un bulbo. Cada flagelo contiene un filamento central, al que se le denomina flagelina y que se relaciona con el citoplasma, (Figura 1.1). La envoltura tiene una doble capa de lípidos que se extiende como una continuación de la bacteria hasta el extremo de la membrana celular (Holt et al., 1994; Rivas & Hernández, 2000).



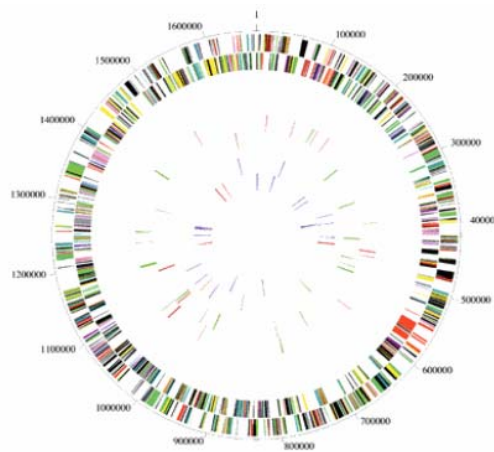
Fuente: Worku et al., 1999.

Figura 1.1. *Helicobacter pylori* en la fase experimental de crecimiento.

Su crecimiento es lento y toma de 5 a 7 días para poder observar y diferenciar las colonias, crece en una atmósfera microaerofílica (aproximadamente (80% N_2 , 15% CO_2 y 5% O_2) y a temperatura de 30 a 37°C, aunque la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C (Alarcón et al., 2004).

1.4.3. Genoma

En 1997, se descubrió la secuencia completa del genoma de *Helicobacter pylori*. La secuencia se obtuvo por métodos de secuenciación randomizada, que previamente se habían utilizado en la obtención del genoma de *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium* y *Methanococcus jannaschii* (Tomb et al., 1997).



Fuente: <http://www.tigr.org/tdb/mdb/hpdb/hpdb.html>

Figura 1.2. Representación circular del cromosoma de *Helicobacter pylori* 26695.

El tamaño promedio del genoma de *H. pylori* es relativamente pequeño, de 1,6Mb, y la composición promedio de G + C es de 39%. Aproximadamente el 40% de los aislamientos de *H. pylori* tienen plásmidos de diferentes tamaños que varían de 1,5 a 23,3 kb, en los cuales no se han identificado factores de virulencia (Kleanthous et al., 1991).

Entre 35% y 50% de las cepas del *H. pylori* contienen plásmidos. Los genes principales que se le han aislado son el estimulador de la ureasa, dos genes en las flagelinas (A y B), los genes *cagA* y *vacA* y uno relacionado con el control de las proteínas de choque térmico (Hsp). *Helicobacter pylori* sintetiza grandes cantidades de una enzima hexamérica para la úrea, llamada ureasa, integrada en seis monómeros y activa en pH bajo. También, este agente produce cantidades aumentadas de catalasa y

superóxido dismutasa, fosfolipasa A2 y C, gama-glutamyltranspeptidasa, DNasa, glucofosfatasa degradadora de moco y leucin-aminopeptidasa (*Serrano et al., 2009*).

1.4.4. Epidemiología

Se estima que el 50% de la población mundial está infectada por *Helicobacter pylori*. La colonización por *H. pylori* aumenta con la edad y la infección aparece en personas de condición socioeconómica baja y en países en vías de desarrollo como el nuestro, con deficientes condiciones sanitarias (*Cervantes et al., 2006*) en donde la tasa de infección es del 80% aproximadamente. La infección por *H. pylori* ocurre principalmente en la infancia, una vez adquirido el microorganismo, la infección persiste durante toda la vida si esta no es tratada (*Gerrits et al., 2006*).

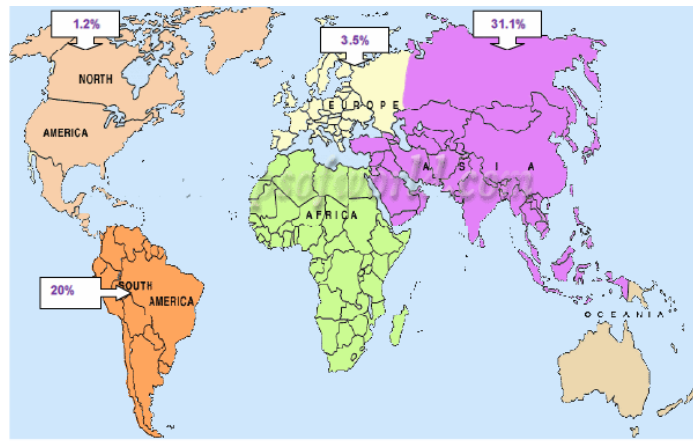
Estudios epidemiológicos muestran que la colonización por *H. pylori* es de alrededor de 30 a 50% de las personas en los países desarrollados mientras que en los países en vías de desarrollo puede extenderse hasta el 80%. Esta condición se atribuye a las pobres condiciones sanitarias existentes en estas sociedades, que determinan frecuentes exposiciones al patógeno. En los países industrializados, en cambio, la prevalencia de la infección es significativamente menor, observándose este cuadro en la mitad de la población de adultos mayores y en alrededor de un décimo de la población joven. La infección se produce inicialmente durante la infancia a partir de otro miembro de la familia (*Vallejos et al., 2003*).

La prevalencia de la infección causada por el *H. pylori* en países de Latinoamérica es alta, oscila entre 30-90% con un promedio de 60% dependiendo de las condiciones socioeconómicas. (*Ramírez et al., 2003*).

La infección por *H. pylori* en adultos suele ser crónica y no se cura sin un tratamiento específico, mientras que en la infancia su eliminación espontánea suele ser común. La tasa de adquisición de *H. pylori* en los países industrializados ha disminuido significativamente durante las últimas décadas, por lo que el continuo aumento de la

prevalencia de *H. pylori* con la edad se debe principalmente a un efecto de cohorte, lo que refleja la transmisión más intensa en el momento de la infancia (Premoli., 2004).

La resistencia bacteriana en *Helicobacter pylori* es variable en relación con los diferentes antibióticos. En este sentido se ha encontrado en Estados Unidos y Europa Occidental resistencia al metronidazol del 30% al 50%, a la claritromicina hasta en el 15% y a la amoxicilina hasta en el 6% de las cepas. En México se ha comunicado resistencia al metronidazol en el 80% de las cepas, en el 24% a la claritromicina y en el 18% a la amoxicilina. Por su parte, en Colombia se ha descrito una resistencia del 80% al metronidazol, lo cual elimina a este medicamento de cualquier régimen de erradicación en nuestro país (Torres et al., 2001).



Fuente: Cisneros, 2008.

Figura 1.3. Porcentaje de resistencia de amoxicilina a nivel mundial.

1.4.5. Diagnóstico

Los primeros informes sobre el hallazgo de *H. pylori* se realizaron analizando biopsias gástricas, lo que llevó a definir una serie de métodos diagnósticos basados en el análisis de tejidos, cuyo prerrequisito era la endoscopia gástrica y por ende la biopsia, de ahí que estos métodos fueron denominados invasivos; en contra posición con aquellos otros desarrollados más tarde, que no requieren biopsia y que se denominan “no invasivos” (Rivas & Hernández, 2000).

Cuadro 1.2. Métodos de detección de *H. pylori*.

TÉCNICAS INVASIVAS	TÉCNICAS NO INVASIVAS
Cultivo	Serología
Pruebas Bioquímicas	Prueba del Aliento
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	Detección de Antígenos en Heces
Prueba Rápida de la Urea	
Pruebas Histológicas	

Fuente: Versalovic, J. 2003.

La elección del método adecuado depende de varios factores como la edad del paciente, la patología, los síntomas, la disponibilidad local de la prueba, los costos y la información clínica que quiera obtener, entre otros. Es así como pacientes con sangrado gastrointestinal, pérdida inexplicable de peso o anemia, así como pacientes de 50 años con dispepsia, deben ser examinados a través de endoscopia; si la biopsia se obtiene fácilmente, la prueba de elección es la prueba de la urea (Ong *et al.*, 2004). En pacientes que presenten sangrado activo o reciente o que estén tomando antibióticos, la histología es el procedimiento más recomendable (MacOne *et al.*, 1999).

El único método utilizado en la actualidad y que evalúa la resistencia antimicrobiana son los cultivos de *H. pylori* utilizados para susceptibilidad antimicrobiana a los agentes antimicrobianos usados en la terapia de erradicación, aunque esta prueba no se realiza rutinariamente en el diagnóstico inicial de la infección por *H. pylori* (Gerrits *et al.*, 2004).

1.4.6. Tratamiento

En una infección crónica con *H. pylori*, la bacteria no puede ser eliminada por el sistema inmune del hospedero, por lo que, para erradicar la infección, se requiere del uso de antibióticos; desafortunadamente no existe un tratamiento ideal y la elección del mismo debe hacerse con base en los patrones de susceptibilidad locales. El tratamiento

para la infección por *H. pylori* debe aplicarse después del diagnóstico clínico (Boer et al., 2000).

El éxito en la erradicación de la infección depende de varios factores, entre los más importantes se consideran: la susceptibilidad de las cepas a los antibióticos utilizados y que el tratamiento sea completado adecuadamente por los pacientes (Megraud et al., 2004).

Los antimicrobianos pueden actuar tópicamente contra *H. pylori* (cuando pasan a través del lumen gástrico en su paso hacia el intestino como el bismuto) o sistemáticamente (cuando son transferidos al lumen gástrico por el sistema circulatorio después de la absorción intestinal como el metronidazol (Goddard, 1998).

En la actualidad, instituciones como los *National Institute of Health* de los Estados Unidos, el *Maastricht Consensus* en Europa y el Consenso Canadiense, recomiendan terapia antibiótica en algunas de las patologías gastro-duodenales asociadas a la infección por *H. pylori*. Los regímenes de erradicación más utilizados hoy en día consideran una combinación de tres drogas, las que incluyen un inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos. Con este esquema terapéutico se consigue una erradicación de 70 al 90%. Entre los antibióticos más usados se encuentran amoxicilina (Amx), tetraciclina (Tc), metronidazol (Mtz) y claritromicina (Cla) (Rodríguez et al., 2003; Regañón et al., 2006; Mégraud et al., 2009).

Debido al aumento de cadenas de *H. pylori* a estos esquemas de tratamiento, ya sea por que adquieren el gen de la β -lactamasa, por su ADN cromosomal o a través de plásmidos, la terapia triple ya no es adecuada para la erradicación de la bacteria. Las terapias cuádruples que administran metronidazol, claritromicina y amoxicilina conjuntamente podrían mejorar las tasas de erradicación, pero aún faltan estudios que sean concluyentes (Sanabria, 2009).

1.4.7. Resistencia a los antimicrobianos

La mayoría de las bacterias tienen la capacidad de adaptarse con rapidez a diversas condiciones para poder sobrevivir. Los microorganismos adquieren resistencia a los antimicrobianos por diferentes mecanismos como la aparición de mutaciones en genes cromosomales o por la adquisición horizontal de genes de resistencia. Las mutaciones espontáneas asociadas con la resistencia a casi todos los antimicrobianos pueden generarse *in vitro* y varía según la especie bacteriana y el agente utilizado. Sin embargo muchos investigadores consideran que las mutaciones (cualquier cambio en la secuencia de ADN) son el único mecanismo que puede producir nuevas actividades y funciones genéticas en el mundo biológico, capaz de proporcionar un mecanismo para la evolución que explique el origen de la resistencia a los antibióticos (*Woodford et al., 2007; Graham et al., 2008*).

La resistencia intrínseca a los antimicrobianos afecta a todos los miembros de una determina especie o género de bacterias debido a la imposibilidad del antibiótico de alcanzar su sitio de acción, a la falta de afinidad por el sitio de acción, por la presencia de bombas de eflujo o de otros mecanismos de resistencia cromosómica. La conjugación, transformación o transducción son los principales medios para la adquisición de resistencia en los genes y pueden incorporarse a plásmidos, transposones o integrones, o estar presente en cassettes genéticos liberados de otras células bacterianas muertas (*Woodford et al., 2007*).

La resistencia a los antimicrobianos es una de las principales causas de fracaso del tratamiento en *H. pylori* y es en gran parte responsable de la disminución de las tasas de erradicación. Para algunos antibióticos la resistencia es intrínseca, es decir, que todos los organismos de *H. pylori* son resistentes y en consecuencia estos antibióticos no puede usarse para el tratamiento. Estos antibióticos son gluco péptidos, polimixinas, ácido nalidíxico, sulfonamidas, trimetoprima y agentes antimicóticos (*Urrestarazu et al., 2003; Mégraud et al., 2009*).

No hay dudas que el mal uso de estas drogas ha contribuido al incremento en la velocidad de resistencia. La claritromicina y el metranidazol son los antibióticos más frecuentemente usados en la terapia de erradicación de *H. pylori*. Esta bacteria ha desarrollado resistencia a estos antibióticos, lo que ha provocado una disminución en la velocidad de su erradicación (Vallejos *et al.*, 2003).

La resistencia *in vitro* a Amoxicilina (Amx) es muy escasa en los aislamientos clínicos de *H. pylori*. Sin embargo, recientemente se describió que la resistencia a Amx está incrementada en diversas regiones geográficas. La Amx es un antibiótico ampliamente usado, por lo que el desarrollo de resistencia en *H. pylori* puede tener un efecto dramático en el éxito de los tratamientos de erradicación (Wang *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2000).

Las bacterias Gram-negativas frecuentemente se hacen resistentes a los β -lactámicos porque adquieren el gen de la β -lactamasa, ya sea en su ADN cromosomal o a través de plásmidos. Sin embargo, a la fecha no se ha reportado ninguna cepa de *H. pylori* que produzca β -lactamasa (Hernández *et al.*, 2008).

β -lactámicos son una de las mejores armas que los médicos han utilizado contra *H. pylori*. Los antibióticos β -lactámicos se subdividen en 5 grupos. Estas son las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactámicos y clavamas (Gerrits *et al.*, 2002). Todos los antibióticos β -lactámicos inhiben la síntesis de la capa de peptidoglucano de la pared celular bacteriana. Lo hacen centrándose en las proteínas fijadoras (PBP) en la membrana citoplasmática. Estas PBPs son enzimas que llevan a cabo carboxipeptidación y transpeptidación, que son los pasos finales de la biosíntesis del peptidoglicano (Jones *et al.*, 2008), además producen cambios en la permeabilidad a la droga y alteraciones en las bombas de eflujo multi drogas como también en las porinas. En *H. pylori* se han descrito tres PBPs (PBP1, PBP2 y PBP3) que corresponden a los marcos de lectura abierto (ORF) HP0597 (homóloga a la PBP1a de *Escherichia coli*), HP1556 (homóloga a la proteína FtsI) y HP1565 (homóloga a PBP2 de *H. pylori*) respectivamente, de acuerdo a la notación de la secuencia del genoma de *H. pylori* 26695 (Gerrits *et al.*, 2004). En términos generales en bacterias la resistencia a β -

lactámicos surge por disminución de permeabilidad de la membrana de las drogas, el aumento de flujo de salida de la droga de la célula bacteriana, la modificación de las PBPs que disminuyen la afinidad de la droga para la proteína, y la presencia de β -lactamasas que inactivan el antibiótico hidrolizando la estructura del anillo (*Ralf et al., 2001; Walsh, 2003; Mark et al., 2006; Rimbara et al., 2008; Mansour et al., 2010*).

1.4.8. Resistencia a la Amoxicilina

La amoxicilina es una penicilina semisintética, tiene una buena biodisponibilidad por vía oral y aumenta su actividad antimicrobiana con la neutralización del pH del estómago. La Amx es actualmente el único de los β -lactámicos utilizados para tratar la infección por *H. pylori*, es muy estable a pH ácido, e inhibe la biosíntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilina PBP localizadas en la pared celular. Esta inhibición resulta en un debilitamiento de la pared celular bacteriana y finalmente en la lisis y muerte celular. Amoxicilina es un bactericida *in vitro* con una tasa de erradicación alta ($\geq 99,9\%$) contra *H. pylori* (*Gómez et al., 1998; Sauvage et al., 2008; Fernández et al., 2009*).

