



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**“ANÁLISIS GENÓMICO DE LA
RESISTENCIA ANTIBIÓTICA Y SU
CONCORDANCIA
GENOTIPO/FENOTIPO EN AISLADOS
DE *Helicobacter pylori*”**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA

MISHELL LANDA FLORES

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

Dr. Luis Jesus Junior Guzman Velasquez

JURADO DE TESIS

DR. Dora Jesus Maurtua Torres

PRESIDENTE

Dra. Monica Jehnny Pajuelo Travezaño

VOCAL

Dra. Patricia Sheen Cortavarria

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA.

A mis dos madres, Lina y Janes, que nunca dudaron de lo que podría alcanzar en el camino que escogí. A mis dos sobrinas e hijas Naomi y Camila, quienes fueron mi principal motivación para seguir mejorando tanto en mi desempeño personal y profesional. A mi compañero de vida, Antony Barrientos, por su apoyo emocional y compañía en los momentos más difíciles de esta travesía.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme el camino adecuado para poder estudiar mi maestría y enfocarme en la ciencia, demostrando que Él sabe lo que hace en cada adversidad. A mi madre, por brindarme su apoyo incondicional desde los inicios de mi carrera universitaria hasta el día de hoy; ella siempre ha sido el ángel de mi vida, y este logro es gracias a ella. A mi hermana, por luchar por su vida cuando sabía que ella era parte de mis sueños, y cubrirme con su amor cuando perdía la fe en mí. A mis dos sobrinas, Naomy y Camila, quienes con su nacimiento cambiaron muchas cosas en mi vida, ellas han sido como mis primeras hijas, y su amor me ha llevado a lograr hacer cosas imposibles. A mi novio Antony, por su amor verdadero, demostrado en los momentos difíciles, y por sus sabios consejos como profesional, que fueron piezas clave en mi mejoría.

Expreso mi profundo agradecimiento a la Fundación Cobián por brindarme la oportunidad de estudiar la maestría mediante las Becas Cobián en la UPCH, un espacio donde tuve el placer de realizar este trabajo de investigación con la asesoría del Dr. Jesús Guzmán en el Laboratorio de Centinela de *Helicobacter pylori*. A quien agradezco todo el apoyo brindando ante cualquier duda que tenía sobre esta apasionante bacteria, y ser un gran consejero para mi mejora continua como profesional y personal. También agradezco a mis queridas compañeras de la maestría en Microbiología: Marjorie, María de Grecia, Angie Saguma y Ayme Huamán con quienes compartí alegrías y conocimientos.

A mis profesores y mentores, el Dr. Mirko y la Dra. Patricia, quienes me han aconsejado y me han dado la oportunidad de seguir mi camino en la investigación en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular. Agradezco su guía en los momentos más difíciles y ser mis principales referentes de calidad de persona y también científicos.

Y un afectuoso agradecimiento a mis colegas y amigos: en especial a mi mejor amiga Maciel Rodríguez, quien me brindó su apoyo sincero y me llevó a un mundo fascinante que es la bioinformática (la magia y diversión); Fresie de Carpio, Alonso Flores, Margaret Huarcaya, Diego Daiquiri, Briguitte Rivera, Luis Canales, Estrellita Díaz, David Hidalgo, Kiara Aricoché, Leonardo Cornejo y Jannireth Guerrero, por sus consejos y apoyo en este proceso.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

SIDISI N° 211483

ANÁLISIS GENÓMICO DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA Y SU CONCORDANCIA GENOTIPO/FENOTIPO EN AISLADOS DE *Helicobacter pylori*

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	datashare.ed.ac.uk Fuente de Internet	1%
2	revistabiomedica.org Fuente de Internet	<1%
3	scielosp.org Fuente de Internet	<1%
4	Evariste Tshibangu-Kabamba, Yoshio Yamaoka. "Helicobacter pylori infection and antibiotic resistance — from biology to clinical implications", Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2021 Publicación	<1%
5	www.revistagastroenterologiamexico.org Fuente de Internet	<1%
6	javeriana.edu.co Fuente de Internet	<1%
7	posgrado.cayetano.edu.pe Fuente de Internet	<1%

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Antecedentes	1
I.2. Planteamiento del problema	4
I.3. Justificación.....	6
II. OBJETIVOS	8
II.1. Objetivo principal.....	8
II.2. Objetivos específicos.....	9
III. MARCO TEÓRICO	9
III.1. <i>H. pylori</i> : Aspectos generales.....	9
III.2. Tratamiento contra la infección causada por <i>H. pylori</i>	10
III.3. Resistencia antimicrobiana.....	11
III.4. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en <i>H. pylori</i>	11
III.4.1. Mecanismos de resistencia a claritromicina	13
III.4.2. Mecanismos de resistencia a amoxicilina.....	14
III.4.3. Mecanismos de resistencia a metronidazol.....	15
III.4.4. Mecanismos de resistencia a levofloxacino.....	17
III.4.5. Mecanismos de resistencia a Tetraciclina.....	18
III.5. Métodos para evaluar la resistencia antimicrobiana en <i>H. pylori</i>	19
III.5.1. Métodos fenotípicos.....	19
III.5.2. Métodos genotípicos	20
IV. METODOLOGÍA	21
IV.1. Tipo de estudio	21
IV.2. Población	21
IV.3. Criterios de inclusión.....	22
IV.4. Criterios de exclusión	23
IV.5. Tamaño de muestra	23
IV.6. Consideraciones éticas	23
IV.7. Procedimientos	24
IV.7.1. Reactivación y cultivo de los aislados de <i>H. pylori</i>	24
IV.7.2. Identificación de cepas de <i>H. pylori</i>	24
IV.7.3. Pruebas de susceptibilidad fenotípicas	24

IV.7.4.	Pruebas de susceptibilidad genotípicas.....	25
IV.7.5.	Secuenciación de genomas completos de las cepas aisladas y la determinación de su resistencia.....	25
IV.7.6.	Análisis estadísticos.....	28
V.	RESULTADOS.....	30
V.1.	Análisis fenotípico.....	30
V.2.	Análisis bioinformático.....	32
V.2.1.	Análisis de calidad inicial y preprocesamiento de lecturas.....	32
V.2.2.	Ensamblado <i>de novo</i> y verificación de calidad de ensamblados.....	33
V.2.3.	Evaluación de la contaminación y completitud con CheckM.....	38
V.2.4.	Evaluación de completitud del ensamblaje con BUSCO.....	40
V.2.5.	Mapeo de lecturas al genoma de referencia y al ensamblado <i>de novo</i> ...	42
V.2.7.	Predicción de genes de resistencia de ensamblados de genomas de <i>H. pylori</i>	45
V.2.8.	Predicción de mutaciones en genes de resistencia a los fármacos de referencia en los ensamblados de genomas de <i>H. pylori</i>	47
VI.	DISCUSIONES.....	83
VII.	LIMITACIONES.....	128
VIII.	CONCLUSIONES.....	129
IX.	RECOMENDACIONES.....	130
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
XI.	ANEXOS.....	160

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Patrón de resistencia antibiótica de cepas secuenciadas.....	30
Tabla N°2: Concordancia del perfil genotipo y fenotípico de resistencia a claritromicina	48
Tabla N°3: Concordancia del perfil genotipo y fenotípico de resistencia a levofloxacino	51
Tabla N°4: Concordancia del perfil genotipo y fenotípico de resistencia a Amoxicilina.	56
Tabla N°5: Concordancia del perfil genotipo(<i>rdxA</i>) y fenotípico de resistencia a Metronidazol.....	66
Tabla N°6. Concordancia del perfil genotipo (<i>frxA</i> y <i>rdxA</i>) y fenotípico de resistencia a Metronidazol.....	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de susceptibilidad antibiótica de cepas secuenciadas.	31
Figura 2. Número de contigs por ensamblados de <i>H. pylori</i>	33
Figura 3. Calidad de ensamblados según la fragmentación.....	34
Figura 4. Longitud de ensamblados de cepas de <i>H. pylori</i>	35
Figura 5. Porcentaje de GC en ensamblados de <i>H. pylori</i> y referencia.....	36
Figura 6. N50 de los ensamblados de <i>H. pylori</i>	36
Figura 7. L50 de los ensamblados de <i>H. pylori</i>.	37
Figura 8. Evaluación de contaminación y completitud de los ensamblados de <i>H. pylori</i>.	39
Figura 9. Evaluación de completitud de los ensamblados de <i>H. pylori</i>.	41
Figura 10. Longitud del ensamblado frente a la densidad de codificación....	44
Figura 11. Número de elementos genómicos anotados por categoría en diversos ensamblados <i>H. pylori</i>.	45
Figura 12. Mapa de calor sobre la predicción de genes de resistencia mediante RGI	46

LISTA DE ABREVIATURAS

WGS: Secuenciación de genoma completo

RAM. Resistencia antimicrobiana

AST: Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

NGS: Secuenciación de nueva generación

CDSs: codificantes de proteínas

gyrA: Gen de la ADN girasa A

gyrB: Gen de la ADN girasa B

rdxA: Gen de la nitroreductasa NAPDH independiente de oxígeno

frxA: Gen de la flavin oxidorreductasa

pbp1A: Gen de la proteína de unión a penicilinas 1

pbp2: Gen de la proteína de unión a penicilinas 2

pbp3: Gen de la proteína de unión a penicilinas 3

pbp4: Gen de la proteína de unión a penicilinas 4

ARNr 23S: Gen de la subunidad ribosómica 23S

ARNr 16S: Gen de la subunidad ribosómica 16S

AMX-R: Resistente a Amoxicilina

LVX-R: Resistente a Levofloxacino

CLR-R: Resistente a claritromicina

TET-R; Resistente a tetraciclina

MTZ-R: Resistente a metronidazol

IBP: Inhibidor de bomba de protones

OMS: Organización mundial de la salud

RESUMEN

La rápida aparición y propagación de cepas de *Helicobacter pylori* resistentes ha disminuido la eficacia de la terapia, destacando la necesidad de tratamientos guiados por pruebas de susceptibilidad antibiótica. Sin embargo, las pruebas actuales basadas en cultivos son lentas, costosas y técnicamente desafiantes. Para superar estos obstáculos, se han desarrollado métodos basados en PCR para identificar mutaciones asociadas a la resistencia a claritromicina y levofloxacin, aunque no explican completamente la resistencia a amoxicilina y metronidazol, resultando en baja concordancia con los perfiles fenotípicos.

Los métodos basados en la secuenciación del genoma completo (WGS) han demostrado ser eficaces para detectar factores genéticos complejos responsables de la resistencia antimicrobiana en *H. pylori*. Este proyecto demostró que la WGS puede describir los múltiples mecanismos de resistencia en aislados de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos del Hospital y Clínica Cayetano Heredia, estableciendo su concordancia con la susceptibilidad fenotípica para los fármacos de referencia.

La resistencia a los fármacos de primera línea fue multifactorial, con cada mutación contribuyendo significativamente en conjunto con otras. Las mutaciones en las posiciones 2142 y 2143 del *ARNr 23S* fueron marcadores robustos de resistencia a claritromicina, con un índice Kappa de 0.714. La combinación de mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* mejoró la precisión diagnóstica de la resistencia a levofloxacin, con un índice Kappa de 0.598. Para la resistencia a amoxicilina, la combinación de mutaciones en los dominios *PBP1A* permitió una predicción moderada, con un coeficiente Kappa de 0.281. Las mutaciones en el gen *rdxA*, que

afectan la unión a FMN y la dimerización, junto con los codones de terminación prematura, son factores principales de resistencia al metronidazol ($Kappa = 0.44$). No se encontraron mutaciones en las posiciones 926-928 del *ARNr 16S*, sugiriendo mecanismos alternativos en cepas resistentes a tetraciclina.

PALABRAS CLAVES *H. pylori*, RESISTENCIA ANTIMICROBIANA, ,
SECUENCIACION DE GENOMA COMPLETO, CONCORDANCIA,
COEFICIENTE DE KAPPA, FENOTIPO, GENOTIPO

ABSTRACT

The rapid emergence and spread of resistant *Helicobacter pylori* strains have reduced the efficacy of therapy, highlighting the need for treatments guided by antibiotic susceptibility testing. However, current culture-based testing methods are slow, costly, and technically challenging. To overcome these obstacles, PCR-based methods have been developed to identify mutations associated with resistance to clarithromycin and levofloxacin, though they do not fully explain resistance to amoxicillin and metronidazole, resulting in low concordance with phenotypic profiles.

Whole-genome sequencing (WGS) methods have proven effective in detecting complex genetic factors responsible for antimicrobial resistance in *H. pylori*. This project demonstrated that WGS can describe multiple resistance mechanisms in *H. pylori* strains isolated from dyspeptic patients at Hospital y Clínica Cayetano Heredia, establishing their concordance with phenotypic susceptibility for reference drugs.

First-line drug resistance was multifactorial, with each mutation contributing significantly in combination with others. Mutations at positions 2142 and 2143 of the 23S rRNA were robust markers of clarithromycin resistance, with a Kappa index of 0.714. The combination of mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes improved the diagnostic accuracy for levofloxacin resistance, with a Kappa index of 0.598. For amoxicillin resistance, the combination of mutations in the *PBP1A* domains allowed for moderate prediction, with a Kappa coefficient of 0.281. Mutations in the *rdxA* gene, affecting FMN binding and dimerization, along with premature stop codons, are major factors in metronidazole resistance (Kappa = 0.44). No mutations

were found at positions 926-928 of the 16S *rRNA*, suggesting alternative mechanisms in tetracycline-resistant strains.

KEYWORDS:

H. pylori, ANTIMICROBIAL RESISTANCE, COMPLETE GENOME SEQUENCE, CONCORDANCE, KAPPA COEFFICIENT, PHENOTYPE, GENOTYPE

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes

Aproximadamente la mitad de la población mundial está afectada por la infección causada por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Los regímenes recomendados por el Colegio Americano de Gastroenterología y la Conferencia de Maastricht incluyen terapia triple, cuádruple y secuencial, que pueden detener la progresión de la gastritis atrófica crónica y la metaplasia intestinal, previniendo el cáncer gástrico (Cho et al., 2021). Estas terapias combinan un supresor de ácido, como los inhibidores de la bomba de protones (IBP), con antibióticos (O'connor et al., 2009).

A pesar de los diversos tratamientos, la erradicación de *H. pylori* es difícil debido a su alta resistencia antimicrobiana. Las tasas de resistencia globales son: claritromicina 5-25%, metronidazol 50-80% , tetraciclina 0-5% y amoxicilina 0-1% (Hunt et al., 2010; Megraud et al., 2013). En Perú, se reportaron tasas de resistencia de 35.2% para claritromicina, 69.9% para metronidazol, 72.1% para levofloxacino, 65.3% para amoxicilina y 7.8% para tetraciclina (Chu, 2021).

La resistencia a los antibióticos se origina principalmente por cambios genéticos en las dianas farmacológicas, impidiendo su mecanismo de acción (Tshibangu-Kabamba et al., 2021). Estudios previos han demostrado que las cepas resistentes de *H. pylori* presentan cambios genéticos cromosómicos, no extracromosómicos, como plásmidos. Estos cambios, que incluyen mutaciones de cambio de lectura, sin sentido, inserciones y deleciones, resultan en resistencia antimicrobiana (Argueta et al., 2022; Tshibangu-Kabamba et al., 2021). Otros mecanismos de resistencia,

como bombas de eflujo, formación de biopelículas y formas cocoides, requieren más investigación (van Amsterdam et al., 2005; Hou et al., 2022).

Mediante métodos moleculares tradicionales, se han detectado numerosas mutaciones en el sitio de unión a macrólidos del gen *ARNr 23S*, relacionadas con la resistencia a claritromicina. Las mutaciones A2142G, A2142C y A2143G han sido confirmadas experimentalmente como contribuyentes a esta resistencia (Taylor et al., 1997). La secuenciación de próxima generación (NGS) ha identificado cambios puntuales en las posiciones de nucleótidos 2142 y 2143 del gen *ARNr 23S* como determinantes clave de la resistencia a claritromicina (De Francesco et al., 2010; Tshibangu-Kabamba et al., 2020; Taylor et al., 1997).

El mecanismo de resistencia a metronidazol no está completamente explicado. Se han descrito diversos mecanismos, como la reducción de la actividad de las nitroreductasas de *H. pylori*, debido a mutaciones puntuales y de cambio de marco en los genes *rdxA* y *frxA*, que codifican las enzimas NAD(P)H nitroreductasa y NAD(P)H flavin nitroreductasa, respectivamente (Argueda et al., 2022). La NGS ha identificado determinantes genéticos adicionales, como inserciones, deleciones y mutaciones sin sentido en estos genes (Saracino et al., 2021; Vital et al., 2022). Sin embargo, también se han encontrado cepas resistentes al metronidazol sin mutaciones en *rdxA* y/o *frxA* (Lauener et al., 2019; Domanovich-Asor et al., 2020). La WGS ha permitido estudiar otros genes hipotéticos relacionados con la resistencia a metronidazol, como *recA*, *sodB*, *fur*, *mdaB*, *ribF*, *omp11* y *rpsU* (Binh et al., 2015; Tshibangu-Kabamba y Yamaoka, 2021).

El levofloxacino tiene como blanco las subunidades de las enzimas girasas (*gyrA* y *gyrB*), esenciales para la síntesis de ADN y transcripción (Miyachi et al., 2006). La

resistencia a este fármaco se debe principalmente a mutaciones puntuales en las regiones QRDR del gen *gyrA*. La WGS ha identificado mutaciones dentro y fuera de las QRDR en *gyrA* y *gyrB* que contribuyen a esta resistencia (Hu et al., 2016; Tshibangu-Kabamba et al., 2020).

La resistencia de *H. pylori* a la amoxicilina se atribuye a cambios genéticos en los genes PBP, especialmente en los motivos SXN/SXXX/KTG de *PBP1A*, *PBP2* y *PBP3* (De Francesco et al., 2011). La WGS ha confirmado la relevancia de los cambios genéticos en *pbp1* y otros posibles mecanismos de resistencia en los genes *hofH*, *hefC* y *hopC* (Qureshi et al., 2014).

La resistencia a tetraciclina está relacionada con sustituciones en el sitio de unión primario en el gen *ARNr 16S* (Gerrits et al., 2002; Ramirez et al., 2012).

Los estudios genómicos iniciales determinaron mutaciones puntuales y complejas en genes asociados a la resistencia a claritromicina, tetraciclina, levofloxacino y rifampicina, mostrando buena concordancia con el perfil de susceptibilidad fenotípica, excepto para metronidazol (Lauener et al., 2019; Tuan et al., 2019). El análisis del resistoma completo también demostró un alto rendimiento en la predicción del perfil fenotípico para amoxicilina, claritromicina y levofloxacino, y moderado para metronidazol (Tshibangu-Kabamba et al., 2020; Saranathan et al., 2020).

Los estudios en Perú han mostrado altas tasas de resistencia a metronidazol y claritromicina, con tasas moderadas a amoxicilina y bajas a tetraciclina (Boehnke et al., 2017; Bilgiler et al., 2020; Olano et al., 2021). Estas altas tasas subrayan la necesidad de estrategias de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en Perú

I.2. Planteamiento del problema

La resistencia a los antibióticos es un problema creciente para las terapias de erradicación de *Helicobacter pylori*. En particular, las tasas de resistencia a claritromicina, metronidazol y levofloxacino en la mayoría de países, incluyendo Latinoamérica han aumentado significativamente (Savoldi et al., 2018). En Perú, según los reportes recientes, las tasas de resistencia primaria a claritromicina, levofloxacino y metronidazol han sobrepasado los límites aceptados, presentando tasas de resistencia de hasta 29,7%, 44,4%, 59,1% respectivamente (Boehnke et al., 2017).

Esto se debe a que, en muchos países, incluyendo Perú, no existen guías locales de tratamiento basadas en la epidemiología local, en cambio se utilizan protocolos globales basados en tratamientos empíricos que pueden pasar por alto situaciones particulares, por ejemplo, regiones con tasas de resistencia específicas. Además, la falla terapéutica se ha intensificado porque estos tratamientos no son guiados por reportes de resistencia individual del paciente (Arama et al., 2016; Savoldi et al., 2018). Respecto, a los métodos convencionales utilizados para evaluar la resistencia a los antibióticos en *Helicobacter pylori* se basan en cultivos bacterianos y pruebas de susceptibilidad a fármacos, que son los estándares de oro para las pruebas de diagnóstico de resistencia fenotípica de esta bacteria (Saleem y Howden, 2020).

Sin embargo, debido al lento crecimiento de la bacteria y los requisitos particulares del cultivo *in vitro*, este no es aplicado como un ensayo de rutina en los laboratorios clínicos, especialmente en los hospitales pequeños y medianos de Perú. La razón

principal, es porque estos laboratorios de microbiología clínica no cuentan con los recursos necesarios para realizar la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en *H. pylori* (Bilgilier et al., 2021; Nishizawa y Suzuki).

Por lo tanto, para abordar estos desafíos de la ejecución de la prueba de susceptibilidad fenotípica de *H. pylori*, se necesitan técnicas independientes al cultivo *In vitro*. Para ello, existen alternativas basadas en técnicas moleculares tradicionales que permiten identificar determinantes genéticos en regiones de genes asociados a la resistencia antimicrobiana. Así, en diversos estudios han podido caracterizar la resistencia antibiótica a nivel de genotipo en *H. pylori*, mediante PCR convencional seguido de la secuenciación de amplicones, a fin de identificar mutaciones específicas en un gen diana y determinar el vínculo de concordancia con su perfil fenotípico (Stepanian, 2020; Teh et al., 2014; Smith, O'Morain, y McNamara, 2014).

No obstante, estas pruebas moleculares tradicionales son limitadas, debido a que esta metodología sólo puede examinar un número limitado de posiciones de nucleótidos y pueden producir falsos negativos cuando surgen nuevos polimorfismos que confieren resistencia al fármaco y que no están incluidos en el ensayo. Así como también, en algunos casos no cubren todas las posibles variantes estructurales complejas que confieren resistencia antimicrobiana, como las mutaciones sin sentido, mutaciones que cambian el marco de lectura, inserciones y deleciones (Stepanian, 2020; Tshibangu-Kabamba et al., 2021).

Otra problemática que enfrentan las pruebas basadas en PCR convencional es que presentan baja concordancia con sus perfiles fenotípicos, especialmente en aquellos fármacos cuyo mecanismo molecular de resistencia no ha sido develado por completo (ejemplo: metronidazol y amoxicilina. Por ello, es necesario caracterizar la resistencia antimicrobiana mediante un enfoque basado en WGS a fin de obtener un panorama más completo de determinantes genéticos asociadas a resistencia antibiótica (Tuan et al., 2019).

I.3. Justificación

Uno de los desafíos cada vez más grandes en el manejo de la infección por *H. pylori* es la aparición de resistencia a los antimicrobianos de referencia, siendo esta la principal causa de los fracasos del tratamiento contra la infección por esta bacteria (Camargo et al., 2014; Abadi, 2017).

Recientemente, el enfoque basado en NGS ha surgido como una herramienta completa, robusta y rápida para la vigilancia, la predicción de resistencia a los antibióticos y el análisis evolutivo de enfermedades infecciosas (Jiang et al., 2019; Ellington et al., 2017). Así, el método basado en NGS para la detección de la resistencia a los antimicrobianos en *H. pylori* presenta varias ventajas sobre los métodos tradicionales basados en PCR (Goldberg et al., 2015; Hendriksen et al., 2019). Por ejemplo, a veces la resistencia a los fármacos de referencia en *H. pylori* puede surgir a partir de mutaciones en posiciones dispersas de la secuencia analizada, por lo que se requiere que la base del enfoque molecular cubra una longitud de secuencia completa del gen asociado a la resistencia para alcanzar su máximo rendimiento; esto sucede con mayor frecuencia en los análisis de la

resistencia a amoxicilina y metronidazol (Tshibangu-Kabamba et al., 2020; Maljkovic et al., 2020; Gardy y Loman, 2018). Por lo tanto, la vigilancia de resistencia antimicrobiana enfocada en la secuenciación de genoma completo en *H. pylori* brinda una visión holística del gen relacionado a la resistencia antimicrobiana (Tshibangu-Kabamba et al., 2020).

Desde otra perspectiva, los métodos basados en WGS son particularmente relevantes para rastrear factores genéticos complejos y multifactoriales que impulsan la resistencia antimicrobiana y ofrecen un potencial interesante para el descubrimiento de genotipos nuevos o raros que codifican la resistencia antimicrobiana en aislados clínicos de *H. pylori* (Tshibangu-Kabamba et al., 2020; MacCannell, 2016; Goldberg et al., 2015). Por ejemplo, Tshibangu-Kabamba et al. (2020), mediante la secuenciación del genoma completo de cepas resistentes de *H. pylori*, reportó mecanismos de resistencia molecular a metronidazol, basados en deleciones e inserción de secuencias grandes en el gen *rdxA*.

Por otro lado, diversos estudios de resistencia a claritromicina y levofloxacino han usado la secuenciación del genoma completo de *H. pylori* para validar la concordancia entre mutaciones previamente estudiadas (A2142G, A2143G y A2143C en el gen que codifica el *ARNr 23S*; D91N y N87K en el gen *gyrA*) y su perfil fenotípico. Es importante mencionar, que estas mutaciones han sido estudiadas bajo dos enfoques, el primero a través de aproximaciones experimentales mediante mutagénesis y transformación, y el segundo bajo comparaciones estadísticas significativas y robustas en cepas de *H. pylori* con fenotipos resistentes y susceptibles (Tshibangu- Kabamba y Yamaoka, 2021; Trespalacios et al., 2015;

Wan et al., 2020). En consecuencia, estos estudios han brindado marcadores genéticos confiables que pueden ser empleados en estrategias para el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido de resistencia antimicrobiana para estos antibióticos (Trespacios et al., 2015; Lee et al., 2014).

De acuerdo a este contexto, el presente proyecto de investigación pretende demostrar que la secuenciación de genoma completo es muy útil para describir de manera completa los múltiples mecanismos de resistencia para los fármacos de referencia a partir de la caracterización molecular de resistencia de cepas aisladas provenientes de pacientes dispépticos del Hospital Cayetano Heredia y Clínica Cayetano Heredia. Esto incluye detectar determinantes genéticos locales de alta confianza o concordantes con su perfil fenotípico de resistencia, a fin de ser utilizados en estrategias de diagnóstico rápido en los puntos de atención al paciente (Baltrus et al., 2009). Así como también, detectar posibles marcadores que requieren una comprobación experimental (Tshibangu- Kabamba y Yamaoka, 2021).

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo principal

Caracterizar a nivel molecular la resistencia antimicrobiana mediante la secuenciación del genoma completo a partir de aislados de *H. pylori* provenientes de pacientes dispépticos del Hospital Cayetano Heredia y la Clínica Médica Cayetano Heredia, y establecer su concordancia con la susceptibilidad fenotípica para los fármacos de referencia.

II.2. Objetivos específicos

- Determinar las métricas de calidad de secuenciación y ensamblaje genomas secuenciados de aislados de *H. pylori*.
- Determinar el resistoma de los aislados de *H. pylori* según los antibióticos de referencia (claritromicina, tetraciclina, levofloxacina, amoxicilina y metronidazol), basado en la secuenciación del genoma completo.
- Determinar la concordancia entre la resistencia antimicrobiana *In-vitro* y el perfil de resistoma de genomas completos de los aislados.

III. MARCO TEÓRICO

III.1. *H. pylori*: Aspectos generales

Helicobacter pylori tiene forma espiral, es Gram-negativa, microaerofílica y mide entre 2 a 4 μm de largo y 0,5 a 1 μm de ancho, con 2 a 6 flagelos polares que le permiten colonizar el estómago humano. Puede transformarse en forma cocoide como mecanismo de supervivencia y resistencia antimicrobiana (Kusters et al., 2006; Tomb et al., 1997)

H. pylori crece mejor a 30°C y un pH de 4.0-6.0 en condiciones de microaerofilia, aunque puede sobrevivir in vivo en un pH tan bajo como 2.5. Es difícil de cultivar in vitro debido a sus requerimientos específicos de microaerofilia, medios de cultivo selectivos y suplementos, y requiere hasta 10 días de incubación (Berg et al., 1997; Doig et al., 1999).

III.2. Tratamiento contra la infección causada por *H. pylori*

Las terapias para combatir la infección causada por *H. pylori* se basan en el uso combinado de antibióticos y un supresor de la acidez gástrica. Los antibióticos utilizados en los diferentes esquemas de erradicación contra *H. pylori* incluyen metronidazol, tetraciclina, amoxicilina, levofloxacino y claritromicina (Arslan et al., 2017).

Según el Informe de Consenso de Maastricht V/Florence, la elección del tratamiento de erradicación debe basarse en las tasas de resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos en la región (Malfertheiner et al., 2017). La mayoría de las guías recomiendan evitar la claritromicina y la levofloxacina en regímenes empíricos en regiones donde la tasa de resistencia local está por encima de un 15 % (Malfertheiner et al., 2007).

La terapia triple es el tratamiento estándar y empíricamente prescrito por muchos médicos gastroenterólogos, que se basa en la administración de tres drogas: claritromicina, amoxicilina (o metronidazol si el paciente es alérgico a las penicilinas) y un inhibidor de la bomba de protones por 14 días. En casos donde la población local muestra alta resistencia a la claritromicina, la terapia cuádruple que contiene bismuto (IBP, bismuto, tetraciclina y amoxicilina) o la terapia cuádruple sin bismuto (concomitante) ha sido recomendada como segunda línea de erradicación de *H. pylori* (Malfertheiner et al., 2016).

III.3. Resistencia antimicrobiana

H. pylori es intrínsecamente resistente a glucopéptidos, cefsulodina, polimixinas, ácido nalidíxico, trimetoprim, sulfonamidas, nistatina, anfotericina B y cicloheximida. Varios de estos se emplean como agentes selectivos en medios de cultivo (Tuan et al., 2019). Además, se sabe que la resistencia antimicrobiana de *H. pylori* se debe a los cambios genéticos en el cromosoma, que modifica el objetivo blanco del fármaco (Tshibangu-Kabamba et al., 2021).

La frecuencia de resistencia a los antimicrobianos está vinculada al uso inapropiado de los antibióticos. En particular, en países donde el uso de claritromicina es poco frecuente, las tasas de resistencia a este antibiótico son bajas, mientras que en países en donde su uso es amplio, las tasas de resistencia a este antibiótico son altas (Camargo et al., 2014). Por lo tanto, la resistencia antimicrobiana depende del uso de las terapias que se usan en el país, región o etnia.