La producción de β -lactamasas, y la inactivación posterior del β -lactámico, es el mecanismo más común que participan en la resistencia a β -lactámicos Gram-negativos. Hasta ahora, β -lactamasa no ha sido demostrada en los aislados de *H. pylori* que puedan conferir resistencia a la amoxicilina por lo que parece estar relacionado con la ausencia de una proteína de unión a la penicilina (PBP) de 30 a 32 kDa (*Herrits et al., 2000; Cantón et al., 2001*).

El tratamiento inicial con amoxicilina demostró ser muy eficaz. La resistencia a la amoxicilina, sin embargo fue documentada por primera vez en 1998, cuando una cepa fue aislada por Hardenberg en Holanda en un paciente 82 años de edad con dispepsia (*Van Zwet et al., 1998*). En la actualidad, las tasas de resistencia a amoxicilina llegan hasta 96,5% (*Smith et al., 2001; Kalach et al., 2007; DeFrancesco et al., 2010*).

En contraste, las mutaciones de aminoácidos en PBP1 pueden ser resistentes debido a la menor afinidad que se da por la amoxicilina (*Okamoto et al., 2002*). Varios estudios han demostrado que las sustituciones de aminoácidos que dan lugar a resistencia ocurren en el extremo carboxilo de PBP1 en el dominio de unión a la penicilina. Por ejemplo, PBP1 de Hardenberg contiene una sola sustitución de aminoácido de serina a arginina en la posición 414 (Ser414Arg) (*Know et al., 2003*). Curiosamente los β -lactámicos adquieren resistencia a múltiples fármacos, y existen 10 sustituciones o mutaciones de diferentes aminoácidos, en el dominio de unión a la penicilina PBP1 confieren resistencia a: Glu406Ala, Ser417Thr, Met515Ile, Asp535Asn, Ser543Arg, Thr556Ser, Asn562Tyr, Lys648Gln, Arg649Lys, y Arg656Pro. Dos de las mutaciones del aminoácido descrito previamente (Thr556Ser y Asn562Tyr) (*Owen et al., 2003; Know et al., 2003; Matteo et al., 2008*) fueron posteriormente confirmadas y más mutaciones de aminoácidos que confieren resistencia fueron identificados; Ala369Thr, Val374Leu, Leu423Phe, Thr593Ala y Gly595 Ser (*Rimbara et al., 2008*). Además, un estudio in vitro encontró que Thr438 mutación Met es suficiente para producir resistencia y que este fenotipo es transmitido a otras cepas mediante transformación genética (*Co & Schiller, 2006*).



Fuente: http://bvs.sld.cu/revistas/med/vol47_4_08/f0209408.gif. (*Hernández et al., 2008*).

Figura 1.4. Mecanismo general de acción de la amoxicilina en su adhesión a las proteínas de unión a penicilina PBP

La detección de las PBPs tanto en cepas AmxR (amoxicilina resistente) como AmxS (amoxicilina susceptible) se han demostrado en un estudio en Korea donde utilizaron cepas HPA, HPK5 y CPY3401 para determinar la afinidad de las PBPs en la Amx. Se preincubaron fracciones de membrana con el antibiótico a diferentes concentraciones a temperatura ambiente más BIO-AMP (ampicilina) y se visualizó el resultado por quimioluminiscencia. El ADN se amplificó por PCR y sus productos fueron secuenciados para observar el tipo de mutación presente. En esta población se pudo confirmar que la reducción de la afinidad de PBP1 de la Amx es causante en parte de la resistencia de cepas de *H. pylori* a este antibiótico, conclusión basada en la reducción de la BIO-AMP y la presencia de varias mutaciones en la secuencia PBP1A (Gerrits *et al.*, 2004).

A pesar de la inducción de resistencia de *H. pylori* a Amx (AmxS/AmxR) con la administración cada vez más de Amx ha indicado una disminución de la afinidad de la PBP1 y disminución de penicilina G (Hp26695) que presenta una conversión de T: M (Edgie *et al.*, 2006). Sin embargo, esto también se puede deber a la baja permeabilidad de los antibióticos a las células o combinaciones de cepas resistentes.

Aunque la resistencia a Amx no es tan marcada en los diferentes países es importante que cada región evalúe la susceptibilidad a este antibiótico como medida preventiva de cepas resistentes y reducción en las tasas de erradicación de *H. pylori*.

1.4.9. Detección de la resistencia a los antimicrobianos

Se han desarrollado muchas técnicas para determinar la resistencia o susceptibilidad de *H. pylori* frente a antimicrobianos, éstas se pueden clasificar en métodos basados en cultivos y basados en técnicas moleculares. Los métodos basados en cultivos son dilución en agar, microdilución, E-test. Sin embargo, como *H. pylori* es relativamente exigente y lento en crecimiento, el estándar de cultivo in vitro basados en pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, incluso en manos de expertos, son lentos y pueden tomar por lo menos 10 -14 días desde la recepción inicial de la biopsia gástrica a

la lectura y comunicación de los resultados de sensibilidad (*Simala et al., 2004; Cisneros, 2009*).

La resistencia de *H. pylori* se detecta cada vez con más frecuencia, porque se han empezado a desarrollar métodos basados en biología molecular como Polimorfismos de Longitud en los Fragmentos de Restricción (RFLP), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (q-PCR), Amplificación de Polimorfismo Aleatorios (RAP), Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) e Hibridación Fluorescente in situ (FISH), entre otros (*Godoy et al., 2007*).

La falta de un método estándar para la determinación de la susceptibilidad añade una nueva complicación para entender la relación entre la evolución clínica y la susceptibilidad in vitro. La aprobación de los ensayos de diagnóstico molecular para la detección de resistencia ofrece una aproximación alternativa atractiva para obtener susceptibilidad a los antibióticos con mayor precisión, velocidad, y la posibilidad de un resultado el mismo día si los ensayos se realizan directamente en la biopsia. El éxito de esas estrategias ha sido ya demostrado por otros microorganismos de crecimiento lento en particular los patógenos humanos causantes de una infección crónica, como *Mycobacterium tuberculosis* (*Torres et al., 2000*).

La PCR y q-PCR permiten amplificar los fragmentos de DNA que presentan mutaciones que puedan conferir resistencia antimicrobiana a las cepas de *H. pylori*. Los ensayos de hibridación por PCR en tiempo real, amplifican el fragmento de DNA de interés en presencia de una o dos sondas marcadas con fluorescencia. Después de la finalización por PCR, la temperatura se incrementa para determinar el punto de fusión de las sondas. Cuando hay desajustes presentes en la secuencia blanco, se obtienen temperaturas de fusión más bajas comparadas con el combinado híbrido. Esta técnica se puede hacer tanto en biopsias como en heces (*Gerrits et al., 2002*).

En las sondas FRET el sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador (reporter) en el extremo 3' y la otra un aceptor (quencher) en el extremo 5'. Cuando las sondas están

hibridadas, los dos fluorocromos están cercanos al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo. Al ser excitado el donador transfiere su energía (*Lejona et. al., 2006*).

En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo corresponde al aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones. Para detectar mutaciones o polimorfismos, un análisis de la curva de fusión se lleva a cabo, dado que la aplicación esencial no se limita a la detección de *H. pylori* (*Megraud, 2007*).

PCR en tiempo real se utilizó por primera vez en el 2002 cuando cuantificó el ADN de *H. pylori* en muestras de biopsia gástrica. Esto se llevó a cabo en una PCR no competitiva en un equipo LightCycler® 1.5 y la tecnología FRET (*He et al., 2002*). El mismo método fue utilizado por *Lascols et al. 2003*, para amplificar el fragmento de 132 pb del gen ARNr 23S.

1.5. Hipótesis

El método molecular qPCR permite la detección a la mutación Ser414Arg asociada a la resistencia que presenta *Helicobacter pylori* a la amoxicilina.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

2.1.1. Instituciones

Las instituciones que colaboraron en este estudio fueron:

- Hospital Eugenio Espejo, Gastroenterología.
- Hospital Pedro Vicente Maldonado, Gastroenterología.
- Hospital Policía Nacional N° 1, Gastroenterología.
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Citogenética.

2.1.2. Personas cooperantes

- Dr. Oswaldo Rodríguez Mora, MD. PhD.
- Dra. Lenis Ortiz Gómez. Msc Microbiología.
- Ing. Cecilia Cruz Betancourt.
- Lic. María José Tamariz Cobos.
- Dr. Marcelo Grijalva. M.D., Ph.D.
- Ing. Pedro Saker, Estadístico.

2.2. Zona de Estudio

2.2.1. Trabajo de Campo

Las muestras fueron escogidas del banco de muestras de biopsias gástricas del Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Citogenética PUCE, muestras que fueron obtenidas de tres hospitales de la ciudad de Quito: Hospital Eugenio Espejo, Hospital de la Policía Nacional N°1 y Hospital Pedro Vicente Maldonado.

2.2.2. Trabajo de Laboratorio

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Citogenética de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador ubicado en la Av. 12 de Octubre y Roca, Quito-Ecuador.

2.3. Período de tiempo de investigación

El estudio comenzó en Septiembre del 2010 y finalizó en Mayo del 2011.

2.4. Diseño Experimental

2.4.1. Cálculo del tamaño de la muestra

Se calculó una muestra de $n = 139$ pacientes, con un nivel de confianza del 95%, una frecuencia esperada del 10% y un error del 5%. Para este cálculo se utilizó la fórmula para el cálculo de tamaño de muestra (n).

Cuadro 2.1. Fórmula para el cálculo del tamaño de muestra dependiendo de la frecuencia esperada y del error permisible.

Fórmula	Donde
$n = \frac{z_{\alpha}^2 p(1-p)}{B^2}$	$z_{\alpha} = 1.96$ constante estadística para 95% de confianza. $p = 0.10$ frecuencia esperada. $B = 0.05$ error permisible.

Fuente: Mateu & Casal, 2003

2.4.2. Muestra para el estudio

140 biopsias gástricas de los hospitales: Eugenio Espejo, Pedro Vicente Maldonado, Hospital N°1 de la Policía Nacional fueron positivos para *H. pylori* por medio de la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Tabla 2.1. Muestras positivas de *H. pylori* de los hospitales Eugenio Espejo, Pedro Vicente Maldonado y Policía N°1 utilizadas en el estudio.

Centro de Salud	Número de pacientes	% del total	Incluidas en el Estudio
HEE	77	32,58	45
HPVM	35	14,76	21
HPQ	125	52,74	74
TOTAL	237	100	140

2.5. Procedimientos

2.5.1. Recolección de muestras y almacenamiento

Se recolectaron muestras de biopsias gástricas desde el año 2007, 2008 hasta el año 2009 de los hospitales Eugenio Espejo, Pedro Vicente Maldonado y Hospital de la Policía N°1, estas muestras se tomarón del antro del estómago.

Cada tubo de 1,5 ml fue etiquetado con el respectivo código del paciente, con un código para la parte del estómago del que proviene la muestra y un código del hospital al que pertenece la muestra.

Las biopsias gástricas positivas para *Helicobacter pylori* se encontraron en el banco de almacenamiento del laboratorio de Diagnóstico Molecular y Citogenética de la

Pontificia Universidad Católica del Ecuador a una temperatura de refrigeración de - 80 °C y fueron trasladadas a temperatura de - 20°C para el presente estudio.

2.5.2. Aislamiento de ADN

2.5.2.1. Aislamiento de ADN de cepa control

La cepa control para la identificación molecular de la resistencia de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina fue la cepa TR 222 Y, la cual es una cepa resistente para la amoxicilina con una concentración mínima inhibitoria de 16 ug/ml. Esta bacteria fue cultivada para su crecimiento y su ADN fue extraído de la bacteria en el Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. El ADN de *Helicobacter pylori* fue traído a Quito-Ecuador en tubo de 1,5 ml a temperatura ambiente.

La cepa silvestre para la identificación molecular de *Helicobacter pylori* fue la cepa ATCC 43504, la cual es una cepa susceptible a amoxicilina. Esta cepa fue cultivada en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción-Chile y fue traída a Quito-Ecuador en agar Columbia y sangre de caballo a 4°C, desde Concepción-Chile hasta Quito-Ecuador.

Para la extracción de la cepa silvestre se utilizó el reactivo DNAzol ® (Invitrogen), el procedimiento se realizó bajo las instrucciones del fabricante.

Para la lisis celular se adicionó 1 *ml* de DNAzol ® en el plato de agar que contenía la cepa control y se homogenizó con movimientos circulares. Con la ayuda de una micropipeta se tomó todo el lisado de las células y se colocó en un tubo de 1.5 *ml*, a continuación se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se colocó el sobrenadante en un tubo estéril nuevo de 1.5 *ml*.

Para precipitar el ADN bacteriano se colocó 0,5 ml de etanol 99,8% (Scharlan) y se mezcló por inversión varias veces, nuevamente se centrifugó a 4000 rpm por 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. El ADN se lavó dos veces con etanol al 75% (v/v) y se centrifugó a 1000 rpm por 2 minutos y nuevamente se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar el tubo por 30 segundos a temperatura ambiente dejando el tubo invertido. El ADN se resuspendió en 0,2 ml de TE.

2.5.2.2. Aislamiento de ADN de *Helicobacter pylori* a partir de muestras de biopsias

El ADN de biopsias gástricas se encuentra en refrigeración a -80°C en el banco de almacenamiento del Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Citogenética de la PUCE, de esta manera se obtuvo el ADN de las muestras seleccionadas.

El aislamiento de ADN de *Helicobacter pylori* comenzó con la lisis celular, la que consistió en homogenizar el tejido macerándolo en un portaobjetos limpio con ayuda de una aguja y un bisturí estéril, luego se colocó en el Buffer lisis TES [Tris HCl 50 mM pH 7.2; EDTA 1 mM; SDS 1% (v/v)] y se añadió *proteinasas K* (Invitrogen) a una concentración final de 100 ug/ml. Luego se incubó a 55 °C por dos horas (Sistema, 2008). Se incubaron las muestras a 98 °C por 10 minutos para desactivar la *proteinasas K*.

A continuación se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm por 13 minutos y se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo, luego se añadió 0.5 ml de etanol al 99.8% (Scharlan), se invirtieron los tubos varias veces para precipitar el ADN, se retiró el sobrenadante y se procedió a lavar el ADN dos veces con etanol al 75% (v/v), se centrifugó a 2.000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante, posteriormente se dejaron secar a los tubos por un lapso de 30 segundos a temperatura ambiente, dejando los tubos invertidos. Finalmente en cada tubo se colocaron 0.2 ml de Buffer TE [Tris HCl 10 mM y EDTA 1 mM; pH 7.5] (Debets-Ossenkopp et al., 2003) para resuspender el ADN (Cruz, 2008).

2.5.3. Detección de las mutaciones (Ser414Arg) en el gen *pbp1A* que confiere resistencia a la amoxicilina por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

Para la detección de las mutaciones (Ser414Arg) en el gen *pbp1A* que confieren resistencia a la amoxicilina se utilizó la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (qPCR) con ayuda del equipo LightCycler® 1.5; el kit LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS}HybProbe de ROCHE y sondas de hibridación fabricadas por ROCHE.

La mastermix FastStart DNA Master^{PLUS}HybProbe de ROCHE (5X) contiene dos viales: el vial 1a contiene la enzima y el vial 1b contiene el mix de reacción [*FastStart Taq DNA Polymerase, reaction buffer, MgCl₂ y dNTP mix*].

El coctel para la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) fue de un volumen final de 20 μ l, el cual contiene: 4 μ l de LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS}HybProbe; 0,2 μ M de cada uno de los primers forward y reverse, 0,2 μ M de cada una de las sondas de anclaje y sensor; 5 μ l de ADN blanco y para completar el volumen final se añade agua grado biología molecular.

Tabla 2.2. Concentraciones y volúmenes de los componentes del coctel de la qPCR para la detección del gen *pbp1A*

Componentes	Concentración inicial	Volumen para 20 μ l de reacción	Concentración final
Agua grado biología molecular	-	9,4 μ l	-
Sondas	10 μ M	0,8 μ l	0,2 μ M
Primers	10 μ M	0,8 μ l	0,2 μ M
Master Mix	5X	4 μ l	1X
Volumen total	-	15 μl	-

2.5.3.1. Primers para la detección del gen *pbp1A*

Los primers utilizados fueron obtenidos y alineados mediante el algoritmo BLAST. Las secuencias obtenidas fueron: *Helicobacter pylori* 1061 penicillin-binding protein 1A (*pbp1A*) gene con la codificación: AF479618.1 y la cepa mutante *Helicobacter pylori* Hardenberg penicillin-binding protein 1A (*pbp1A*) gene con codificación AF479617.1. Estas secuencias se encuentran en las posiciones de 1145 – 1279 y al momento de la amplificación da como resultado un amplicón de 135 pb (Anexo C).

Tabla 2.3. Características de los primers *pbp1A* de la cepa susceptible y de la cepa mutante de *H. pylori* resistente a la amoxicilina.

Cepa	No. de acceso GenBank	Mutación	Susceptibilidad
1061	AF479618.1	Sin mutación	Sensible
Hardenberg	AF479617.1	Ser ₄₁₄ Arg	Resistente

Tabla 2.4. Nombres, secuencias, temperatura de melting y posición de los primers de la cepa *Helicobacter pylori* 1061 penicillin-binding protein 1A (*pbp1A*) gene.

Nombre de Primer	Secuencia 5' - 3'	Posición	T _m (°C)
AMOF	GCTATTCCACGACTTCTAAA	1145 a 1163	56
AMOR	GCAAGGTTACAAGCCCTAAA	1279 a 1260	58

2.5.3.2. Sondas para la detección del gen *pbp1A*

Para la identificación molecular de la mutación, utilizamos el programa ClustalW, programa que nos ayudó a identificar la posición exacta de la mutación

Ser414Arg, debido a que dentro de nuestro amplicón de 135 pb se encontraban 6 mutaciones diferentes cuando se alinearon la secuencia mutante con la cepa susceptible. La mutación se identificó por el cambio de un solo nucleótido: citosina por adenina (C/A) que transforma al aminoácido de serina a arginina produciéndose la mutación y convirtiendo la cepa silvestre en una cepa mutante resistente a amoxicilina (Anexo D).

Se utilizó sondas de hibridación específicas (FRET), conocidas como sondas Kiss, para dar mayor especificidad a la mutación. La construcción de la sonda de anclaje y la sonda sensor fue realizada en base a la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A* resistente a la amoxicilina en *Helicobacter pylori*, mediante el programa LightCycler Probe Design Software 2.0 (Anexo F).

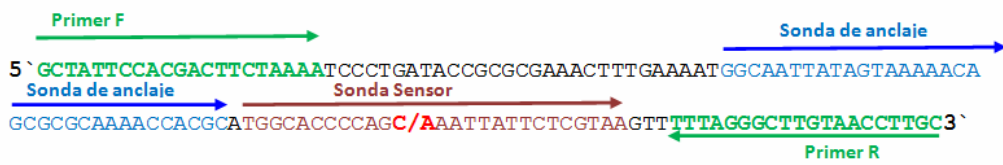


Figura 2.5. Fragmento de la cepa control de *H. pylori* donde se encuentran los primers, sondas y mutaciones.

2.5.3.3. Programa utilizado para la detección del gen *pbp1A*

El procedimiento ha sido optimizado para el uso de LightCycler® 1.5 con el kit LigthCycler® Fast Start DNA MAster^{PLUS} HybProbe. Este programa contiene los siguientes parámetros:

Pre-Incubación: activación de la polimerasa FastStart DNA y la denaturación de ADN; **Ampification:** del ADN blanco; **Melting curve:** para el análisis de amplicones, cuando se realiza la detección de una mutación y **cooling:** enfriamiento del rotor y de la cámara del equipo (LigthCycler® Fast Start DNA MAster^{PLUS} HybProbe. Cat. No. 03515575001).

En el programa se realizó los siguientes cambios para la estandarización de la amplificación del gen *pbp1A*:

Se calculó la temperatura de annealing de los primers utilizando la fórmula $T_m=2^{\circ}\text{C}(A+T)+4^{\circ}\text{C}(G+C)$. Se realizó un cambio en el Ramp Rate de la temperatura de annealing de 20°C a 2°C, ya que la temperatura de annealing de los primers fue menor a 55°C y es una recomendación del fabricante bajar la temperatura.

El tiempo de extensión en el programa de amplification se calculó dividiendo el peso molecular del amplicón (135 pb) para 25 segundos, lo que da como resultado 5.4 segundos.

En el programa de melting curve se realizó cambios en el tiempo denaturation de 30 segundos a 0 segundos y en el tiempo de annealing de 30 segundos a 15 segundos.

Tabla 2.5. Programa para la amplificación del gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori* resistencia a la amoxicilina.

Analysis Mode	Cycles	Segment	Target Temperature	Time	Fluorescence Acquisition Mode
Pre – incubation					
None	1		95°C	10 min.	none
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95°C	10 seg.	none
		Annealing	51°C	4 seg.	single
		Extension	72°C	5,4 seg.	none
Melting Curve					
Melting Curves	1	Denaturation	95°C	30 seg.	none
		Annealing	61°C	15 seg.	none
		Melting	95°C	0 seg.	continuous
				Ramp rate 0,2 °C/seg	
Cooling					
None	1		40°C	60 seg.	none

Fuente: LigthCycler® Fast Start DNA MAster^{PLUS} HybProbe. Cat. No. 03515575001

2.6. Análisis de datos

2.6.1. Detección del gen *pbp1A*, mutación Ser414Arg

Una vez terminada la fase experimental se analizó el diagnóstico del gen *pbp1A*, para la mutación Ser414Arg.

Para la detección se realizó una matriz con 1 para las muestras positivas, las cuales poseen la mutación y con 0 para las muestras negativas, las que no presentan la mutación, tomando en cuenta los siguientes parámetros: se consideró una muestra positiva para la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A* de *H. pylori* cuando la temperatura de melting en la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) fue de 59°C a 61,7°C y una cepa susceptible de *Helicobacter pylori* cuando la temperatura de melting se encontraba en un rango de 64°C a 67°C. Estos rangos fueron obtenidos bajo el programa LightCycler Probe Design Software 2.0.

2.6.2. Análisis estadístico entre la presencia de la mutación Ser414Arg de *H. pylori* y las variables edad y sexo

Se realizó el análisis descriptivo de frecuencias con los datos de la variable dependiente y con la información disponible de los pacientes: edad y sexo.

Se dividió a los pacientes del estudio en grupos por sexo: hombres y mujeres y también se dividió a los pacientes que se enrolaron en el estudio en 5 grupos de edad que comprendían los rangos: 18 a 32 años, 33 a 47 años, 48 a 62 años, 63 a 77 años y 78 a 93 años.

Del mismo modo se realizó el análisis descriptivo de frecuencias con los datos de la variable dependiente y la información disponible de los pacientes (edad, sexo), con la prueba de hipótesis (PDH) del chi cuadrado, mediante el software estadístico InfoStat versión 2008, el cual permite obtener pruebas de bondad de ajuste, para la asociación de variables. La hipótesis nula especifica un modelo distribucional teórico

para los datos, que en este estudio es que las variables categóricas de edad y sexo son independientes.

Para finalizar se realizó la estimación inferencial por intervalo de confianza para la proporción poblacional de personas con infección a *H. pylori* que presentan resistencia a la amoxicilina, mediante el software estadístico InfoStat.

Tabla 2.6. Tabla de contingencia de variables, para la estimación inferencial por intervalo de confianza.

Código de variables	
y =	# de muestras resistentes a AMX
n =	# de muestras procesadas en el estudio
p =	Proporción muestral
1 - α =	Nivel de confianza
$z_{\alpha/2}$ =	Distribución normal estándar
E =	Error
L =	Límite inferior
U =	Límite superior

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Pacientes

Se evaluaron muestras pertenecientes a 140 pacientes positivos para *Helicobacter pylori* de los cuales 51% (71 pacientes) fueron hombres y 49% (69 pacientes) fueron mujeres. El rango de edad fue de 19 a 93 años, con una edad media de 44 años.

3.2. Edad

Del total de pacientes: 40 pacientes se ubicaron en un rango de edad de 18 a 33 años; 51 pacientes se ubicaron entre 34 a 48 años; 33 pacientes se ubican entre 49 a 63 años; 12 pacientes se ubicaron entre 64 a 78 años y solamente 4 pacientes se ubicaron en el rango de edad de 79 a 93 años.

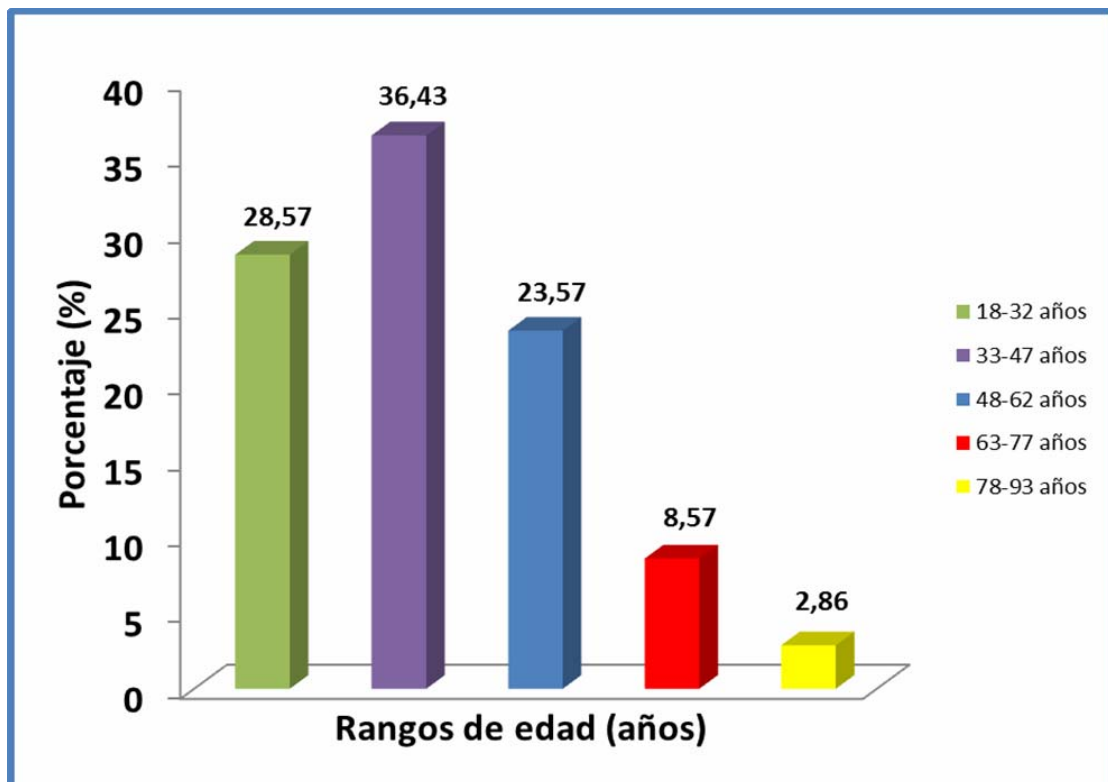


Figura 3.1. Porcentaje de los rangos de edad de los pacientes enrolados en el estudio

3.3. Detección de la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina (mutación Ser414Arg) por medio de qPCR

El diagnóstico por medio de qPCR de la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a amoxicilina demostró que del total de pacientes 9 fueron resistentes a amoxicilina y 131 fueron susceptibles a amoxicilina.

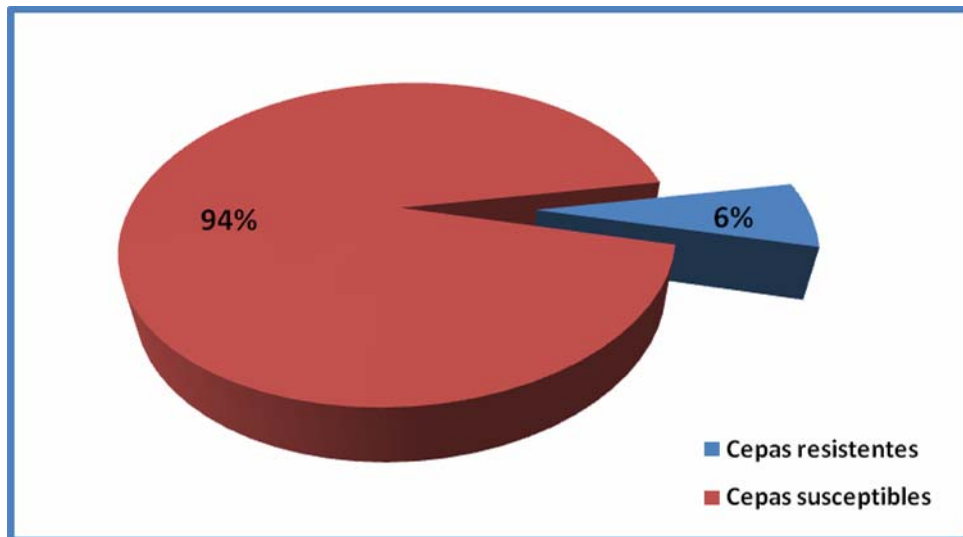


Figura 3.2. Porcentaje de pacientes con resistencia antimicrobiana de *H. pylori* a amoxicilina

3.4. Detección de la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina de la mutación Ser414Arg por medio de qPCR según sexo

El diagnóstico por medio de qPCR de la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a amoxicilina demostró que 9 de los 140 pacientes fueron resistentes a amoxicilina. De los 9 pacientes, 3 fueron mujeres y 6 fueron hombres (Anexo K).

Tabla 3.1. Porcentaje de detección de la resistencia a amoxicilina de *Helicobacter pylori* según sexo.