Se ha informado que la prevalencia en la resistencia a claritromicina entre los años 2012-2016 fue del 20% en América, 32% en el Mediterráneo Oriental, 28% en Europa, 21% en el Sudeste de Asia, y 35% en el Pacífico Occidental, mientras que en Latinoamérica en los años de 1988 al 2011 fue 12%, según la OMS.

III.4. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en *H. pylori*

La resistencia a los antimicrobianos en *H. pylori* es debido principalmente a mutaciones en la secuencia génica diana, que afectan al objetivo del fármaco o inhiben la activación de este dentro de las células (Arévalo et al., 2019). Los

estudios sugieren que, a diferencia de otras bacterias, estas mutaciones están codificadas cromosómicamente y no en elementos extracromosómicos como plásmidos (Mégraud et al.2015; Mégraud y Lehours, 2007) (Anexo 1).

Además, existen otros mecanismos de resistencia con relevancia clínica limitada, como la sobreexpresión de proteínas de membrana externa que reducen la permeabilidad celular y la formación de biopelículas que actúan como barreras físicas y favorecen el intercambio genético (Tshibangu-Kabamba y Yamaoka, 2021; Smiley et al., 2013; Yonezawa et al., 2013) (Anexo 1).

También se han identificado proteínas de eflujo que expulsan los antibióticos fuera de la célula, contribuyendo a la resistencia a amoxicilina, metronidazol, claritromicina y tetraciclina, aunque se requiere mayor investigación para entender completamente su rol (Iwamoto et al., 2014; Qureshi et al., 2014). Además, las formas cocoides de *H. pylori* persistentes en la mucosa gástrica durante los tratamientos de erradicación pueden restaurar su crecimiento y llevar al fracaso del tratamiento (Gong y Yuan, 2018; Thung et al., 2016) (Anexo 1).

III.4.1. Mecanismos de resistencia a claritromicina

La claritromicina, un macrólido efectivo contra *Helicobacter pylori*, se absorbe bien en la mucosa gástrica y es estable en el pH ácido del estómago. Su acción se basa en unirse al *ARNr 23S*, interfiriendo con la síntesis de proteínas. (Vester & Douthwaite; Rodvold et al., 1999; Smith et al., 2014) (Anexo 2).

La resistencia a la claritromicina en *H. pylori* se debe principalmente a mutaciones en el *ARNr 23S*, que impiden la unión del fármaco a la subunidad ribosomal 50S. Estas mutaciones, como A2143G y A2142G, están generalmente presentes en ambas copias del operón de *ARNr 23S*. Existen cepas con alto ($MIC > 64$ mg/L) y bajo nivel de resistencia ($0.5 \leq MIC \leq 1$ mg/L) (Anexo 2).

Las mutaciones más comunes son A2143G y A2142G, y con menor frecuencia, A2142C (Mégraud, 2004; Trespalacios et al., 2013). Otras mutaciones como A2115G, G2141A, G2172T, T2182C, T2190C, C2195T, A2223G, G2224A, G2245T, G2254T, T2289C y C2611A también se han asociado con resistencia primaria o secundaria a claritromicina (Hao et al., 2004; Kim et al., 2008; Rimbara et al., 2008a; Zhu et al., 2013) (Anexo 2).

Además, las bombas de eflujo de múltiples fármacos, especialmente de la familia RND, contribuyen a la resistencia expulsando el antibiótico de la célula. Tres operones putativos en *H. pylori* son hefABC, hefDEF (*cznABC*) y hefGHI (*czcAB-crdB*) (Ma et al., 1995; Hirata et al., 2010). Entonces es probable que exista un efecto sinérgico entre las mutaciones del *ARNr 23S* y las bombas de eflujo en las cepas resistentes de *H. pylori*; siendo el primer mecanismo que conduce a reducir la

afinidad de la claritromicina por el ribosoma y el segundo expulsa el antibiótico disminuyendo su concentración en el citoplasma (Marques et al., 2020) (Anexo 2). Por último, en los estudios de Smiley et al. (2013), se reportó que, al exponer cepas susceptibles a dosis bajas de claritromicina, se generaron mutaciones en los genes *infB* (factor de iniciación de la traducción IF-2) y *rpl22* (proteína ribosómica L22), las cuales contribuyeron a un bajo nivel de resistencia a la claritromicina (valor MIC bajo). Además, algunas cepas que presentaban mutaciones en los genes *rpl22*, *infB* y *ARNr 23S* mostraron un valor de MIC muy alto (De Francesco et al., 2010; Tshibangu-Kabamba et al., 2020; Taylor et al., 1997) (Anexo 2).

III.4.2. Mecanismos de resistencia a amoxicilina

La amoxicilina es un antibiótico β -lactámico bactericida de la familia de las penicilinas. Actúa uniéndose a las proteínas de unión a penicilinas (PBPs, por sus siglas inglés, penicillin-binding proteins), inhibiendo la síntesis de peptidoglicano y la pared celular bacteriana (Hu et al., 2016; Gerrits et al., 2006) (Anexo 3).

Los cambios en las PBPs de *H. pylori* son el principal mecanismo de resistencia a la amoxicilina. Las mutaciones en el gen *pbp1*, que codifica *PBP1*, causan cambios en el C-terminal, reduciendo la afinidad del antibiótico por *PBP1*. Las mutaciones principales en *PBP1* son N107R, A201V, V250I y S543T (Saranathan et al., 2020) (Anexo 3).

También se han reportado mutaciones en los genes *pbp2* y *pbp3*, que podrían contribuir a la resistencia a la amoxicilina junto con las mutaciones en *pbp1*. Sin embargo, estas no están completamente estudiadas (Arslan, Yilmaz, y Demiray-

Gurbuz, 2017). Adicionalmente, se han identificado mutaciones en los genes *hopB* y *hopC*, que codifican porinas de la membrana externa y facilitan la difusión de amoxicilina fuera de la célula, reduciendo su concentración intracelular (Kwon et al., 2003; Hu et al., 2016).

III.4.3. Mecanismos de resistencia a metronidazol

El metronidazol es un nitroimidazol sintético con acción bactericida contra microorganismos anaeróbicos (Debets-Ossenkopp et al., 1995). Su activación se produce mediante nitroreductasas que generan radicales libres que dañan el ADN bacteriano (Smith y Edwards, 1995). En el entorno microaerófilo de *H. pylori*, el oxígeno compite con el metronidazol por los electrones, formando superóxidos que también dañan el ADN (Cederbrant et al., 1992).

En específico, el principal mecanismo de resistencia a metronidazol en *H. pylori* se origina por la presencia de mutaciones en el gen *rdxA* que codifica una NADPH nitroreductasa insensible al oxígeno, cuya expresión es esencial para la activación intracelular del fármaco, y es potenciada por las mutaciones en el gen *frxA*, que codifica una NAD(P)H-flavina oxidorreductasa y secundariamente las mutaciones en el gen *fdxB* (que codifica una proteína similar a la ferredoxina) (Bejarano, 2010; Vallejos et al., 2003; Megraud et al., 2003). Dentro de las mutaciones se incluyen: mutaciones puntuales, mutaciones sin sentido, mutaciones con cambio de sentido, mutaciones que producen desplazamiento en el marco de lectura, deleciones e inserciones, que resultan en la síntesis prematura de la proteína *RdxA*, produciendo polipéptidos de *RdxA* incompletos o inactivos. Estos tipos de mutaciones también

se han encontrado en el gen *frxA* (Kwon et al., 2000; Vallejos et al., 2003) (Anexo 4).

La resistencia al metronidazol también se debe a la sobreactividad en la eliminación de radicales de oxígeno, destacando la sobreexpresión de la superóxido dismutasa (SodB). Esta sobreexpresión, inducida por una proteína reguladora mutada (Fur), protege contra los superóxidos y facilita su dismutación en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Además, la mutación *furR3I* altera el potencial redox intracelular, contribuyendo a la resistencia. Aunque estos mecanismos pueden mediar la resistencia en *H. pylori*, su relevancia clínica requiere más investigación (Choi et al., 2011; Tsugawa et al., 2011) (Anexo 4).

La investigación sobre las enzimas de reparación del ADN aún no ha aportado resultados concluyentes. Estudios recientes han demostrado que las mutaciones en el gen que codifica RecA podrían estar asociadas con un aumento en la actividad de la recombinasa A (RecA) (Thompson y Blaser, 1995) (Anexo 4). Otros mecanismos de resistencia al metronidazol incluyen el aumento del eflujo del fármaco y la disminución de su absorción. En cuanto a las bombas de eflujo, las investigaciones se han centrado en los sistemas de la familia de división de nodulación de resistencia (RND). Específicamente, el aumento de la expresión de genes homólogos de TolC (*hp0605*, *hp0971*, *hp1327* y *hp1489*) podría regular positivamente la actividad de la bomba de eflujo, contribuyendo así a la resistencia al metronidazol (Hiyama et al., 2003).

Por último, estudios recientes sobre la secuenciación del genoma completo de cepas de *H. pylori* han identificado mutaciones candidatas en el gen *rpsU*, que podrían contribuir a la resistencia al metronidazol (Binh et al., 2015). Este gen codifica una

proteína ribosomal 30S (S21) y participa en la síntesis de proteínas en *H. pylori*. Además, su participación en cepas recombinantes de *E. coli* resistentes a antibióticos sugiere que podría desempeñar un papel en la resistencia al metronidazol en *H. pylori* a través de un mecanismo desconocido (Bubunenko et al., 2007) (Anexo 4).

III.4.4. Mecanismos de resistencia a levofloxacino

Las mutaciones puntuales en los genes que codifican la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) son responsables de la resistencia a levofloxacino en *H. pylori*. Este microorganismo solo posee genes de la ADN girasa, por lo que la resistencia se asocia exclusivamente a mutaciones en *gyrA* y *gyrB* (Mégraud et al., 2015) (Anexo 5).

Diversos estudios han identificado tres posiciones en el gen *gyrA* que confieren resistencia a quinolonas: codón 87 (Asn a Lys, Tyr, Ile), codón 91 (Asp a Gly, Asn, Tyr), y codón 88 (Asn a Val) en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) de *GyrA* (Secka et al., 2013; Trespalacios et al., 2015; Trespalacios-Rangél et al., 2016). La resistencia baja a quinolonas (MIC bajo) puede resultar de una mutación en la posición 91, mientras que una mutación en la posición 87 puede conducir a una resistencia alta (MIC alto) (Murakami et al., 2009). Otras mutaciones que pueden conferir resistencia a fluoroquinolonas incluyen D86N, T87I y N87Y (Barnard & Maxwell, 2001; Moore et al., 1995) (Anexo 5).

También se han reportado mutaciones en el gen *gyrB* implicadas en la resistencia a quinolonas: D481E, R484K, D484K, F438S y E463K (Gong y Yuan, 2018). Las

mutaciones en *gyrB* pueden potenciar el efecto de las mutaciones en *gyrA*, aunque su incidencia es significativamente menor (Miftahussurur et al., 2016; Hu et al., 2016) (Anexo 5).

III.4.5.Mecanismos de resistencia a Tetraciclina

Tetraciclina es un antibiótico bacteriostático utilizado en la terapia cuádruple contra la infección por *H. pylori*, mostrando buenos resultados en su erradicación. Actúa uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma, impidiendo la unión del aminoacil-ARNt al sitio A y bloqueando la síntesis de péptidos nacientes (Gerrits et al., 2006). El principal mecanismo de resistencia a la tetraciclina en *H. pylori* son las mutaciones puntuales en el gen *ARNr 16S*, específicamente en las posiciones 926-928 (Saranathan et al., 2020). Estas mutaciones, localizadas en el sitio de unión de la tetraciclina, reducen la afinidad del antibiótico con el ribosoma, disminuyendo su efecto inhibitor (Gerrits et al., 2006; Hu et al., 2016; Saranathan et al., 2020). El número de mutaciones en el *ARNr 16S* puede influir en el MIC de la tetraciclina. En particular, las mutaciones triples en el *ARNr 16S*, como AGA a TTC (926-928), confieren un alto nivel de resistencia, mientras que las mutaciones de uno o dos pares de bases provocan un bajo nivel de resistencia (Dadashzadeh et al., 2014). La mutación comúnmente asociada a la resistencia a tetraciclina es A926G (Saranathan et al., 2020) (Anexo 6).

Algunos estudios sugieren que la resistencia a tetraciclina también puede ocurrir en ausencia de mutaciones en el *ARNr 16S*, indicando un carácter multifactorial de la resistencia, posiblemente debido a la disminución de la permeabilidad de la membrana, degradación enzimática del antibiótico y sobreexpresión de bombas de eflujo (Mégraud & Lehours, 2007; Arslan et al., 2017) (Anexo 6).

III.5. Métodos para evaluar la resistencia antimicrobiana en *H. pylori*

Durante muchos años, el tratamiento para combatir una infección por *H. pylori* ha sido empírico, basado en los patrones de susceptibilidad local. Sin embargo, el enfoque óptimo es basarse en el perfil de susceptibilidad de la cepa infectante del individuo, ya que evitaría la exposición a antimicrobianos ineficaces contra cepas resistentes (Graham y Liou, 2021; Argueta et al., 2022).

III.5.1. Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos basados en cultivos incluyen la difusión en disco, microdilución en caldo, E-test y dilución en agar (Mahmoudi et al., 2015). Estas técnicas utilizan diferentes diluciones de antibióticos frente a un cultivo de *H. pylori* para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) después de 72 horas de incubación (Fox y Megraud, 2006).

Aunque los métodos fenotípicos de susceptibilidad se consideran estándares, presentan importantes limitaciones. En primer lugar, requieren un laboratorio bien equipado y personal capacitado debido a las exigencias de crecimiento del patógeno. El éxito del cultivo no es alto (60-70%) por diversas razones, como condiciones de transporte, materiales (biopsia gástrica), número de biopsias y dificultades de crecimiento (Kuo et al., 2016; Cammarota et al., 2014). Además, la interpretación de los resultados fenotípicos depende de las condiciones experimentales, lo que puede hacerla subjetiva y no siempre reproducible (Hombach et al., 2013). Finalmente, estas pruebas son lentas, ofreciendo resultados una semana después del aislamiento de las bacterias (Arslan et al., 2017).

III.5.2. Métodos genotípicos

III.8.2.1 Métodos tradicionales

Actualmente, los métodos basados en ácidos nucleicos son una alternativa para la identificación de cepas de *H. pylori*. Los métodos basados en ácidos nucleicos, como la PCR, son alternativas rápidas y reproducibles para determinar la resistencia a antibióticos en *H. pylori*, identificando mutaciones puntuales en genes específicos. Estos ensayos pueden realizarse a partir de cultivos aislados o directamente de muestras biológicas como biopsias gástricas y heces, aunque la exactitud puede verse afectada por el estado de las muestras y la presencia de contaminantes (Tang et al., 2013).

El PCR en tiempo real detecta *H. pylori* y su resistencia a claritromicina mediante la amplificación del gen *ARNr 23S* y el análisis de la curva de fusión, mostrando alta concordancia con las pruebas fenotípicas (96.4%) (Schabereiter-Gurtner et al., 2004). La PCR-RFLP identifica mutaciones creando sitios de restricción en el amplicón, siendo rápida y económica con buena especificidad y sensibilidad (Roldán et al., 2019).

El GenoType HelicoDR detecta mutaciones que predicen resistencia a claritromicina y levofloxacin con alta sensibilidad y especificidad, mostrando alta concordancia con el perfil fenotípico (Cambau et al., 2009).

Las técnicas PCR son precisas para detectar cepas heterorresistentes, aunque tienen limitaciones en identificar mecanismos genéticos complejos. Por ello, no se han desarrollado técnicas moleculares para la detección rápida de la resistencia a amoxicilina y metronidazol (Arslan et al., 2017).

III.8.2.2. Secuenciación de genoma completo

Las metodologías NGS ofrecen ventajas sobre los métodos moleculares tradicionales al proporcionar un perfil integral de resistencia a múltiples fármacos. Permiten la evaluación simultánea de mutaciones asociadas con resistencia a los seis antimicrobianos más comúnmente recetados para *H. pylori*: claritromicina, amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, rifabutina y levofloxacino (Saracino et al., 2021). Estas pruebas pueden completarse en 24 a 72 horas y permiten evaluar todo el gen asociado a la resistencia, describiendo diversos tipos de mutaciones, desde simples hasta complejas, que las PCRs convencionales no detectan (Pohl et al., 2019). Además, NGS es aplicable en la detección de heterorresistencia dentro de comunidades de *H. pylori*, al proporcionar múltiples lecturas de secuenciación por muestra (Arguea et al., 2021; Hulten et al., 2021).

IV. METODOLOGÍA

IV.1. Tipo de estudio

Este estudio descriptivo y transversal caracterizó la resistencia antimicrobiana mediante la secuenciación del genoma completo de aislados de *H. pylori* y su concordancia con la susceptibilidad fenotípica.

IV.2. Población

En este proyecto, se utilizaron aislados de *H. pylori* previamente criopreservadas en el Laboratorio Centinela de *H. pylori* de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Estas muestras formaron parte de un estudio preliminar registrado bajo el código 63157, aprobado por el comité de ética bajo la constancia N° 590-26-15. Durante dicho estudio, se recolectaron 1500 biopsias gástricas de 500 pacientes,

identificando 737 cepas aisladas de distintas regiones del estómago (antro, cuerpo y pliegue angular) en pacientes tratados en las mencionadas instituciones médicas.

IV.3. Criterios de inclusión

La selección de los aislados de los aislados de *H. pylori*, se obtuvo mediante los criterios de inclusión mencionados a continuación:

- Aislados con diagnóstico positivo para cultivos realizados en el estudio preliminar.
- Aislados con densidad bacteriana adecuada para poder reactivar y obtener una cantidad de biomasa mínima y necesaria para la secuenciación del genoma completo.
- Los aislados obtenidos de cualquiera de las tres zonas del estómago (antro, cuerpo y pliegue angular) de un mismo paciente.
- Las aislados seleccionadas deben tener información de la prueba de susceptibilidad *In vitro* frente a los cinco antibióticos del tratamiento de referencia (claritromicina, amoxicilina, tetraciclina, levofloxacino y metronidazol) (Olano, 2018).
- Las aislados seleccionadas deben tener información del perfil genotípico de resistencia realizado mediante PCR convencional para los cinco antibióticos de referencia (claritromicina, amoxicilina, tetraciclina, levofloxacino y metronidazol) (Chu, 2021).

IV.4. Criterios de exclusión

En este estudio, se excluyeron a todos los aislados de *H. pylori* con información incompleta para la presente investigación. densidad bacteriana para poder reactivarlos

IV.5. Tamaño de muestra

A través de los resultados previos de Chu (2021), se calcularon los valores de kappa esperados para cada fármaco evaluado (IC: 95%, α : 0.05) (Bujang y Baharum, 2017). Este coeficiente de kappa midió la concordancia entre la metodología fenotípica y genotípica, es decir, la prueba de susceptibilidad *In vitro* y pruebas de tipificación mediante PCR convencionales, respectivamente. Con lo mencionado, se pudo obtener el número mínimo de aislados a considerar en el presente estudio para estimar un coeficiente de Kappa para claritromicina y levofloxacino (N=40) (poder: 0.8; beta 0.2) (Donner y Eliasziw,1992). Los cálculos se realizaron mediante el software PASS (Hintze, J. (2011). PASS 11. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, EE. UU) (Anexo 7).

IV.6. Consideraciones éticas

Los aislados de *H. pylori*, fueron obtenidos del biobanco del proyecto de investigación: "Prototipo de Laboratorio centinela para controlar la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos en el Perú", que fue financiado por Ciencia Activa (CONV-000117-2015-FONDECYT). Este proyecto obtuvo la aprobación del *Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código de inscripción 63157. Constancia N° 590-26-15)*. Los aislados provenían de cualquier zona del estomago como antro, cuerpo y pliegue angular de un mismo paciente.

Además, el presente estudio (SIDISI: 211483) fue revisado y registrado en la Dirección Universitaria de Asuntos Regulatorios de la Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Debido a sus características, fue exonerado de la evaluación tanto por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Humanos como por el Comité Institucional de Ética para Uso de Animales (Anexo 8).

IV.7. Procedimientos

IV.7.1. Reactivación y cultivo de los aislados de *H. pylori*

Los aislados seleccionadas se sembraron en placas Petri con medio selectivo para *H. pylori*, compuesto por infusión cerebro corazón-agar (BHI) suplementado con 10% de sangre de cordero desfibrinada, isovitalex®, anfotericina B y skirrow® (vancomicina, trimetoprim y polimixina B) en condiciones de anaerobiosis (Stevenson et al., 2000; Miendje et al., 2010).

IV.7.2. Identificación de cepas de *H. pylori*.

Se evaluó el crecimiento de colonias a los 5, 7 y 10 días de incubación. Los aislados de *H. pylori* se identificaron mediante cribado microbiológico por sus características de cultivo, morfología y pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa y ureasa positivas). Los cultivos positivos se replicaron en medios frescos para aumentar las concentraciones bacterianas necesarias para pruebas posteriores (Stevenson et al., 2000).

IV.7.3. Pruebas de susceptibilidad fenotípicas

En el proyecto preliminar (PROTOTIPO, 2016), se obtuvieron perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos mediante la técnica de microdilución en caldo,

siguiendo las directrices del CLSI (CLSI, 2015) (Anexo 9). Estos resultados proporcionaron el perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas de *H. pylori* para cinco antibióticos, permitiendo su uso en los análisis de concordancia con los resistomas obtenidos en este estudio (Olano, 2018).

IV.7.4. Pruebas de susceptibilidad genotípicas

En el proyecto preliminar (PROTOTIPO, 2016), se obtuvieron perfiles genotípicos de susceptibilidad a los antimicrobianos de referencia de las cepas aisladas de *H. pylori* mediante PCR convencionales (Chu, 2021) (Anexo 10). Esta información permitió calcular el tamaño de muestra mínimo para este proyecto

IV.7.5. Secuenciación de genomas completos de las cepas aisladas y la determinación de su resistencia

IV.7.6.1. Obtención de ADN genómico, preparación de bibliotecas y secuenciación del genoma completo.

El ADN genómico se obtuvo utilizando el kit GeneJet (Thermo Fisher Scientific) y se cuantificó con el kit Qubit dsDNA BR. Para preparar las bibliotecas de ADN, se usó el kit Illumina Nextera XT. Se fragmentó el ADN, se realizó la tagmentación e indexación mediante PCR y se purificaron las muestras con perlas AMPure XP. Las bibliotecas se ajustaron a una concentración de 2 nmol/L, se desnaturalizaron y se secuenciaron usando el protocolo de extremo emparejado 2 × 250 en un instrumento Illumina MiSeq, logrando una cobertura del genoma entre 50X y 60X (Tuan et al., 2019).

IV.7.6.2. Ensamblaje de los genomas de cepas *H. pylori* y su anotación

La calidad de las lecturas sin procesar se evaluó con FastQC (Wingett y Andrews, 2018). Las bases de baja calidad y los adaptadores se eliminaron usando Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Las lecturas filtradas de alta calidad se ensamblaron para obtener contigs mediante el servicio en línea BV-BRC, utilizando Spades y corrigiendo errores con Pilon (Bankevich et al., 2012; Walker et al., 2014). La calidad de los ensamblados se evaluó con QUAST (Gurevich et al., 2013).

La contaminación de las secuencias se evaluó con CheckM y la integridad del genoma con BUSCO, que clasifica los genes en cuatro categorías: "Completo y en una sola copia", "Completo y duplicado", "Fragmentado" y "Perdido" (Parks et al., 2015; Simão et al., 2005).

Se realizó el mapeo de lecturas y el ensamblado de novo, reportando el número de lecturas no alineadas, alineadas una vez, alineadas en múltiples ubicaciones y el porcentaje total de alineación. Finalmente, los ensamblados se anotaron con BAKTA para obtener un borrador del genoma útil para el análisis bioinformático (Schwengers et al., 2021).

IV.7.6.3. Predicción de genes asociados a la resistencia a los antimicrobianos

Se utilizó la herramienta RGI para predecir genes de resistencia a antibióticos, usando los contigs obtenidos del ensamblaje (archivo.fna) como archivos de entrada y las condiciones predeterminadas de RGI. RGI empleó Prodigal para predecir marcos de lectura abiertos (ORF) a partir de las secuencias proporcionadas, considerando solo ORF completos y excluyendo aquellos con menos de 30 pares

de bases. Los ORF predichos se compararon mediante BLAST contra las secuencias de referencia en CARD.

IV.7.6.4. Detección *In silico* de mutaciones en genes relacionados con resistencia a los antimicrobianos (resistoma).

Se evaluaron cambios genéticos a nivel de nucleótidos y aminoácidos en genes asociados con la resistencia antimicrobiana, utilizando como referencia los genes de la cepa *H. pylori* 26695 (NC_000915.1). Se consideraron mutaciones reportadas en estudios previos relacionadas con la resistencia a cada fármaco evaluado. En particular, se identificaron mutaciones en los genes: *ARNr 23S*, *infB*, *rpl22* (resistencia a claritromicina); *gyrA*, *gyrB* (resistencia a levofloxacino); *PBP1A*, *PBP2*, *PBP3*, *PBP4*, *hefC*, *hofH* (resistencia a amoxicilina); *rdxA*, *frxA*, *rclC*, *HP0370*, *HP0918*, *Rspu*, *Fur*, *RecA*, *Ribf*, *Omp11* (resistencia a metronidazol); y *ARNr 16S* (resistencia a tetraciclina).

Para identificar mutaciones en genes de resistencia a cada fármaco evaluado, se utilizó el pipeline Snippy versión 3.2. Complementando estos resultados, se extrajeron los genes y proteínas asociados a la resistencia utilizando los archivos GenBank generados por Bakta. Posteriormente, se añadieron el gen y la proteína de referencia a cada archivo multifasta, y se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con MAFFT (v7.397) (Katoh et al., 2013). Finalmente, se buscaron manualmente las mutaciones reportadas en la bibliografía (Qumar et al., 2021)

IV.7.6. Análisis estadísticos

IV.7.7.1 Descripción de datos

Los datos de las frecuencias de mutaciones obtenidas en genes conocidos y putativos relacionados con la resistencia a cada fármaco evaluado se registraron en una base de datos de Excel. Las variables cualitativas (dependientes e independientes) se describieron mediante porcentajes o frecuencias.

IV.7.7.2 Análisis de datos

El presente trabajo de investigación tuvo como variable dependiente el perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas de *H. pylori* para cada fármaco evaluado y como variable independiente la presencia de mutaciones identificadas en los genes conocidos que estén relacionados a la resistencia antimicrobiana según los fármacos de referencia evaluados (Anexo 12).

IV.7.7.3 Análisis estadísticos

Se calculó el coeficiente kappa de Cohen para determinar el grado de concordancia entre el perfil genotípico de resistencia antimicrobiana de cepas de *H. pylori* y los resultados de la prueba de susceptibilidad in vitro, utilizando el software PASS 11. Los valores del coeficiente kappa se interpretaron de la siguiente manera: menos de 0.4 indicó concordancia baja, 0.4 a 0.6 concordancia moderada, 0.61 a 0.8 concordancia sustancial, y 0.81 a 1.0 concordancia casi perfecta o perfecta (Carrasco & Jover, 2004; Tuan et al., 2019). Además, se evaluó la significancia estadística de cada coeficiente kappa.

Este análisis estadístico fue posible debido a que las variables dependiente e independiente eran nominales-dicotómicas y las muestras eran independientes. Las

predicciones realizadas por las herramientas bioinformáticas se ejecutaron siguiendo los parámetros estadísticos de cada servidor.

V. RESULTADOS

V.1. Análisis fenotípico

En este estudio, se seleccionaron y secuenciaron un total de 51 aislados, cada uno proveniente de un paciente diferente. Se observó que la resistencia más prevalente era al levofloxacino, con un 84.31% (N=43). A continuación, el 62.75% de las cepas (N=32) mostraban resistencia al metronidazol, el 50.98% (N=26) a la amoxicilina, el 31.37% (N=16) a la claritromicina, y el 5.88% (N=3) a la tetraciclina. Estos datos indican que (N=46) cepas eran resistentes al menos a un antibiótico, mientras que 5 cepas eran sensibles a todos los antibióticos. Además, se identificaron cepas monorresistentes: el 9.80% (N=5) solo a levofloxacino y el 3,92% (N=2) solo a metronidazol. También se detectaron cepas con resistencia a múltiples fármacos (Tabla N°1; Figura N°1).

Tabla N°1. Patrón de resistencia antibiótica de cepas secuenciadas

Patrón de resistencia	%(n/N)
Sensible a todo	9,80
Resistente total	90,20
CLR	31,37
LVX	84,31
AMX	50,98
MTZ	62,75
TET	5,88
SDR	
CLR	0,00
LVX	7,84
AMX	0,00
MTZ	3,92
MDR	
CLR + LVX	27,45
AMX + MTZ	33,33

AMX + TET	5,88
AMX + CLR	23,53
AMX + LVX	49,02
MTZ + TET	3,92
MTZ + CLR	21,57
MTZ + LVX	54,90
TET + CLR	1,96
TET + LVX	5,88
AMX+MTZ+TET	3,92
AMX+MTZ+CLR	15,69
AMX+MTZ+LVX	31,37
AMX+TET+CLR	1,96
AMX+TET+LVX	5,88
AMX + CLR +LVX	5,88
MTZ+TET+CLR	0,00
MTZ+TET+LVX	3,92
MTZ+CLR+LVX	21,57
TET+CLR+LVX	1,96
AMX+MTZ+TET+LVX	3,92
AMX+MTZ+CLR+LVX	13,73
AMX+TET+CLR+LVX	1,96

CLR: claritromicina; TET: tetraciclina; AMX: amoxicilina; MTZ: metronidazol; LEV: levofloxacino; MDR: múltiple resistencia; SDR: Mono resistente

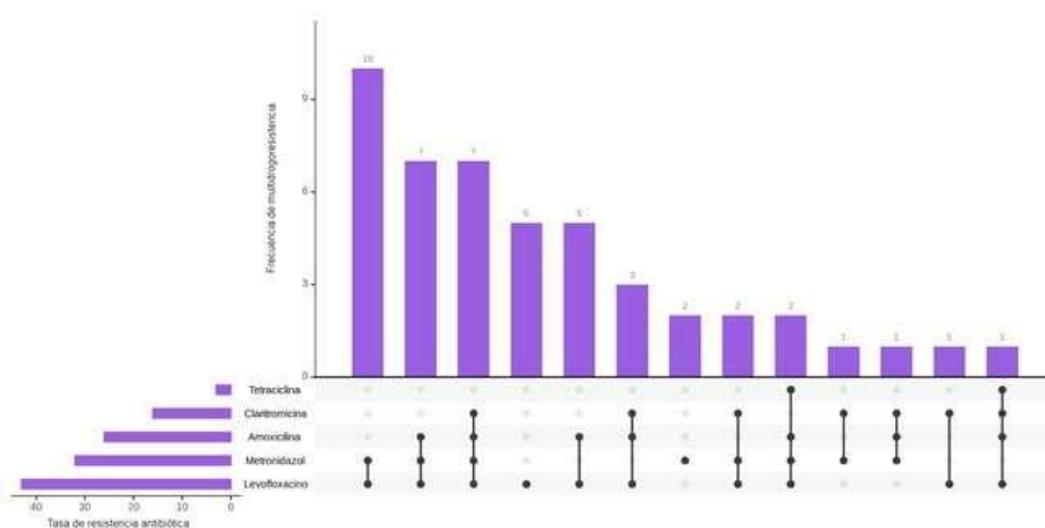


Figura 1. Perfil de susceptibilidad antibiótica de cepas secuenciadas.