	Pacientes n=140			
	<i>H. pylori</i> resistentes a amoxicilina n = 9		<i>H. pylori</i> sensibles a amoxicilina n = 131	
	No. de pacientes	Porcentaje (%)	No. de pacientes	Porcentaje (%)
Hombres	6	33,33	65	49,61
Mujeres	3	66,67	66	50,39

n= número de pacientes

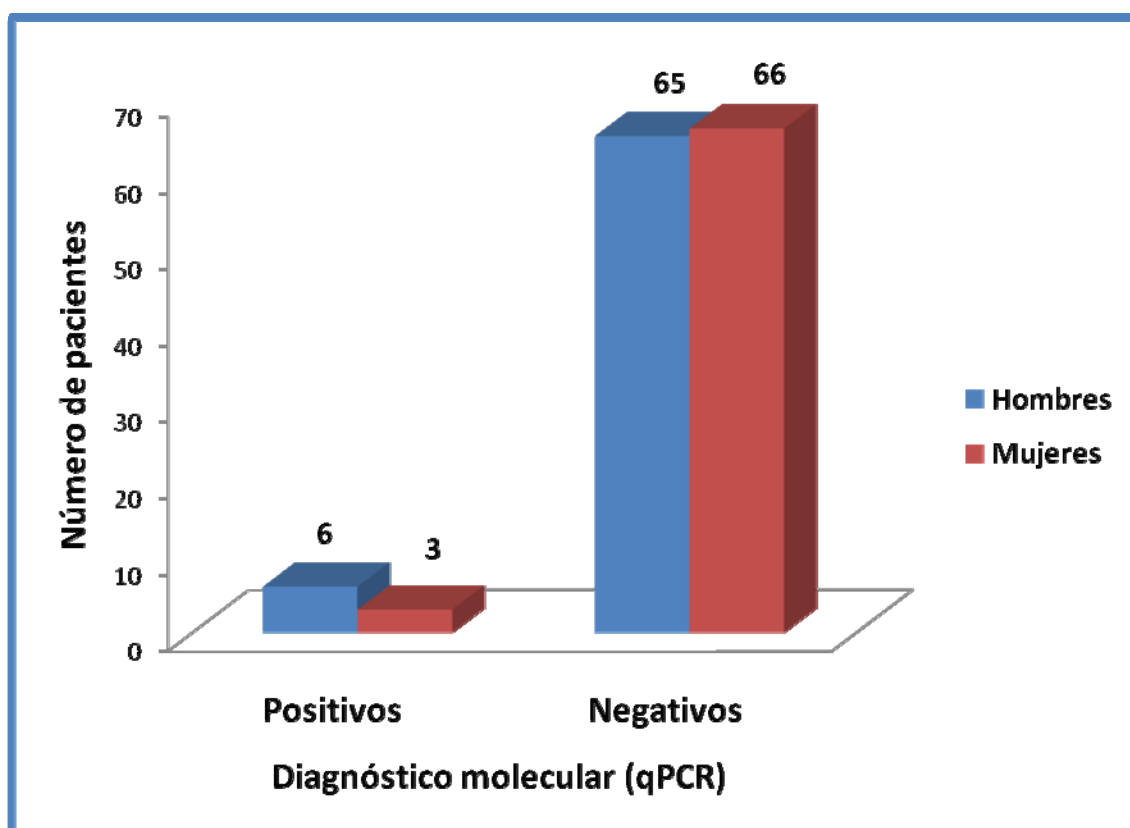


Figura 3.3. Número de pacientes con resistencia antimicrobiana de *H. pylori* a amoxicilina según el sexo

3.5. Detección de la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina de la mutación Ser414Arg por medio de qPCR según edad

El diagnóstico de la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a amoxicilina por medio de qPCR también demostró que de los 9 pacientes resistentes a amoxicilina, 4 pacientes están en el rango de edad de 18 a 32 años, 4 pacientes están en el rango de edad de 33 a 47 años y 1 paciente está en el rango de edad de 78 a 93 años. En los rangos de edad de 48 a 63 años y de 64 a 77 años no hubo ningún paciente resistente a la amoxicilina.

Tabla 3.2. Porcentaje de detección de la resistencia a amoxicilina de *Helicobacter pylori* según edad de los pacientes.

	Pacientes n=140			
	<i>H. pylori</i> resistentes a amoxicilina n = 9		<i>H. pylori</i> sensibles a amoxicilina n = 131	
	No. de pacientes	Porcentaje (%)	No. de pacientes	Porcentaje (%)
18-33 años	4	44,44	36	27,48
34-48 años	4	44,44	47	35,87
49-63 años	0	0,00	33	25,19
64-78 años	0	0,00	12	9,16
79-93 años	1	11,12	3	2,29

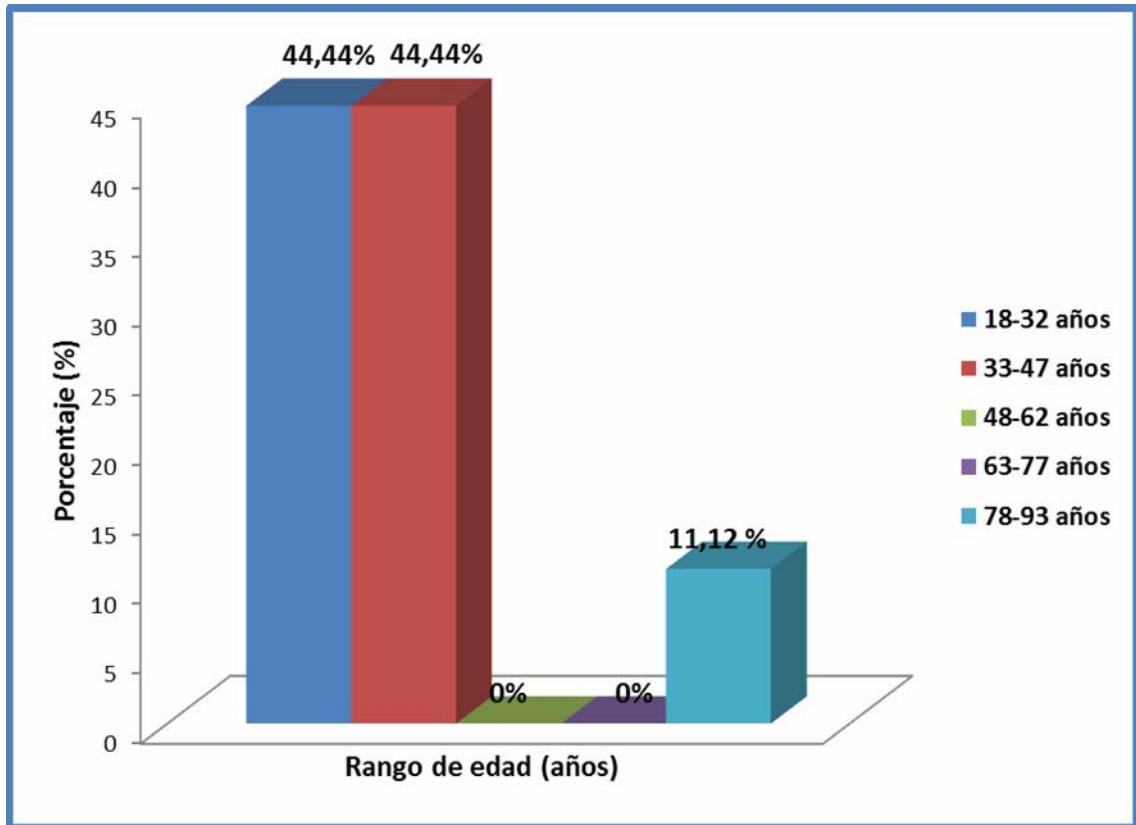


Figura 3.4. Porcentaje de pacientes con resistencia antimicrobiana de *H. pylori* a amoxicilina según la edad

3.6. Detección de la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina de la mutación Ser414Arg por medio de qPCR según el lugar de recolección de la muestra

De los 9 pacientes resistentes a amoxicilina, 5 de los pacientes procedieron de Hospital de la Policía N°1, 3 pacientes procedieron del Hospital Pedro Vicente Maldonado y 1 paciente procedió del Hospital Eugenio Espejo.

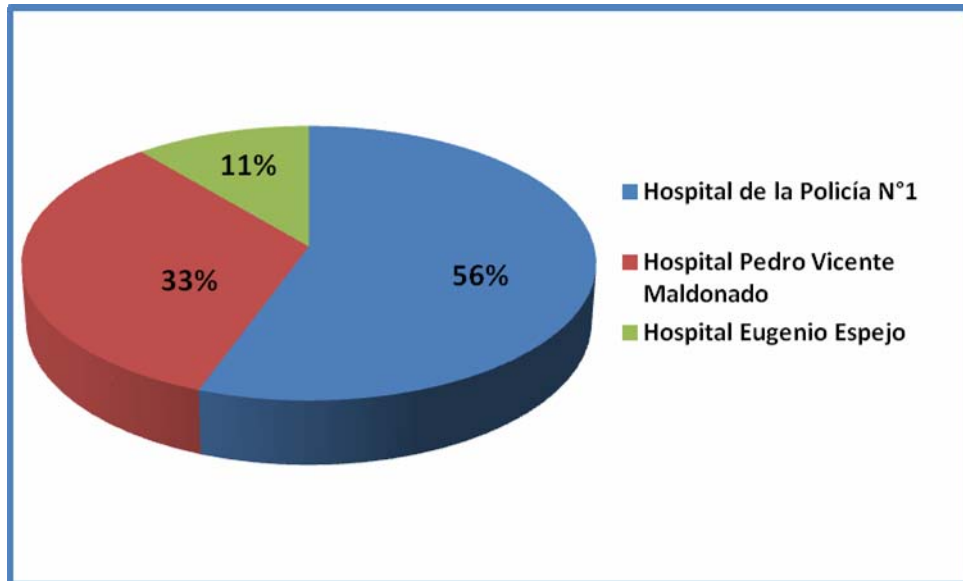


Figura 3.5. Porcentaje de pacientes con resistencia antimicrobiana de *H. pylori* a amoxicilina según el lugar de recolección de la muestra

3.7. Análisis estadístico

3.7.1. Análisis descriptivo de la frecuencia de la mutación Ser414Arg según la edad y el sexo del paciente

Sobre la base de datos de las personas involucradas en el estudio que presentan la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A* que confiere resistencia de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina, no existe dependencia de variables de la edad y sexo con un $p = 0,5698$ (56,98%).

Tabla 3.3. Tabla de contingencia del Chi cuadrado de frecuencias de pacientes de *H. pylori* que presentan la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A*

Edad	Femenino	Masculino	Total
18-33	1	3	4
33-48	2	2	4
78-93	0	1	1
Total	3	6	9

Estadístico	Valor	Gl	<i>p</i>
Chi Cuadrado Pearson	1,13	2	0,5698

Estos resultados confirman que no existe dependencia directa ni con la edad, ni con el sexo de las personas, lo que indica que la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina puede conferirse a cualquier edad y en cualquier sexo.

3.7.2. Estimación inferencial por intervalo de confianza para aspectos de la población Ecuatoriana.

En la prueba de intervalo de confianza (IDC) se obtuvo que a nivel inferencial para aspectos de la población Ecuatoriana se puede afirmar sobre la base de la evidencia muestral recopilada en los pacientes de tres hospitales de la ciudad de Quito, Eugenio Espejo, Pedro Vicente Maldonado y Policía Nacional N°1 que de las personas que presentan la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori* la tasa de resistencia va de 2,37 % a 10,49 %, con un nivel de confianza del 95% y un error del 4,06 % de nivel de confianza.

Tabla 3.4. Estimación inferencial por intervalo de confianza de la proporción a nivel de los pacientes que presentan la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A* de *H. pylori*.

Códigos de variables	Mutación Ser414Arg
y =	9
n =	140
p =	6,43%
1 - α =	95,00%
$z_{\alpha/2}$ =	1,959963985
E =	4,06%
L =	2,37%
U =	10,49%

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El mecanismo de resistencia de *Helicobacter pylori* contra la amoxicilina consiste en mutaciones en las PBPs (penicillin binding proteins). Particularmente, mutaciones en la PBP1A, que presenta mayor afinidad por la amoxicilina que las proteínas restantes de la familia. Esta resistencia está ligada aparentemente a que una sustitución aminoacídica en el gen que codifica la *pbp1A* (Ser 414 Arg) puede aumentar la CMI de la amoxicilina, por lo que conduce a una disminución de la afinidad por los β -lactámicos (Herris *et al.*, 2000; Okamoto *et al.* 2002; Gerrits *et al.*, 2002). En el presente trabajo se realizó el diagnóstico molecular de la resistencia de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina por la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A*, por medio de la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).

En el estudio realizado se identificó una tasa de resistencia de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina del 6,43% (9/140), esta resistencia es mucho mayor a la que presentó un estudio realizado en el Hospital de Guayaquil en el 2003, con 38 pacientes los cuales no presentaron tasas de resistencia a la amoxicilina (SOLCA, 2003). La diferencia puede ser debido al método utilizado y a la poca cantidad de pacientes presentes en el estudio de ese año (Debets *et al.*, 2003).

En latinoamérica, países como Colombia presentan una resistencia de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina de un 3,8%, Brasil y El Salvador presentan tasas de resistencia a la amoxicilina del 72% y el 59% respectivamente. En el 2008 las tasas de resistencia a la amoxicilina en Taiwán y Brasil, alcanzaron el 20% y 30% respectivamente, en unos casos disminuyendo la erradicación y en otros aumentando su prevalencia (Matteo *et al.*, 2008; Trespalacios *et. al.*, 2009; Wu *et. al.*, 2000).

Si las cepas de *H. pylori* se vuelven resistentes a amoxicilina y su propagación se hace cada vez mayor, esto causaría graves problemas, provocando un aumento de los fracasos de erradicación de un 0% a 59% (Okamoto *et al.*, 2002). En el estudio se encontró una resistencia del 6,43%, lo que es importante evaluar ya que todavía se

recomienda como la terapia de elección de primera línea (claritromicina, amoxicilina y metranidazole (*Chey & Wong, 2007*) y se debe tomar precaución al utilizar antibióticos diferentes, cuando la resistencia local a los mismos esté por encima de ciertos valores que comprometerían su eficacia como: 15-20% para claritromicina, 40% para metronidazol y 0% a 29% para amoxicilina (*Malfertheiner et. al., 2006*).

Las diferencias en las tasas de resistencia encontrados en los hospitales Eugenio Espejo, Pedro Vicente Maldonado y Policía N°1; 11,11%; 33,33% y 55,56% respectivamente, pueden deberse a las diferencias socioeconómicas encontradas en cada hospital, además por los diferentes períodos de recolección que fueron en los años 2007, 2008 y 2009, debido a que se ha registrado que cada año aumenta un nivel de resistencia a antimicrobianos a nivel mundial, lo que también puede ayudar a explicar las diferencias observadas. (*Nahar et al., 2004; Ndip et al., 2008; Momenah et al., 2008*).

La población estudiada no presenta diferencias en cuanto a la distribución por sexo. Sin embargo hubo un discreto predominio de la prevalencia de infección por *H. pylori* en el sexo masculino con un 4,29 % (6/140) comparado con 2,14% (3/140) para el sexo femenino, pero no existen diferencias significativas. Un estudio similar realizado en Alaska, muestra que la resistencia se dio en pacientes masculinos 0,8% (4/497) y femeninos 1,5% (7/497), sin mostrar diferencias significativas. Estudios previos reportan que la infección por *H. pylori* no se encuentra relacionada con el sexo (*Ndip et al., 2008; Tanih et al., 2008; De Francesco et al., 2010*).

Nuestros datos no demuestran significación estadística ($p = 0.5698$) de una mayor prevalencia de cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a la amoxicilina en las mujeres que en los hombres, ni en relación con su edad. Esto confirma los resultados de otros estudios (*Meyer et al., 2001; Suerbaum, 2002 y Michetti, 2002; Parsons et al., 2004; Nahar et al., 2004; De Francesco et al., 2010*).

El estudio también reveló una mutación extra en el fragmento de 135pb del gen *pbp1A* de *H. pylori* el cual comprendía una temperatura de melting de rango de 62 a

63°C, el cual debería ser analizado para caracterizar el tipo de mutación. Según *Gerrits et al., 2002* el fragmento de 135pb del gen *pbp1A* comprende dos mutaciones Glu406Ala y Ser414Arg, las cuales confieren resistencia de *H. pylori* a la amoxicilina. Si esta mutación se confirmaría la resistencia encontrada en el estudio puede aumentar de un 6,4% a un 25,71%, por lo que es importante ampliar la investigación presente a nivel nacional.

La presencia de la mutación extra encontrada en el fragmento de 135pb es de un 19,29% (27/140), mayor a la mutación Ser414Arg de 6,43% (9/149), esto pudo deberse a que la mutación Ser414Arg es aparentemente la única mutación que puede aumentar la CMI de la amoxicilina, mientras que otras mutaciones como la Glu406Ala pueden estar combinados o ligados a otras mutaciones para adquirir la resistencia a la amoxicilina (*Gerrits et al., 2004*).

De la misma forma, los datos estadísticos obtenidos de los pacientes que presentaron otra mutación no muestran un nivel significativo de correlación entre su edad y su sexo con un $p = 0,1929$, lo que es confirmado con estudios anteriores (*De Francesco et al., 2010*).

Como una parte del estudio se proyectó los resultados obtenidos a nivel de la población Ecuatoriana, por medio inferencial y se obtuvo una resistencia de intervalo de 2,37 a 10,49%, datos que se podrían comparar a la población Ecuatoriana con datos obtenidos en Colombia de 3,8%, Kenia 4,6% y Bangladesh de 6,6%, esto debido a las condiciones socioeconómicas de los países (*Trespacios et al., 2009*).