V.2. Análisis bioinformático

V.2.1. Análisis de calidad inicial y preprocesamiento de lecturas

En la evaluación de la calidad de las lecturas, se observó que las bases al inicio presentaron puntajes de calidad muy altos ($Q>30$) (Anexo 13A y 14A). Al evaluar el contenido de N por base y la representación de nucleótidos, se observó variabilidad al inicio de las lecturas, que se estabilizó después de las primeras posiciones, mostrando un 25% para cada nucleótido sin sesgo en la composición a lo largo de las lecturas, aunque con cierta variabilidad hacia el final (Anexo 15A). La calidad de las secuencias individuales se evaluó mediante el puntaje de calidad media (Phred Score) (Anexo 16A), indicando una calidad de secuenciación generalmente excelente y datos confiables para análisis posteriores. El contenido de GC por secuencia en cada muestra (Anexo 17A) mostró una distribución estrecha alineada con la teórica, sugiriendo ausencia de sesgo técnico o contaminación, con una variación baja y un valor medio de 39%, característico del genoma de *H. pylori*.

La distribución de la longitud de las secuencias (Anexo 18A) mostró que la mayoría caía dentro de un rango específico (aproximadamente 35-251 pb), esperado para plataformas como Illumina.

Luego, se utilizó Trimmomatic para eliminar secuencias no deseadas, corregir errores y recortar bases con calidad inferior a Q30, descartando lecturas excesivamente cortas. Posteriormente, se reevaluó la calidad de las lecturas recortadas con FastQC (Anexos 13B a 18B), confirmando una calidad superior a Q30 desde el inicio hasta el final de las lecturas, y una distribución de GC alineada

con la teórica, con secuencias agrupadas dentro de un rango específico (35% a 25%).

V.2.2. Ensamblado *de novo* y verificación de calidad de ensamblados

Para evaluar dicha calidad, se utilizó la herramienta QUAST, la cual, proporcionó parámetros estadísticos que se detallarán en las siguientes líneas (Anexo 19).

Primero, para evaluar la calidad de los ensamblados de *H. pylori*, se evaluó en el número de contig (Figura 2).

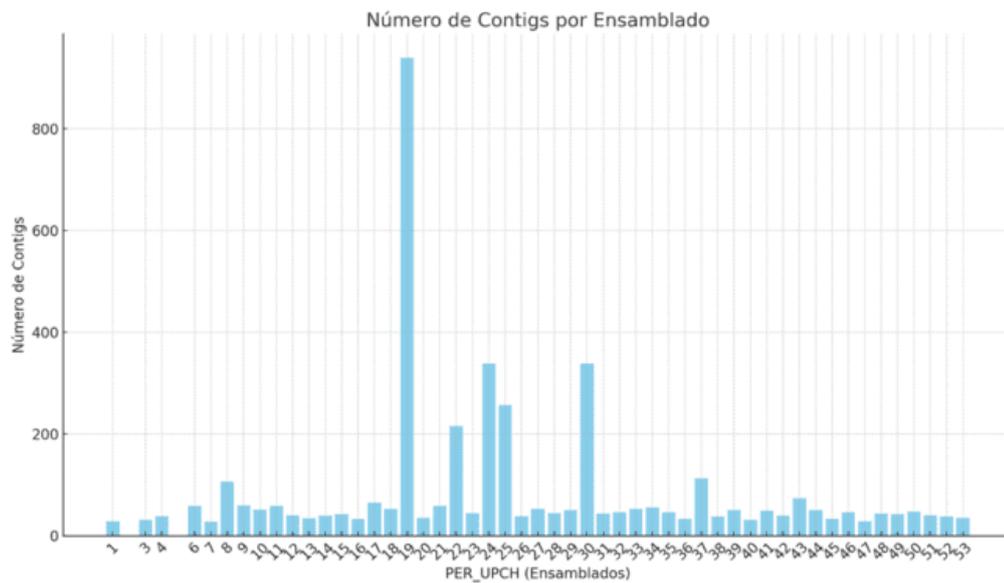


Figura 2. Número de contigs por ensamblados de *H. pylori*

Según la Figura 2, el número de contigs varió considerablemente entre muestras, lo cual pudo deberse a la calidad de la secuenciación o el ensamblado. Por ejemplo, el ensamblado PER_UPCH_1 tuvo muy pocos contigs en comparación con PER_UPCH_19, que presentó la mayor cantidad, indicando un ensamblado menos exitoso en la construcción de contigs largos. El número de contigs es un indicador indirecto de la calidad del ensamblado, un menor número de contigs sugiere una mayor continuidad y calidad del ensamblado (Anexo 19).

Para *H. pylori*, que tiene un genoma relativamente estable en tamaño, se espera que un ensamblaje de alta calidad produzca menos de 50-150 contigs, asumiendo prácticas óptimas en secuenciación y ensamblaje. Un número de 150-200 contigs indica un ensamblaje moderadamente fragmentado, mientras que más de 200 contigs generalmente se considera un ensamblaje fragmentado (Figura 3) (Anexo 19).

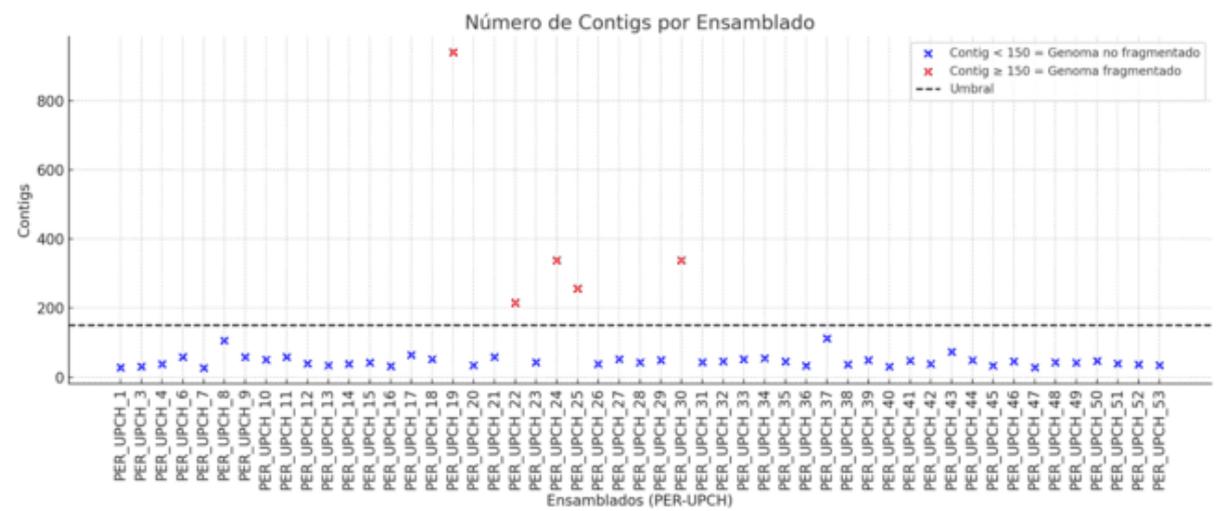


Figura 3. Calidad de ensamblados según la fragmentación.

Por otro lado, la longitud de los ensamblados fue fundamental para evaluar la calidad del ensamblado genómico, ya que proporcionó una medida inicial de la integridad y representatividad del genoma. Un ensamblado que se alinea estrechamente en tamaño con un genoma de referencia sugiere una secuenciación adecuada y un ensamblaje preciso, mientras que las discrepancias pueden revelar problemas como ensamblados incompletos, errores de secuenciación o contaminación.

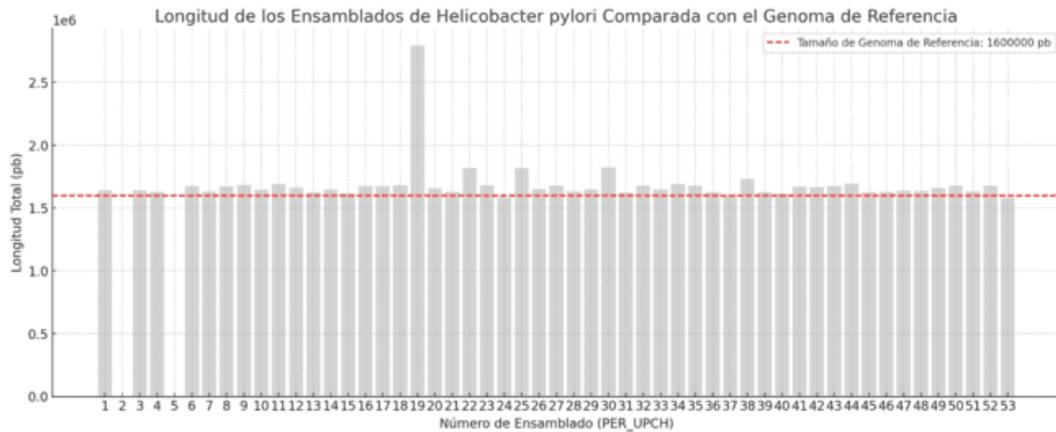


Figura 4. Longitud de ensamblados de cepas de *H. pylori*.

En la Figura 4 se muestra que los tamaños de los genomas variaron desde aproximadamente 1.63 millones de pares de bases (pb) hasta cerca de 1.68 millones de pb. Algunos ensamblados mostraron tamaños ligeramente inferiores al genoma de referencia, lo que podría indicar ensamblados incompletos o pérdida de información genética, afectando la calidad e integridad del genoma ensamblado. Ensamblados que estuvieron cerca o superaron ligeramente el tamaño de referencia se consideran de buena calidad (Anexo 19).

La evaluación del porcentaje de guanina-citosina (GC%) en los ensamblados de *H. pylori* demostró una alta fidelidad en la representación de la composición genómica esperada para esta especie (Figura 5). La consistencia observada en los valores de GC% sugiere que los ensamblados reflejan de manera precisa la composición genómica de *H. pylori*, asegurando la validez de los datos para pasos posteriores (Anexo 19).

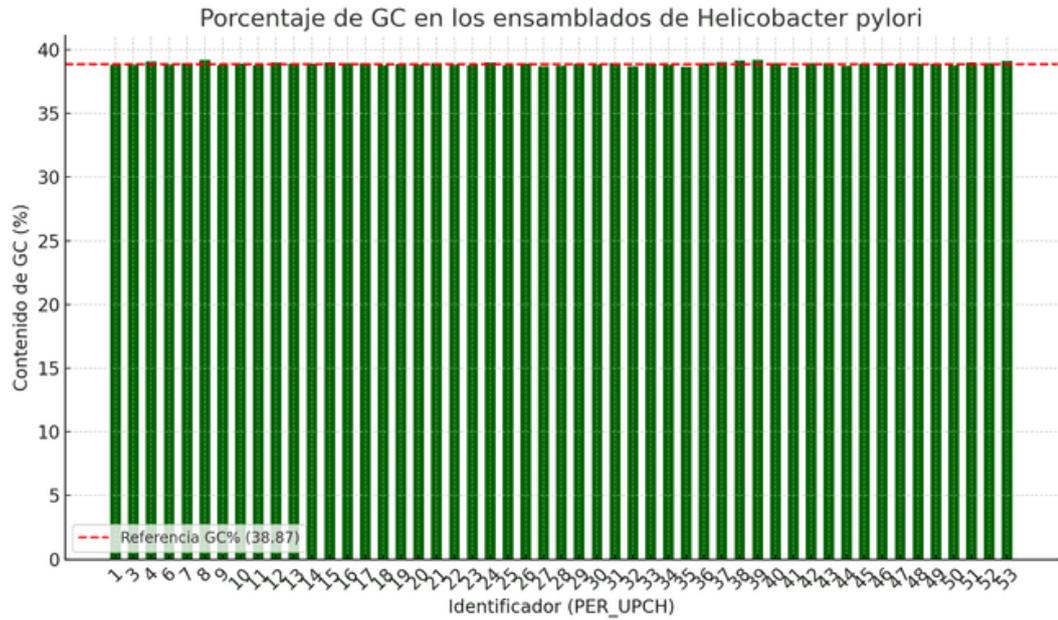


Figura 5. Porcentaje de GC en ensamblados de *H. pylori* y referencia. La línea roja horizontal indica el porcentaje de GC de referencia, que es de aproximadamente 38.87%.

Otra métrica importante a evaluar es el N50, que evalúa la contigüidad y, por consiguiente, la calidad de los ensamblajes genómicos, indicando la longitud mínima de los contigs que, en conjunto, cubren al menos el 50% del genoma.

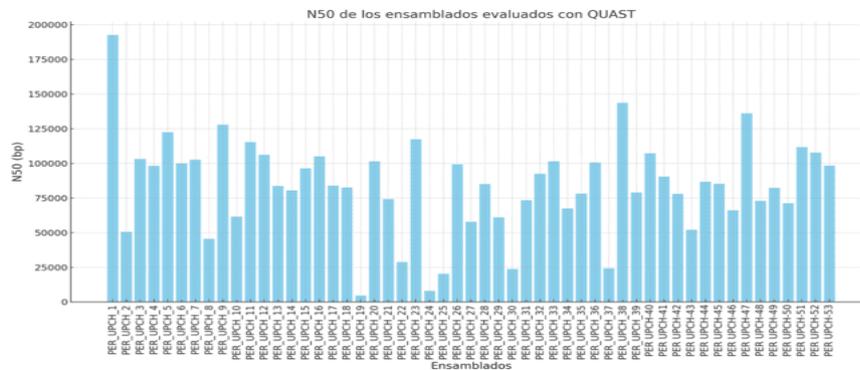


Figura 6. N50 de los ensamblados de *H. pylori*.

Los valores de N50 variaron significativamente entre los ensamblados, lo que sugiere variaciones en la efectividad de la metodología de ensamblaje. Los ensamblajes con valores altos de N50, como PER_UPCH_1, PER_UPCH_38, PER_UPCH_47, PER_UPCH_9, y PER_UPCH_23, indicaron una mayor contigüidad en la secuencia, lo cual permitió una reconstrucción genómica más precisa y confiable. En contraste, los ensamblajes con valores bajos de N50, como PER_UPCH_19, PER_UPCH_24, PER_UPCH_25, PER_UPCH_30 y PER_UPCH_37, mostraron menor contigüidad, resultando en fragmentos más cortos (Figura 6) (Anexo 19).

Asimismo, se calculó los valores de L50, que es otra métrica esencial en la evaluación de ensamblajes genómicos porque proporciona una visión clara sobre la contigüidad de un ensamblaje. La mayoría de los ensamblados tuvieron un valor de L50 relativamente bajo, indicando que pocos contigs fueron necesarios para cubrir al menos el 50% del genoma. Esto sugiere una buena contigüidad y calidad en la mayoría de los ensamblados (Figura 7) (Anexo 19).

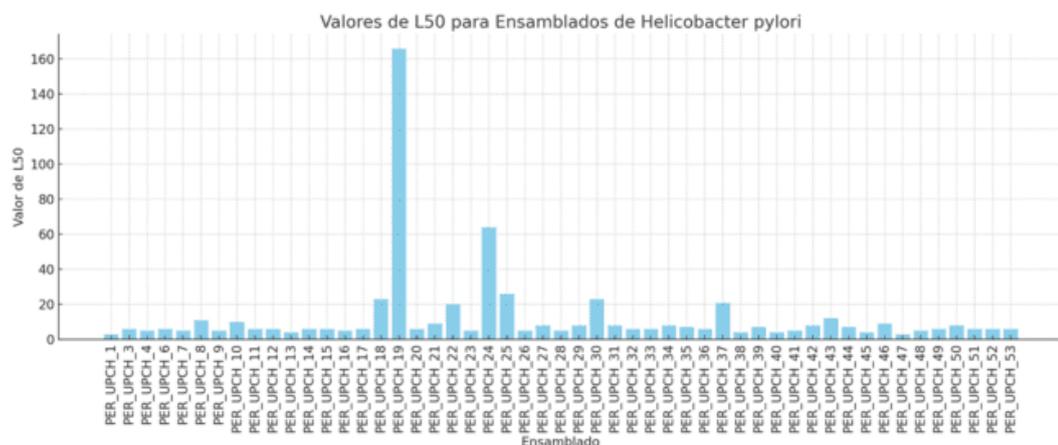


Figura 7. L50 de los ensamblados de *H. pylori*.

De acuerdo con las Figuras 6 y 7, el ensamblaje de mejor calidad fue PER_UPCH_1, con un valor N50 de 192,703 y un L50 de 3, indicando que cubrió el 50% del genoma con solo tres contigs largos. En contraste, el ensamblaje de menor calidad fue PER_UPCH_19, con un N50 de 4,712 y un L50 de 164, lo que requirió muchos contigs pequeños para cubrir el 50% del genoma, típico de un ensamblaje altamente fragmentado (Anexo 19).

Para comprender la relación entre los valores de N50 y L50, que conjuntamente indican la contigüidad y calidad de los ensamblados, se establecieron percentiles basados en los valores de N50. Los ensamblados cuyo N50 se encontraba por encima del percentil 67 fueron clasificados como de alta calidad; aquellos que estaban entre el percentil 33 y 67 se consideraron de calidad media; y finalmente, los ensamblados con un N50 por debajo del percentil 33 se clasificaron como de baja calidad (Anexo 20; 21; 22).

V.2.3. Evaluación de la contaminación y completitud con CheckM

Para evaluar la completitud y la contaminación en los ensamblados, se utilizó la herramienta CheckM2, estableciendo umbrales específicos: completitud $\geq 99.5\%$ y contaminación $\leq 2\%$. Bajo estos criterios, 45 ensamblados fueron considerados óptimos, mostrando una representación casi total del genoma de *H. pylori* y una mínima contaminación (Anexo 23; Figura 8).

Seis ensamblados fueron identificados como subóptimos debido a sus niveles de contaminación. Un caso significativo fue el ensamblado PER_UPCH_19, que presentó una completitud perfecta del 100%, pero una alta contaminación del 58.71%, lo que indica la presencia de secuencias no pertinentes o repetidas,

posiblemente debido a contaminación cruzada, múltiples especies o errores en el ensamblaje (Anexo 23; Figura 8).

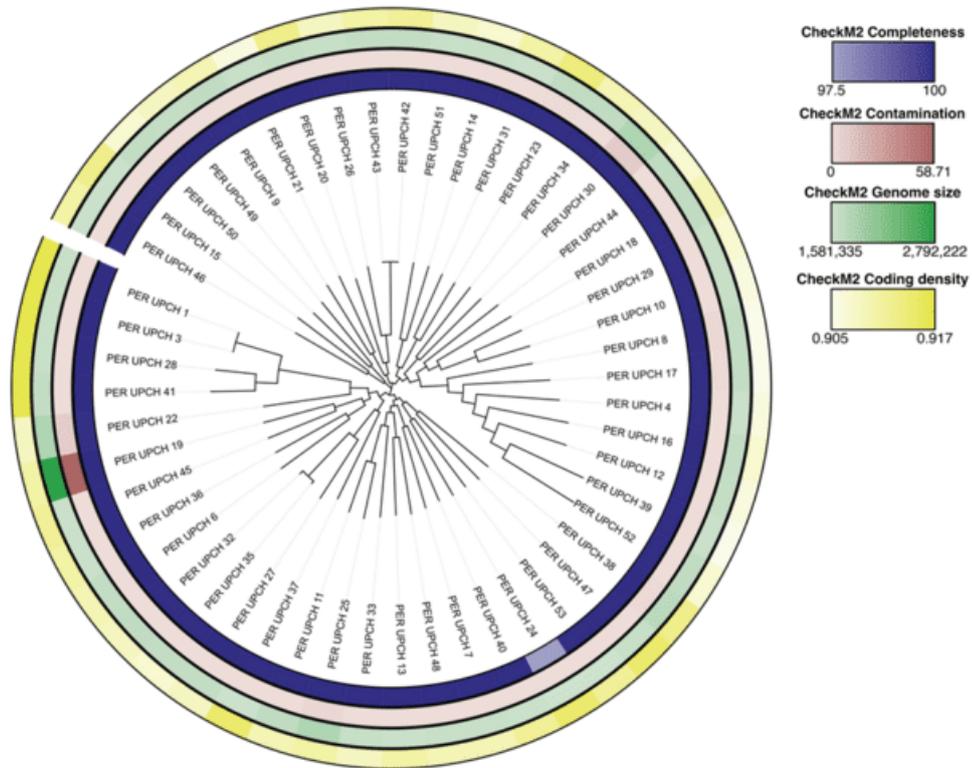


Figura 8. Evaluación de contaminación y completitud de los ensamblados de *H. pylori*.

Sin embargo, es importante mencionar que, aunque algunos ensamblados excedieron el umbral de contaminación establecido, aún pudieron ser utilizados en este estudio. En particular, los ensamblados PER_UPCH_22 (99.94% completitud, 7.72% contaminación), PER_UPCH_25 (99.98% completitud, 3.05% contaminación), PER_UPCH_30 (99.95% completitud, 8.80% contaminación) y PER_UPCH_8 (100% completitud, 2.34% contaminación) presentaron ligeros niveles de contaminación, pero mantuvieron una completitud casi total del genoma. Se sospechaba que esta contaminación se debía a secuencias derivadas de otras bacterias o de múltiples cepas de *H. pylori*, resultando en un alto porcentaje de

heterogeneidad: PER_UPCH_22 mostró 95.77%, PER_UPCH_25 95.24%, PER_UPCH_30 100.00% y PER_UPCH_8 86.49% (Anexo 23; Figura 8).

El ensamblado PER_UPCH_24 (97.50% completitud, 0.04% contaminación) también fue útil en este estudio, a pesar de no alcanzar el 100% de completitud. El bajo porcentaje de contaminación minimizó la interferencia de secuencias no deseadas en el análisis genómico. Para su uso en los análisis, se verificó que los genes de interés presentaran una buena cobertura de secuencia.

Se evaluó la densidad de codificación con un umbral del 90%, clasificando los ensamblados en dos grupos: óptimos y no óptimos. Todos los ensamblados analizados alcanzaron o superaron este umbral, sugiriendo una organización eficiente del genoma con la mayoría de sus secuencias asignadas a genes codificantes (Figura 8; Anexo 23).

V.2.4. Evaluación de completitud del ensamblaje con BUSCO

En la categoría de "Completo y en una sola copia," los ensamblados PER_UPCH_39, PER_UPCH_32, PER_UPCH_10, PER_UPCH_23 y PER_UPCH_52 destacaron con los mayores porcentajes, entre 83.06% y 84.68% (Anexo 24). Este resultado indica una excelente integridad y una representación precisa del genoma de referencia. La predominancia de genes completos en una sola copia subraya la alta calidad de estos ensamblajes y confirma la eficacia de la secuenciación y el proceso de ensamblado (Figura 9; Anexo 24).

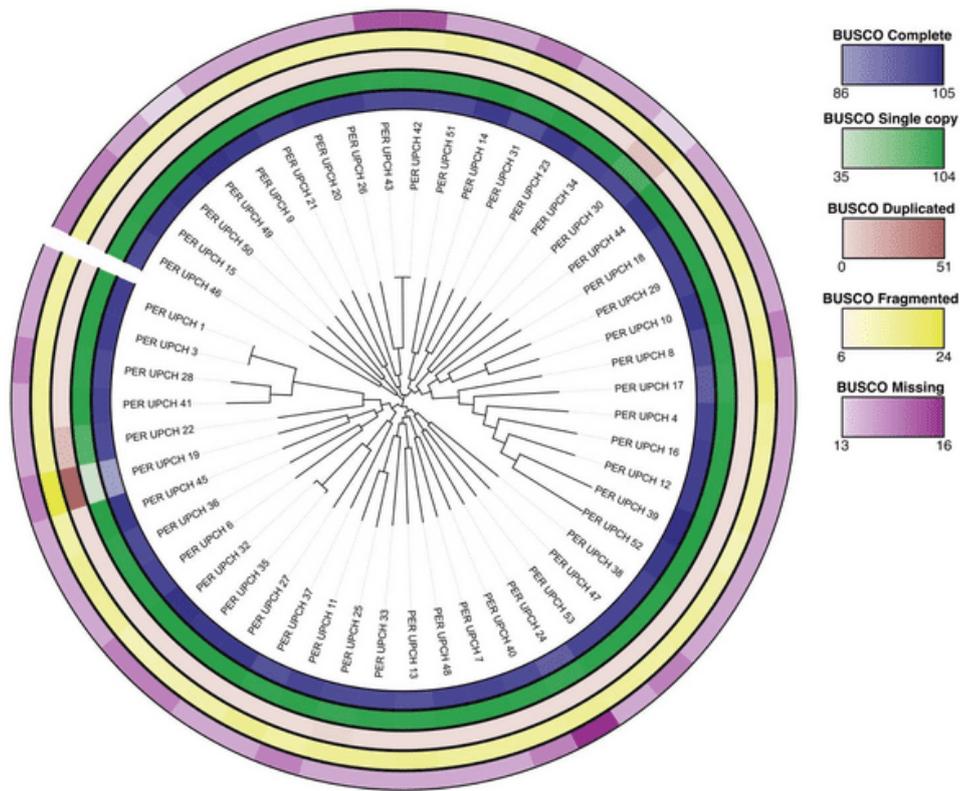


Figura 9. Evaluación de completitud de los ensamblados de *H. pylori*.

Sin embargo, algunos ensamblajes mostraron una notable presencia de genes "Completo y duplicado", especialmente PER_UPCH_19, donde el 41.13% de los genes se encontraban en esta categoría. Otros ensamblajes como PER_UPCH_22, PER_UPCH_30, PER_UPCH_25 y PER_UPCH_27 también mostraron duplicaciones, aunque en menor medida, indicando variaciones en la calidad del ensamblaje entre muestras.

La evaluación reveló que los ensamblajes PER_UPCH_24, PER_UPCH_43, PER_UPCH_42, PER_UPCH_19 y PER_UPCH_28 presentaron los mayores porcentajes de genes "Fragmentado". Además, PER_UPCH_24 y PER_UPCH_43 mostraron más del 12% de genes "Perdido", destacando deficiencias en la cobertura genómica (Figura 9; Anexo 24).

V.2.5. Mapeo de lecturas al genoma de referencia y al ensamblado *de novo*

En nuestro estudio, se evaluó el mapeo de las lecturas al ensamblado obtenido (re-mapeo) para verificar la calidad e integridad del ensamblado y detectar posibles problemas genómicos. Las lecturas que no se alinean o lo hacen de manera discordante pueden señalar secuencias de baja calidad, contaminación o errores en el ensamblado (Anexo 25).

Se consideró un "buen porcentaje de alineación única" para ensamblados con más del 70% de las lecturas alineadas de manera única. De los ensamblados analizados, 41 cepas cumplieron este criterio, indicando alta especificidad. Un "moderado porcentaje de alineación única" se definió para ensamblados con 60-70% de lecturas alineadas de manera única, criterio que cumplieron 8 muestras. Evaluar la cobertura de los ensamblados es crucial, ya que una alta profundidad puede justificar umbrales más bajos para la alineación única, asegurando que las regiones críticas del genoma estén bien representadas.

Se observó que 24 ensamblados mostraron más del 1% de lecturas alineadas en múltiples lugares del genoma, indicando regiones genómicas repetitivas o similitudes significativas. En particular, el ensamblado PER_UPCH_19 destacó con un 46.39% de alineación múltiple, sugiriendo una alta presencia de regiones repetitivas.

Se estableció un umbral óptimo de "Tasa de Alineación Total" del 90%, esperando que al menos el 90% de las lecturas se alineen al menos una vez al genoma de referencia. Los resultados mostraron que los 51 ensamblados evaluados superaron este umbral, indicando una excelente calidad en los ensamblados y confirmando la efectividad del proceso de secuenciación y alineación empleado.

Finalmente, se evaluó la densidad de lecturas que soportan cada contig en los ensamblados, considerando la calidad de N50 y L50 (Anexo 26 al 31).

V.2.6. Anotación de ensamblados de genomas de *H. pylori*

Se realizó la anotación genómica de los ensamblados de *H. pylori* mediante la herramienta Backta. Para evaluar si la anotación genómica fue óptima, se consideraron múltiples aspectos de los datos como la longitud total del genoma, densidad de codificación, secuencias codificantes de proteínas (CDSs), RNAs, *rARNs*, y ncRNA (Anexo 32).

La densidad de codificación en *H. pylori* generalmente varía entre 85% y 92%. Los ensamblados PER_UPCH_1 y PER_UPCH_7 mostraron densidades de codificación del 91.9% y 91.0%, respectivamente, indicando alta calidad del ensamblaje (Figura 22). En contraste, los ensamblados PER_UPCH_22, PER_UPCH_25 y PER_UPCH_30 presentaron densidades del 84.7%, 82.6% y 81.2%, mientras que PER_UPCH_24 registró la más baja con 79.9% (Figura 10; Anexo 32).