En Europa, los datos disponibles a partir de dos estudios que incluían a 599 pacientes muestran una tasa de prevalencia de resistencia inferior al 1%. Por el contrario, en dos estudios realizados en África se encontró que la resistencia a la amoxicilina estuvo ausente en un estudio realizado en Senegal en donde se enroló a 40 pacientes, mientras que una prevalencia sorprendentemente alta se registró en Camerún (85,6%). Del mismo modo, la prevalencia de la resistencia a la amoxicilina varía ampliamente en los países asiáticos. En Korea se presentó una prevalencia del 8,8%, en

Taiwán del 36,1%, aunque otro estudio realizado en Taiwán encontró una prevalencia baja (0,9%) y Japón no presentó resistencia a la amoxicilina (*Kato et al., 2002; Nahar et al., 2004; Ndip et al., 2008; De Francesco et al., 2010*).

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del ADN de *H. pylori* directamente en la biopsia gástrica. La mayoría de las técnicas se basan en la PCR tanto clásica como en tiempo real y presentan diferentes objetivos de diagnóstico, siendo fundamentales: la detección de genes específicos de la bacteria, identificación de los factores de virulencia y caracterización de mecanismos de resistencia (*Lima et al., 2007*).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) puede determinar la presencia de mutaciones usando sondas diferentes, capaces de discriminar dos alelos. La discriminación alélica se produce cuando utilizamos dos sondas marcadas con distinto fluorocromo y que son específicas de la secuencia silvestre y de la mutada. Al final del proceso, las curvas de fluorescencia para las dos sondas nos indicarán el genotipo. Este método es muy rápido en comparación con la PCR convencional, ya que en una sola reacción de qPCR se obtienen los genotipos silvestres y mutantes de *Helicobacter pylori* (*Lejona et al., 2006*).

Por esta razón para la estandarización de la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) se utilizó el kit LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe de ROCHE, en el cual se indican los rangos de temperatura y tiempo en el que deben ser analizadas las muestras. En el protocolo se realizaron cambios para dar mejores resultados, en el programa de la amplificación se cambió el tiempo de annealing de 5 a 4 segundos debido a que se necesita menos tiempo para que los primers se unan y no amplifiquen fragmentos inespecíficos (*Vinueza, 2009*).

El análisis de la temperatura de melting (T_m °C) pudo llevarse a cabo al final de la reacción de amplificación. La medida de la fluorescencia dependiente de la temperatura se realiza mientras la temperatura en el termociclador aumenta de alrededor

de 50°C a 95°C, siendo la fluorescencia detectada dependiente de la presencia de secuencias de doble cadena de ADN (*Giglio et al., 2003; Know et al., 2003*). Por esta razón la temperatura de annealing para el programa de las curvas de melting en el presente estudio fue de 61°C con un tiempo de 15 segundos. Esto debido a que cuando las cadenas dobles de ADN se separan por efectos de la temperatura, la fluorescencia disminuye porque el colorante deja de estar unido al producto de la PCR.

La mayoría de los instrumentos proporcionan un análisis de estos datos teniendo en cuenta el punto en donde aparece el primer diferencial negativo de la señal de fluorescencia con respecto a la temperatura y la temperatura de fusión. Este punto aparece como uno o más picos que representan las temperaturas a las que los máximos niveles de cambio de la fluorescencia se producen, correspondiendo estos a un producto particular en la PCR (*Know et al., 2003*).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- La resistencia que presenta *Helicobacter pylori* a la amoxicilina en los hospitales y poblaciones estudiadas, presenta una tasa del 6,43%.
- La mutación Ser414Arg del gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori* que confiere resistencia antimicrobiana a la amoxicilina se presentó en 9 de 140 pacientes analizados.
- Las muestras del Hospital Eugenio Espejo demostró una tasa de resistencia de *H. pylori* a la amoxicilina de 11,11%, las del Hospital Pedro Vicente Maldonado del 33,33% y las del Hospital de la Policía Nacional N°1 del 55,56%.
- No existieron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A* de *H. pylori* por sexo y edad de los pacientes ($p = 0,5698$).
- Con una certeza del 95% se puede inferir que la resistente de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina a nivel nacional, se encuentra una tasa entre el 2,37% al 10,49%.
- La mutación hallada en el estudio del gen *pbp1A* de *H. pylori* que puede estar relacionada con la mutación Glu406Ala presenta un porcentaje del 19,29%.
- Si la mutación encontrada en el gen *pbp1A* de *H. pylori*, confiere resistencia a la amoxicilina la tasa de resistencia del presente estudio aumentaría a un 25,71%.
- La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) determina mutaciones que pueden estar relacionadas con resistencia a medicamentos antimicrobianos o con factores de virulencia, siendo una técnica sencilla y precisa.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- En el Ecuador existe una alta incidencia de cáncer gástrico en comparación con otros países. El principal factor de riesgo para cáncer gástrico es la infección/colonización con *Helicobacter pylori*, por lo tanto es importante realizar estudios acerca de esta bacteria para entender cómo funciona su mecanismo de patogénesis y como está relacionado con el desarrollo de cáncer gástrico y otras enfermedades.
- Es recomendable ampliar el estudio de resistencia de *Helicobacter pylori* a los diferentes antibióticos a nivel nacional, ya que si Ecuador sigue presentando tasas altas de resistencia a los antibióticos, este podría estar fallando en su erradicación con la triple terapia de primera línea de claritromicina, amoxicilina y metronidazol de un 80% ,95% y 25% respectivamente en la eficiencia de tratamiento.
- Se recomienda analizar las muestras positivas de *H. pylori* que presentaron una mutación en el gen *pbp1A* a través de secuenciación, para verificar si se trata de la mutación Glu406Ala ya que si la mutación se confirmaría la tasa de resistencia reportada aumentaría del 6,43% a al 25,71%.
- Se sugiere ampliar el estudio a nivel nacional, a fin de recopilar la mayor cantidad de datos y afirmar o negar las correlaciones entre edades, sexo y mutaciones presentes en la bacteria.
- Para la construcción de las sondas, en este caso las sondas de hibridación FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente), las moléculas del donador y del aceptor deben estar muy próximas (por una distancia de 1-5 nucleótidos).

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Ahmet U., Abderrahmán K., Yesilova Z., Cemil M., Ates Y., Yildirim K., Cigerim M., Bagci S., & Kemal D. (2004). El reciente éxito de pantoprazol o basado en la claritromicina más el tratamiento con lansoprazol amoxicilina en la erradicación de *Helicobacter pylori*. El Diario Turco de Gastroenterología; Vol 15, N° 4: 219-224.

Antelo P., Almuzara M., Avagnina A., Topor J., Berberis C., Barcia T., Araujo G., Vay C., & Famiglietti. (2001). Diagnóstico y tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* su relación con la ulcera gastrointestinal y la resistencia a los antimicrobianos. Medicina (Buenos Aires); 61: 545-551.

Argent RH., Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC. (2004) Determinants and consequences of different levels of Cag A phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology; 127: 514-23.

Ávila J., Arévalo M., Mercado M., Villamizar O., Regno W., & Trespalacios A. (2009). Comparación de las pruebas de dilución en Agar y PCR para determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Helicobacter pylori*. Revisión sistemática de la literatura. Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. Revista Colombiana Gastroenterología/ 24 (2).

Belzer C., Stoof J., Breijer S., Kusters J., Kuipers E., & Vliet A. (2009). The *Helicobacter hepaticus* hefA Gene is Involved in Resistance to Amoxicillin. Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter; 14: 72-79.

De Boer W.A. & G. N. Tytgat. (2000). Regular review: treatment of *Helicobacter pylori* infection. BMJ 320:31-34.

Chey WD & Wong BCY. (2007). American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. Am J Gastroenterol; 102: 1808-25.

Chi C., Lin C., Sheu B., Yang H., Huang A., & Wu J.(2003). Quadruple therapy containing amoxicillin and tetracycline is an effective regimen to rescue failed triple therapy by overcoming the antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther: 18: 347-353.

Cisneros M. (2009). Mecanismo de resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos Amoxicilina, Claritromicina, Levofloxacina y Metranisazol. Tesis de pregrado de la Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bacteriología. Bogotá.

Co, E.-M. A. & Schiller, N. L. (2006). Resistance Mechanisms in an In Vitro-Selected Amoxicillin-Resistant Strain of *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 4174-4176.

Costa J. (2004). Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. Enferm Infecc Microbiol Clin; 22(5):299-305.

De Francesco V., Giorgio F., Hassan C., Manes G., Vannella L., Panella C., Ierardi E., & Zullo A. (2010). Worldwide *H. pylori* Antibiotic Resistance: a Systematic. J. Gastrointest Liver Dis. Vol 19: 4: 409-414.

Debets-Ossenkopp YJ., Reyes G, Mulder J, Stegge B, Peters J., Savelkoul P, Tanca J., Peña A., Vandenbroucke-Grauls C. (2003). Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51, 141–145.

Dore M., Piana A., Carta M., Atzei A., Are B., Mura I., Massarelli G., Maida A., Sepulveda A., & Graham D., Realdi G. (1998). Amoxycillin resistance is one reason for failure of amoxycillin- pmeprazole treatment of *Helicobacter pylori* infection. Institute of Internal Medicine. Aliment Pharmacol Ther: 12: 635-639.

Dore M., Osato M., Realdi G., Mura I., Graham D., & Sepulveda A. (1999). Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 43: 47-54.

Erah P., Goddard A., Barrett D., Shaw P., & Spiller R. (1997). The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 39, 5-12.

Fernández M., & Vargas J. (2009). Infección por *Helicobacter pylori*. Prevalencia, investigación y repercusión de la resistencia antibiótica. Revista Española Enfermedad Digestivas; 101 (11): 743-756.

Falsafi T., Mobasheri F., Nariman F., & Najafi, M. (2004). Susceptibilities to Different Antibiotics of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Patients at the Pediatric Medical Center of Tehran, Iran. Journal. Clinical. Microbiology; 42: 387-389.

Fariña N., Kasamatsu E., Samudio M., Morás M., Sanabria R., & Laspina F. (2007). Susceptibilidad a antibióticos de cepas paraguayas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con enfermedad gastro-duodenal. Rev. Médica de Chile: 135; 1009-1014.

Gerrits M., Schuijffel D., Zwet A., Kuipers E., Vandenbroucke-Grauls C., & Kusters J. (2002). Alterations in penicillin- binding protein 1A confer resistance to B-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 46: 2229-2233.

Gerrits M., Godoy A., Kuipers E., Ribeiro M., Stoof J., Mendonca S., Vliet A., Pedrazzoil J., & Kusters J. (2006). Multiple Mutations in or Adjacent to the Conserved Penicillin-Binding Protein Motifs of the Penicillin-Binding Protein 1A Confer Amoxicillin Resistance to *Helicobacter pylori*. Journal compilation. Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter 11: 181-187.

Gisbert J., González L., Calvet X., García N., López T., Roque M., Gabriel R., & Pajares J. (2000). Proton pump inhibitor, clarithromycin and either amoxicillin or nitroimidazole: a meta- analysis of eradication of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther; 14: 1319-1328.

Goddard, A. F. (1998). Getting to the route of *Helicobacter pylori* treatment. J Antimicrob Chemother 42:1-3.

Godoy A., Reis F., Ferraz L., Gerrits M., Mendonca S., Kusters J., Ottoboni L., Ribeiro M., & Pedrazzoli J. (2007). Differentially expressed genes in response to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. FEMS Immunol Med Microbiol; 50: 226-230.

Goffin A., & Ghuysen J. (1998). Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. Microbioly and Molecular Biology Reviews; 62: 1079-1093.

Gómez N., Álvarez L., Zapatier J., & Vargas P. (2005). Eficacia de las pruebas de antígenos en heces y serológica para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en la población Ecuatoriana. Revista Gastroenterología Mexico, Vol 70, N° 2.

Graham J., Peek R., Krishna U., & Cover T. (2002). Global Analysis of *Helicobacter pylori* Gene Expression in Human Gastric Mucosa. Gastroenterology; 123. No.5: 1637–1648.

Graham DY, & Shiotani A. (2008). New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Nature Clin Pract Gastroenterol Hepatol; 5: 321-31.

He, Q., Wang J, Osato M, & Lachman L. (2002). Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 40:3720–3728.

Herris A., Hazell S., & Netting G. (2000). Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 45: 591-598.

Hernández M., Reyes O., & Rodríguez G. (2008). La resistencia a antimicrobianos en *Helicobacter pylori*. Revista Cubana Medicina. Ciudad de la Habana. Vol. 47, N° 4.

Holt JG., Krieg NR, Sneath PHA., Staley JT., Williams ST. (1994). Bergey's manual of determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore (MD): Williams and Wilkins:42-43, 62.

Jones K., Cha J., & Merrell S. (2008). Who's Winning the War? Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. Current Drug Therapy; 3: 190-203.

Kalach N, Serhal L, Asmar E, et al. (2007). *Helicobacter pylori* primary resistant strains over 11 years in French children. Diagn Microbiol Infect Dis; 59: 217-22.

Kato S., Fujimura S., Udagawa H., Shimizu T., Maisawa S., Ozawa K., & Iinuma K. (2002). Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* Strains in Japanese Children. Journal of Clinical Microbiology. Vol 40 N°2: 649-653.

Kleanthous H., Clayton C., & Tabaqchali C. (1991). Characterization of plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. Mol Microbiol: 5; 2377-2389.

Know D., Dore M., Kim J., Kato M., Lee M., Wu J., & Graham D. (2003). High- Level B- Lactam Resistance Associated with Acquired Multidrug Resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 47: 2169-2178.

Lascols, C., D. Lamarque, J. M. Costa, C. Copie Bergman, J. M. Le Glaunec, L. Deforges, C. J. Soussy, J. C. Petit, J. C. Delchier, & J. Tankovic (2003). Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of

clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. J. Clin. Microbiol; 41: 4573–4577.

Lejona S., Benetti M., Fay F., & Fay O. (2006). Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimersa (PCR) en tiempo real. Anuario Fundación Dr. J. r. Villavicencio N° XIV 033 – 037.

Lima M., Cunha C., Mattos G., Mendonca S., & Pedrazzoli J. (2007). Quantitative real-time PCR for the clinical detection of *Helicobacter pylori*. Genetics and Molecular Biology, 30, 2, 431-434.

Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R., Rokkas T., Vakil N., & Kuipers E. (2006). The European *Helicobacter* study Group (EHSg): Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 56: 772-728.

Mansour K., Burucoa C., Zribi M., Masmoudi A., Karoui S., Hallel L., Boubaker J., Cheikh I., Hriz M., Siala N., Ayadi A., Filali A., Mami N., Najjar T., Maherzi A., Tahar M., & Fendri C. (2010). Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of *Helicobacter pylori* isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: a prospective multicenter study. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials; 10: 9-22.

Mark E., & Schiller N. (2006). Resistance Mechanisms in an In Vitro- Selected Amoxicillin- Resistant Strain of *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 50: 4174-4176.

Matteo M., Granados G., Olmos M., Wonaga A., & Catalano M. (2008). *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenetic isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 61: 474-477.

Megraud F. (2004). *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Recent advances in clinical practice; 53: 1374-1384.

Megraud F., & Lehours P. (2007). *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Reviews; 20: 2: 280-322.

Megraud F., & Corti R. (2009). Resistencia Bacteriana del *Helicobacter pylori* en el mundo en el año 2009. Laboratorio de Bacteriología. Acta Gastroenterología Latinoamericana. Vol 39. N°4.

Meyer JM., Silliman NP., Wang W *et al.* (2002) Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study 1993–1999 . Annals of Internal Medicine 136, 13 – 24.

Momenah A., & Asghar A. (2008). Prevalencia y Resistencia a los Antibióticos entre *Helicobacter pylori* aislados Clínicos de los Hospitales principales en la Región Occidental de Arabia Saudita. Pakistan Journal of Medical Sciences Quarterly. Vol. 24 (1).

Nahar S., AK Mukhopadhyay, Khan R *et al.* (2004) *H. pylori* strains isolated in Bangladesh . Journal of Clinical Microbiology 42 , 4856 – 4858.

Ndip RN., Malange Takang AE., Ojongokpoko JE, *et al.*(2008). *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastroduodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram. Trop Med Int Health 13: 848-854.

Okamoto T., Yoshiyama H., Nakazawa T., Park I., Chang M., Yanai H., Okita K., Shirai M. (2002). A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 50, 849-856.

Owen R. (2002). Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. An International Journal of Gastroenterology and Hepatology; 50: 285-289.

Parsons HK., MJ Carter, DS Sanders, Winstanley T & Lobo AJ (2001) *Helicobacter pylori* resistencia a los antimicrobianos en el Reino Unido: el efecto de la edad, sexo y estatus socio-económico 1478 alimentario. Farmacología y Terapéutica 15, 1473 -.1478

Ralf P., Postius S., Melchers K., & Schafer K. (2001). Mutations of the *Helicobacter pylori* Genes rdxA and pbp1 Cause Resistance against Metronidazole and Amoxicillin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 45: 962-965.

Regañón D., Alarcón T., Domingo D., López M. (2006). Sensibilidad de 36 aislamientos de *Helicobacter pylori* a cuatro antibióticos de primera línea y características de virulencia. Revista Española Quimioterapia; Vol. 19. (Nº1): 34-38.

Rimbara E., Noguchi N., Kawai T., & Sasatsu M. (2008). Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 61: 995-998.

Rivas F., & Hernández F. (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Revista Biomédica; 11: 187-205.

Rodríguez W., Pareja A., & Yushimito L. (2003). Tratamiento del *Helicobacter pylori* con Omeprazol, Amoxicilina y Claritromicina en esquemas de 7 a 10 días. Revista Gastroenterología. Perú; 23: 177-183

Sanabria M. (2009). Efecto de la erradicación de *Helicobacter pylori* en la prevención del Cáncer Gástrico. Revisión Bibliográfica. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXVII (590) 427-429.

Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J., & Charlier P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiol Rev; 32: 234-258.

Serrano A., Hernández M., Garza J., & Herrera L. (2009). *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. Cancerología 4: 193-204.

Simala J., & Taylor D. (2004). Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. APMIS; 112: 886-897.

Singh V., Mishra S., Maurya P., GRKoteswar R., Jain A., Kumar V., Gulati A., & Gopal N. (2009). Drug resistance pattern and clonality in *H. pylori*. J Infect Developing Countries; 3(2):130-136.

Smith, SI, SK Oyedeji, AO Arigbabu, Atimomo C & Coker AO (2001) La alta resistencia a la amoxicilina en el *Helicobacter pylori* aisladas de la gastritis y la úlcera péptica en pacientes oeste de Nigeria. Diario de Gastroenterología 36, 67 68.

Suerbaum S. & Michetti P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. New England Journal of Medicine 347, 1175 – 1186

Tanih N. F., Clarke A. M., Mkwetshana N., Green E, Ndip L. M., & Ndip R. N. (2008). *Helicobacter pylori* infection in Africa: Pathology and microbiological diagnosis. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (25), pp. 4653-4662.

Tanih N., Okeleye B., Naidoo N., Clarke A., Mkwetshana N., Green E., Ndip L., & Ndip N. (2010). Marked susceptibility of South African *Helicobacter pylori* strains to ciprofloxacin and amoxicillin: Clinical implications. South African Medical Journal; 100: 49-52.

Tomb J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidmann, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E.,

Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M., Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature; 338; 530-47.

Torres MJ., Criado A., & Palomares JC. (2000). El uso de PCR en tiempo real y fluorimetría para la detección rápida de rifampicina e isoniazida mutaciones asociadas a resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol; 38: 3194 -9

Torres J., Carmolingo-Ponce M., et al. (2001). Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolate from children and adults in Mexico. J Clin Microbiol; 39: 2677-2680.

Tseng Y., Wu D., Chang C., Kuo C., Yang Y., Jan C., Su Y., Kuo F., Chang L. (2009). Amoxicillin resistance with B- lactamase production in *Helicobacter pylori*. Kaohsiung Medical University. European Journal of Clinical Investigation; 39 (9): 807-812.

Trespalcios A., Otero W., & Reyes M. (2009). Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronizol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. Revista Colombiana Gastroenterol / 25 (1).

Urrestarazu M., Serrano N., Piñero R., & Cavazza M. (2003). Susceptibilidad de *Helicobacter Pylori* a los antimicrobianos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Vol. 23 N° 1.

Vakil N. & Megraud F. (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. Gastroenterology; 133: 985-100.

Van Zwet AA., Vandenbroucke-Grauls CM., Thijs JC, van der Wouden EJ., Gerrits MM., Kusters JG. (1998). Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. Lancet; 352: 1595.

Vallejos C., Cerda O., Valenzuela M., & Toledo H. (2003). *Helicobacter pylori*: aspectos clínicos y moleculares. Revista Médica Chile; 131:1313-1320.

Versalovic J., Fox J., Murray P., Baron E., Pfaller M., Tenoer F., & Tenover R. (1999). *Helicobacter pylori*. Manual of Clinical Microbiology. ASM Washington; 727-738.

Versalovic J. (2003). *Helicobacter pylori*. Pathology and diagnostic strategies. Am J Clin Pathol 119:403-412.

Wang G., Trevor W., Jiang Q., & Taylor D. (2001). Spontaneous Mutations That Confer Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 45: 727-733.

Walsh C. (2003). Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. Washington, DC, ASM Press.

Woodford N., Ellington M., (2007). The Emergence of Antibiotic Resistance by Mutation. Clinical Microbiology and Infection; 13; 5-18.

Worku M., Sidebotham M., Walker M., Keshavarz T., & Karim Q. (1999). The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. Microbiology 145; 2803-2811.

Wu H., Shi X., Wang H., & Liu J. (2000). Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxicillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 46: 121-123.

ANEXOS

Anexo A. Cepa Silvestre Helicobacter pylori 1061 penicillin-binding protein 1A (pbp1A) gene, complete cds

GenBank: AF479618.1

LOCUS AF479618 1980 bp DNA linear BCT
03-JUL-2002
DEFINITION Helicobacter pylori 1061 penicillin-binding protein 1A
(pbp1A)
gene, complete cds.
ACCESSION AF479618
VERSION AF479618.1 GI:19073476
KEYWORDS .
SOURCE *Helicobacter pylori*
ORGANISM *Helicobacter pylori*
Bacteria; Proteobacteria; Epsilonproteobacteria;
Campylobacterales;
Helicobacteraceae; Helicobacter.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1980)
AUTHORS Gerrits,M.M., Schuijffel,D., van Zwet,A.A., Kuipers,E.J.,
Vandenbroucke-Grauls,C.M. and Kusters,J.G.
TITLE Alterations in penicillin-binding protein 1A confer
resistance to
beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*
JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 46 (7), 2229-2233 (2002)
PUBMED [12069978](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1980)
AUTHORS Gerrits,M.M., Schuijffel,D., van Zwet,A.A., Kuipers,E.J.,
Vandenbroucke-Grauls,C.M.J.E. and Kusters,J.G.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-JAN-2002) Gastroenterology and Hepatology,
Academic
Hospital Dijkzigt, Dr. Molewaterplein 40, Rotterdam 3015

```
/translation="MLKKIFYGFIVLFLIVMGLLAILIAQVWVTTDKDIKIKDYRPGVASQILDRKGRL  
IANIYDKEFRFYARFEEIPPRFIESLLAVEDTLFFEHGGINLDAIMRAMIRNAKSGHYTEGGSTLTQQLV  
KNMVLTREKTLTRKLKEAIIISLRIEKVLKSEEILERYLNQTFFGHGYGVKTASLGYFKKPLDKLTLKEI  
TMLVALPRAPSFYDPTKNLEFSLSRANDILRRLYSLGWISSNELK GALNEVP I VYNQTSTQNIAPYVVD E  
VLKQLDQLDGLKTQGYTIKLTIDL DYQRLALESLRFGHQKILEKIAKEKPKTNASNEDEDNLNASMIVTD  
TSTGKILALVGGIDYKKS AFNRATQAKRQFGSAIKPFVYQIAFDNGYSTTSKIPDTARNFENGNSKNSE  
QNHAWHPSNYSRKFLGLVTLQEALSHSLNLATINLSDQLGF EK IYQSLSDMGFKNLPKDLSIVLGSFAIS  
PIEAAEKYSLFSNYGTMLKPLIESITNQNDVKTFTPIETKKITSKEQAF L TSVLMNAVENGTGSLAR  
IKGLEIAGKTGTSNNNIDAWFIGFTPTLQSVIWFGRDDNTPISKGATGGVVSAPVYSYFMRNILAIEPSL  
KRKFDV PKGLRKEIVDKIPYYSTPNSITPTPKRTDDSEERLLF"
```

ORIGIN

```
1 atgctaaaaa agatTTTTta tggTTTTatc gTTTTatTTt tgattgtcat ggggttgTta  
61 gccattctta tcgctcaagt ttgggtaact acggataagg atattgctaa aattaaagat  
121 tatcgccccg gagtcgcttc acagatttta gaccgaaaag ggcgTTTgat cgctaatatc  
181 tatgataaag aattccgTTt ttatgcgcgt tttgaagaaa tccccccacg atttattgaa
```

241 agccttttag cggtagaaga caccctcttt tttgaacatg gggggatcaa ttttagacgct
301 atcatgcgcg ctatgattag aaacgctaaa agcgggtcatt acaccgaggg gggtagcacc
361 ctaaccacaac aactcgttaa aaacatgggtg ctcacacgag aaaaaaccct aaccagaaaa
421 ctcaaagaag ctatcatttc tttacgcatt gaaaaagtct taagcaaaga agaaatttta
481 gagcgttatt tgaaccaaac tttttttggg catgggtatt atggcgtgaa aaccgcaagt
541 ttaggggtatt ttaaaaaacc ctttgacaaa ctcacgctta aagaaatcac catgttagtc
601 gccttgccta gggctccaag tttttatgat cctaccaaaa atttagaatt ttcactctct
661 agggctaatt atattttaag gcggttggat tctttaggct ggatttcttc taacgagctc
721 aaagggtgctc tcaatgaagt gccaatcgctc tataaccaga cttccacgca aaatatcgct
781 ccctatgtcg tggatgaagt gttgaagcaa ttggatcaat tagacgggtt aaaaactcaa
841 ggctatacca taaagctcac gatagatttg gattaccaac gcttagcggt agagtccttg
901 cgttttgggc atcaaaaaat cttagaaaaa atcgctaaag aaaagccaaa aactaacgcc
961 tctaatagaag atgaagacaa cttaaaccgct agcatgatcg ttacagacac gagcaccggt
1021 aagatttttag ctttagtggg ggggattgat tataaaaaaa gcgctttcaa tcgcgccacg
1081 caagccaaac ggcagtttgg gagtgcgata aagccttttg tgtatcaaat cgcttttgat
1141 aatggctatt ccacgacttc taaaatccct gataccgcg cgaattttga aaatggcaat
1201 tatagtaaaa acagcgaaca aaaccacgca tggcacccca gcaattatc tcgtaagttt
1261 ttagggcttg taaccttgca agaagcctta agccattcgt taaatctagc cacgatcaat
1321 ttaagcgatc agcttggctt tgaaaaaatt tatcaatctt taagcgacat ggggtttaaa
1381 aacctcccta aagacttgctc tatcgtgtta gggagctttg ctatctcacc cattgaagcg
1441 gctgaaaagt attctttatt ttctaattac ggcaccatgc tcaaaccat gctcattgaa
1501 agcatcacta accaacaaaa cgatgtcaaa actttcacgc ccattgaaac caaaaagatc
1561 acctccaaag aacaggcttt tttaacctt tcagtgtgta tgaatgcggg agaaaacggc
1621 acagggagtt tagctcgcat taaaggttta gaaattgccg gtaaaaccgg gacttctaac
1681 aacaatattg acgcttgggt cattggcttt acccccacct tgcaaagcgt gatctgggtt
1741 gggaggggagc ataacacgcc tattagtaaa ggagcgacag gaggcgttgt gagtgcgct
1801 gtgtattegt atttcatgcy taatatttta gcgattgaac cttctttaaa aagaaagttt
1861 gatgtcccca aaggattgcy taaagaaatc gtggataaaa tcccctacta ctcaaccctt
1921 aattccatca cccccacccc caaagaaca gacgatagcy aggagcgctt gttgttctaa

Anexo B. Cepa mutante *Helicobacter pylori* Hardenberg penicillin-binding protein 1A (*pbp1A*) gene, complete cds

GenBank: AF479617.1

LOCUS AF479617 1980 bp DNA linear BCT
03-JUL-2002
DEFINITION *Helicobacter pylori* Hardenberg penicillin-binding protein
1A
(*pbp1A*) gene, complete cds.
ACCESSION AF479617
VERSION AF479617.1 GI:19073474
KEYWORDS .
SOURCE *Helicobacter pylori*
ORGANISM *Helicobacter pylori*
Bacteria; Proteobacteria; Epsilonproteobacteria;
Campylobacterales;
Helicobacteraceae; *Helicobacter*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1980)
AUTHORS Gerrits,M.M., Schuijffel,D., van Zwet,A.A., Kuipers,E.J.,
Vandenbroucke-Grauls,C.M. and Kusters,J.G.
TITLE Alterations in penicillin-binding protein 1A confer
resistance to
beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*
JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 46 (7), 2229-2233 (2002)
PUBMED [12069978](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1980)
AUTHORS Gerrits,M.M., Schuijffel,D., van Zwet,A.A., Kuipers,E.J.,
Vandenbroucke-Grauls,C.M.J.E. and Kusters,J.G.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-JAN-2002) Gastroenterology and Hepatology,
Academic
Hospital Dijkzigt, Dr. Molewaterplein 40, Rotterdam 3015
GD, The Netherlands

```
/translation="MLKKIFYGFMVLVLIIGLLAILIAQVWVTTDKDIAKIKDYRPGVASQILDRKGR  
IANIYDKEFRFYARFEEIPPRFIESLLAVEDTLFFEHHGGINLDAIMRAMIKNAKSGRYTEGGSTLTQQLV  
KNMVLTRKTLTRKLKEAIIISIRIEKVLKKEEILERYLNQTFFGHGYGVKTASLGYFKKPLDKLTLKEI  
TMLVALPRAPNFYDPTKNLEFSLSRANDILRRLYSLGWISSNELKALNEVPIVYNQSTSTQNIAPYVVDE  
VLKQLDQLDGLKTQGYTIKLTIDLDYQRLALESLRFGHQKILEQIAKEKPKTNASNEDEDNLNASMIVTD  
TSTGKILALVGGIDYKKSANRATQAKRQFGSAIKPFVYQIAFDNGYSTTSKIPDPTARNFENGYSKNSA  
QNHAWHPRNYSRFLGLVTLQEALSHSLNLATINLSDQLGFEEKIYQSLSDMGFKNLPKDLSIVLGSFAIS  
PIDVAEKYSLFSNYGSMKPLIESITDQNNIKTFTPIETKKITSKEQAFLLSVLMNAVENGTGSLAR  
IKGLEIAGKTGSSNNYIDAWFIGFTPTLQSVIWFGRDDNTPIGKGATGGVVSAPVYSYFMRNILSIEPSL  
KRKFDVVKGLRKEIVDKIPYYSTPNSITPTPKRTDDSEEPLLF"
```

ORIGIN

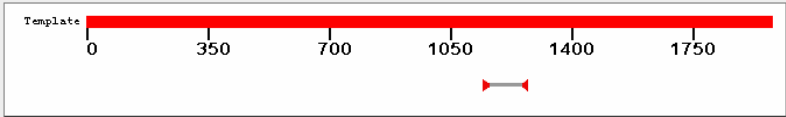
```
1 atgctaaaaa agatttttta tggttttatg gttttggttt taattatcat agggttattg  
61 gccattctta tcgctcaagt ctgggtaact acggataagg atattgcaa aattaaagat  
121 tatcgcccg gcgctgcttc acagatttta gaccgaaaag ggcgtttgat cgctaatatt  
181 tatgataagg aatttcgttt ttatgcgcgt tttgaagaaa tccccccacg atttattgaa  
241 agccttttag cggtagaaga caccctcttt tttgagcatg gggggatcaa tttggacgct  
301 atcatgcgcg ctatgattaa aaacgctaaa agcggtcggt acaccgaagg gggtagcact  
361 ctaaccaaac aactcgtaa aaacatggtg ctcacacgag aaaaaacct gaccagaaa
```