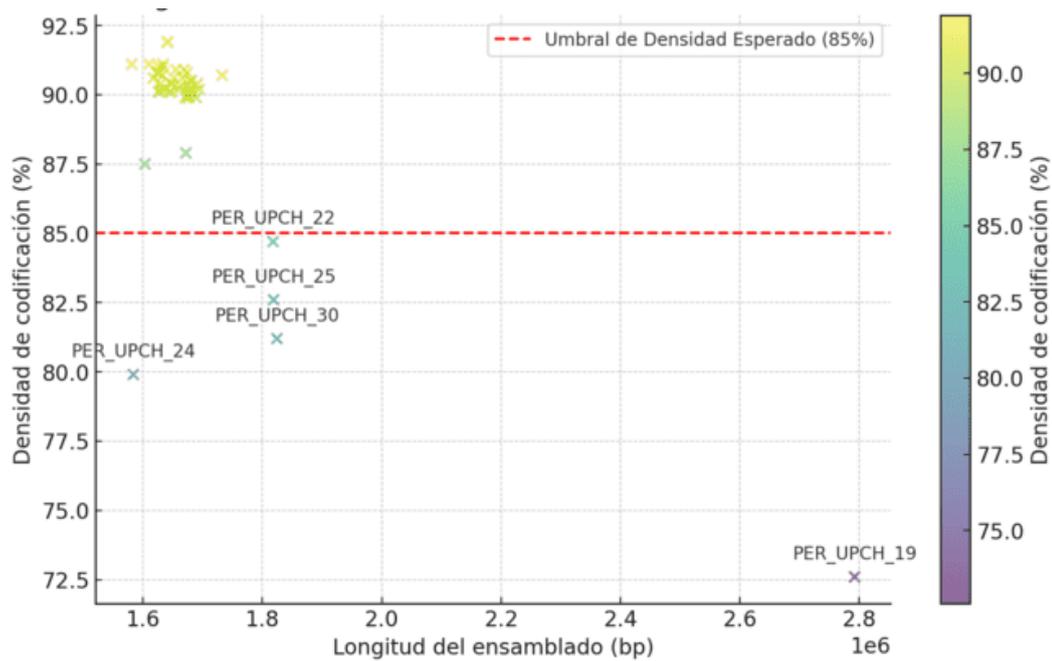


Figura 10. Longitud del ensamblado frente a la densidad de codificación.

En el análisis de 50 ensamblados de *H. pylori* anotados, se observaron variaciones en varios parámetros genómicos. El número de tRNAs osciló entre 34 y 40, con la mayoría de los ensamblados presentando entre 36 y 38. Todos los ensamblados contenían 1 tmRNA y 3 rARNs, consistentemente. Los ncARNs variaron de 6 a 10, siendo común encontrar entre 8 y 10 ncARNs. Además, el número de regiones ncRNA varió, con algunos ensamblados sin regiones ncRNA y otros con hasta dos regiones (Figura 11; Anexo 32).

Ninguno de los ensamblados presentó sistemas CRISPR. El número de CDSs varió entre 1449 y 1678, con valores predominantes entre 1500 y 1600. La cantidad de pseudogenes fluctuó entre 6 y 16, siendo más común encontrar entre 6 y 12. El número de proteínas hipotéticas varió de 11 a 97, con la mayoría de los ensamblados

presentando entre 20 y 50. Finalmente, el número de sORFs varió de 3 a 8, con la mayoría de los ensamblados teniendo entre 4 y 6 sORFs (Figura 11; Anexo 32).

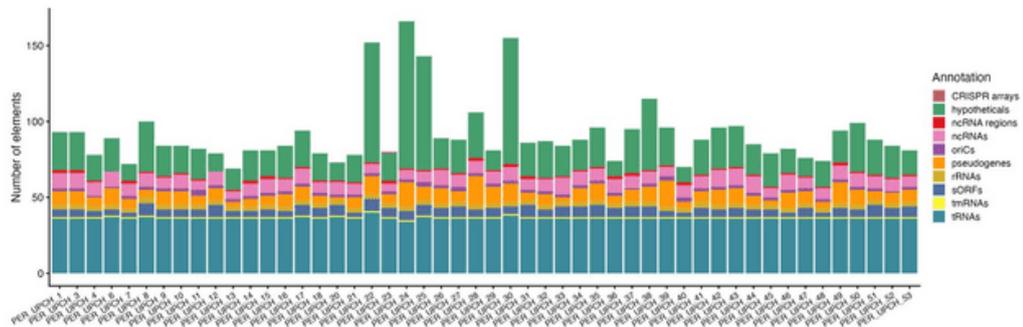


Figura 11. Número de elementos genómicos anotados por categoría en diversos ensamblados *H. pylori*.

En cuanto a la cantidad de secuencias codificantes de proteínas (CDSs), los ensamblados PER_UPCH_24, PER_UPCH_15 y PER_UPCH_53, con 1449, 1482 y 1474 CDSs respectivamente, no alcanzaron los valores esperados para *H. pylori* (Anexo 19). No obstante, se confirmó la presencia de tRNAs y rARNs en las cantidades esperadas, aproximadamente 36 tRNAs y 3 rARNs, esenciales para la síntesis de proteínas y la función celular. La mayoría de los ensamblados presentaron un bajo número de pseudogenes, lo que demuestra una anotación precisa y un margen reducido de error en la identificación de secuencias genéticas funcionales (Figura 11; Anexo 32).

V.2.7. Predicción de genes de resistencia de ensamblados de genomas de *H. pylori*

En el análisis de resistencia a antibióticos mediante la herramienta de identificación de genes de resistencia (RGI), se observó la presencia significativa y uniforme de

variantes mutadas del gen *H. pylori* *pbp1* que confieren resistencia a la amoxicilina, en todos los ensamblados biológicos (Figura 12).

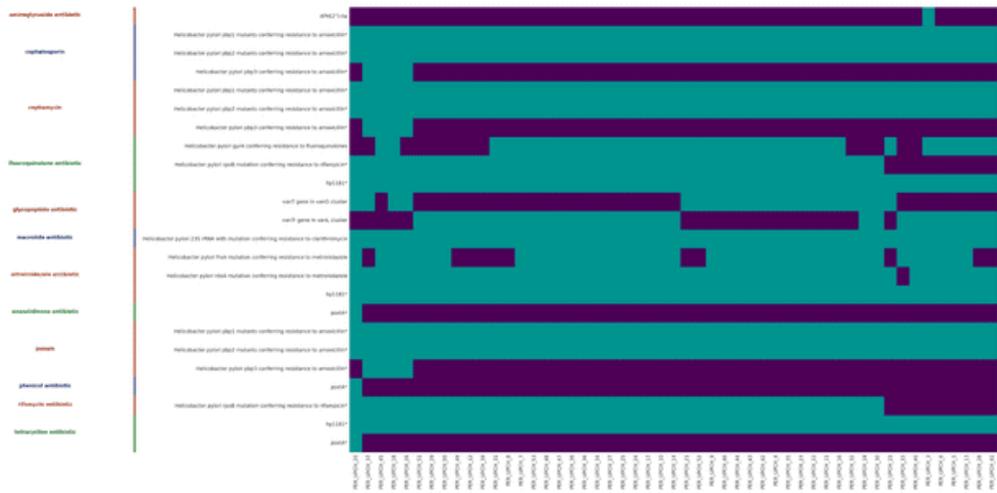


Figura 12. Mapa de calor sobre la predicción de genes de resistencia mediante RGI. El amarillo representa una coincidencia perfecta, el verde azulado una coincidencia estricta y el morado ninguna coincidencia. Los genes marcados con un asterisco (*) presentan potencial para conferir resistencia a diversas clases de antibióticos.

También se observó una presencia significativa y uniforme de variantes mutadas del gen *H. pylori* *pbp1* y *pbp2* que confieren resistencia a la amoxicilina (tanto en la clase cefalosporina y cefamicina) en todos los ensamblados biológicos. El gen *pbp3*, codificador de la penicillin-binding protein 3 (*PBP3*), se encontró en ensamblados específicos (PER_UPCH_37, PER_UPCH_45, PER_UPCH_18, PER_UPCH_26) (Figura 12).

En 37 ensamblajes de *H. pylori* se identificó el gen *gyrA*, asociado con la resistencia a las fluoroquinolonas. En 51 ensamblajes se encontró el gen *hp1181*, asociado con múltiples categorías de resistencia según la ontología de resistencia a los antibióticos (ARO), incluyendo fluoroquinolonas y tetraciclina. Además, 49

ensamblajes mostraron mutaciones en el gen *ARNr 23S*, confiriendo resistencia a claritromicina (Figura 12).

Se identificaron 38 ensamblajes con mutaciones en el gen *frxA* y 48 en el gen *rdxA*, confiriendo resistencia al metronidazol. Solo un ensamblado presentó el gen *poxA*, asociado con resistencia a tetraciclina y oxazolidinone según la ARO (Figura 12).

V.2.8. Predicción de mutaciones en genes de resistencia a los fármacos de referencia en los ensamblados de genomas de *H. pylori*

V.2.8.1. Resistencia a claritromicina

De las 16 cepas resistentes y 34 sensibles a claritromicina, se identificaron 91 variantes en el *ARNr 23S*. Específicamente, en las posiciones 2142 y 2143, conocidas por conferir resistencia, se encontraron mutaciones en 7/16 de las cepas resistentes en la posición 2142 y en 5/16 de las cepas resistentes en la posición 2143. Además, 9/16 y 11/16 de las cepas resistentes mostraron la secuencia nativa en las posiciones 2142 y 2143, respectivamente. También se detectaron cambios genéticos en la posición 2143 en 9/34 de las cepas sensibles (Anexo 33 y 34).

Se evaluó la concordancia entre el perfil de resistencia fenotípico y las mutaciones A2142G y A2143G del *ARNr 23S* en *Helicobacter pylori*. Para la mutación A2142G, se obtuvo un coeficiente kappa de 0.5140, indicando una concordancia moderada y significativa (ProbZ = 0.0000). El acuerdo fue del 82.00%, superior al 62.96% esperado por casualidad, validando esta mutación como un marcador fiable de resistencia a la claritromicina. Sin embargo, estos resultados también sugieren que la mutación A2142G no identifica todas las cepas resistentes, lo que sugiere la presencia de otros mecanismos de resistencia (Tabla N°2).

Por otro lado, la evaluación de la concordancia entre el fenotipo de resistencia y la mutación A2143G mostró un coeficiente kappa de 0.2981, lo que indica una concordancia débil pero significativa ($p = 0.0079$). Aunque la mutación A2143G es eficaz para confirmar resistencia cuando está presente, no detecta todos los casos de resistencia, subrayando la necesidad de identificar otros marcadores para mejorar la detección (Tabla N°2).

Tabla N°2: Concordancia del perfil genotipo y fenotípico de resistencia a claritromicina

Mutación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Std. err.	Prob>Z
A2142G	82.00%	62.96%	0,514	0,1236	<0,001
A2143G	74.00%	62.96%	0,2981	0,1236	0,008
A2142G y A2143G	88.00%	57.92%	0,7148	0,1408	<0,001
T2182C	82.00%	62.96%	0,514	0,1236	<0,001
A2142G, A2143G y T2182C	88.00%	57.92%	0,7148	0,1408	<0,001

La evaluación de la concordancia entre las mutaciones A2143G o A2142G y el fenotipo de resistencia a la claritromicina mostró un alto grado de acuerdo (88.00%) y un coeficiente kappa de 0.7148, indicando una concordancia sustancial y significativa ($Z = 5.08$, $p = 0.0000$). Estos hallazgos destacan la utilidad clínica de las mutaciones A2143G y A2142G como marcadores fiables para identificar la resistencia a la claritromicina (Tabla N°2).

Con respecto a las otras mutaciones aún en estudio, que han sido reportadas tanto en aislados resistentes como sensibles (Gong et al., 2018). Se encontraron las mutaciones G1940A (2/34), G1959A (1/34) y T2182C (5/34) en cepas fenotípicamente sensibles, y C1944T (1/16), T1965C (1/16) y T2182C (2/16) en cepas resistentes (Anexo 33 y 34).

En cuanto a los genes putativos relacionados con la resistencia a la claritromicina, como *infB* y *rpl22*, no se encontraron mutaciones en sus secuencias (Anexo 33). Además, dos cepas con perfil fenotípicamente resistente no presentaron ninguna mutación en los genes evaluados en este estudio, lo que sugiere que otros mecanismos de resistencia, como bombas de eflujo, formas cocoides y formación de biopelículas, podrían estar confiriendo la resistencia a la claritromicina.

V.2.8.2. Resistencia a levofloxacino

La resistencia a la levofloxacina en *H. pylori* se debe a mutaciones puntuales en las regiones determinantes de resistencia a las quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA* y *gyrB* (Mori et al., 2018). Las QRDR de *GyrA* y *GyrB* abarcan los codones A71 a Q110 y E415 a S454, respectivamente. Los cambios en los aminoácidos en los codones 87 y 91 del gen *gyrA* (N87I, N87K, N87T, D91Y, D91N, D91G) son determinantes del estado de resistencia (Lauener et al., 2019; Tshibangu-Kabamba et al., 2020).

En nuestro estudio, se identificaron las siguientes variantes genéticas en 43 cepas resistentes: el 18.06 % (8/43) presentaron un cambio en el codón N87K, el 25.58 % (11/43) N87I, el 4.65 % (2/43) N87T, el 6.98 % (3/43) D91Y, el 20.93 % (9/43) D91G y el 18.60 % (8/43) D91N. Además, el 27.9 % (12/43) de las cepas resistentes presentaron una extensión N-terminal de *GyrA* por cinco residuos de aminoácidos

(QDNSV), y el 13.95 % (6/43) no presentaron ninguna mutación en la región QRDR (Anexo 35, 36 y 37).

Por otro lado, el 62.5% (5/8) de las cepas sensibles a levofloxacino no presentaron ninguna variante en el gen *gyrA*. El 12.5% (1/8) de las cepas sensibles presentaron un cambio en el codón 87 (N a T) y otra cepa sensible presentó un cambio en la posición 87 (N a I). Cabe resaltar que el 37.5% (3/8) de las cepas sensibles presentaron una extensión N-terminal de *GyrA* por cinco residuos de aminoácidos (QDNSV) (Anexo 35, 36 y 37).

La evaluación de la concordancia entre las mutaciones N87K y N87I y el fenotipo de resistencia a levofloxacino mostró una concordancia muy baja, con coeficientes kappa de 0.0602 y 0.0396, respectivamente. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos ($p > 0.1$), sugiriendo que la concordancia observada podría deberse al azar (Tabla N°3). De manera similar, la evaluación de la concordancia entre las mutaciones D91G y D91N y el fenotipo de resistencia a levofloxacino también mostró una concordancia muy baja, con coeficientes kappa de 0.0690 y 0.0602, respectivamente, y sin significancia estadística ($p > 0.09$).

En conjunto, al evaluar de manera individual las mutaciones N87I, N87K, D91G y D91N, se concluye que no son buenos candidatos para explicar la resistencia a levofloxacino debido a su baja concordancia con el fenotipo resistente. Por lo tanto, es necesario considerar el efecto combinado de estas mutaciones u otros factores adicionales para una mejor explicación de la resistencia a levofloxacino (Tabla N°3).

Tabla N°3: Concordancia del perfil genotipo y fenotípico de resistencia a levofloxacino

	Mutacion	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Std. err.	Prob>Z
QDR_ <i>gyrA</i>	N87K	30.00%	25.52%	0,0602	0,0483	0,1065
	N87I	34.00%	31.28%	0,0396	0,061	0,2582
	N87T	16.00%	18.32%	-0,0284	0,0285	0,8402
	D91G	32.00%	26.96%	0,069	0,0516	0,0907
	D91N	30.00%	25.52%	0,0602	0,0483	0,1065
	D91Y	20.00%	18.32%	0,0206	0,0285	0,2355
	N87I + N87K+D91G +D91N	78.00%	62.96%	0,4060	0,1236	0,0005
	N87I + N87K+D91G +D91N+D91Y	84.00%	67.28%	0,5110	0,1316	0,0001
out QDR_ <i>gyrA</i>	aminoacidNterminalextensi	32.00%	35.60%	-0,0559	0,0698	0,7883
	V199A	54.00%	57.20%	-0,0748	0,1123	0,7472
	V199M	16.00%	15.44%	0,00660	0,0162	0,3418
	N87I + N87K+ N87Y + D91G +D91N+D91Y+aminoacidNterminalextensi	80.00%	73.04%	0,25820	0,1399	0,0325
	N87I + N87K+ N87Y + D91G +D91N+D91Y +V199A	84.00%	78.80%	0,24530	0,1399	0,0387
	N87I + N87K+ N87Y + D91G +D91N+D91Y+V199M	86.00%	68.72%	0,55240	0,134	0,0000
	N87I + N87K+ N87Y + D91G +D91N+D91Y +V199A+V199M	86.00%	80.24%	0,29150	0,1347	0,0153
out_QDR_ <i>gyrB</i>	R579C	16.00%	15.44%	0,00660	0,0162	0,3418
	D481E	16.00%	15.44%	0,00660	0,0162	0,3418
	N87I + N87K+ N87Y + D91G +D91N+D91Y+R579C	86.00%	68.72%	0,55240	0,134	<0,001
	N87I + N87K+ N87Y + D91G +D91N+D91Y+D481E	86.00%	68.72%	0,55240	0,134	<0,001
	N87I + N87K+ N87Y + D91G +D91N+D91Y+V199M + R579C+D481E	88.00%	70.16%	0,59790	0,1362	<0,001

La evaluación de la concordancia del conjunto de mutaciones N87I, N87K, D91G, D91N y D91Y con el perfil fenotípico mostró una concordancia moderada, con un valor de kappa de 0.5110, indicando una mejora en la identificación de cepas resistentes. Aunque estas mutaciones ofrecen una herramienta más precisa para identificar la resistencia, no son definitivas para todas las cepas resistentes a levofloxacino en *H. pylori*. El valor de significancia para esta combinación de mutaciones es 0.0001, lo que indica que la concordancia observada es estadísticamente significativa (Tabla N°3).

Por otro lado, es importante mencionar que se identificaron cepas que presentaron mutaciones fuera del dominio QRDR y que previamente han sido reportadas tanto en cepas sensibles como resistentes a este fármaco (Lin et al., 2023). De las cepas resistentes, 1/43 presentó la mutación V172I, 1/43 presentó la mutación D161N, 25/43 presentaron la mutación V199A, y 1/43 presentó la mutación V199M. Con respecto a las cepas sensibles, 5/7 presentaron la mutación V199A (Anexo 35). La concordancia de la presencia de estas mutaciones con su perfil fenotípico fue evaluada individualmente (Tabla N°3).

También se evaluó el grado de concordancia entre la presencia de cualquier mutación en y cercano del dominio QRDR y su proximidad con el perfil de susceptibilidad. Por ello, se evaluó el grupo de variantes compuesto por N87I, N87K, N87Y, D91G, D91N, D91Y y V199M frente al fenotipo, mostró un coeficiente de Kappa de 0.5524(Prob>Z=0.00), indicando una fuerte concordancia entre las mutaciones presentes y la resistencia a levofloxacino

. Esto indica que la presencia de estas mutaciones juntas puede ser un buen predictor del fenotipo de resistencia. Esta combinación se convierte en un marcador de resistencia altamente confiable y raramente encontrado en cepas no resistentes (Tabla N°3).

Las mutaciones en *gyrB* en la región QRDR que va desde la posición E415 hasta S454 no se considera un mecanismo común de resistencia a levofloxacino, pero diversos reportes sugieren que el cambio en las posiciones 463,479,484 y 483 de *gyrB* puede contribuir a la resistencia a este fármaco, ya que se han encontrado en aislados resistentes a este mismo fármaco. En nuestro estudio dos cepas resistentes presentaron la mutación D481E y R579C, cada una. Se evaluó individualmente la concordancia entre la presencia de estas mutaciones y su perfil fenotípico (Tabla N°3).

Diversos estudios han reportado que algunas mutaciones en *gyrB* están asociadas con las mutaciones en los codones 87 y 91 de *gyrA*. Se evaluó la concordancia entre las mutaciones en *gyrA* que confieren resistencia junto con mutaciones en la región QRDR de *gyrB*. Se consideraron tres combinaciones de mutaciones. En el primer grupo, se incluyeron las mutaciones N87I, N87K, N87Y, D91G, D91N y D91Y en *gyrA*, junto con R579C en *gyrB*. En el segundo grupo, se evaluaron las mismas mutaciones en *gyrA*, acompañadas de D481E en *gyrB*. Para ambas combinaciones, la concordancia observada fue del 86%, con un coeficiente kappa de 0.5524 (Tabla N°3).

En el tercer grupo, se incorporaron todas las mutaciones de los primeros dos grupos, añadiendo R579C y D481E en *gyrB*. Este conjunto mostró una mejoría en la concordancia y un coeficiente kappa significativo, alcanzando un 88% y 0.5979, respectivamente. Estos datos sugieren que la resistencia a levofloxacino puede ser el resultado de un evento multifactorial, con mutaciones en la región QRDR de *gyrA* y *gyrB* contribuyendo a la resistencia (Anexo 37).

V.9.2.3. Resistencia a amoxicilina

Nos centramos en los motivos de unión a penicilina conservados (PBP-motifs), específicamente los motivos SXXK, SXN y KTG, dentro de los genes *pbp1A*, *pbp2*, *pbp3* y *pbp4*, que codifican las PBPs. Los cambios en codones específicos dentro de estos motivos generalmente se consideran asociados con la resistencia a la amoxicilina en *H. pylori* (Gerrits et al., 2002).

En nuestro estudio, de las 26 cepas resistentes a amoxicilina, se identificaron las siguientes mutaciones: S414R (1/26), T556S (1/26), N562Y (2/26), T593A (8/26), T593G (1/26) y T593P (1/26). Estas mutaciones confieren resistencia a la amoxicilina, como se ha corroborado mediante transformación en estudios previos (Tshibangu-Kabamba et al., 2020; Kwon et al., 2017). De las 24 cepas sensibles a amoxicilina, se encontraron las mutaciones S414R (1/24), T556S (2/24), T593A (5/24), T593G (1/24) y T593S (1/24) (Anexo 39 y 40).

La evaluación de la concordancia entre las mutaciones S414R y N562Y y el perfil de susceptibilidad fenotípica para la amoxicilina mostró baja utilidad para predecir resistencia. La mutación S414R tuvo una concordancia casi nula (Kappa = 0.0370),

lo que la hace poco útil para identificar cepas resistentes. De manera similar, la mutación N562Y presentó baja concordancia ($Kappa = 0.0741$), lo que la convierte en un marcador perfecto para la no resistencia, pero con una aplicabilidad clínica limitada debido al bajo número de verdaderos positivos (Tabla N°4).

Asimismo, la evaluación de la presencia de mutaciones en la posición 993 del motivo PBP1A mostró una baja concordancia ($Kappa = 0.0916$), lo que indica una capacidad limitada para predecir resistencia. Sin embargo, al evaluar la concordancia entre las mutaciones S414R, N562Y, T556S y T993 en conjunto con el perfil de susceptibilidad fenotípica, se observó una concordancia moderada ($Kappa = 0.2063$). Esto sugiere una mejora en la predicción de resistencia en comparación con la evaluación de mutaciones individuales (Tabla N°4).

Tabla N°4: Concordancia del perfil genotipo y fenotípico de resistencia a Amoxicilina.

	Mutación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Std. err.	Prob>Z
Mutaciones en PBP1 verificados en experimentos de transformación natural	S414R	50.00%	48.08%	0,0370	0,0381	0,1659
	T556S	46.00%	48.24%	-	0,0433	0,7478
	N562Y	52.00%	48.16%	0,0741	0,0534	0,0828
	T593A/G/P/S	54.00%	49.36%	0,0916	0,1322	0,2441
	S414R+T556S+N562Y+T593A/G/P/S	60.00%	49.60%	0,2063	0,1374	0,0665
Mutaciones en PBP1 que estan asociados a la resistencia de amoxicilina	A474T	48.00%	48.32%	-	0,0062	0,5333
	T558S	46.00%	48.08%	-	0,0401	0,0381
	V374L	56.00%	48.48%	0,146	0,0891	0,051
	N504D	48.00%	48.48%	-	0,0093	0,0891
	V469M/A	54.00%	48.24%	0,1113	0,0648	0,043
	S543R/N	52.00%	48.80%	0,0625	0,1104	0,2856
	V16I	60.00%	50.56%	0,1909	0,1372	0,08200
	G242S	48.00%	48.96%	-	0,0188	0,1182
Mutaciones en PBP1 verificados en experimentos de transformación natural + Mutaciones en dominios PBP1 que están asociados a la resistencia de amoxicilina	S414R+T556S+N562Y+T593A/G/P/S+V374L	62.00%	49.84%	0,2424	0,1404	0,0421
	S414R+T556S+N562Y+T593A/G/P/S+V374L+V469M/A	64.00%	49.92%	0,2812	0,1410	0,0231
	S414R+T556S+N562Y+T593A/G/P/S+V374L+V469M/A+V16I	64.00%	51.20%	0,2623	0,1158	0,0118

Mutación cercana al motivo PBP1	E406	64.00%	51.20%	0,2623	0,1158	0,0118
Mutaciones en PBP1 verificados en experimentos de transformación natural +Mutación cercana al motivo PBP1s	S414R+T556S+N562Y+T593A/G/P/S+E406	60.00%	51.20%	0,1803	0,1158	0,0597
Mutaciones en PBP1 verificados en experimentos de transformación natural +Mutación cercana al motivo PBP1's+Mutaciones que están asociados a la resistencia de amoxicilina	S414R+T556S+N562Y+T593A/G/P/S+V374L+E406	58.00%	51.28%	0,1379	0,1114	0,1079
	S414R+T556S+N562Y+T593A/G/P/S+V374L+V469M/A+E406	58.00%	51.28%	0,1379	0,1114	0,1079
	S414R+T556S+N562Y+T593A/G/P/S+V374L+V469M/A+V16I+E406	56.00%	51.68%	0,0894	0,0793	0,1299
Mutaciones en el motivo PBP-2	S494N	50.00%	49.04%	0,0188	0,1216	0,4385
Mutaciones verificadas en experimentos de transformación natural Mutaciones en el motivo PBP-2	S414R+T556S+N562Y+T593A/G/P/S+S494N	58.00%	50.16%	0,1573	0,1413	0,1328

En estudios previos, se identificaron varias mutaciones asociadas con la resistencia a la amoxicilina. Entre estas, la mutación A474T estuvo presente en 2/26 cepas resistentes y en 2/24 cepas sensibles. La mutación T558S se encontró únicamente en 1/24 cepas sensibles. La G595S apareció en 5/26 cepas resistentes y en 2/26 cepas sensibles. La V374L se observó en 5/26 cepas resistentes y en 1/24 cepas sensibles. Las mutaciones V469M y V469A se detectaron exclusivamente en cepas resistentes, cada una en 1/26 cepas. La N504D estuvo en 2/26 cepas resistentes y en 3/24 cepas sensibles (Anexo 39 y 40).

Las mutaciones S543R y S543S se encontraron en 3/26 y 2/26 cepas resistentes, respectivamente, y en 2/24 y 1/24 cepas sensibles, respectivamente. La mutación V16I fue notablemente prevalente, con 19/26 cepas resistentes y 13/24 cepas sensibles. Finalmente, la G242S estuvo presente en 6/26 cepas resistentes y en 6/24 cepas sensibles. La concordancia de la presencia de estas mutaciones con su perfil fenotípico fue evaluada individualmente (Anexo 39 y 40).

La evaluación de la concordancia entre diversas combinaciones de mutaciones en el gen *PBP1A* y el perfil de susceptibilidad fenotípica a la amoxicilina mostró una mejora en la predicción de la resistencia en comparación con mutaciones individuales. En el primer grupo (S414R, T556S, N562Y, T593A/G/P/S y V374L), la concordancia fue baja ($Kappa = 0.1720$), pero significativa. El segundo grupo, que añadió las mutaciones V469M/A, mostró una concordancia moderada ($Kappa = 0.2812$) y significativa. El tercer grupo, que incluyó la mutación V16I, también

presentó una concordancia moderada (Kappa = 0.2623) y significativa (p value = 0,0118)

Estos resultados indican que la inclusión de múltiples mutaciones mejora la predicción de la resistencia fenotípica a la amoxicilina más allá del azar. La identificación de estas mutaciones como marcadores genéticos puede ser útil para el desarrollo de pruebas de diagnóstico de resistencia a este fármaco, permitiendo una detección más precisa y efectiva de cepas resistentes (Tabla N°4).

Se encontraron mutaciones cercanas al dominio SKN 402_404 en cepas resistentes y sensibles. La mutación E406M se presentó en 1/ 26 cepas resistentes. La mutación E406A se encontró en 13/26 cepas resistentes y en 12/24 cepas sensibles. La mutación E406T apareció en 3/26 cepas resistentes, y la mutación E406V se presentó en 3/26 cepas resistentes y en 1/24 cepas sensibles (Figura 13). La evaluación de la concordancia de cualquier cambio en la posición 406 con el perfil de susceptibilidad fenotípica a la amoxicilina mostró una concordancia moderada y significativa (Kappa = 0.2301) (Tabla N°4).

Adicionalmente, se estableció una variable para detectar las mutaciones S414R, T556S, N562Y, T593A/G/P/S, E406M, E406T, E406A y E406V, evaluando su presencia frente al perfil fenotípico de resistencia a la amoxicilina. La evaluación mostró una concordancia moderada (Kappa = 0.1803), sugiriendo una capacidad limitada para identificar correctamente los casos no resistentes (Tabla N°4).

Estos resultados indican que, aunque la presencia de mutaciones en la posición 406 del dominio SKN y otras mutaciones asociadas pueden mejorar la predicción de la

resistencia fenotípica a la amoxicilina, la capacidad de estas mutaciones para identificar correctamente los casos no resistentes sigue siendo limitada. Esto sugiere la necesidad de considerar factores adicionales o combinaciones de mutaciones para mejorar la precisión de las pruebas de diagnóstico de resistencia a la amoxicilina.

Por último, se encontraron mutaciones en los dominios de PBP2 que previamente han sido reportadas por tener una buena asociación con el perfil fenotípico de resistencia a amoxicilina. La mutación S494N estuvo presente en 7 de 26 cepas resistentes y en 6 de 24 cepas sensibles (Anexo 39 y 41). La evaluación de la concordancia de la presencia de la mutación S494N en el gen objetivo PBP2 con el perfil fenotípico de resistencia a amoxicilina mostró una concordancia muy baja (Kappa = 0.0188) (Tabla N°4).

Además, se evaluó la presencia de las mutaciones S414R, T556S, N562Y, T593A/G/P/S en los motivos PBP1A y S494N en los motivos PBP2 frente al perfil de susceptibilidad fenotípica a amoxicilina. La concordancia fue baja (Kappa = 0.1573) y no significativa, lo que sugiere una capacidad limitada para identificar correctamente los casos resistentes (Tabla N°4).