421 ctcaaagaag ccatcatttc tatacgcatt gaaaaagtct taagcaaaga agaaatttta
481 gagcgttatt tgaaccaaac tttttttggg catgggtatt atggcgtgaa aaccgcaagt
541 ttaggggtatt ttaaaaaacc ctttgacaaa ctacgcctta aagaaatcac catgttagtc
601 gccttaccta gggctccgaa tttttatgat cctacccaaa atttagaatt ttcactctct
661 agggctaagt atattttaag gcggttgat tctttaggct ggatttcttc taacgagctc
721 aaaggcgtc tcaatgaagt gccaatcgtc tataacccaa cttccacgca aaatatcgct
781 ccctatggtg tagatgaagt gttgaagcaa ttggatcaat tagacgggtt aaaaactcaa
841 ggctatacca taaaactcac gatagatttg gattaccaac gcttagcgtt agagtccttg
901 cgttttgggc atcaaaaaat cttagaacaa atcgctaaag aaaagccaaa aactaacgca
961 tctaatagag atgaagacaa cttgaacgcc agcatgatcg ttacagacac gagcaccggt
1021 aagatttttag ctttagtggg ggggattgat tataaaaaaa gcgctttcaa tcgcgccacg
1081 caagccaaac ggcagtttgg gagcgcgata aagccttttg tgtatcaaat cgcttttgat
1141 aatggctatt ccacgacttc taaaatccct gataccgcgc gaaactttga aaatggcaat
1201 tatagtaaaa acagcgcgca aaaccacgca tggcacccca gaaattattc tcgcaagttt
1261 ttagggcttg taaccttgca agaagccttg agccattcgt taaatctggc tacgatcaat
1321 ttaagcgatc agcttggctt tgaaaaaatt tatcaatctt taagcgatat ggggtttaa
1381 aacctcccta aagacttgtc ttcgtgtta gggagctttg ctatctcacc cattgatgtg
1441 gctgaaaagt attctctatt ttctaattac ggctccatgc tcaaaccat gctcattgaa
1501 agcattaccg atcagcaaaa caatatcaaa actttcacgc ccattgaaac caaaaagatc
1561 acctccaaag aacaggcttt tttaacctt tcagtactga tgaatgcggg agaaaatggc
1621 acagggagtt tggctcgcat taaaggcttg gaaatcgctg gtaaacggg gtcttctaac
1681 aactatattg acgcttgggt cattggcttt acccccaccc tacaagcgt gatctgggtt
1741 gggagagacg ataacacgcc tattggcaaa ggagcgacag gaggcgttgt gaggtcacct
1801 gtgtattcgt acttcatgcy taatattcta agcattgaac cttctttaa aagaaagttt
1861 gatgtcccca aaggattgcy taaagaaatc gtggataaaa tcccttacta ttcaaccccc
1921 aattccatca cccccacccc caaagaaca gacgatagcy aagaaccctt attattctaa

Anexo C. Alineación de primers mediante el programa de base de datos BLAST de la secuencia de genes: *Helicobacter pylori* 1061 penicillin-binding protein 1A (*pbp1A*) gene y la cepa mutante: *Helicobacter pylori* Hardenberg penicillin-binding protein 1A (*pbp1A*) gene.

Input PCR template [AF479618.1](#) Helicobacter pylori 1061 penicillin-binding protein 1A (*pbp1A*) gene, complete cds
Range 1 - 1980
Specificity of primers primer specificity was not determined as specificity checking option was not selected.

▼ **Summary of primer pairs**



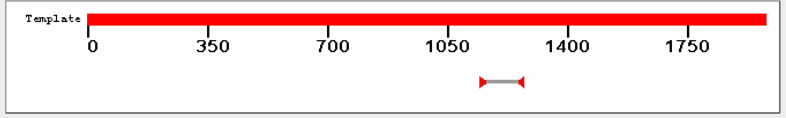
▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	GCTATTCCACGACTTCTAAA	Plus	20	1145	1164	47.09	40.00%
Reverse primer	GCAAGGTTACAAGCCCTAAA	Minus	20	1279	1260	50.13	45.00%

Input PCR template [AF479617.1](#) Helicobacter pylori Hardenberg penicillin-binding protein 1A (*pbp1A*) gene, complete cds
Range 1 - 1980
Specificity of primers primer specificity was not determined as specificity checking option was not selected.

▼ **Summary of primer pairs**



▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	GCTATTCCACGACTTCTAAA	Plus	20	1145	1164	47.09	40.00%
Reverse primer	GCAAGGTTACAAGCCCTAAA	Minus	20	1279	1260	50.13	45.00%
Product length	135						

Anexo D. Alineamiento secuencias FASTA de las cepas control silvestre y mutante mediante el programa Clustalw para identificación de la mutación.

```

1163-1279      1 AAATCCCTGATACCGCGCGAAACTTTGAAAATGGCAATTATAGTAAAAAC      50
                |||...|||
1163-1279      1 AAATCCCTGATACCGCGCGGAATTTGAAAATGGCAATTATAGTAAAAAC      50

1163-1279      51 AGCGCGCAAACCACGCATGGCACCCCAGCAATTATTCTCGCAAGTTTTT      100
                |||...|||
1163-1279      51 AGCGAACAAACCACGCATGGCACCCCAGCAATTATTCTCGTAAGTTTTT      100

1163-1279      101 AGGGCTTGTAACCTTGC      117
                |||...|||
1163-1279      101 AGGGCTTGTAACCTTGC      117
    
```

```

AGU Serina
AGC Serina
AGA Arginina
AGG Arginina
    
```


Anexo F. Ecuaciones del análisis estadístico Chi cuadrado, e inferencia por intervalo de confianza

CHI CUADRADO

H₀: No hay asociación entre las variables.

H_a: Sí hay asociación entre las variables.

χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Dónde:

O_{ij} denota a las frecuencias observadas. Es el número de casos observados clasificados en la fila i de la columna j.

E_{ij} denota a las frecuencias esperadas o teóricas. Es el número de casos esperados correspondientes a cada fila y columna. Se puede definir como aquella frecuencia que se observaría si ambas variables fuesen independientes.

ANÁLISIS INFERENCIAL POR INTERVALO DE CONFIANZA

$$\left(\hat{p} - z \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}}, \hat{p} + z \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}} \right)$$

ERROR = $z \cdot \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}}$

Dónde:

Código de variables	
y =	# de muestras resistentes a AMX
n =	# de muestras procesadas en el estudio
p =	Proporción muestral
1 - α =	Nivel de confianza
$z_{\alpha/2}$ =	Distribución normal estándar
E =	Error
L =	Límite inferior
U =	Límite superior

Anexo G. Construcción de sonda de anclaje y sonda sensor para la mutación Ser414Arg que presenta resistencia de *Helicobacter pylori* a la amoxicilina

Untitled - LightCycler Probe Design Software 2.0
 File Sequence Settings Tools Help

wt

Sequence Analysis Primer Probe Sets

Forward Primer: 1-4
 Reverse Primer: 4-4 1-2011
 Sensor: 1-4
 Anchor: 1-4
 WTGGGAACG

Rank 1 Score -233335822 MaxScore -233335822

Forward Primer	5' Pos	3' Pos	Length	GC%	Tm
GCTATCCAGGACTTCTAAA	1145	1164	20	40.0	54.9
Reverse Primer					
GCAAGGTTACAAGCCCTAAA	1279	1260	20	45.0	58.7
Sensor					
LC Red 640-TGGACCCAGCAATTATTC TGGTAAG-Phosphate	1231	1257	27	48.1	65.3
Anchor					
GGCAATTATAGTAAAAAACAGGACAAAAACCAGC-Fluorescein	1195	1229	35	40.0	67.4

Mutation: 1242 C to A
 Match: wt
 Mismatch: 59.5

Reaction Parameters

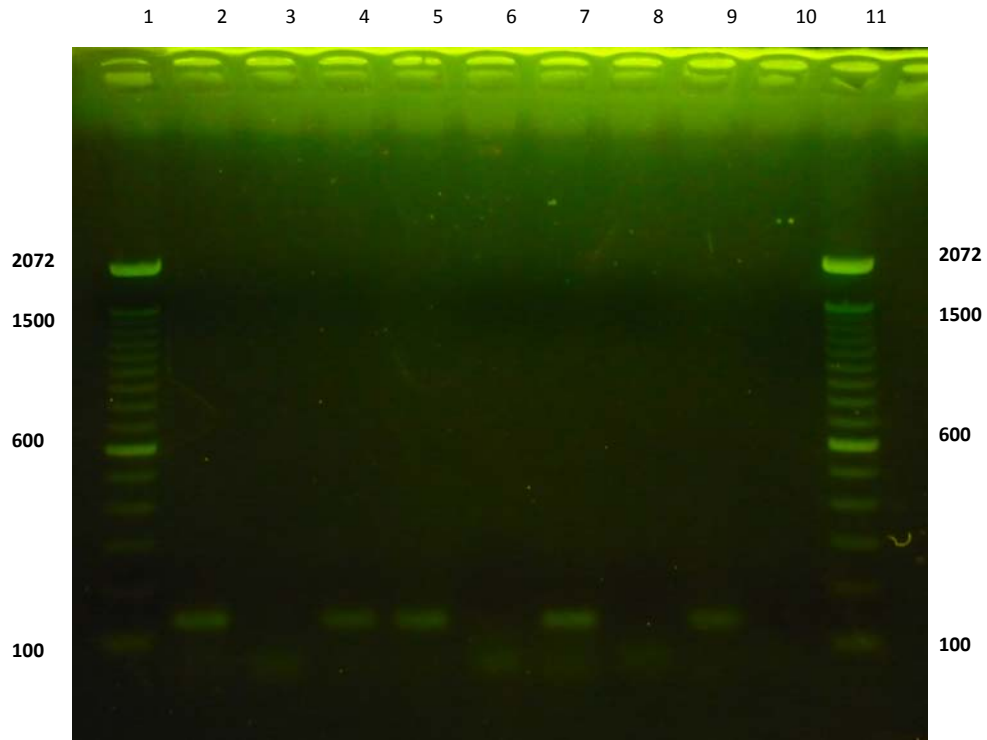
Buffer Name: LC FastStart DNA Master Plus HP
 [Mg++] (µM): 3000

Search Type: Region
 Comments:

Sequence: Analyzed From: 1135 Analyzed To: 1294
 Length: 160 GC%: 41.3
 Region: Region Start: 1145 Region End: 1279
 Length: 135 GC%: 42.2

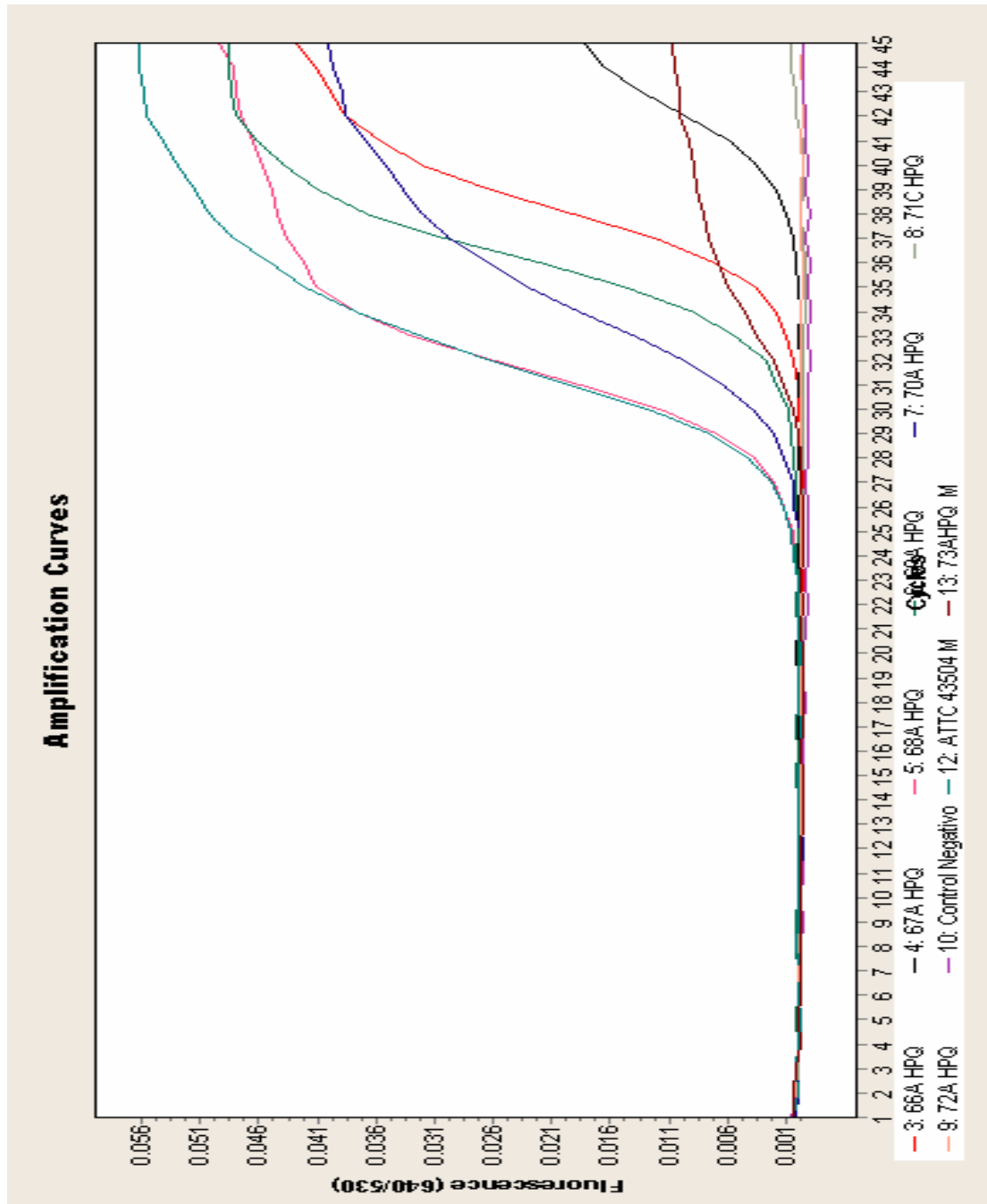
Mostrar escritorio

Anexo H. Productos de la amplificación del fragmento de 135 pb del gen *pbp1A* por la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