Estos resultados indican que, aunque algunas mutaciones en los dominios de PBP1A y PBP2 se han asociado previamente con la resistencia a amoxicilina, su capacidad para predecir correctamente los casos resistentes es limitada. Esto resalta la necesidad de considerar otras mutaciones o factores adicionales para mejorar la precisión de las pruebas de diagnóstico de resistencia a amoxicilina.

Otra mutación, A541V, se encontró en el motivo *PBP2* en un aislado resistente que también presentaba mutaciones en los dominios cercanos de SKN en *PBP1A*

Además, se identificó una mutación putativa N561D en el dominio SNN 559_561 de *PBP1A* en una cepa resistente; este cambio no ha sido reportado anteriormente en algún estudio (Anexo 41).

Se identificó una única cepa resistente que presentaba una mutación en la posición S265L de la proteína *PBP4* (Anexo 40). En el resto de las cepas resistentes no se detectaron mutaciones en los motivos de *PBP3* y *PBP4*, lo que sugiere que estas cepas podrían tener otros mecanismos de resistencia a la amoxicilina. Por ello, se evaluaron otros mecanismos, como las bombas de eflujo y proteínas de membrana.

Se encontró que 11/26 cepas resistentes y 2/24 cepas sensibles presentaron una deleción del aminoácido en las posiciones 811_812 en la proteína de resistencia a la acriflavina o en los sistemas de eflujo multidroga del tipo RND-CmeABC y CmeDEF. Además, 5 / 26 cepas resistentes mostraron una mutación K229Q en la proteína beta-barril de la membrana externa *HofH* (Anexo 42 y 43).

V.9.2.4. Resistencia a metronidazol.

En los estudios de Méndez y Megraud(2002) proporcionaron una compilación de mutaciones en *RdxA* que incluye aquellas que dan como resultado la pérdida de la función de la enzima informada por muchos laboratorios (Mendez & Mégraud, 2002). Una de las principales mutaciones que afectan la unión de la apoproteína *rdxA* al cofactor FMN, y por lo tanto su función son los cambios en los residuos R16, S18, K20, N73, I142, G162 y K200 involucrados en la unión de FMN. Se encontró que de las 32 cepas resistentes 7 presentaron un cambio en el codón R16

y de las 18 cepas sensibles 2 presentaron este mismo cambio (Anexo 44). La concordancia entre la mutación en R16 y la resistencia al metronidazol fue de 0.0841 y no significativa, indicando que puede deberse al azar ($p= 0,1708$) (Tabla N°6).

En el ensamblado PER UPCH 6 se observa una delección de la secuencia del ADN codificante de la posición 482_484(del TTG, posiciones eliminadas) lo que afectó a los aminoácidos isoleucina en la posición 161 y glicina en la posición 162, y se insertó un aminoácido arginina en su lugar (Anexo 45). Por otro lado, no se encontraron mutaciones en las posiciones S18, K20, N73, I142, G162 y K200.

Además, se evaluaron mutaciones que podrían desestabilizar la formación de dímeros en la proteína *RdxA*. Esta proteína es un dímero compacto, y se espera que mutaciones en la interfaz del dímero (R41, L42, S43, Q50, V55, M56, I142, G145, K202, L209) desestabilicen su estructura. Del total de cepas evaluadas, 1 ensamblado (PER_UPCH_33) presentó un cambio en el codón R41, y esta cepa fue sensible al metronidazol. Además, 9/32 cepas resistentes presentaron un cambio en la posición M56, y 4/18 cepas sensibles también mostraron esta mutación.

La mutación M56I mostró baja concordancia con la resistencia al metronidazol ($Kappa = 0.0480$) no significativa evidenciando una capacidad baja para predecir resistencia (Tabla N°5). Por otro lado, no se encontraron otras mutaciones en las posiciones L42, S43, Q50, V55, I142, G145, K202 y L209 en nuestros aislados (Anexo 44). Al evaluar las mutaciones de manera individual, reforzo la necesidad

de un enfoque multifactorial para evaluar la resistencia a metronidazol. Por ello, la evaluación entre las mutaciones del grupo (R16, G162, M56, Y47C) y la resistencia al metronidazol mostro una concordancia moderada a través del valor de kappa de 0.1960. Sin embargo, esta concordancia no es estadísticamente significativa, indicando que esta combinación de mutaciones no es un marcador fiable de resistencia en el contexto evaluado (Tabla N°5). Esto refuerza la necesidad de considerar múltiples variables para evaluar la resistencia al metronidazol.

En nuestro estudio se evaluaron varias mutaciones missense en codones funcionales definidos según estudios experimentales. Se identificaron cambios exclusivos en cepas resistentes en las posiciones N14T (PER_UPCH_28), Y47C (PER_UPCH_34), H53R (PER_UPCH_37), A67V (PER_UPCH_48), A68T (PER_UPCH_16) y V192M (PER_UPCH_51) (Anexo 44). La mutación V204I se encontró en 7/32 cepas resistentes y 6/18 cepas sensibles. Otras mutaciones como H25R, A206T, V172, G98S, H99R y E175Q se identificaron en 2/32, 2/32, 13/32, 5/32, 6/32 cepas resistentes, respectivamente, y en 1/18, 1/18, 10/18, 7/18, 6/18 cepas sensibles, respectivamente. Las mutaciones K64N y A68V solo se encontraron en cepas sensibles (PER_UPCH_31 y PER_UPCH_33) (Anexo 44).

Además, se evaluaron mutaciones missense observadas en aislados clínicos. Las mutaciones T31E, R90K, H97T/Y, A118S/T y R131K se encontraron en 18/32, 9/32, 7/32, 5/32 y 3/32 cepas resistentes, respectivamente, y en 8/18, 7/18, 7/18, 4/18 y 11/18 cepas sensibles, respectivamente. La mutación P106S/L se encontró en 2/32 cepas resistentes, mientras que la mutación D59N se encontró tanto en cepas

resistentes como sensibles (Anexo 44). Asimismo, se evaluó la combinación de mutaciones R16, G162, M56, Y47C, P106 y T31E mostró una concordancia del 64.00% con la resistencia, con un valor de kappa de 0.1573. Aunque esta combinación de mutaciones indica una concordancia leve, el valor no es estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.1232$), lo que implica que la relación observada podría ser atribuida al azar. Por tanto, se necesita más investigación para confirmar la relevancia de estas mutaciones en la resistencia al metronidazol.

Se evaluó la presencia de mutaciones en el gen *rdxA*, inducidas por altas concentraciones de metronidazol y comprobadas por transformación, aunque no encontradas en aislados clínicos. Las mutaciones incluyen C46T, G238A y G352A. La mutación C46T se presentó en 5/32 cepas resistentes y 1/18 cepas sensibles. La mutación G238A se encontró exclusivamente en cepas resistentes. La mutación G352A se detectó en 5/32 cepas resistentes y 4/18 cepas sensibles. La concordancia de las mutaciones C46T, G238A y G352A con el perfil fenotípico fue evaluada (Anexo 44).

Se evaluó la concordancia entre diversas mutaciones en el gen *rdxA* y la resistencia al metronidazol en *Helicobacter pylori*. Inicialmente, se analizaron las mutaciones R16, G162, M56, Y47C, P106 y C46T, que mostraron una concordancia moderada con la resistencia, con un valor de kappa de 0.1960. No obstante, esta concordancia no resultó estadísticamente significativa ($\text{Prob}>Z = 0.0632$), lo que sugiere que, aunque existe una indicación de que estas mutaciones podrían estar asociadas con la resistencia, no se dispone de evidencia concluyente para confirmarlo. La

presencia de estas mutaciones sugiere una posible asociación con la resistencia al metronidazol, pero se requieren estudios adicionales para corroborar esta relación (Tabla N°6).

Por otro lado, la combinación de mutaciones R16, G162, M56, Y47C, P106, C46T y G238A mostró una concordancia moderada con la resistencia, con un valor de kappa de 0.2567, que fue estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0263$). Esto indica que esta combinación de mutaciones es un marcador relativamente fiable de resistencia en el contexto estudiado. La significancia estadística respalda que la presencia de estas mutaciones está asociada con la resistencia al metronidazol, lo cual es fundamental para la identificación de cepas resistentes (Tabla N°5).

Finalmente, se analizó la combinación de mutaciones R16, G162, M56, Y47C, P106, C46T, G238A y V192, que mostró una concordancia moderada con la resistencia, con un valor de kappa de 0.2880, también estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0159$). Esto refuerza la fiabilidad de esta combinación de mutaciones como marcador de resistencia al metronidazol. La significancia estadística confirma que la presencia de estas mutaciones está realmente asociada con la resistencia a este fármaco, lo cual es crucial para la identificación de cepas resistentes (Tabla N°5).

Tabla N°5: Concordancia del perfil genotipo(rdxA) y fenotípico de resistencia a Metronidazol.

Mecanismo	Mutación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kappa	Std. err.	Prob> Z
Mutaciones simples en rdxA que afectan la unión del cofactor a la apoproteína.	R16	46.00%	41.04%	0,0841	0,0885	0,1708
	V204I	38.00%	43.28%	-0,0931	0,105	0,8124
	G162	38.00%	36.56%	0,0227	0,03	0,2243
Mutaciones que afecten la dimerización de la proteína rdxA.	M56	46.00%	43.28%	0,048	0,105	0,3239
	Y47C	38.00%	36.56%	0,0227	0,0300	0,2243
Combinaciones mutaciones que afectan la union del cofactor a la apoproteína y su dimerización.	R16 /G162 /M56/Y47C	58.00%	47.76%	0,196	0,1283	0,0632
Mutaciones estadísticamente	A206T	38.00%	37.68%	0,0051	0,0517	0,4605

e asociadas al perfil fenotípico de resistencia a metronidazol encontrados en aislados clínicos resistentes	Y97	36.00%	43.84%	- 0,139 6	0,1085	0,9008
	P106	40.00%	37.12%	0,045 8	0,0423	0,1395
	R90K	40.00%	44.96%	- 0,090 1	0,1151	0,7832
	R131K	40.00%	49.44%	- 0,186 7	0,1342	0,918
	A118	38.00%	41.04%	- 0,051 6	0,0885	0,72
	V172I	42.00%	48.88%	- 0,134 6	0,1324	0,8454
	Combinaciones mutaciones que afectan la unión del cofactor a la apoproteína, su dimerización y mutaciones asociadas al perfil de resistencia encontrados en	R16 /G162 /M56/Y47C/P106	58.00%	47.76%	0,196 0	0,1283

aislados resistentes						
Mutaciones que afecta a codones funcionales y estadísticamente asociadas al perfil fenotípico de resistencia a metronidazol	G98S	32.00%	42.72%	0,187 2	1.012	1
	T31E	56.00%	50.56%	0,11	0,1372	0,2113
	L62V	42.00%	42.16%	- 0,002 8	0,9720	0,5113
	A68T	38.00%	36.56%	0,022 7	0,03	0,2243
	A68V	32.00%	37.12%	- 0,081 4	0,0423	0,9729
	A68	34.00%	37.68%	- 0,059 1	0,0517	0,8731
	S91P	36.00%	37.12%	- 0,017 8	0,0423	0,6631
	E175Q	36.00%	42.72%	- 0,117 3	0,1012	0,8768
	V192	38.00%	36.56%	0,022 7	0,03	0,2243
	Combinaciones mutaciones que afectan la unión	R16 /G162 /M56/Y47C/P106/T31E	64.00%	57.28%	0,157 3	0,1357

del cofactor a la apoproteína, su dimerización, mutaciones asociadas al perfil de resistencia encontrados en aislados resistentes y mutaciones que afectan codones funcionales estadísticamente asociados a un perfil de resistencia a metronidazol						
Mutaciones en el gen rdxA, inducidas por altas concentraciones de metronidazol y comprobadas por transformación	G352A	38.00%	41.04%	0,0516	0,0885	0,72
	C46T	44.00%	39.36%	0,0765	0,0728	0,1465
	G238A	40.00%	37.12%	0,0458	0,0423	0,1395
	V192	38.00%	36.56%	0,0227	0,03	0,2243

Combinaciones de mutaciones que afectan la unión del cofactor a la apoproteína, su dimerización, mutaciones asociadas al perfil de resistencia encontrados en aislados resistente y mutaciones inducidas por altas concentraciones de metronidazol y comprobadas por transformación	R16 /G162 /M56/Y47C/P106/C46T	58.00%	47.76%	0,196 0	0,1283 0	0,0632
	R16 /G162 /M56/Y47C/P106/C46T/G238A	62.00%	48.88%	0,256 7	0,1324 0	0,0263
	R16 /G162 /M56/Y47C/P106/C46T/G238A/V192	64.00%	49.44%	0,288 0	0,1342	0,0159
Codones stop prematuro en rdxA	L33Ter	38.00%	36.56%	0,022 7	0,03	0,2243
	Q50Ter	34.00%	36.56%	- 0,040 4	0,03	0,911
	W52Ter	38.00%	36.56%	0,022 7	0,03	0,2243

				-		
	Q65Ter	34.00%	36.56%	0,040 4	0,03	0,911
	N73Ter	38.00%	36.56%	0,022 7	0,03	0,2243
	Q175Ter	34.00%	36.56%	- 0,040 4	0,03	0,911
	A206TerC	38.00%	36.56%	0,022 7	0,03	0,2243
	E75Ter	40.00%	37.12%	0,045 8	0,0423	0,1395
	Gln65Ter	38.00%	36.56%	0,022 7	0,03	0,2243
Codones stop en rdxA	L33Ter/W52Ter/N73Ter/A206TerC/E75Ter/Gln65Ter	50.00%	39.92%	0,167 8	0,0784	0,0162
Mutaciones simples y codones stop en rdxA	R16 /G162 /M56/Y47C/P106/C46T/G238A/V192/L33Ter/W52Ter/N73Ter/A206TerC/E75Ter/Gln65Ter	72.00%	51.68%	0,420 5	0,1395	0,0013

Otro evento biológico evaluado en nuestro estudio fue la ganancia de codones de stop prematuros, resultante de mutaciones nonsense o más complejas. Se identificaron ocho cepas resistentes y dos sensibles con estas mutaciones (Anexo 46). La evaluación de la concordancia entre la presencia de codones de terminación prematura (L33Ter, W52Ter, N73Ter, A206Ter, E75Ter, Gln65Ter) en el gen *rdxA* y el fenotipo de resistencia al metronidazol mostró una concordancia del 50.00% y un valor de kappa de 0.1678, lo que indica una concordancia leve. Este valor de kappa fue estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0162$), lo que sugiere que, aunque la concordancia es baja, existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de estas mutaciones y la resistencia al metronidazol. La significancia estadística respalda la relevancia de estas mutaciones como marcadores de resistencia, aunque su utilidad práctica podría ser limitada debido a la baja concordancia observada. (Tabla N°5).

La evaluación combinada de codones de terminación prematura y otras mutaciones en el gen *rdxA* mostró una concordancia del 50.00% con la resistencia, con un valor de kappa de 0.1678, lo que indica una concordancia leve. Este valor de kappa fue estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0162$), lo que sugiere que, aunque la concordancia es baja, existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de estas mutaciones y la resistencia al metronidazol. La significancia estadística respalda la relevancia de estas mutaciones como marcadores de resistencia, aunque su utilidad práctica podría ser limitada debido a la baja concordancia observada. (Tabla N°5).

Se identificaron cambios de marco de lectura causados por mutaciones complejas, presentes solo en cepas resistentes. En el ensamblado PER_UPCH_28, se encontró una mutación frameshift c.41delA p.Asn14fs, que eliminaba una adenina en la posición 41 del cDNA, provocando un cambio en el marco de lectura y resultando en una proteína truncada (Anexo 47).

El ensamblado PER_UPCH_41 presentó dos mutaciones significativas: c.632G>A p.Ter211Ter, que podría afectar el splicing del ARN mensajero, y c.184_185delTTinsGTA p.Leu62fs, que causaba un desplazamiento del marco de lectura y generaba un codón de parada prematuro, produciendo una proteína truncada (Anexo 48).

En el ensamblado PER_UPCH_50, se detectó una mutación compleja c.192dupA p.Gln65fs, caracterizada por la duplicación de una adenina en la posición 192 del cDNA, lo que provocaba un cambio en el marco de lectura y resultaba en una proteína truncada y potencialmente no funcional (Anexo 49).

Por otro lado, se evaluaron las mutaciones presentes en el gen *frxA* que estaban relacionadas con el mecanismo de resistencia a metronidazol. Los cambios en el codón V71, R38G, R38D, N111 y C193S se presentaron en 15/32, 8/32, 8/32, 3/32 y 1/32 cepas resistentes, respectivamente, y en 8/18, 5/18, 2/18, 2/18 y 5/18 cepas sensibles, respectivamente. El cambio en el codón A15 y R38E estuvo presente solo en una cepa sensible, y la mutación R38V, M149 y A152V se encontró solo en una cepa resistente (Anexo 50).

Por otro lado, se evaluó la relación entre mutaciones específicas en el gen *frxA* (R38, N111, M149, A152V, C193S, V7I) y el fenotipo de resistencia a un fármaco, mostrando una concordancia muy baja con la resistencia, con un valor de kappa de 0.074, que no es estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.28$). Esto indica que, aunque estas mutaciones están presentes en un porcentaje considerable de cepas resistentes, no hay suficiente evidencia para concluir que esta combinación de mutaciones sea un marcador fiable de resistencia al metronidazol. Estos hallazgos subrayan la necesidad de integrar más marcadores genéticos para mejorar la precisión en la evaluación de la resistencia, ya que la presencia de una mutación sola no es suficiente para confirmar resistencia ni su ausencia garantiza sensibilidad (Anexo 45).

La evaluación de la concordancia entre mutaciones en los genes *frxA* y *rdxA* y el fenotipo de resistencia mostro una concordancia baja a moderada con la resistencia al metronidazol, con un valor de kappa de 0.187 que es estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0476$). Esto indica que esta combinación de mutaciones es un marcador relativamente fiable de resistencia en el contexto evaluado. La significancia estadística respalda que la presencia de estas mutaciones está asociada con la resistencia al metronidazol, lo cual es importante para identificar cepas resistentes.

En el estudio, se identificaron codones de parada prematura en la secuencia génica de la proteína *frxA*, presentes exclusivamente en cepas resistentes. Los codones W30fs, L54fs, P21fs y V99fs se encontraron solo en cepas resistentes. Los codones L39fs y L74fs estuvieron presentes en 16/32 y 3/29 cepas resistentes,

respectivamente, y en 6/18 y 1/18 cepas sensibles. Por otro lado, los codones E35fs, L63fs y W68fs se encontraron únicamente en cepas sensibles (Anexo 50).

Se evaluó la concordancia entre la presencia de codones de terminación prematura en *frxA* (W30fs, L54fs, L39fs, P21fs, L63fs, W68fs, L74fs y V99fs) y el fenotipo de resistencia a metronidazol, obteniendo una concordancia moderada con un valor de kappa de 0.3220, estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0111$). Esto sugiere que esta combinación de mutaciones es un marcador confiable de resistencia en el contexto estudiado. La significancia estadística respalda que la presencia de estas mutaciones de terminación está efectivamente asociada con la resistencia al metronidazol, lo cual es crucial para la identificación de cepas resistentes.

La combinación de mutaciones en *frxA* (R38, M149, A152V, V7I) junto con varias mutaciones de terminación prematura (stop) en *frxA* (W30fs, L54fs, L39fs, P21fs, L63fs, W68fs, L74fs y V99fs) muestra una concordancia muy baja con la resistencia, con un valor de kappa de 0.1107, que no es estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.184$). Esto indica que, aunque estas mutaciones están presentes en un porcentaje considerable de cepas resistentes, no hay suficiente evidencia para concluir que esta combinación de mutaciones sea un marcador fiable de resistencia al metronidazol. Se requiere más investigación para confirmar cualquier posible asociación.

Finalmente, se evaluó la combinación de mutaciones en los genes *frxA* y *rdxA*, que incluye varias mutaciones de terminación prematura (stop), muestra una concordancia de baja a moderada con la resistencia al metronidazol, con un valor de kappa de 0.187, estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0476$). Esto sugiere que esta combinación de mutaciones es un marcador relativamente confiable de

resistencia en el contexto estudiado. La significancia estadística apoya la asociación de estas mutaciones con la resistencia al metronidazol, lo cual es fundamental para la identificación y el tratamiento eficaz de cepas resistentes.

Tabla N°6. Concordancia del perfil genotipo (*frxA* y *rdxA*) y fenotípico de resistencia a Metronidazol.

Mecanismo	Mutación	Acuerdo	Acuerdo esperado	Kap pa	Std. err.	Prob>Z
Mutaciones simples en <i>frxA</i> asociadas a la resistencia a metronidazol	V7I	50.00 %	48.88 %	0,0219	0,1324	0,4343
	R38G	42.00 %	43.28 %	0,0226	0,105	0,5851
	R38D	48.00 %	41.60 %	0,1096	0,093	0,1193
	R38E	34.00 %	36.56 %	0,0404	0,03	0,911
	R38V	38.00 %	36.56 %	0,0227	0,03	0,224
	R38	54.00 %	50.00 %	0,08	0,1358	0,2778
	N111	38.00 %	38.80 %	0,0131	0,0666	0,5779
	M149	38.00 %	36.56 %	0,0227	0,03	0,2243

	A152V	38.00 %	36.56 %	0,02 27	0,03	0,22 43
	C193S	32.00 %	40.48 %	- 0,14 25	0,08 36	0,95 58
Combinacion de mutaciones en frxA asociadas a la resistencia a metronidazol	R38/M149/A152V/V7I	62.00 %	58.96 %	0,07 4	0,12 71	0,28
Codones stop prematuro en frxA	W30fs	38.00 %	36.56 %	0,02 27	0,03	0,22 43
	L54fs	38.00 %	36.56 %	0,02 27	0,03	0,22 43
	E35fs	34.00 %	36.56 %	- 0,04 04	0,03	0,91 1
	L39fs	56.00 %	48.32 %	0,14 86	0,13 04	0,12 72
	P21fs	38.00 %	36.56 %	0,02 27	0,03	0,22 43

	L63fs	34.00 %	36.56 %	- 0,04	0,03	0,91 1
	W68fs	34.00 %	36.56 %	- 0,04	0,03	0,91 1
	L74fs	40.00 %	38.24 %	0,02 85	0,05 96	0,31 64
	V99fs	38.00 %	36.56 %	0,02 27	0,03	0,22 43
Mutaciones en rdxA+frxA	R16 /G162 /M56/Y47C/P106/C46T/G238A/V192/R38/M149/A152V/V7I	68.00 %	60.64 %	0,18 7	0,11 21	0,04 76
Combinacion de stop en frxA	W30fs/L54fs/L39fs/P21fs/L63fs/ W68fs/ L74fs/V99fs	68.00 %	52.80 %	0,32 20	0,14 09	0,01 11
Combinacion de mutaciones en frxA asociadas a la resistencia	R38/M149/A152V/V7I/W30fs/L54fs/L39fs/P21fs/L63fs/ W68fs/ L74fs/V99fs	64.00 %	59.52 %	0,11 07	0,12 3	0,18 4

metronidazol y codones stop prematuro frxA						
Combinacion de mutaciones en frxA Y rdxA asociadas a la resistencia a metronidazol y codones stop prematuro en frxA y rdxA	R16 /G162 /M56/Y47C/P106/C46T/G238A/V192/L33Ter/W52Ter/N73Ter/A206TerC/E75Ter/Gln65Ter/Q50Ter/Q65Ter/Q175Ter/R38/M149/A152V/V7I/W30fs/W30fs/E35fs/L39fs/P21fs/L63fs/ W68fs/ L74fs/V99fs	68.00 %	60.64 %	0,187	0,1121	0,0476
other genes	N85D	50.00 %	55.60 %	-	0,1261	0,816

A51V	46.00 %	38.80 %	0,11 76	0,06 66	0,03 85
N118R	38.00 %	36.56 %	0,02 27	0,03	0,22 43
N118H	54.00 %	46.64 %	0,13 79	0,12 35	0,13 20
H103Y	56.00 %	56.16 %	- 36	0,13 90	0,51 05
S121D	44.00 %	43.84 %	0,00 28	0,10 85	0,48 95
T222A	44.00 %	40.48 %	0,05 91	0,08 36	0,23 97
Q242K	66.00 %	61.20 %	0,12 37	0,10 500	0,11 93
A51V/N118H/N118R/T222A/Q242K	68.00 %	62.88 %	0,13 79	0,07 17	0,02 71

Se evaluaron mutaciones en genes putativos asociados a la resistencia al metronidazol. En la proteína RclC, la mutación N85D se identificó en 14 de 18 cepas sensibles y en 21 de 38 cepas resistentes. En la proteína HP0370, la mutación V265I se encontró en una única cepa resistente. En la proteína HP918, la mutación A51V se presentó exclusivamente en cepas resistentes (5 de 32). No se observaron cambios en la proteína RspU en ninguna de las cepas, sean resistentes o sensibles (Anexo 50).

En la proteína Fur, se detectaron las mutaciones N118R y N118H en 14 de 32 cepas resistentes y 5 de 18 cepas sensibles; la mutación N118R se encontró solo en una cepa resistente. En la proteína RecA, las mutaciones H103Y y S121D estuvieron presentes en 23 de 32 y 9 de 32 cepas resistentes, respectivamente, y en 13 de 18 y 5 de 18 cepas sensibles, respectivamente. En el promotor de *sodB*, la mutación A5C se encontró en 25 de 32 cepas resistentes y en 14 de 18 cepas sensibles. Finalmente, en la proteína RibF, las mutaciones T222A y Q242K se presentaron en 6 de 32 y 30 de 32 cepas resistentes, respectivamente, y en 2 de 18 y 15 de 18 cepas sensibles, respectivamente (Anexo 51).

V.9.2.6. Resistencia a tetraciclina

La resistencia a la tetraciclina en *H. pylori* es menos común que en otras bacterias y sus mecanismos moleculares no están completamente explorados. Se sabe que las mutaciones en el *ARNr 16S* en las posiciones 926 a 928 (codón AGA) son las principales responsables de esta resistencia. En nuestro estudio, no se encontraron

mutaciones en estas posiciones en ninguna de las cepas, tanto resistentes como sensibles (Anexo 52).

Asimismo, no se encontró la mutación A939C en nuestros ensamblados con fenotipo resistente y sensible. Esta mutación se ha reportado en otros estudios en aislados resistentes a este fármaco (Anexo 53).

VI. DISCUSIONES

La resistencia antimicrobiana en *H. pylori* es un desafío creciente en Latinoamérica, con altas tasas de resistencia a claritromicina, metronidazol y levofloxacino. En Perú, las investigaciones indican tasas significativas de resistencia a varios antibióticos, variando del 14% al 57% para amoxicilina, del 35% al 43% para claritromicina, del 58% al 67% para metronidazol, y del 51% para quinolonas, mientras que la resistencia a tetraciclina es baja (4%). Estos altos niveles de resistencia se deben al uso de protocolos de tratamiento globales que no consideran las particularidades locales, aumentando las fallas terapéuticas.

Aunque las pruebas fenotípicas mediante cultivo son el estándar para evaluar la resistencia, su aplicación en Perú es limitada debido a la complejidad del cultivo de *H. pylori*. Las técnicas moleculares, como la PCR y la secuenciación de amplicones, han surgido como alternativas viables para identificar mutaciones asociadas a la resistencia, aunque presentan limitaciones, incluyendo la incapacidad de detectar todas las variantes estructurales complejas y la posibilidad de falsos negativos.

Para superar estos obstáculos, es crucial adoptar la secuenciación del genoma completo (WGS). Este método permite una exploración exhaustiva de los determinantes genéticos de la resistencia antibiótica, proporcionando una comprensión más profunda que las técnicas tradicionales (Tuan et al., 2019; Lin et al., 2023; Fernández-Caso et al., 2023). Además, la comparación de genomas de cepas resistentes y sensibles facilita la identificación de mecanismos de resistencia, lo que puede guiar la elección de terapias clínicas más adecuadas (Saracino et al., 2021).

En este estudio se secuenciaron 51 genomas completos de cepas de *H. pylori* provenientes de pacientes del Hospital Cayetano Heredia y la Clínica Peruana Cayetano Heredia. Estos genomas cuentan con una evaluación completa de su perfil fenotípico de susceptibilidad para los cinco antibióticos: claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tetraciclina y levofloxacino. La resistencia más frecuente fue al levofloxacino, con un 84.31% de las cepas (N=43) mostrando resistencia. Le siguieron el metronidazol con un 62.75% (N=32), la amoxicilina con un 50.98% (N=26), la claritromicina con un 31.37% (N=16) y la tetraciclina con un 5.88% (N=3).

La secuenciación de 51 genomas de *H. pylori* en pacientes del Hospital Cayetano Heredia y la Clínica Peruana Cayetano Heredia utilizó la plataforma Illumina MiSeq, produciendo lecturas paired-end de 150 a 300 pb. FastQC mostró puntajes altos de calidad ($Q > 30$), con mínima presencia de N por base y distribución de GC alineada con la teórica. Trimmomatic eliminó secuencias no deseadas, confirmándose la alta calidad de las lecturas para análisis posteriores. La resistencia más frecuente fue al levofloxacino (84.31%), seguida de metronidazol (62.75%),

amoxicilina (50.98%), claritromicina (31.37%) y tetraciclina (5.88%). Estos resultados respaldan la idoneidad de la plataforma Illumina MiSeq para la secuenciación de *H. pylori*, permitiendo estudios detallados de resistencia antimicrobiana y estructura poblacional. La base de datos de NCBI contiene más de 4,494 genomas de *H. pylori*, secuenciados principalmente con tecnología Illumina, contribuyendo a iniciativas globales de investigación (Jiang et al., 2021; Thorell et al., 2023).

Luego de verificar la calidad de las lecturas, se realizó un ensamblado de novo utilizando el pipeline de Patric junto con las herramientas bioinformáticas de Spades y Pilon, obteniendo 50 ensamblados de alta calidad de *H. pylori*. El ensamblado de novo ha demostrado ser superior al basado en un genoma de referencia para evaluar los determinantes genéticos relacionados con la resistencia antimicrobiana (RAM) en *H. pylori*. Estudios previos han validado la eficacia del ensamblaje de novo para identificar variantes genéticas relacionadas con la RAM, mostrando mayor exactitud y fiabilidad. Específicamente, el ensamblaje de novo permitió recuperar genes completos y mostró una mejor congruencia con las secuencias de referencia estándar, alcanzando un valor de Kappa de 1.0 y tasas de verdaderos positivos (TP) y verdaderos negativos (TN) del 100% ($p < 0.0001$) (Tshibangu-Kabamba et al., 2020).