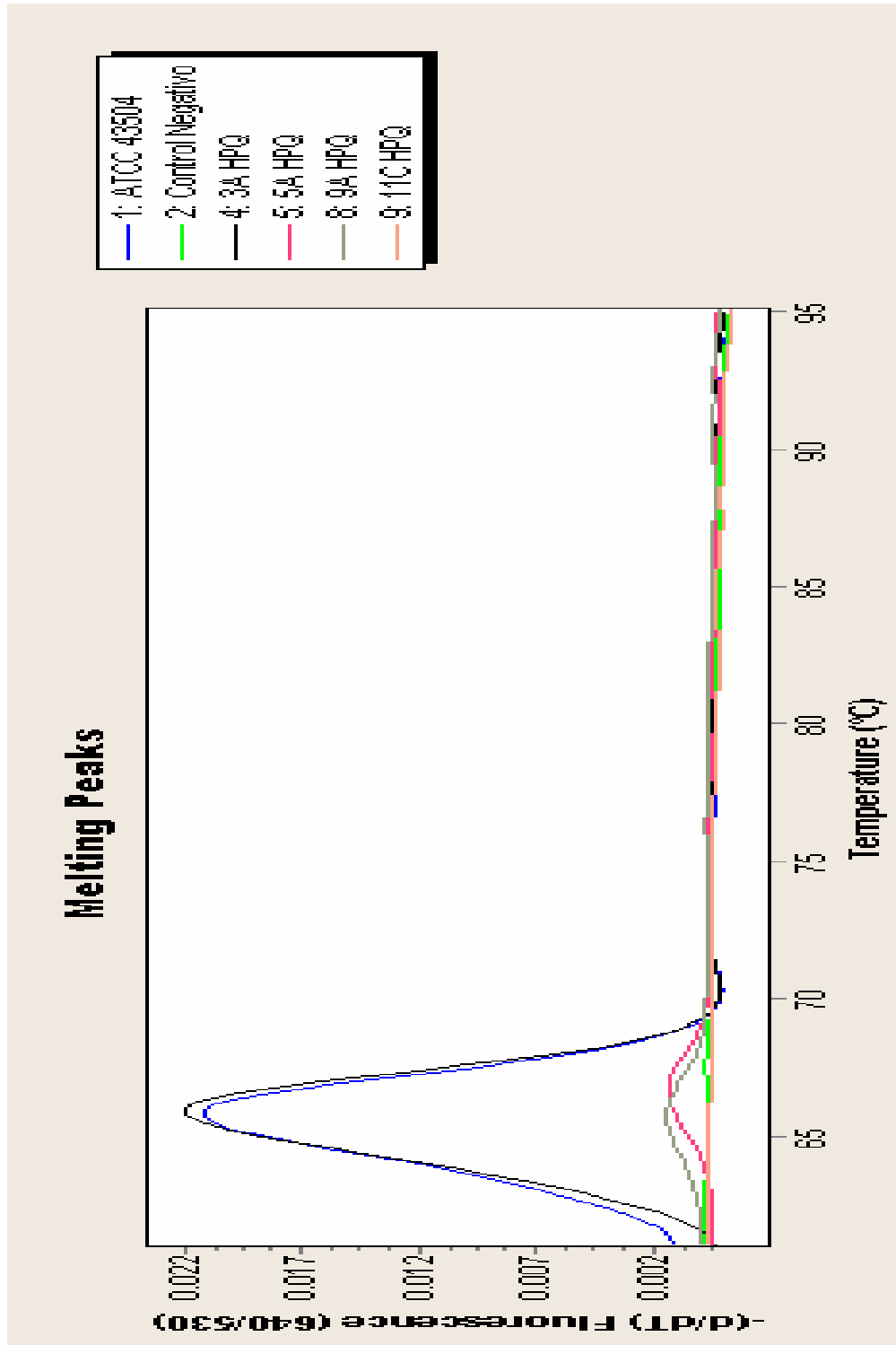


Número de pocillos	Muestras
1	Ladder 100 pb, Invitrogen.
2	Control positivo: ATCC 43504
3	Control negativo: Agua
4	2A HPQ: muestra positiva
5	3A HPQ: muestra negativa
6	Control negativo: muestra <i>S. pneumoniae</i>
7	Control positivo: ATCC 43504
8	Control negativo: Agua
9	9A HPQ: muestra positiva
10	Control negativo: muestra <i>S. pneumoniae</i>
11	Ladder 100 pb, Invitrogen.

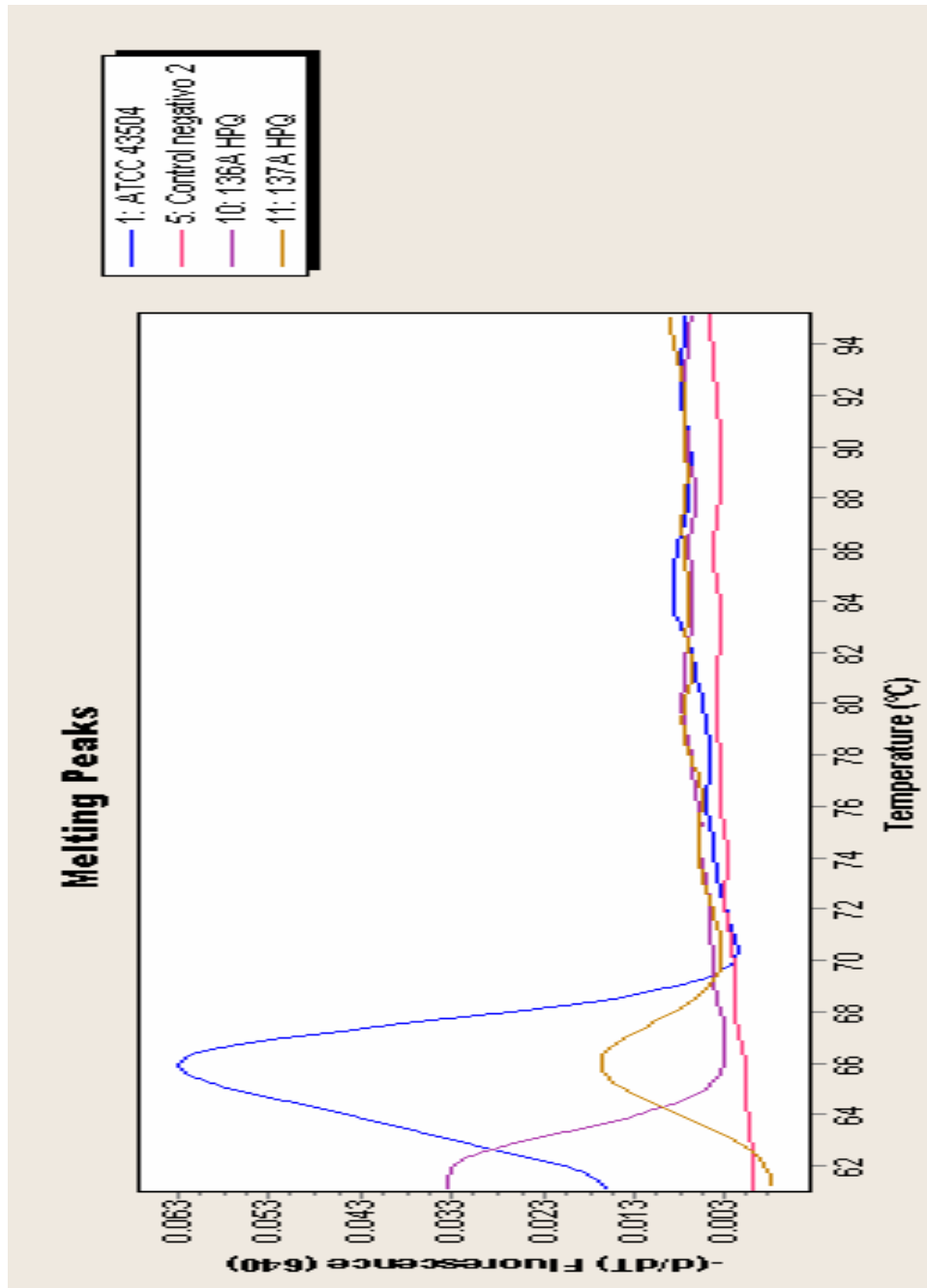
Anexo I. Productos de la amplificación del fragmento de 135 pb del gen *pbp1A* por la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).



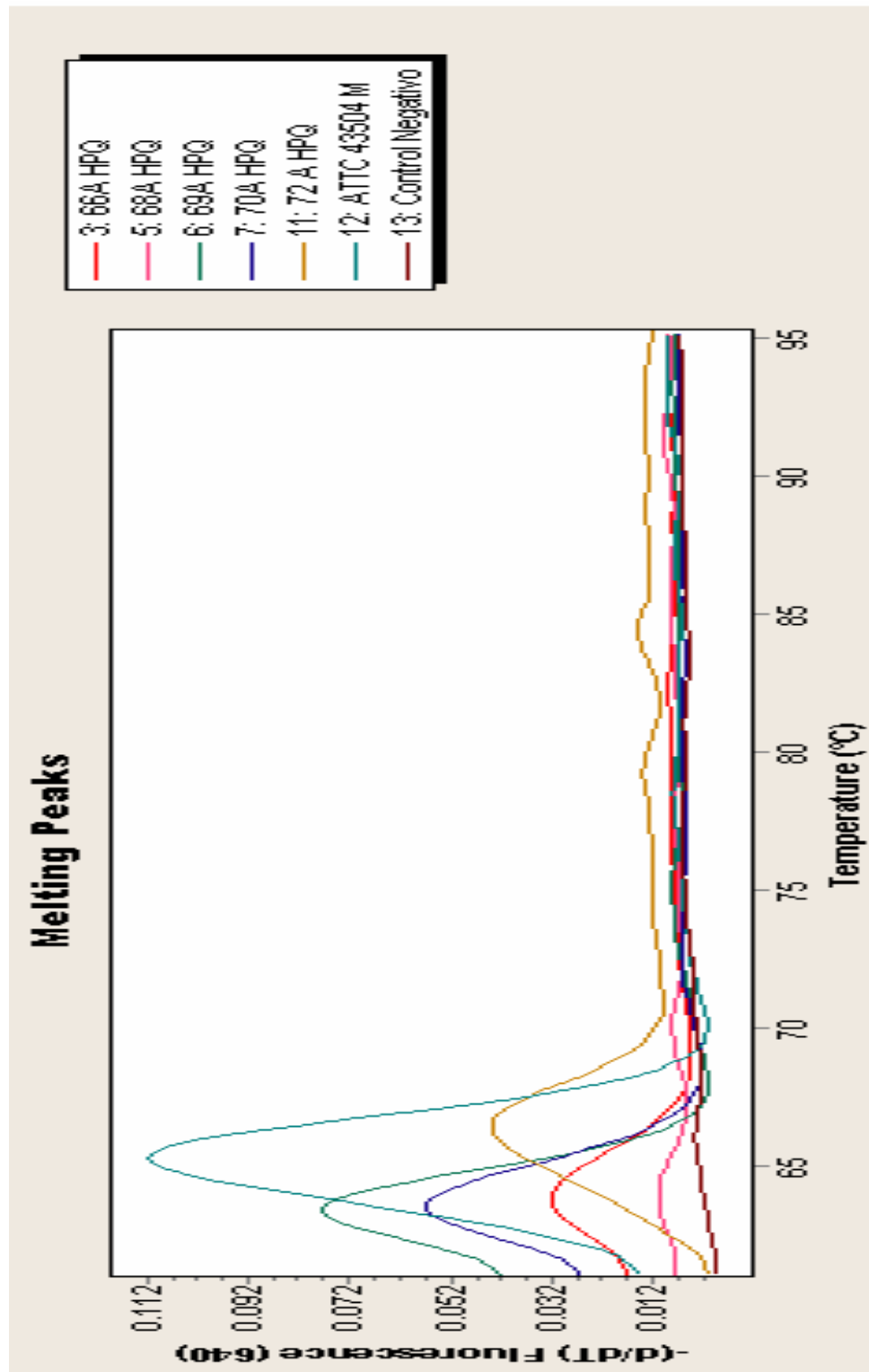
Anexo J. Curvas de melting de la cepa susceptible de *Helicobacter pylori* mediante la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)



Anexo K. Curvas de melting donde se localiza la mutación Ser414Arg del gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori*, mediante la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)



Anexo L. Productos de la curva de melting donde se localiza la mutación extra del gen *pbp1A* de *Helicobacter pylori*, la cepa susceptible y el control negativo, mediante la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)



Anexo M. Base de datos de los pacientes de los hospitales: Eugenio Espejo, Pedro Vicente Maldonado y hospital de la Policía Nacional N° 1

HOSPITAL EUGENIO ESPEJO

No.	Edad	Sexo	Tm (°C)	Mutación del gen <i>pbp 1A</i> Ser 414Arg
1	55	F	64,43	0
2	20	M	65,1	0
3	49	F	65,01	0
4	56	F	62,49	0
5	57	F	65,07	0
6	30	F	65,23	0
7	58	F	63,87	0
8	46	F	66,86	0
9	74	F	65,14	0
10	34	M	65,2	0
11	38	F	64,44	0
12	32	M	65,13	0
13	78	F	65,09	0
14	45	F	64,64	0
15	53	F	63,5	0
16	53	F	63,95	0
17	32	F	64,3	0
18	44	M	66,07	0
19	40	F	65,14	0
20	70	F	65,12	0
21	49	M	65,06	0
22	81	M	61,77	1
23	50	M	65,32	0
24	30	F	65,09	0
25	23	M	64,09	0
26	64	F	64,9	0
27	41	F	65,12	0
28	74	M	63,66	0
29	45	F	63,74	0
30	46	F	65,94	0
31	44	M	69,3	0
32	39	M	66,33	0

33	43	M	66,8	0
34	40	M	66,14	0
35	43	M	65,12	0
36	52	F	65,78	0
37	73	F	65,47	0
38	53	F	64,09	0
39	44	F	63,88	0
40	50	M	67,05	0
41	45	F	64,38	0
42	25	M	62,74	0
43	50	F	66,78	0
44	62	F	66,06	0
45	25	M	66,67	0

HOSPITAL PEDRO VICENTE MALDONADO

No.	Edad	Sexo	Tm(° C)	Mutación del gen <i>pbp 1A</i> Ser 414Arg
1	62	F	64,44	0
2	44	F	63,77	0
3	72	M	64,82	0
4	24	F	61,34	1
5	70	M	0	0
6	54	F	0	0
7	67	M	0	0
8	23	M	0	0
9	60	M	0	0
10	45	M	0	0
11	57	F	0	0
12	45	F	0	0
13	36	M	0	0
14	29	M	61,29	1
15	35	M	0	0
16	39	M	61,78	1
17	43	M	0	0
18	51	M	65,74	0
19	64	F	0	0
20	40	M	66,31	0
21	35	M	0	0

HOSPITAL POLICÍA NACIONAL N° 1

No.	Edad	Sexo	Tm (° C)	Mutación del gen <i>pbp 1A Ser 414Arg</i>
1	37	M	61,19	1
2	44	M	65,21	0
3	35	F	65,2	0
4	33	F	64,25	0
5	22	F	65,25	0
6	37	F	61,99	1
7	31	M	61,28	1
8	57	F	63,3	0
9	57	M	65,19	0
10	24	M	64,31	0
11	40	M	66,26	0
12	29	M	66,02	0
13	22	F	66,08	0
14	93	F	65,1	0
15	27	M	67,14	0
16	27	M	65,13	0
17	60	M	62,71	0
18	28	M	62,22	0
19	31	M	63,49	0
20	19	F	65,14	0
21	32	M	65,12	0
22	65	F	62,24	0
23	26	M	62,73	0
24	28	M	62,91	0
25	46	F	65,09	0
26	32	M	60,83	1
27	39	F	65,02	0
28	28	F	62,8	0
29	26	M	62,66	0
30	42	M	65,12	0
31	58	F	66,23	0
32	60	M	62,83	0
33	23	M	66,14	0
34	48	F	63,04	0
35	46	M	66,06	0

36	33	M	62,99	0
37	53	F	65,74	0
38	21	M	65,73	0
39	65	M	63,71	0
40	61	M	65,84	0
41	29	M	63,7	0
42	29	F	63,78	0
43	32	M	65,35	0
44	41	M	65,31	0
45	31	M	64,08	0
46	38	M	63,62	0
47	21	F	65,14	0
48	36	M	65,43	0
49	32	F	65,09	0
50	55	F	65,81	0
51	53	F	66,33	0
52	62	F	66,01	0
53	39	F	66,04	0
54	34	M	66,12	0
55	42	F	65,83	0
56	21	F	66,59	0
57	22	F	66,12	0
58	27	M	66,24	0
59	73	M	65,63	0
60	78	M	63,6	0
61	34	F	66,23	0
62	49	M	65,55	0
63	69	M	64,98	0
64	36	M	64,9	0
65	44	F	66,8	0
66	47	F	66,32	0
67	41	F	66,96	0
68	30	F	64,62	0
69	37	F	65	0
70	49	F	65,45	0
71	29	M	65,43	0
72	40	F	65,34	0
73	55	M	65,23	0
74	40	F	61,38	1