En la evaluación de la calidad de los ensamblados de *H. pylori* se observó una variabilidad considerable en el número de contigs, desde 28 en PER_UPCH_1 hasta 940 en PER_UPCH_19. Un menor número de contigs sugiere ensamblados de mayor calidad, mientras que un alto número indica ensamblados más fragmentados y de menor calidad. La calidad del ensamblado puede verse afectada por la calidad

de las lecturas de secuenciación, la cobertura del genoma y la eficiencia del software de ensamblado (Gurevich et al., 2013).

El uso de Pilon mejoró significativamente la calidad de los ensamblados al corregir errores, cerrar brechas y arreglar ensamblajes incorrectos, reduciendo el número de contigs y aumentando su longitud (Walker et al., 2014). Otros estudios también han utilizado Pilon para mejorar los ensamblados de *H. pylori*, como la caracterización de la cepa 444A y los genomas completos de las cepas vietnamitas CHC155 y VN1291, demostrando su efectividad en obtener ensamblados más precisos y completos (Wilkinson et al., 2023; Phuc et al., 2023).

La longitud total del ensamblado es un indicador crucial de la calidad del ensamblaje genómico, ya que refleja la integridad y representatividad del genoma (Gurevich et al., 2013). Un ensamblado que se aproxima al tamaño del genoma de referencia de *H. pylori* (~1.6 Mbp) sugiere precisión en el ensamblaje. En este estudio, los tamaños de los genomas ensamblados variaron entre aproximadamente 1.63 y 1.68 Mbp, indicando alta calidad y representatividad. Discrepancias menores pueden deberse a diferencias en la calidad del ADN o la presencia de variantes genéticas. Ensamblados significativamente menores pueden indicar incompletitud o pérdida de información genética, mientras que ensamblados más grandes pueden capturar secuencias adicionales relevantes (Tomb et al., 1997; Wilkinson et al., 2022).

Un caso particular fue el ensamblado PER_UPCH_19, con un tamaño de 2,792,222 pb, significativamente mayor que el genoma de referencia. Esto sugiere posibles problemas como contaminación, errores de secuenciación o ensamblaje, o elementos genéticos adicionales. Este ensamblado fue examinado más

detenidamente para identificar posibles errores del ensamblado y contaminación por otros elementos genéticos en las siguientes etapas (Gurevich et al., 2013)

La evaluación del porcentaje de guanina-citosina (GC%) en los ensamblados de *H. pylori* reveló varios aspectos críticos sobre la calidad y precisión del ensamblado. Los porcentajes de GC se alinearon estrechamente con el valor de referencia (38.87%), lo que indica que los ensamblajes son representaciones precisas de la composición genómica de *H. pylori* (Tomb et al., 1997; Ge & Taylor, 1998). Esta concordancia es esencial, ya que discrepancias significativas en el contenido de GC podrían sugerir errores en el ensamblado, como inclusión de secuencias contaminantes o pérdida de fragmentos de ADN (Draper et al., 2017).

Se evaluó la métrica del N50 en los ensamblados para determinar su calidad. El N50 representa la longitud mínima de un contig que abarca el 50% del genoma ensamblado. Un valor elevado de N50 indica un ensamblado más continuo y de mayor calidad, sugiriendo que contiene contigs más largos y menos fragmentados (Salzberg et al., 2012).

Los ensamblajes con los valores de N50 más altos, como PER_UPCH_1 (192,703 bp), PER_UPCH_38 (143,833 bp), PER_UPCH_47 (136,220 bp), PER_UPCH_9 (128,097 bp) y PER_UPCH_23 (117,350 bp), mostraron una mayor contigüidad. Estos resultados sugieren que las metodologías de ensamblaje fueron efectivas, logrando ensamblar el genoma en fragmentos más largos y reduciendo la fragmentación. Esta alta contigüidad facilitó la anotación de genes, el mapeo de variantes genéticas y la exploración de la organización estructural del genoma en *H. pylori* (Daza et al., 2023; Aguilar-Bultet et al., 2015).

Por otro lado, los ensamblajes con valores más bajos de N50, como PER_UPCH_19, PER_UPCH_24, PER_UPCH_25, PER_UPCH_30 y PER_UPCH_37, indicaron una menor contigüidad en comparación con aquellos que presentaron valores de N50 más altos. Los valores reducidos de N50 sugirieron que los ensamblajes resultaron fragmentados. Esta fragmentación fue evaluada con más detalle, así como los resultados de los procesos de anotación y llamados de variantes, utilizando parámetros estrictos para evitar la introducción de falsos positivos (Aguilar-Bultet et al., 2015).

Los valores de L50 también se evaluaron como una métrica crucial para la calidad de los ensamblajes genómicos de *H. pylori*. La mayoría de los ensamblados genómicos de *H. pylori* presentaron valores de L50 bajos, indicando que se necesitó un número reducido de contigs para cubrir el 50% del genoma. Esto sugiere buena contigüidad y calidad en estos ensamblados, lo cual es crucial para análisis genómicos detallados y precisos (Salzberg et al., 2012; Gurevich et al., 2013).

Sin embargo, ensamblados con valores de L50 considerablemente más altos, como PER_UPCH_19, con el valor N50 más bajo de 4,712 y un L50 de 164, indicaron que se necesitó un número significativamente mayor de contigs pequeños para cubrir el 50% del genoma. Esto sugiere una menor contigüidad y calidad en comparación con otros ensamblados del estudio. La menor contigüidad pudo haber sido resultado de problemas técnicos durante la secuenciación o de limitaciones inherentes a la técnica de ensamblaje (Aguilar-Bultet et al., 2015).

En seguida, se utilizó la herramienta CheckM2 para evaluar la completitud y la contaminación de los ensamblados genómicos de *H. pylori*, (Chklovski et al.,

2023). Bajo los criterios, 45 ensamblados cumplieron con los requisitos, demostrando una representación casi total del genoma y una mínima presencia de material genético no deseado. En contraste, 6 ensamblados fueron identificados como subóptimos debido a niveles elevados de contaminación. En particular, PER_UPCH_22, PER_UPCH_25, PER_UPCH_30 y PER_UPCH_8 presentaron ligeros niveles de contaminación, pero mantuvieron una completitud casi total. Esta contaminación puede indicar la presencia de secuencias derivadas de otras bacterias o múltiples cepas de *H. pylori* (Mehrotra et al., 2021).

Para investigar la causa de la contaminación observada, se empleó la herramienta KrakenUniq. En el ensamblado PER_UPCH_22, el análisis reveló la presencia de múltiples cepas de *H. pylori*, incluyendo *H. pylori* ELS37 y NY40. Similarmente, PER_UPCH_25 mostró múltiples linajes genéticos, destacándose *H. pylori* ELS37 y NY40. PER_UPCH_30 también identificó múltiples cepas, con *H. pylori* SJM180 y ELS37 entre las predominantes. En el ensamblado PER_UPCH_8, se detectó una notable diversidad de cepas, incluyendo *H. pylori* PeCan18 y Gambia94/24. Estos hallazgos corroboran la teoría de que la contaminación observada se debe a la coexistencia de múltiples cepas de la misma especie.

Por otro lado, el ensamblado PER_UPCH_19, que, a pesar de tener una completitud del 100%, mostró una contaminación excepcionalmente alta del 58.71. El análisis de Kraken reveló una considerable diversidad genética, destacando cepas como *H. pylori* ELS37 con 32 lecturas (12.45%), *H. pylori* SJM180 con 22 lecturas (8.56%) y *H. pylori* NY40 con 20 lecturas (7.78%), entre otras. Esta mezcla de cepas explica

la alta contaminación observada y subraya la importancia de considerar la variabilidad intraespecífica en el estudio.

En un estudio de 42 borradores de genomas de otras cepas indias de *H. pylori* presentado por Shetty et al. (2018), CheckM indicó más del 99% de integridad del genoma, pero 12 cepas tuvieron contaminación con porcentajes entre 0.05% y 0.81%. Ocho cepas de *H. pylori* mostraron heterogeneidad, con una sola cepa representando el 50% y las siete restantes una mezcla del 100% de múltiples cepas. En otros 70 genomas completos de *H. pylori*, CheckM2 reveló integridad superior al 99%, con 16 cepas teniendo entre 0.1% y 4.07% de contaminación, y 11 genomas con heterogeneidad de cepas entre el 50% y el 100%, indicando la presencia de ADN de múltiples cepas. Solo una cepa de *H. pylori* tuvo más del 1% de contaminación. En un estudio reciente, Mehrotra et al. (2021) revelaron que los genomas ensamblados de 12 aislamientos reportados tienen una cobertura del genoma superior al 98%. Se detectó menos del 0.5% de contaminación en 4 cepas, y no se identificaron lecturas contaminantes en las 8 cepas restantes de *H. pylori*. Se observó heterogeneidad en dos genomas ensamblados, con un 50% y 100%, y una contaminación muy baja de 0.41% y 0.2%, respectivamente.

La densidad de codificación es un parámetro crucial para evaluar la calidad de los ensamblados genómicos, ya que refleja la proporción del genoma compuesta por secuencias codificantes de proteínas. El genoma de *Helicobacter pylori* tiene una densidad de codificación excepcionalmente alta, con más del 90% de su genoma constituido por secuencias codificantes, lo que refleja su naturaleza compacta y adaptación a su nicho gástrico especializado (Farnbacher et al., 2010). Todos los ensamblados analizados mostraron una densidad de codificación superior al 90%,

indicando una organización óptima del genoma y un alto porcentaje de secuencias destinadas a genes codificantes, característica típica de genomas bacterianos compactos y bien anotados, como los de *H. pylori*.

Las características generales del genoma de *H. pylori*, incluyendo la longitud promedio de las secuencias codificantes y la densidad de codificación, son similares entre diferentes cepas (Mobley et al., 2001). Por ejemplo, el genoma de la cepa 26695 tiene un cromosoma circular de 1,667,867 pares de bases y 1,590 secuencias codificantes predichas (Tomb et al., 1997), mientras que la cepa HP14039 tiene 1,678,260 pares de bases con 1,574 genes codificantes (Lamichhane et al., 2019).

Para asegurar la integridad y calidad de los ensamblados genómicos de *H. pylori*, se utilizó la herramienta BUSCO. En ensamblados con alta integridad, como PER_UPCH_39, PER_UPCH_32, PER_UPCH_10, PER_UPCH_23 y PER_UPCH_52, se observaron altos porcentajes de genes "Completo y en una sola copia", con valores entre el 83.06% y el 84.68%. Estos resultados destacan la eficacia de las técnicas de secuenciación y ensamblaje utilizadas, reflejando una representación precisa del genoma de referencia. La misma herramienta se utilizó en el Proyecto Genoma de *H. pylori* (HpGP), donde los 1,011 ensamblajes generados obtuvieron puntuaciones BUSCO superiores al 95%, considerado un buen ensamblaje, independientemente del instrumento de secuenciación PacBio utilizado (Thorell et al., 2023).

En el ensamblado PER_UPCH_19, se observó una notable presencia de genes "Completos y duplicados" (41.13%), sugiriendo posibles amplificaciones genéticas o artefactos de ensamblaje. Esto concuerda con la evaluación de la heterogeneidad del ensamblado, que reveló múltiples cepas. Algunos contigs podrían albergar

secuencias con alta identidad de diferentes cepas debido a la conservación de la secuencia. Los genes duplicados en *H. pylori* son principalmente proteínas de la membrana externa (OMP), como homB y homA, implicados en la virulencia y la aptitud bacteriana (Oleastro et al., 2009).

La evaluación también reveló ensamblados con altos porcentajes de genes "Fragmentado", como PER_UPCH_24, PER_UPCH_43, PER_UPCH_42, PER_UPCH_19 y PER_UPCH_28, lo que podría indicar problemas en el ensamblaje o en la calidad del material genético. La fragmentación es común en bacterias patógenas y puede influir en su capacidad para transferir ADN y desarrollar resistencia a antibióticos (Pérez Mendoza, 2004; González & Jiménez, 2010). Además, ensamblados como PER_UPCH_24 y PER_UPCH_43 mostraron más del 12% de genes "Perdido", indicando deficiencias en la cobertura genómica. El remapeo de las lecturas al ensamblado de novo se realizó para validar la calidad y precisión del ensamblado. Un alto porcentaje de lecturas que se alinean correctamente con el ensamblado indica que este es una representación fiel del genoma original, asegurando que no contiene errores significativos ni secuencias contaminantes (Lischer & Shimizu, 2017). Este proceso permite no solo garantizar una alta cobertura, es decir, cuántas veces cada base del ensamblado está cubierta por una lectura, sino también identificar variantes genéticas con mayor precisión (Biomedical Hub, 2019; Lischer & Shimizu, 2017).

La mayoría de los ensamblados (41) de *H. pylori* presentaron más del 70% de lecturas alineadas de manera única a una región del genoma, lo que indica alta especificidad en el mapeo y confianza en la precisión de estas regiones. Un porcentaje de mapeo del 70% o superior refleja buena calidad de las secuencias y

parámetros de alineación apropiados (Harvard Chan Bioinformatics Core, 2020). Sin embargo, 24 ensamblados mostraron más del 1% de lecturas alineadas en múltiples ubicaciones, sugiriendo la presencia de regiones repetitivas o similitudes genómicas significativas. Estas secuencias repetitivas, comunes en *H. pylori*, pueden mediar variaciones de fase y regular la expresión de genes esenciales para la colonización (Åberg et al., 2014; Saunders et al., 2005).

Todos los ensamblados evaluados superaron el umbral del 90% en la tasa de alineación total, asegurando que la mayoría de las lecturas contribuyeran significativamente a la construcción del genoma y permitiendo un análisis detallado y confiable (Crysnanto & Pausch, 2020; Harvard Chan Bioinformatics Core, 2020). Tras evaluar la calidad del ensamblaje con Quast, CheckM2, Busco, densidad de cobertura y mapeo de lecturas, se determinó que 50 ensamblados eran óptimos, excepto PER_UPCH_19, que no cumplió con los parámetros mínimos requeridos (Manchanda et al., 2020; Mikheenko et al., 2023).

La anotación de los 50 ensamblados óptimos de *H. pylori* se realizó utilizando Bakta y la base de datos UniRef de UniProt, asegurando alta sensibilidad y especificidad en la anotación genómica. La densidad de codificación en los ensamblados varió entre 85% y 92%, excepto en PER_UPCH_24, que presentó una densidad del 79.9%, sugiriendo posibles problemas de ensamblaje o secuencias no codificantes extensas (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999; Kawahara et al., 2011; Pop & Salzberg, 2008).

Se evaluaron parámetros como la longitud del ensamblado, la proporción de bases 'N', el contenido de GC, la densidad de codificación, el número de CDSs, y la

presencia de genes de ARNt, ARNm y ARNr. La mayoría de los ensamblados presentaron entre 36 y 38 ARNt, valores típicos para *H. pylori*, con variabilidad reflejando adaptaciones genéticas (Dundon et al., 1999; Kanaya et al., 1999). Todos los ensamblados contenían un tmRNA, crucial para la trans-terminación de ribosomas bloqueados y la respuesta al estrés celular (Keiler, 2008).

El número de rARNs fue consistente con tres rARNs en todos los ensamblados, reflejando la estructura genómica típica de *H. pylori* (Iost et al., 2019; Marais et al., 1999; Salama et al., 2000). Ninguno de los ensamblados presentó arrays CRISPR, alineándose con reportes previos sobre *H. pylori* (Smeets & Kusters, 2002).

El número de CDSs varió entre 1449 y 1678, reflejando una estructura genómica conservada, con variabilidad debido a recombinación y transferencia horizontal de genes (HGT) (Baltrus et al., 2009; Falush et al., 2003). La cantidad de pseudogenes fluctuó entre 6 y 16, indicando dinámica evolutiva y adaptación a diferentes ambientes (Kuo & Ochman, 2010; Aras et al., 2003). El número de proteínas hipotéticas varió de 11 a 97, con la mayoría entre 20 y 50, dificultando la comprensión completa de la biología de *H. pylori* (Park et al., 2012).

La resistencia antimicrobiana a la claritromicina en Perú ha mostrado cifras alarmantes. La prevalencia de resistencia de *H. pylori* varía significativamente entre antibióticos. Para amoxicilina, la resistencia en pacientes fue del 14% y en muestras alcanzó el 57%. La claritromicina mostró una resistencia del 43% en pacientes y del 35% en muestras. Para el metronidazol, la resistencia fue del 58% en pacientes y del 67% en muestras. Las quinolonas presentaron una resistencia del 51% en pacientes y del 55% en muestras. La resistencia a tetraciclina fue baja, reportándose un 4% en muestras (Villavicencio et al., 2022).

En Perú, como en otros países latinoamericanos, no existen directrices oficiales basadas en la epidemiología local para el tratamiento de *H. pylori*. Dados los umbrales de las tasas de resistencia propuestos por el Informe de Consenso V de Maastricht, los informes recientes sugieren que, idealmente, la prueba de susceptibilidad antimicrobiana debería realizarse antes del tratamiento y los tratamientos empíricos basados en tres o cuatro fármacos deberían abandonarse (Malfertheiner et al., 2017).

Para identificar posibles mecanismos moleculares de resistencia antimicrobiana (RAM), se analizaron los datos de secuenciación del genoma completo (WGS) de *H. pylori* mediante la plataforma Illumina. Al no detectar plásmidos en nuestros aislados, confirmamos que todos los determinantes de resistencia están codificados en el genoma bacteriano. Utilizamos un enfoque basado en WGS para descubrir variantes en genes relacionados con la RAM, permitiendo identificar posibles marcadores moleculares para cada antibiótico. Esto puede ser usado en el desarrollo de pruebas moleculares de resistencia antimicrobiana en *H. pylori*. Se midió la eficacia de la detección molecular de resistencia y se estimó la concordancia fenotipo-genotipo utilizando las mutaciones asociadas a la resistencia a claritromicina, levofloxacina, amoxicilina y metronidazol.

Primero, utilizamos la herramienta bioinformática RGI (Resistance Gene Identifier) para identificar genes de resistencia a antimicrobianos en secuencias genómicas de *H. pylori*. Se reveló una presencia significativa de variantes mutadas en los genes *pbp1* y *pbp2* en todos los ensamblados, codificando las proteínas de unión a penicilina (*PBP1* y *PBP2*). Estas mutaciones reducen la afinidad del antibiótico, resultando en resistencia bacteriana (Alcock et al., 2023). Estudios previos

identificaron mutaciones en *pbp* como un mecanismo común de resistencia a los antibióticos betalactámicos en *H. pylori* (Mégraud, 2004; Gerrits et al., 2006; Rimbara et al., 2008; Tshibangu-Kabamba et al., 2020).

La presencia del gen *pbp3* en varios ensamblados (PER_UPCH_37, PER_UPCH_45, PER_UPCH_18, PER_UPCH_26) sugiere una adaptación para modificar *PBP3* y reducir la afinidad por la amoxicilina, confiriendo resistencia a cefalosporinas y cefamicinas (Calvo y Martínez, 2009).

Se identificaron mutaciones específicas en el gen *gyrA* en 37 ensamblados, asociadas con la resistencia a las fluoroquinolonas. Estas mutaciones afectan la ADN girasa, un objetivo principal de las fluoroquinolonas. Estas mutaciones alteran la estructura de la ADN girasa y modifican el sitio de unión de la rifampicina en la ARN polimerasa, impidiendo su acción inhibitoria (Heep et al., 2000; Lauener et al., 2019; Tshibangu-Kabamba et al., 2020; Miyachi et al., 2006).

El gen *hp1181* estuvo presente en 51 ensamblados, mientras que el gen *ARNr 23S* fue identificado en 49 ensamblados con mutaciones asociadas a la resistencia a la claritromicina. El gen *hp1181* codifica una translocasa de la familia de bombas de eflujo de la superfamilia de facilitadores mayores (MFS), involucrada en la resistencia antimicrobiana mediante el eflujo activo de antibióticos fuera de la célula bacteriana (Falsafi et al., 2016; Li et al., 2016). Las mutaciones en *hp1181* se han asociado con la resistencia a fluoroquinolonas y tetraciclina, sugiriendo que este gen podría estar involucrado en mecanismos de eflujo o alteraciones en las dianas del antibiótico (Miyachi et al., 2006). Este mecanismo es una estrategia clave de *H. pylori* para sobrevivir frente a múltiples clases de antibióticos, contribuyendo tanto a su resistencia intrínseca como adquirida (Fernández-Caso et al., 2023).

Por otro lado, estudios previos han demostrado que las mutaciones en el gen *ARNr 23S* son un mecanismo bien establecido de resistencia a la claritromicina en *H. pylori*. Las mutaciones más comunes asociadas con esta resistencia son las transiciones A2142G y A2143G, que provocan cambios conformacionales en el sitio de unión, reduciendo la afinidad del ribosoma por la claritromicina y, por lo tanto, su eficacia inhibidora. Estos cambios son altamente prevalentes en cepas resistentes y son un indicador importante de resistencia antimicrobiana (Liu et al., 2022; Mégraud, 2004).

Las mutaciones en los genes *frxA* y *rdxA*, encontradas en 38 y 48 ensamblados respectivamente, indican resistencia al metronidazol, otro antibiótico clave en el tratamiento de *H. pylori*. Estudios previos demostraron que las mutaciones en *frxA*, que codifica una proteína reductasa, y en *rdxA*, que codifica una oxidorreductasa, inactivan estas enzimas, disminuyendo la capacidad del metronidazol para ser reducido a su forma activa, resultando en resistencia (Goodwin et al., 1998). Gerrits et al. (2002) identificaron que la pérdida de función en *rdxA* es un mecanismo principal de resistencia al metronidazol. La prevalencia de estas mutaciones subraya la adaptabilidad de *H. pylori* y la necesidad de continuar investigando estos mecanismos para mejorar las estrategias de tratamiento.

La resistencia de *H. pylori* a la claritromicina, un antibiótico de primera línea, es un problema creciente en varios países, incluyendo Perú (Guzmán et al., 2019). En este estudio, se utilizó WGS para evaluar estas mutaciones. Se investigaron variaciones en las posiciones 2142 y 2143, conocidas por conferir resistencia a la claritromicina.

Se analizaron 16 cepas resistentes y 34 cepas sensibles, identificando 91 variantes en el *ARNr 23S*. Las mutaciones en las posiciones 2142 y 2143 fueron predominantes en las cepas resistentes, encontrándose en 7 de 16 cepas en la posición 2142 y en 5 de 16 cepas en la posición 2143.

Estos hallazgos coinciden con otros estudios que identificaron estas mutaciones como claves en la resistencia a la claritromicina. Un estudio en pacientes sudaneses encontró las mutaciones A2142G y A2143G en cepas resistentes, confirmando su asociación con la resistencia (Albasha et al., 2021). Otro estudio utilizando WGS también identificó estas mutaciones en cepas resistentes, reforzando su validez como marcadores de resistencia (Chen et al., 2018).

En un estudio con 431 pacientes infectados por *H. pylori*, se identificaron las mutaciones A2142G, A2142C, A2143G y A2143C como clínicamente significativas para la resistencia a la claritromicina, siendo A2143G la más prevalente (Seo et al., 2019). En América Latina, varios estudios han observado una alta prevalencia de estas mutaciones en el gen *ARNr 23S* asociadas con resistencia a claritromicina. En México, un estudio de WGS encontró estas mutaciones en cepas resistentes de *H. pylori*, indicando que estas posiciones son cruciales para la resistencia (Camorlinga-Ponce et al., 2021). Otro estudio en América Latina reportó la prevalencia de estas mutaciones en varias poblaciones, subrayando su relevancia clínica y epidemiológica (Ha et al., 2018).

En el estudio, se evaluó la concordancia entre el perfil de resistencia fenotípico y la presencia de la mutación A2142G en el gen *ARNr 23S*, obteniendo un coeficiente kappa de 0.5140, lo que indica una concordancia moderada y significativa ($\text{Prob} > Z=0$). El acuerdo entre los métodos fue del 82%, mayor que el acuerdo

esperado por casualidad del 62.96%. Esto refuerza la validez de la mutación A2142G como marcador de resistencia.

Estos hallazgos coinciden con otros estudios sobre la mutación A2142G como marcador de resistencia. Por ejemplo, un estudio en Corea encontró la mutación A2142G en un número significativo de cepas resistentes a claritromicina, reportando un kappa de 0.61, indicando una alta concordancia moderada (Iwamoto et al., 2014). Un estudio en China reportó un kappa de 0.62 utilizando DPO-PCR, subrayando la fiabilidad de este marcador (Kim et al., 2023). Además, investigaciones han demostrado que las mutaciones en las posiciones 2142 y 2143 del *ARNr 23S* son clínicamente significativas para la resistencia a claritromicina en varias poblaciones, incluyendo Corea y otros países asiáticos (Gong et al., 2020).

Un estudio europeo encontró una concordancia del 99% entre las mutaciones detectadas por secuenciación de genoma completo y el fenotipo de resistencia a claritromicina, reforzando la validez del uso de la mutación A2142G como marcador fiable (Kim et al., 2023). Otro estudio utilizando secuenciación de genoma completo identificó mutaciones en todas las cepas resistentes, confirmando la fuerte asociación entre la mutación A2142G y la resistencia a claritromicina (Iwamoto et al., 2014).

La evaluación de la concordancia entre el fenotipo de resistencia a claritromicina y la presencia de la mutación A2143G en *H. pylori* reveló un coeficiente kappa de 0.2981, indicando una concordancia débil. Aunque existe una relación entre la mutación y la resistencia, esta no es fuerte, sugiriendo la influencia de otros factores. La significancia estadística de estos resultados ($p=0.0079$, $Z=2.41$) confirma que la concordancia observada es real y no producto del azar.

Este hallazgo es consistente con estudios previos que han encontrado que la resistencia a la claritromicina en *H. pylori* es multifactorial y que la mutación A2143G, aunque importante, no es el único determinante (Marques et al., 2020; Sugimoto et al., 2009; Albasha et al., 2021; Losurdo et al., 2020). Otros estudios han reportado una fuerte correlación entre la mutación A2143G y la resistencia a la claritromicina, con coeficientes kappa significativamente mayores. Por ejemplo, un estudio en Japón reportó una concordancia del 90% y un coeficiente kappa de 0.85, sugiriendo una fuerte asociación entre la mutación y el fenotipo de resistencia (Kobayashi et al., 2007). Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en las poblaciones estudiadas, métodos de detección o variaciones en las cepas de *H. pylori*.

La evaluación de la concordancia entre las mutaciones A2143G o A2142G y el fenotipo de resistencia a la claritromicina es fundamental para comprender cómo estas variaciones genéticas contribuyen a la resistencia a los antibióticos. Nuestro estudio mostró un alto grado de acuerdo del 88.00% y un coeficiente kappa de 0.7148, indicando una concordancia sustancial. Estos resultados, respaldados por una estadística Z de 5.08 y un valor p de 0.0000, confirman que la relación observada no es producto del azar y supera significativamente el acuerdo esperado por casualidad del 57.92%. La evaluación de estas mutaciones como marcadores de resistencia a la claritromicina mostró alta efectividad en la identificación del fenotipo resistente.

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que han confirmado la fuerte correlación entre las mutaciones A2143G y A2142G y la resistencia a la claritromicina. Por ejemplo, Camorlinga-Ponce et al. (2021) encontraron una

concordancia sustancial entre estas mutaciones y el fenotipo de resistencia en cepas mexicanas de *H. pylori*, con un coeficiente kappa de 0.69. Farzi et al. (2019) analizaron cepas de varias regiones del mundo, confirmando que estas mutaciones se asocian fuertemente con la resistencia, con coeficientes kappa superiores a 0.7 en la mayoría de las regiones. Tshibangu-Kabamba et al. (2020) también reportaron una concordancia significativa en cepas aisladas en África y Asia.

En Perú, Chu et al. (2020) reportaron una razón de prevalencia (RP) de 3.4 para la mutación A2143G (IC 95%: [2.6-4.5], $p < 0.001$) y una RP de 3.7 para la mutación A2142G (IC 95%: [2.9-4.7], $p < 0.001$), basándose en un análisis bivariado utilizando un modelo de regresión de Poisson. Estos resultados sugieren que el genotipado del *ARNr 23S* puede ser recomendado para la detección de resistencia a claritromicina en cepas de *H. pylori* en nuestra comunidad.

Además, se evaluaron mutaciones adicionales que están en estudio por su relación con la resistencia a la claritromicina. En las cepas fenotípicamente sensibles, se detectaron las mutaciones G1940A en 2 de 34 cepas, G1959A en 1 de 34 cepas y T2182C en 5 de 34 cepas. En las cepas resistentes, se identificaron las mutaciones C1944T en 1 de 16 cepas, T1965C en 1 de 16 cepas y T2182C en 2 de 16 cepas. Además, la mutación T2243C se encontró en todas las cepas resistentes. Estas observaciones coinciden con estudios previos que han reportado la presencia de la mutación T2182C en cepas resistentes, aunque no de manera exclusiva, sugiriendo su posible rol en la resistencia a la claritromicina (Ayaş et al., 2024; Guzmán, 2016). Un estudio en Sudán también identificó la mutación T2182C en varias muestras resistentes a claritromicina, reforzando su implicancia en los mecanismos de resistencia de *H. pylori* (Albasha et al., 2021).

Las mutaciones G1940A y G1959A, aunque menos frecuentemente reportadas, junto con C1944T y T1965C, han sido identificadas en cepas resistentes, sugiriendo un papel potencial en mecanismos específicos de resistencia que requieren más investigación (Gong et al., 2020). Estos estudios subrayan la importancia de las mutaciones en el gen *ARNr 23S* y su relación con la resistencia a la claritromicina en *H. pylori*. La comprensión detallada de estos mecanismos y la identificación de nuevas mutaciones relevantes son áreas cruciales de investigación para mejorar las estrategias de tratamiento y manejo de esta infección resistente (Ayaş et al., 2024). Además, se evaluaron genes putativos relacionados con la resistencia a la claritromicina, como *infB* y *rpl22*, sin encontrar mutaciones en estas secuencias. Este hallazgo es relevante, ya que estos genes podrían servir como marcadores moleculares en futuros estudios para determinar su contribución a la resistencia a la claritromicina. Investigaciones previas han sugerido que ciertas mutaciones en el gen *infB*, como la G160A, pueden estar asociadas con una mayor tolerancia a la claritromicina en *H. pylori* (Zanotti & Cendron, 2019; Binh et al., 2014).

La ausencia de mutaciones en dos cepas fenotípicamente resistentes sugiere que otros mecanismos de resistencia, como las bombas de eflujo, las formas cocoides y la formación de biopelículas, podrían estar contribuyendo a la resistencia a la claritromicina. Este resultado es consistente con estudios previos que han demostrado que las bombas de eflujo y las biopelículas juegan un papel crucial en el desarrollo de la resistencia a los antibióticos en *H. pylori*. Por ejemplo, se ha informado que las bombas de eflujo pueden contribuir significativamente a la resistencia a la claritromicina, incluso en presencia de mutaciones en el gen *ARNr*

23S (Ayaş et al., 2024; Park et al., 2023). Además, la formación de biopelículas ha sido reconocida como un mecanismo importante que protege a las bacterias de la acción de los antibióticos, lo cual puede explicar la resistencia observada en las cepas que no presentan mutaciones específicas (Gong et al., 2020). Estos hallazgos refuerzan la necesidad de continuar investigando no solo las mutaciones específicas en genes como el *ARNr 23S*, sino también otros posibles mecanismos y genes involucrados en la resistencia a los antibióticos. La comprensión detallada de estos mecanismos permitirá desarrollar estrategias de tratamiento más efectivas y personalizadas para combatir la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina, mejorando así las tasas de erradicación y reduciendo la incidencia de fracasos terapéuticos.

La resistencia a levofloxacino en *H. pylori* se debe principalmente a mutaciones en codones específicos dentro y fuera de la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA* y *gyrB*, que codifican las subunidades A y B de la ADN girasa (Moore et al., 1995; Tankovic et al., 2003). Específicamente, se han identificado intercambios de aminoácidos N87I, N87K y N87T en el codón 87, y D91Y, D91N y D91G en el codón 91. Estas mutaciones alteran la estructura y función de la enzima ADN girasa, impidiendo que las quinolonas se unan eficazmente y ejerzan su efecto bactericida.

En nuestro estudio, se identificaron varias variantes genéticas en 43 cepas resistentes a levofloxacino. Las frecuencias de las mutaciones en *gyrA* fueron: N87K (18/100), N87I (26/100), N87T (5/100), D91Y (7/100), D91G (21/100) y D91N (19/100). Además, 12/43 de las cepas resistentes presentaron una extensión

N-terminal de *GyrA* (QDNSV) y 6/43 no presentaron ninguna mutación en QRDR. En cepas sensibles, 5/8 no presentaron variantes, mientras que 1/8 presentaron N87T, 1/8 presentaron N87I y 3/8 presentaron la extensión QDNSV.

Estudios en Nepal, Brasil y Colombia han encontrado mutaciones similares. En Nepal, se identificaron mutaciones N87I y D91N en cepas resistentes. En Brasil, el 83.3% de las mutaciones ocurrieron en el codón 87 y el 16.7% en el codón 91. En Colombia, Trespacios y colaboradores reportaron mutaciones N87I, D91N y N87K en cepas resistentes, siendo N87I la más común. Estos estudios confirman la importancia de las mutaciones en los codones 87 y 91 de *gyrA* en la resistencia a levofloxacino (Miftahussurur et al., 2016; Vianna et al., 2018; Egli et al., 2020; Trespacios-Rangél et al., 2016).

La evaluación de la concordancia entre las mutaciones N87K y N87I en el gen *gyrA* y el fenotipo de resistencia a levofloxacino mostró baja concordancia, con coeficientes kappa de 0.0602 para N87K y 0.0396 para N87I, ninguno de los cuales fue estadísticamente significativo. Estudios previos han indicado que ciertas mutaciones en el gen *gyrA* son indicadores de resistencia, pero no están presentes en todas las cepas resistentes. De Francesco et al. (2010) identificaron la mutación N87K como un marcador de resistencia en un subgrupo específico de cepas resistentes a levofloxacino, sugiriendo que la resistencia en *H. pylori* puede involucrar múltiples mecanismos. Un estudio en Colombia encontró la mutación N87K en solo el 11.3% de las cepas resistentes a levofloxacino, mientras que en Polonia se observó una alta prevalencia de esta mutación en cepas resistentes, aunque con variabilidad en otras mutaciones del gen *gyrA*.

La mutación N87I mostró una baja concordancia no significativa con el fenotipo de resistencia ($p=0.2582$). Cambau et al. (2009) encontraron que N87I estaba asociada con la resistencia a levofloxacino en *H. pylori*, pero no en todas las cepas resistentes, reflejando la heterogeneidad genética de la bacteria. En Bogotá, Colombia, N87I era prevalente en el 43.8% de las cepas resistentes, pero también se encontraron cepas resistentes sin mutaciones en *gyrA*, sugiriendo otros mecanismos de resistencia. Un estudio en Senegal también reportó que N87I era común en cepas resistentes, pero no en todas, subrayando la necesidad de considerar múltiples mutaciones para un diagnóstico más preciso.

La mutación N87T muestra una baja concordancia con el perfil fenotípico de resistencia a levofloxacino, con un coeficiente kappa de -0.0284. La baja concordancia, con un valor p de 0.8402, indica que esta mutación no está presente en todas las cepas resistentes. Un estudio de Rimbara et al. (2012) también encontró que N87T no estaba significativamente asociada con la resistencia a levofloxacino, confirmando que no debe ser considerada un marcador fiable para esta resistencia.

La evaluación de la concordancia entre las mutaciones D91G y D91N en el gen *gyrA* y el fenotipo de resistencia a levofloxacino reveló una concordancia muy baja, con coeficientes kappa de 0.0690 y 0.0602, respectivamente, ninguno de los cuales fue estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0907$ para D91G y $\text{Prob}>Z = 0.1065$ para D91N), sugiriendo que la concordancia observada podría ser aleatoria.

Estudios previos, como el realizado en Bogotá, Colombia (2009-2014), y análisis de secuenciación en China y República del Congo, identificaron la mutación D91G como significativamente asociada con la resistencia a levofloxacino, pero no universal en todas las cepas resistentes. De manera similar, la mutación D91N,

aunque presente en cepas resistentes, no es el único determinante de resistencia. Lauener et al. (2019) encontraron que D91N no es estadísticamente significativa como marcador único de resistencia. Rimbara et al. (2012) reportaron que las cepas con D91N presentaban niveles más bajos de resistencia en comparación con mutaciones en la posición 87.

En conclusión, estos estudios subrayan la necesidad de un enfoque multifacético en la identificación de resistencia a levofloxacino en *H. pylori*, combinando varios marcadores genéticos para mejorar la precisión diagnóstica y abordar la variabilidad genética. Para ello, se evaluó la concordancia de la presencia de cambios en las posiciones 87 y 91 con el perfil de susceptibilidad antimicrobiana.

El análisis de la concordancia entre las mutaciones N87I, N87K, D91G, D91N y D91Y en el gen *gyrA* y el perfil fenotípico mostró una concordancia moderada, con un valor de kappa de 0.5110, sugiriendo una mejora en la detección de cepas resistentes. El valor de significancia para esta combinación de mutaciones es 0.0001, confirmando que la concordancia observada es estadísticamente significativa.

Saranathan et al. (2020) encontraron una fuerte concordancia entre las mutaciones en el gen *gyrA* y la resistencia fenotípica a levofloxacino, con un coeficiente de kappa de 0.9 (95% CI, 0.77 a 1.0), indicando una concordancia casi perfecta. Zhou et al. (2022) también reportaron una concordancia casi perfecta, con un coeficiente de kappa de 0.833 (95% CI, 0.693 a 0.973), una sensibilidad del 89.66% y una especificidad del 92.86%, apoyando la fiabilidad de las mutaciones en los codones 87 y 91 como marcadores de resistencia. Hu et al. (2023) destacaron una buena

concordancia entre las mutaciones en estos aminoácidos y la resistencia fenotípica, con un coeficiente kappa de 0.830.

Lauener et al. (2019) encontraron que las mutaciones N87I, N87K, D91G, D91N y D91Y estaban significativamente asociadas con la resistencia a levofloxacino, mostrando alta especificidad y sensibilidad (98% y 100%, respectivamente), con una congruencia significativa del 99% entre las mutaciones identificadas y el perfil fenotípico de resistencia. Vo Phuoc Tuan et al. (2019) investigaron la relación entre las mutaciones en los codones 87 y 91 y el perfil fenotípico, encontrando que el 83.3% de las cepas resistentes tenían mutaciones en estos codones, y que las cepas con mutaciones mostraron CIM significativamente más altas. La concordancia fue sustancial, con un coeficiente kappa de 0.73, una sensibilidad del 83.3% y una especificidad del 100%.

Estos hallazgos refuerzan que las mutaciones en los codones 87 y 91 del gen *gyrA* son buenos indicadores de resistencia a levofloxacino, proporcionando una herramienta útil para predecir la resistencia fenotípica a levofloxacino en *H. pylori*. Además, se identificaron aislados de *H. pylori* con mutaciones fuera del dominio QRDR, encontradas tanto en cepas sensibles como resistentes a levofloxacino (Lin et al., 2023). Entre las cepas resistentes, se hallaron mutaciones V172I, D161N, V199A y V199M, mientras que en las cepas sensibles, la mutación V199A fue común.

Las mutaciones V199A y V199M mostraron baja concordancia con el perfil fenotípico de resistencia (kappa = -0.0748 y 0.0066, respectivamente), indicando baja capacidad predictiva. Esto es consistente con estudios que sugieren que estas

mutaciones fuera del QRDR no contribuyen significativamente a la resistencia (Tshibangu-Kabamba et al., 2020).

Las mutaciones en el gen *gyrB* son menos comunes que en *gyrA* y su papel en la resistencia a levofloxacino sigue investigándose (Dascălu et al., 2023). En este estudio, se encontraron mutaciones D481E y R579C en cepas resistentes. Estudios previos han mostrado que mutaciones dobles en *gyrB* y *gyrA* aumentan la resistencia (Chung et al., 2012; Bińkowska et al., 2018).

La combinación de mutaciones en *gyrA* y *gyrB* mostró una concordancia moderada con la resistencia fenotípica ($\kappa = 0.5979$, $\text{Prob}>Z = 0.0$). Tshibangu-Kabamba et al. (2020) reportaron alta concordancia ($\kappa = 0.828$) al considerar mutaciones en QRDR de ambos genes, mientras que Saranathan et al. (2020) encontraron una concordancia excelente ($\kappa = 0.9$), apoyando la utilidad de estas mutaciones para predecir la resistencia.

La resistencia a amoxicilina en *H. pylori* está asociada con mutaciones en genes que codifican proteínas fijadoras de penicilina (PBP), como *pbp1A*, *pbp2*, *pbp3* y *pbp4*. Estas mutaciones afectan los motivos de unión a penicilina (SXXK, SXN y KTG) y reducen la afinidad por el antibiótico.

Las mutaciones S414R, T556S y N562Y mostraron baja concordancia con el perfil fenotípico de resistencia a amoxicilina, con coeficientes κ muy bajos (0.0370, -0.0433, y 0.0741 respectivamente). Estudios previos indican que estas mutaciones, aunque presentes en algunas cepas resistentes, no son buenos marcadores predictivos por sí solas (Tshibangu-Kabamba et al., 2020; Rimbara et al., 2008; Fauzia et al., 2023; Tran et al., 2022).

En el estudio de Tshibangu-Kabamba et al. (2020), la mutación S414R se encontró en el 5.7% de los aislados resistentes a amoxicilina, mostrando una relación no significativa con el fenotipo de resistencia ($p = 0.116$). La mutación T556S se identificó en el 8.6% de los aislados resistentes, demostrando una relación significativa con la resistencia ($p = 0.038$). Aunque T556S no es un buen predictor de resistencia por sí sola, su presencia junto con otras mutaciones puede indicar un perfil de resistencia más complejo y multifactorial.

Rimbara et al. (2008) identificaron la mutación N562Y en cepas resistentes a amoxicilina junto con otras mutaciones en *PBP1*, contribuyendo a una alta resistencia. Sin embargo, N562Y por sí sola no es suficiente para conferir resistencia significativa, alineándose con nuestra observación de su baja sensibilidad y capacidad predictiva. Estudios en Bangladesh (Fauzia et al., 2023) y Vietnam (Tran et al., 2022) también confirmaron la asociación significativa de N562Y con la resistencia a amoxicilina. Aunque N562Y puede garantizar la ausencia de resistencia cuando no está presente, no es efectiva para identificar todas las cepas resistentes, disminuyendo su valor predictivo clínico.

La mutación en la posición 993 del motivo *PBP1A* mostró baja concordancia ($kappa = 0.0916$) lo que causa capacidad limitada para predecir resistencia a amoxicilina. En el estudio de Tuan et al. (2019), se evaluaron variantes en el gen *pbp1A* de 5 cepas resistentes y 48 cepas susceptibles a amoxicilina, identificando 45 variantes. Las mutaciones T593A/G/K mostraron una asociación significativa con la resistencia ($p = 0.005$), pero también se encontraron en cepas susceptibles, lo que indica que no son exclusivas de las cepas resistentes. El estudio de Tshibangu-Kabamba et al. (2020) encontró que T593A estaba en el 62.9% de las

cepas resistentes y en el 28.4% de las cepas sensibles, sugiriendo una posible asociación con la resistencia. Sin embargo, otras mutaciones en la misma posición no diferenciaron claramente entre cepas resistentes y sensibles. Estos resultados indican que, aunque las mutaciones T593A/G/K están asociadas con la resistencia, no son suficientes para predecir con precisión el fenotipo resistente. Se necesita considerar otros factores genéticos y mecanismos adicionales para entender completamente la resistencia a amoxicilina en *H. pylori*.

Las mutaciones en las posiciones 414, 556, 562 y 593, adyacentes a los motivos conservados SKN402-404 y KTG555-557 de la *PBP1A*, son determinantes clave en la resistencia a la amoxicilina en *H. pylori*. Estos cambios disminuyen la afinidad de la *PBP1A* por la amoxicilina, permitiendo la supervivencia bacteriana en presencia del antibiótico (Guindo et al., 2022; Gerrits et al., 2006).

El estudio de Tshibangu-Kabamba et al. (2020) mostró una concordancia casi perfecta ($\kappa = 0.842$; $p < 0.0001$) entre la susceptibilidad fenotípica y las mutaciones en el gen *pbp1A*. La prueba de susceptibilidad genotípica a amoxicilina basada en mutaciones del gen *pbp1A* mostró un índice de Youden, sensibilidad y especificidad de 0.8136, 82.9% y 98.5%, respectivamente.

En resumen, la presencia de las mutaciones S414R, T556S, N562Y y T593A/G/K/S mejora la predicción de la resistencia fenotípica a la amoxicilina en comparación con la evaluación de mutaciones individuales, aunque se requiere considerar otros factores genéticos para una predicción más precisa (Tshibangu-Kabamba et al., 2020).

En nuestro estudio se identificaron mutaciones que, según estudios previos, estadísticamente confieren resistencia aunque no se han corroborado

experimentalmente. Se analizó la mutación V16I en *H. pylori* para determinar su concordancia con la resistencia a la amoxicilina. Esta mutación mostró un coeficiente kappa de 0.1909 que refleja una concordancia moderada . Gerrits et al. (2002) encontraron que las mutaciones en *pbp1A*, junto con otros factores, pueden reducir la afinidad por amoxicilina, contribuyendo a la resistencia en *H. pylori*.

La mutación V374L mostró una baja concordancia con la resistencia a la amoxicilina, con un valor de kappa de 0.146 y un valor p de 0.051, lo cual no fue estadísticamente significativo. Aunque estuvo presente en muchas cepas resistentes, no hubo suficiente evidencia para considerarla un marcador fiable de resistencia, por lo que se requiere más investigación para confirmar cualquier posible asociación. Rimbara et al. (2008) identificaron varias mutaciones en *pbp1A* asociadas con resistencia a amoxicilina, destacando la necesidad de considerar múltiples factores y mutaciones adicionales. La presencia de V374L se ha reportado en cepas de *H. pylori* de Camboya y Vietnam, sugiriendo su papel en conferir resistencia (Park et al., 2023). Sukri et al. (2022) encontraron la mutación V374L exclusivamente en cepas resistentes a amoxicilina, junto con otras mutaciones como V346L, G595_V596InsG, Y604H y N608S.

La evaluación combinada de las mutaciones S414R, T556S, N562Y, T593A/G/P/S y V374L mostró una mejora en la predicción de resistencia fenotípica a la amoxicilina en comparación con las mutaciones individuales. Esto respalda la noción de que la resistencia a los antibióticos en *H. pylori* es un fenómeno multifactorial. Estudios como el de Tshibangu-Kabamba et al. (2020) han demostrado que la combinación de múltiples mutaciones en *pbp1A* puede

proporcionar una predicción más precisa de la resistencia a la amoxicilina, sugiriendo que un enfoque holístico es necesario para una evaluación efectiva.

En el estudio de resistencia a la amoxicilina en *H. pylori*, se identificaron varias mutaciones asociadas con resistencia. La mutación A474T se encontró en 2/26 cepas resistentes y 2/24 cepas sensibles, mientras que T558S apareció solo en 1/24 cepa sensible. G595S se identificó en 5/26 cepas resistentes y 2/24 cepas sensibles, y V374L en 5/26 cepas resistentes y 1/24 cepa sensible. Las mutaciones V469M y V469A se detectaron solo en cepas resistentes, y N504D en 2/26 cepas resistentes y 3/24 cepas sensibles. Las mutaciones S543R y S543N estuvieron presentes en algunas cepas tanto resistentes como sensibles. La mutación V16I fue prevalente en 19/26 cepas resistentes y 13/24 cepas sensibles, mientras que G242S se encontró en 6/26 cepas resistentes y 6/24 cepas sensibles.

Hu et al. (2020) identificaron mutaciones en cepas resistentes y sensibles a la amoxicilina, siendo A474T, T558S, G595S, V374L, V469M y S543R más prevalentes en cepas resistentes, confirmando su asociación con la resistencia. Al incluir las mutaciones V469M/A junto con S414R, T556S, N562Y, T593A/G/P/S y V374L, la concordancia mejoró ligeramente ($\kappa = 0.2812$), sugiriendo que un enfoque combinado con múltiples marcadores genéticos puede ser más robusto para predecir la resistencia. (Tran et al., 2022). Tran et al. (2022) encontraron la mutación V469M en el gen *pbp1A* significativamente asociada con la resistencia a la amoxicilina ($p = 0.021$), aunque también presente en algunas cepas sensibles.

Incluir V16I junto con otras mutaciones aumentó significativamente la sensibilidad para detectar resistencia (92.3%), pero la baja especificidad (33.3%) sugiere que

estas mutaciones no excluyen la posibilidad de sensibilidad a la amoxicilina, lo que podría llevar a decisiones terapéuticas erróneas si se usan como único criterio diagnóstico (Sukri et al., 2022).

Las mutaciones cerca del dominio SKN 402-404, como E406M, E406A, E406T y E406V, mostraron una concordancia moderada con la resistencia a amoxicilina, con un valor de kappa de 0.2623 que fue estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0118$). Esto indica que esta mutación es un marcador relativamente fiable de resistencia. La significancia estadística respalda que la presencia de esta mutación está asociada con la resistencia a la amoxicilina, lo cual es importante para identificar y tratar eficazmente las cepas resistentes. Tran et al. (2022) encontraron que la mutación E406M era exclusiva de las cepas resistentes y tenía una fuerte asociación con la resistencia ($p < 0.001$), mientras que E406A era común en ambas. E406T y E406V fueron menos frecuentes en cepas resistentes y mostraron una menor asociación con la resistencia a la amoxicilina.

Se identificaron varias mutaciones en el dominio de pbp2, incluyendo S494N, presente en cepas resistentes y sensibles. La mutación S494N mostró una concordancia muy baja con la resistencia a la amoxicilina, con un valor de kappa de 0.0188 y sin significancia estadística ($\text{Prob}>Z = 0.4385$). Aunque presente en algunas cepas resistentes, no hay suficiente evidencia para considerarla un marcador fiable de resistencia. La combinación de mutaciones S414R, T556S, N562Y, T593A/G/P/S y S494N mostró una concordancia baja a moderada, con un kappa de 0.1573 y sin significancia estadística ($\text{Prob}>Z = 0.1328$). Aunque esta combinación aparece en muchas cepas resistentes, la evidencia no es suficiente para considerarla un marcador fiable de resistencia a la amoxicilina.

Rimbara et al. (2008) observaron que la mutación S494H en *PBP2* era exclusiva de cepas altamente resistentes a la amoxicilina. Además, la mutación A541V en *PBP2* se encontró solo en cepas altamente resistentes, sugiriendo una fuerte asociación con la resistencia. En *PBP4*, solo una cepa resistente mostró la mutación S265L, y no se detectaron mutaciones en los motivos de *PBP3*. Esto sugiere que las cepas resistentes sin mutaciones en *PBP1*, *PBP2*, *PBP3* y *PBP4* pueden tener otros mecanismos de resistencia, como las bombas de eflujo.

Las mutaciones en genes de porinas y bombas de eflujo, como *hofH*, *hefC* y *hopC*, probablemente alteran la permeabilidad de la membrana a la amoxicilina (Tshibangu-Kabamba et al., 2021). En nuestro estudio, 11/26 cepas resistentes y 2/24 cepas sensibles presentaban una delección en las posiciones 811_812 en la proteína de resistencia a la acriflavina o en los sistemas de eflujo multidroga del tipo RND-CmeABC y CmeDEF. El gen *hefC* en *H. pylori* codifica una proteína de resistencia a la acriflavina, y las mutaciones D131E y L378F en este gen aumentan significativamente la resistencia a la amoxicilina, incrementándola hasta 16 veces cuando ambas están presentes (Qureshi et al., 2014).

Además, 5/26 cepas resistentes mostraron la mutación G228W en el gen *hofH*, que codifica la proteína Omp3 o HofH, contribuyendo a la resistencia a la amoxicilina. Los experimentos de transformación en cepas sensibles con la mutación *hofH* resultaron en un aumento de 16 veces en la resistencia. El uso del inhibidor de eflujo NMP redujo la resistencia en estas cepas transformadas, sugiriendo que HofH podría desempeñar un papel en el mecanismo de eflujo de antibióticos (Bina et al., 2000).

Estos hallazgos destacan la diversidad de mutaciones y mecanismos genéticos que contribuyen a la resistencia a la amoxicilina en *H. pylori*, subrayando la complejidad de esta resistencia y la necesidad de estudiar múltiples genes y regiones genómicas para comprender completamente su perfil de resistencia

La predicción de la resistencia al metronidazol basada en información genotípica sigue siendo un reto. Diversas mutaciones en distintos genes están implicadas en esta resistencia en *H. pylori* (Chua et al., 2019; Hoffman et al., 1996). Las técnicas moleculares han identificado determinantes en los genes *rdxA* (NAD(P)H nitroreductasa insensible al oxígeno) y *frxA* (NAD(P)H flavina nitroreductasa) que están relacionados a la resistencia al metronidazol. Las mutaciones en *rdxA* pueden modificar la estructura proteica y reducir su afinidad por el cofactor FMN, impactando negativamente su función (Goodwin et al., 1998; Mendz & Mégraud, 2002). Mendz y Mégraud (2002) clasificaron múltiples mutaciones en *rdxA* en cinco categorías, destacando las de clase I por disminuir la afinidad de *RdxA* por FMN. Estas incluyen cambios en los residuos R16, S18, K20, N73, I142, G162 y K200, reduciendo la fuerza de unión del FMN y afectando la funcionalidad proteica (Martínez-Júlvez et al., 2012)

Entre las 32 cepas resistentes estudiadas, se encontró que 7 tenían una mutación en el codón R16. De las 18 cepas sensibles, 2 también presentaron esta mutación. En el ensamblado PER_UPCH_6, se identificó una delección en las posiciones 482 a 484, eliminando los aminoácidos isoleucina y glicina en las posiciones 161 y 162, y reemplazándolos con arginina.

La concordancia entre la mutación en el codón R16 del gen *rdxA* y la resistencia al metronidazol fue muy baja concordancia y no es estadísticamente significativa ($\text{Prob}>Z = 0.1708$). Esto sugiere que esta mutación no es un buen marcador de resistencia. Tshibangu-Kabamba et al. (2020) encontraron la mutación R16C/H en el 6.5% de las cepas resistentes al metronidazol, pero en ninguna cepa sensible, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 1.000$). Lauener et al. (2019) también hallaron la mutación R16C/H exclusivamente en cepas resistentes (7.14% de las cepas resistentes), sugiriendo una asociación con la resistencia. Saranathan et al. (2020) reportaron truncamientos en el gen *rdxA* en el 58% de los aislados resistentes al metronidazol y una mutación en el codón R16 en seis de los ocho aislados resistentes sin truncamiento en *rdxA*. La presencia de un gen *rdxA* truncado o una mutación en R16 mostró una alta correlación con la resistencia fenotípica ($\text{kappa} = 0.76$). Estos hallazgos indican que la mutación R16C/H podría tener un papel en la resistencia al metronidazol, aunque su baja prevalencia y falta de significancia estadística sugieren la contribución de otros factores. En nuestros aislados, no se detectaron mutaciones en las posiciones S18, K20, N73, I142, G162 y K200, subrayando la complejidad de los mecanismos de resistencia en *H. pylori*.

Analizamos un grupo de mutaciones que podrían desestabilizar la formación de dímeros de la proteína *RdxA*, cuya estabilidad depende de su configuración como dímero. Mutaciones en residuos de la interfaz del dímero, como L42, S43, R41, Q50, V55, M56, I142, G145, K202 y L209, podrían desestabilizar la proteína. Entre las cepas evaluadas, el ensamblado PER_UPCH_33 mostró un cambio en el codón

R41 y resistencia al metronidazol. Además, 9/32 cepas resistentes y 4/18 cepas sensibles tenían un cambio en la posición M56.

Zhang et al. (2020) encontraron que las mutaciones en las posiciones R41 y M56 son comunes en cepas resistentes al metronidazol en aislamientos norteamericanos de *H. pylori*. Estas mutaciones desestabilizan la estructura de *RdxA*, afectando su capacidad de reducir el metronidazol. Albert et al. (2020) también identificaron mutaciones en R41 y M56, correlacionándolas con la resistencia al metronidazol a través de análisis genómicos avanzados. En los aislados analizados, no se encontraron mutaciones en L42, S43, Q50, V55, I142, G145, K202 y L209.

La combinación de mutaciones R16, G162, M56 y Y47C mostro una concordancia moderada con la resistencia a través del valor de kappa de 0.1960. Sin embargo, esta concordancia no es estadísticamente significativa ($\text{Prob}>Z=0.0632$) indicando que esta combinación de mutaciones no es un marcador fiable de resistencia en el contexto evaluado.

Tshibangu-Kabamba et al. (2020) utilizaron mutaciones en *rdxA* para predecir la resistencia fenotípica, mostrando una sensibilidad, especificidad y un índice de Youden del 72.8%, 90.0% y 0.625%, respectivamente, con una concordancia moderada (Kappa = 0.304). Camorlinga-Ponce et al. (2021) identificaron 32 variantes de aminoácidos en *RdxA* asociadas exclusivamente con cepas resistentes en más del 50% de los aislados resistentes. Sin embargo, la alta variabilidad y distribución de las variantes explican la baja concordancia observada entre la detección molecular y el fenotipo de resistencia.

En nuestro estudio, evaluamos mutaciones missense en codones funcionales del gen *rdxA* y su asociación con la resistencia al metronidazol en *H. pylori*. Identificamos

cambios en las posiciones N14T, Y47C, H53R, A67V, A68T y V192M exclusivamente en cepas resistentes: N14T en PER_UPCH_28, Y47C en PER_UPCH_34, H53R en PER_UPCH_37, A67V en PER_UPCH_48, A68T en PER_UPCH_16 y V192M en PER_UPCH_51. La mutación V204I se encontró en 7/32 cepas resistentes y en 6/18 cepas sensibles. Mutaciones como H25R, A206T, V172, G98S, H99R y E175Q se observaron tanto en cepas resistentes como sensibles, subrayando la complejidad de los mecanismos de resistencia.

Mutaciones como T31E, R90K, H97T/Y, A118S/T y R131K se encontraron tanto en cepas resistentes como sensibles, sugiriendo que no son exclusivas de un fenotipo de resistencia. Por ejemplo, T31E apareció en 18/32 cepas resistentes y en 8/18 cepas sensibles, mientras que P106S/L solo en 2/32 cepas resistentes. D59N se encontró en ambas cepas, evidenciando que no hay una correlación clara con la resistencia al metronidazol. Estos hallazgos resaltan la necesidad de enfoques diagnósticos que consideren múltiples factores genéticos para evaluar la resistencia. Rasheed et al. (2014) identificaron varias sustituciones de aminoácidos en *RdxA* en aislados resistentes a metronidazol, incluyendo R16C/H, C19Y, T31E, R90K, H97T, S108A y A118T/S. T31E y H97T fueron las más comunes, presentes en 8/16 aislados resistentes, y A118T/S en 11 aislados. Estas mutaciones afectan la estructura y función de *RdxA*, reduciendo su capacidad para activar el metronidazol, sugiriendo que la resistencia puede estar mediada por una combinación de cambios estructurales.

Evaluamos la presencia de mutaciones en *rdxA* inducidas por altas concentraciones de metronidazol, como C46T, G238A y G352A. C46T se encontró en 5/32 cepas

resistentes y en 1/18 cepas sensibles, mientras que G238A se presentó exclusivamente en cepas resistentes.

La combinación de mutaciones R16, G162, M56, Y47C, P106 y C46T muestra una concordancia moderada con la resistencia, reflejada en un valor kappa de 0.1960. No obstante, esta concordancia no es estadísticamente significativa ($\text{Prob}>Z = 0.0632$), lo que indica que, aunque hay una ligera sugerencia de que estas mutaciones podrían estar relacionadas con la resistencia, no existe suficiente evidencia para confirmarlo de manera concluyente. La presencia de estas mutaciones sugiere una posible asociación con la resistencia al metronidazol, pero se necesita realizar más investigaciones para confirmar esta relación. Bin et al. (2015) encontraron que las mutaciones C46T, G238A y G352A en *rdxA* están asociadas con la resistencia al metronidazol en *H. pylori*. Estas mutaciones conferían una resistencia moderada, con una MIC de 48 mg/L. Además, se observó un efecto sinérgico al combinar mutaciones en *rdxA* y *frxA*, aumentando aún más la resistencia (Bin et al., 2015; Suerbaum et al., 1998).

La mutación V192 en el gen *rdxA* también mostró una concordancia extremadamente baja (kappa = 0.0227) con el fenotipo de resistencia, siendo detectada en 1/32 de casos resistentes. La evaluación de la presencia de cualquier mutación en el gen *rdxA* (R16, G162, M56, Y47C, P106, C46T, G238A, V192) mostró una concordancia del 64.00% con la resistencia, con un valor de kappa de 0.2880, también estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0159$). Esto refuerza la fiabilidad de esta combinación de mutaciones como marcador de resistencia al metronidazol. Aunque la presencia de alguna de estas mutaciones es un buen

indicador de resistencia, su ausencia no descarta efectivamente la resistencia, subrayando la necesidad de integrar otros marcadores genéticos o realizar análisis más detallados para una evaluación precisa.

Algunos estudios han reportado resultados contradictorios sobre la utilidad de ciertas mutaciones en *rdxA* para predecir la resistencia a metronidazol. Marais et al. (2003) no encontraron una asociación significativa entre mutaciones específicas en *rdxA* y la resistencia en aislados clínicos de *H. pylori*, sugiriendo que otros mecanismos pueden estar involucrados. Van Doorn et al. (2000) identificaron variaciones genéticas distintas que podrían influir en la resistencia, destacando la complejidad del fenómeno y la necesidad de una caracterización más amplia.

Las mutaciones nonsense que resultan en codones de terminación prematura en el gen *rdxA* están ampliamente asociadas con la resistencia al metronidazol. Estas mutaciones inactivan la nitroreductasa *RdxA*, necesaria para la activación del metronidazol. Estudios han demostrado que la introducción de codones de terminación en *rdxA*, ya sea por mutaciones de cambio de sentido o de desplazamiento del marco de lectura, es una causa común de resistencia en *H. pylori* (Bereswill et al., 2003; Zhang et al., 2020). Estos codones stop difieren de los reportados en estudios previos, como los encontrados por Camorlinga-Ponce et al. (2021) en las posiciones 13, 26, 37, 72, 73 y 76, por Butlop et al. (2016) en las posiciones 2, 50 y 52, y por Tanih et al. (2011) en las posiciones 113, A16, R56, E6, T110S, E169, T26, L121, E27, E60 y E78.

La concordancia entre los codones L33Ter, W52Ter, N73Ter, A206Ter, E75Ter y Gln65Ter y la resistencia al metronidazol fue baja, con un valor de kappa de 0.1678,

lo que indica una concordancia leve. Este valor de kappa fue estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0162$), lo que sugiere que, aunque la concordancia es baja, existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de estas mutaciones y la resistencia al metronidazol. La significancia estadística respalda la relevancia de estas mutaciones como marcadores de resistencia, aunque su utilidad práctica podría ser limitada debido a la baja concordancia observada.

Un estudio reciente encontró que el 36.29% de las cepas resistentes tenían mutaciones truncantes en *rdxA*, con una alta prevalencia de resistencia de alto nivel ($\text{MIC} > 256 \text{ mg/mL}$) en cepas con truncamientos antes del aminoácido 70, sugiriendo que estas mutaciones afectan significativamente la función de *RdxA* y su capacidad para activar el metronidazol (Gong et al., 2023).

El análisis de codones de terminación prematuros y otras mutaciones en *rdxA* (R16, G162, M56, Y47C, P106, C46T, G238A, V192, L33Ter, W52Ter, N73Ter, A206Ter, E75Ter y Gln65Ter) mostró una concordancia de moderada a alta con la resistencia al metronidazol, con un valor de kappa de 0.4205, estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0013$). Esto sugiere que esta combinación de mutaciones es un marcador fiable de resistencia en el contexto estudiado.

Tshibangu-Kabamba et al. (2020) mostraron una sensibilidad del 72.8%, especificidad del 90.0% y un índice de Youden de 0.625 para las mutaciones que afectan la expresión de *rdxA*, con una concordancia razonable ($\text{kappa} = 0.304$) entre los resultados genotípicos y fenotípicos. Saranathan et al. (2020) encontraron que la resistencia fenotípica al metronidazol se correlacionaba con la presencia de mutaciones nonsense y la mutación R16H en *rdxA*, presentes en el 58% de los aislados resistentes, con un kappa de 0.76 .

Además, al examinar el gen *rdxA*, confirmamos que la secuenciación de genoma completo (WGS) puede identificar variantes complejas de mutaciones difíciles de detectar mediante métodos clásicos basados en PCR. Estas variantes incluyen deleciones, inserciones de secuencias que terminan en codones de parada y cambios en el marco de lectura. En nuestro estudio, se detectaron cambios en el marco de lectura solo en cepas resistentes.

Por ejemplo, el ensamblado PER_UPCH_28 presentó una variante de desplazamiento de marco c.41delA p.Asn14fs. El ensamblado PER_UPCH_41 mostró dos mutaciones de relevancia clínica: c.632G>A p.Ter211Ter, que podría afectar el splicing del ARN mensajero, y c.184_185delTTinsGTA p.Leu62fs, que provoca un cambio en el marco de lectura y un codón de terminación prematuro, resultando en una proteína truncada. El ensamblado PER_UPCH_50 presentó la mutación c.192dupA p.Gln65fs, produciendo una proteína no funcional.

De manera similar, el estudio de Tshibangu-Kabamba et al. (2020) identificó mutaciones complejas en aislados resistentes de *H. pylori*, incluyendo una gran secuencia insertada (K168_V169insSGRDFRTAYQTer) y un cambio mutacional continuo (Ter201LextTer25). Mientras que la secuencia insertada finaliza con un codón de terminación, el cambio mutacional continuo afecta el codón de terminación, extendiendo el extremo C de la proteína sin mostrar una secuencia predecible.

Se evaluaron las mutaciones en el gen *frxA* relacionadas con el mecanismo de resistencia a metronidazol en *H. pylori*. Los cambios en los codones V71, R38G, R38D, N111 y C193S se presentaron en 15/32, 8/32, 8/32, 3/32 y 3/32 de las cepas resistentes, respectivamente, y en 8/18, 5/18, 2/18, 2/18 y 5/18 de las cepas

sensibles, respectivamente. La mutación en el codón A15 y R38E estuvo presente únicamente en cepas sensibles, mientras que las mutaciones R38V, M149 y A152V se encontraron en cepas resistentes.

De manera similar, Lauener et al. (2019) identificaron varias mutaciones en el gen *frxA* de *H. pylori* asociadas con la resistencia al metronidazol. Específicamente, se encontraron mutaciones en los codones R38, N111D, N111H, C193S y V71 tanto en cepas susceptibles como resistentes. En el estudio de Aldana et al. (2005), se identificaron mutaciones específicas en el gen *frxA*, como V69A, K126I, M149R, Y62D, A16T, V211A, S43A y I44F en diferentes cepas, asociadas con niveles moderados y altos de resistencia a metronidazol.

El estudio evaluó la concordancia entre mutaciones específicas en *frxA* (R38, N111, M149, A152V, C193S, V71I) y la resistencia al metronidazol mostro una concordancia muy baja con la resistencia, con un valor de kappa de 0.074, que no es estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.28$). Esto indica que, aunque estas mutaciones están presentes en un porcentaje considerable de cepas resistentes, no hay suficiente evidencia para concluir que esta combinación de mutaciones sea un marcador fiable de resistencia al metronidazol.

La inactivación del gen *frxA*, que codifica la NAD(P)H-flavin oxidoreductasa, puede contribuir a la resistencia al metronidazol, ya sea de forma aislada o en combinación con *rdxA* (Jeong et al., 2000; Kwon et al., 2001; Llanes et al., 2010). Estudios de secuenciación han demostrado que las mutaciones que causan un cambio de marco en *frxA* se encuentran con frecuencias similares en aislados sensibles y resistentes al metronidazol (Chisholm y Owen, 2004), lo que hace controvertida su contribución exacta a la resistencia. Según Jeong et al. (2000), la

mayoría de la resistencia al metronidazol en *H. pylori* depende de la inactivación de *rdxA*, aunque las mutaciones en *frxA* pueden aumentar dicha resistencia. Genes que confieren resistencia al metronidazol sin inactivación de *rdxA* son raros en *H. pylori*.

Asimismo, se evaluó la concordancia entre mutaciones en *frxA* y *rdxA* (R16, G162, M56, Y47C, P106, C46T, G238A, V192, R38, M149, A152V) y la resistencia a metronidazol, obteniendo una concordancia baja a moderada con la resistencia al metronidazol, con un valor de kappa de 0.187 que es estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0476$). Esto indica que esta combinación de mutaciones es un marcador relativamente fiable de resistencia en el contexto evaluado. La significancia estadística respalda que la presencia de estas mutaciones está asociada con la resistencia al metronidazol, lo cual es importante para identificar cepas resistentes. Camorlinga-Ponce et al. (2021) determinaron que *rdxA* y *frxA* son genes muy variables con muchas SNPs y ninguna mutación claramente asociada con la resistencia, resultando en una ligera concordancia (<0.2). Esto confirma que la resistencia a metronidazol implica principalmente la inactivación de *rdxA* (Jenks et al., 1999; Kim et al., 2009).

En el estudio se investigó la relación entre los codones de terminación prematura en *frxA* y la resistencia a metronidazol. Codones de parada prematura como W30fs, L54fs, P21fs y V99fs se encontraron exclusivamente en cepas resistentes, mientras que L39fs y L74fs aparecieron en cepas tanto resistentes como sensibles. Codones como E35fs, L63fs y W68fs estuvieron presentes solo en cepas sensibles. La concordancia entre estos codones y el fenotipo de resistencia fue moderada (kappa = 0.3220) estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.0111$). Tshibangu-Kabamba

et al. (2020) identificaron varios codones de parada prematura en *frxA*, como D92Ter, E214Ter, E57Ter y otros, con frecuencias bajas en cepas resistentes y aún menores o nulas en cepas sensibles, mostrando que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias observadas en cepas resistentes y sensibles.

Sin embargo, al evaluar la relación entre la combinación de mutaciones en *frxA* (R38, M149, A152V, V7I) junto con varias mutaciones de terminación prematura (stop) en *frxA* (W30fs, L54fs, L39fs, P21fs, L63fs, W68fs, L74fs y V99fs) frente a su perfil fenotipo muestra una concordancia muy baja con la resistencia, con un valor de kappa de 0.1107, que no es estadísticamente significativo ($\text{Prob}>Z = 0.184$). Esto indica que, aunque estas mutaciones están presentes en un porcentaje considerable de cepas resistentes, no hay suficiente evidencia para concluir que esta combinación de mutaciones sea un marcador fiable de resistencia al metronidazol. Estos resultados resaltan la necesidad de sumar marcadores para diferenciar una cepa no resistente, especialmente mutaciones que inactivan *rdxA*, contribuyendo principalmente a la resistencia a este fármaco.

Las mutaciones nonsense en el gen *rdxA*, que resultan en codones de terminación prematura, están ampliamente asociadas con la resistencia al metronidazol. Sin embargo, se encontraron algunas cepas resistentes al metronidazol sin mutaciones en *rdxA* y/o *frxA* (N=3). Estudios recientes sugieren que genes adicionales como *RclC*, *HP0370*, *HP0918*, *sodB* y su promotor, *recA*, *rpsU* y *RibF* pueden estar involucrados en la resistencia al metronidazol en *H. pylori* (Chua et al., 2019).

En nuestro estudio, se evaluaron mutaciones en otros genes putativos asociados con la resistencia al metronidazol. En la proteína *RclC*, la mutación N85D se identificó

en 14/18 cepas sensibles y en 21/32 cepas resistentes. En la proteína HP0370 (CoA subunidad carboxilasa biotina carboxilasa), la mutación V265I se encontró en una única cepa resistente (1/32). En la proteína HP0918 (treonilcarbamoil-AMP sintasa), la mutación A51V se presentó exclusivamente en cepas resistentes (5/32). Chua et al. (2019) identificaron mediante WGS cuatro grupos de proteínas con sitios variables, observando una mayor distribución de variantes de aminoácidos en cepas resistentes al metronidazol. Estos sitios incluyen D85N en RclC, V265I en biotina carboxilasa y A51V/T en HP0918, relacionada con la biosíntesis de ARNt. No se observaron cambios (G37Y y G38T) en los genes *rpsU* en ninguna cepa. Sin embargo, Tran et al. (2015) identificaron una mutación en *rpsU* (G38T) que cambia el aminoácido aspártico (D) por tirosina (Y) en la posición 13, sugiriendo una posible asociación con la resistencia al metronidazol en *H. pylori*. Aunque no se obtuvieron transformantes resistentes solo con esta mutación, su presencia en cepas clínicas resistentes indica que *rpsU* podría contribuir a la resistencia en combinación con otros genes, como *rdxA* y *frxA*.

Se detectaron cambios en la proteína Fur relacionados con la resistencia: las mutaciones N118R y N118H se encontraron en 14/32 cepas resistentes y 5/18 cepas sensibles, mientras que N118R se halló exclusivamente en una cepa resistente. En la proteína RecA, las mutaciones H103Y y S121D estuvieron presentes en 23/32 y 9/32 cepas resistentes, y en 13/18 y 5/18 cepas sensibles, respectivamente. Además, se analizaron cambios en el promotor de *sodB* asociados con la resistencia al metronidazol; la mutación A5C se identificó en 25/32 cepas resistentes y en 14/18 cepas sensibles.

Por último, se observaron cambios en la proteína RibF relacionados con la resistencia antimicrobiana: las mutaciones T222A y Q242K se presentaron en 6/32 y 30/32 cepas resistentes, y en 2/18 y 15/18 cepas sensibles, respectivamente. Según Tshibangu-Kabamba et al. (2020), la mutación A5C tiene una alta prevalencia tanto en cepas resistentes como sensibles, sugiriendo que esta mutación por sí sola no es suficiente para conferir resistencia al metronidazol, sino que puede estar involucrada en un mecanismo más complejo de resistencia.

Respecto a la resistencia a tetraciclina, esta está relacionada con mutaciones en el *ARNr 16S*, localizadas principalmente en las posiciones 926-928 (Wu et al., 2005). Las mutaciones reportadas incluyen AGA926-928ATC (Wueppenhorst et al., 2009), AGA926-928AGC (Ontsira Ngoyi et al., 2015), AGA926-928TTC, A928C, AG926-927GT, A926G/A928C (Toledo y López, 2010), AGA926-928GGA/AGC y A939C (Dadashzadeh et al., 2014). Estas alteraciones se encuentran en ambas copias de los genes *ARNr 16S* en cepas resistentes y pueden reducir la afinidad de los antibióticos por el ribosoma. Las cepas con estas mutaciones presentan un MIC mayor a 1-2 µg/mL en comparación con las cepas sensibles (Gerrits et al., 2002).

Nuestros resultados revelan que no se encontraron mutaciones en las posiciones 926 a 928 del *ARNr 16S* en ninguna de las cepas evaluadas. Tampoco se detectó la mutación A939C en los ensamblajes analizados. Esta última mutación ha sido reportada en estudios previos como asociada a la resistencia a la tetraciclina (Dadashzadeh et al., 2014). Por ello, se sospecha que existen otros mecanismos aún no estudiados, como la acumulación del fármaco, que podrían explicar la resistencia a tetraciclina en nuestros aislados resistentes (Wu et al., 2005).

VII. LIMITACIONES

- Este estudio se basa en muestras de biopsias de pacientes dispépticos reclutados en el Hospital Cayetano Heredia y la Clínica Médica Cayetano Heredia. Por lo tanto, los resultados obtenidos no reflejan los patrones de resistencia antimicrobiana de la población total peruana, pero sí proporcionan información sobre los genotipos de resistencia a nivel local.
- El tamaño de la muestra es relativamente pequeño para la evaluación de resistencia de algunos antibióticos (metronidazol y tetraciclina), es decir, las mutaciones relacionadas con la resistencia antimicrobiana podrían estar subrepresentadas, lo que dificultaría alcanzar la significancia estadística al evaluar genotipos individuales. Sin embargo, nuestros resultados pueden proporcionar una base importante para formular una política general en las estrategias de erradicación de *H. pylori* en Perú.
- Además, es probable que surjan nuevos mecanismos moleculares que confieran resistencia antimicrobiana y que no estén tomados en cuenta en este proyecto (ejemplo: cepas resistentes sin mutación relevante de *ARNr 23S*, *pbp1A*, *gyrA / gyrB* y *rdxA/frxA*), lo que podría explicar parcialmente la falta de concordancia entre los posibles resultados del perfil fenotípico y genotípico de susceptibilidad antimicrobiana (Tshibangu-Kabamba et al., 2020; Luan et al., 2019).
- Debido a que la aparición de resistencia a los medicamentos en *H. pylori* parece ser multifactorial, nuestro estudio no pudo descartar definitivamente la contribución incremental de múltiples genes. Esto requeriría análisis adicionales,

tales como estudios transcripcionales, ensayos de inhibición de la bomba de eflujo, experimentos de acumulación de fármacos y generación de mutantes, que estaban fuera del alcance de nuestro estudio

VIII. CONCLUSIONES

- Los ensamblados proporcionados por este proyecto son de alta calidad, con una cantidad de contigs inferior a 150, un N50 elevado, y un L50 reducido. Además, presentan bajos niveles de contaminación (<2%) y una completitud superior al 99.5%. Estos parámetros reflejan una secuenciación óptima y una estrategia de ensamblado eficaz.
- Las mutaciones en las posiciones 2142 y 2143 del ARNr 23S se confirmaron como marcadores robustos para predecir la resistencia a claritromicina en *H. pylori*. Se obtuvo un coeficiente kappa de 0.7148, indicando una concordancia moderada y significativa (ProbZ < 0.0000).
- La combinación de mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* (N87I, N87K, N87Y, D91G, D91N, D91Y, R579C y D481E) mejoró significativamente la precisión diagnóstica para la resistencia a levofloxacino. Esto se refleja en un índice Kappa de 0.5979 (ProbZ < 0.001), sugiriendo que evaluar múltiples mutaciones es crucial para predecir con precisión la resistencia a levofloxacino.
- La combinación de las mutaciones (S414R, T556S, N562Y, T593A/G/P/S, V374L y V469M/A) ubicadas en los dominios *pbp1A* o muy cercanos a ellos permitió predecir la resistencia a amoxicilina de manera moderada. El coeficiente kappa fue de 0.2812 y significativo (ProbZ = 0.0118).

- La combinación de mutaciones en el gen *rdxA*, conocidas por afectar la unión a FMN y la dimerización de la proteína, junto con los codones de terminación prematura, se identificó como el principal factor que influye en el fenotipo de nuestros aislados resistentes. Esto se refleja en un coeficiente kappa de 0.4205, estadísticamente significativo (ProbZ = 0.0013).
- En nuestro estudio no se encontraron mutaciones en las posiciones 926 a 928 del ARNr16S ni la mutación A939C en los aislados de *H. pylori*. Esto sugiere que las cepas resistentes a tetraciclina podrían utilizar otros mecanismos alternativos.

IX. RECOMENDACIONES

- Dado que el principal mecanismo de resistencia para metronidazol es la inactivación de las enzimas *rdxA* (NAD(P)H nitroreductasa insensible al oxígeno) y *frxA* (NAD(P)H flavina nitroreductasa). Es importante evaluar los candidatos moleculares para detectar resistencia a nivel experimental; mediante una transformación natural, estudios transcripcionales, CRISPR, y poder usarlos en el desarrollo de pruebas moleculares de resistencia para este fármaco a nivel local.
- Se recomienda estudiar el potencial de los mecanismos intrínsecos de eflujo para la resistencia a uno o varios fármacos, como ya se ha demostrado en *H. pylori* en otros estudios, como las bombas de eflujo (Tsugawa et al., 2011; Hirata et al., 2010; van Amsterdam et al., 2005). Esto requeriría análisis adicionales, tales como estudios transcripcionales, ensayos de inhibición de la bomba de eflujo, experimentos de acumulación de fármacos y generación

de mutantes (por ejemplo, eliminación de los genes hefABC, hefDEF y hefGHI), que estaban fuera del alcance de nuestro estudio(Lee et al., 2108)

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abadi, A. T. B. (2017). *H. pylori* treatment: New perspectives using current experience. *Journal of global antimicrobial resistance*, 8, 123-130.
2. Acosta, C. P., Quiroga, A. J., Sierra-Torres, C. H., & Trespalacios, A. A. (2017). Frecuencia de mutaciones de la nitrorreductasa *RdxA* de *H. pylori* para la activación del metronidazol en una población del departamento del Cauca, Colombia. *Biomédica*, 37(2), 191-199.
3. Ailloud, F., Didelot, X., Woltemate, S., Pfaffinger, G., Overmann, J., Bader, R. C., ... & Suerbaum, S. (2019). Within-host evolution of *H. pylori* shaped by niche-specific adaptation, intragastric migrations and selective sweeps. *Nature communications*, 10(1), 1-13
4. Alebouyeh, M., Yadegar, A., Farzi, N., Miri, M., Zojaji, H., Gharibi, S., ... & Zali, M. R. (2015). Impacts of *H. pylori* mixed-infection and heteroresistance on clinical outcomes. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*, 8(Suppl1), S1.
5. Alvarez-Ortega, C., Olivares, J., & Martínez, J. L. (2013). RND multidrug efflux pumps: what are they good for?. *Frontiers in microbiology*, 4, 7.
6. Amieva, M. R., & El-Omar, E. M. (2008). Host-bacterial interactions in *H. pylori* infection. *Gastroenterology*, 134(1), 306-323.

7. Ang, T. L., & Fock, K. M. (2014). Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore medical journal*, 55(12), 621–628. <https://doi.org/10.11622/smedj.2014174>
8. Arama, S. S., Tiliscan, C., Negoita, C., Croitoru, A., Arama, V., Mihai, C. M., ... & Garg, A. (2016). Efficacy of 7-day and 14-day triple therapy regimens for the eradication of *H. pylori*: a comparative study in a cohort of romanian patients. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016.
9. Arslan , N., Yilmaz, O., & Demiray-Gurbuz, E. (2017). Importance of antimicrobial susceptibility testing for the management of eradication in *H. pylori* infection. *World J Gastroenterol*, 23(16), 2854-2869.
10. Atherton, J. C. (2006). The pathogenesis of *H. pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1, 63-96.
11. Azzaya, D., Gantuya, B., Oyuntsetseg, K., Davaadorj, D., Matsumoto, T., Akada, J., & Yamaoka, Y. (2020). High antibiotic resistance of *H. pylori* and its associated novel gene mutations among the Mongolian population. *Microorganisms*, 8(7), 1062.
12. Baj, J., Brzozowska, K., Forma, A., Maani, A., Sitarz, E., & Portincasa, P. (2020). Immunological aspects of the tumor microenvironment and epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2544.
13. Baltrus, D. A., Blaser, M. J., & Guillemin, K. (2009). *H. pylori* genome plasticity. In *Microbial Pathogenomics* (Vol. 6, pp. 75-90). Karger Publishers.

14. Boehnke, K. F., Valdivieso, M., Bussalleu, A., Sexton, R., Thompson, K. C., Osorio, S., ... & Xi, C. (2017). Antibiotic resistance among *H. pylori* clinical isolates in Lima, Peru. *Infection and drug resistance*, *10*, 85.
15. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10:321-2.
16. Berg, D. E., Gilman, R. H., Srivastava, K., Valdez, Y., Watanabe, J., Miyagi, J., ... & Leon-Barua, R. (1997). *H. pylori* populations in Peruvian patients. *Clinical infectious diseases*, *25*(5), 996-1002.
17. Bilgiler, C., Thannesberger, J., Ojeda Cisneros, M., Boehnke, K., Wu, J., Xi, C., ... & Steininger, C. (2021). Antimicrobial Resistance of *H. pylori* in Gastric Biopsy Samples from Lima/Peru. *Microbial Drug Resistance*, *27*(7), 951-955
18. Bina, J. E., Nano, F., & Hancock, R. E. (1997). Utilization of alkaline phosphatase fusions to identify secreted proteins, including potential efflux proteins and virulence factors from *H. pylori*. *FEMS microbiology letters*, *148*(1), 63-68.
19. Binh, T. T., Suzuki, R., Trang, T. T. H., Kwon, D. H., & Yamaoka, Y. (2015). Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in *H. pylori* using next-generation sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *59*(4), 2343-2348.
20. Bubunenko, M., Baker, T., & Court, D. L. (2007). Essentiality of ribosomal and transcription antitermination proteins analyzed by systematic gene

- replacement in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(7), 2844-2853.
21. Cavalieri, S. J. (2005). Editora coordinadora Marie B. Coyle. *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. 2005: ISBN 1-55581-347-X.
22. Camargo, C., García, A., Riquelme, A., Otero, W., Camargo, C., Hernandez-García, T., Rabkin, C. (2014). The Problem of *H. pylori* Resistance to Antibiotics: A Systematic Review in Latin America. *Am J Gastroenterol*, April ; 109(4): 485–495.
23. Cambau, E., Allerheiligen, V., Coulon, C., Corbel, C., Lascols, C., Deforges, L., ... & Megraud, F. (2009). Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *H. pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), 3600-3607.
24. Cammarota, G., Ianiro, G., Bibbò, S., Di Rienzo, T. A., Masucci, L., Sanguinetti, M., & Gasbarrini, A. (2014). Culture-guided treatment approach for *H. pylori* infection: review of the literature. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(18), 5205.
25. Carrasco, J. L., & Jover, L. (2004). Métodos estadísticos para evaluar la concordancia. *Med Clin (Barc)*, 122(Supl 1), 28-34.
26. Carriço, J. A., Sabat, A. J., Friedrich, A. W., & Ramirez, M. (2013). Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-generation sequencing revolution. *Eurosurveillance*, 18(4), 20382.

27. Cederbrant G, Kahlmeter G, Ljungh A. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *H. pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1992;29:115–20.
28. Chahuán, J., Pizarro, M., Díaz, L. A., Villalón, A., & Riquelme, A. (2020). Métodos de diagnóstico para la detección de la infección por *H. pylori*. *Gastroenterol. latinoam*, 31(2), 98-106.
29. Choi, S. S., Chivers, P. T., & Berg, D. E. (2011). Point mutations in *H. pylori*'s fur regulatory gene that alter resistance to metronidazole, a prodrug activated by chemical reduction. *PLoS One*, 6(3), e18236.
30. Cattoir, V.; Nectoux, J.; Lascols, C.; Deforges, L.; Delchier, J.-C.; Mégraud, F.; Soussy, C.-J.; Cambau, E. Update on fluoroquinolone resistance in *H. pylori*: New mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2007, 29, 389–396, doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.11.007.
31. Cho, J., Prashar, A., Jones, N. L., & Moss, S. F. (2021). *H. pylori* infection. *Gastroenterology Clinics*, 50(2), 261-282.
32. Clayton, C. L., Kleanthous, H., Coates, P. J., Morgan, D. D., & Tabaqchali, S. (1992). Sensitive detection of *H. pylori* by using polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(1), 192-200.
33. Correa P, Piazuolo MB. Evolutionary History of the *H. pylori* Genome: Implications for Gastric Carcinogenesis. *Gut and liver*. 2012;6:21-8.
34. Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Tannenbaum, S., & Archer, M. (1975). A model for gastric cancer epidemiology. *The Lancet*, 306(7924), 58-60.

35. Correa, P., & Piazuelo, M. B. (2012). The gastric precancerous cascade. *Journal of digestive diseases*, *13*(1), 2-9.
36. Cover, T. L., & Blaser, M. J. (2009). *H. pylori* in health and disease. *Gastroenterology*, *136*(6), 1863-1873.
37. Chu Mendoza, M. E. (2021). Caracterización molecular de la resistencia antimicrobiana de *H. pylori* en pacientes dispépticos del Hospital y la Clínica Médica Cayetano Heredia
38. Chen, D., Cunningham, S. A., Cole, N. C., Kohner, P. C., Mandrekar, J. N., & Patel, R. (2017). Phenotypic and molecular antimicrobial susceptibility of *H. pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *61*(4), e02530-16..
39. Chisholm, S. A., Owen, R. J., Teare, E. L., & Saverymuttu, S. (2001). PCR-based diagnosis of *H. pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. *Journal of clinical microbiology*, *39*(4), 1217-1220.
40. Cui, R., Song, Z., Suo, B., Tian, X., Xue, Y., Meng, L., Niu, Z., Jin, Z., Zhang, H., & Zhou, L. (2021). Correlation Analysis Among Genotype Resistance, Phenotype Resistance and Eradication Effect of *H. pylori*. *Infection and drug resistance*, *14*, 1747–1756. <https://doi.org/10.2147/IDR.S305996>.
41. Dailidienė, D., Bertoli, M. T., Miciuleviciene, J., Mukhopadhyay, A. K., Dailide, G., Pascasio, M. A., ... & Berg, D. E. (2002). Emergence of tetracycline resistance in *H. pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *46*(12), 3940-3946.

42. DeLoney, C. R. & Schiller, N. L. Characterization of an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *H. pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3368–3373 (2000)
43. Deyi, V. Y. M., Burette, A., Bentatou, Z., Maaroufi, Y., Bontems, P., Lepage, P., & Reynders, M. (2011). Practical use of GenoType® HelicoDR, a molecular test for *H. pylori* detection and susceptibility testing. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(4), 557-560.
44. Doig, P., de Jonge, B. L., Alm, R. A., Brown, E. D., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., ... & Trust, T. J. (1999). *H. pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 675-707.
45. Domanovich-Asor, T., Motro, Y., Khalfin, B., Craddock, H. A., Peretz, A., & Moran-Gilad, J. (2020). Genomic Analysis of Antimicrobial Resistance Genotype-to-Phenotype Agreement in *H. pylori*. *Microorganisms*, 9(1), 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010002>.
46. Dubois, A., Fiala, N., Weichbrod, R. H., Ward, G. S., Nix, M., Mehlman, P. T., ... & Blaser, M. J. (1995). Seroepizootiology of *H. pylori* gastric infection in nonhuman primates housed in social environments. *Journal of clinical microbiology*, 33(6), 1492-1495.
47. Egli, K., Wagner, K., Keller, P. M., Risch, L., Risch, M., & Bodmer, T. (2020). Comparison of the diagnostic performance of qPCR, sanger sequencing, and whole-genome sequencing in determining clarithromycin and levofloxacin resistance in *H. pylori*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 789.

48. Ellington, M. J., Ekelund, O., Aarestrup, F. M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., ... & Woodford, N. (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical microbiology and infection*, 23(1), 2-22.
49. Fallone, C. A., Chiba, N., van Zanten, S. V., Fischbach, L., Gisbert, J. P., Hunt, R. H., ... & Marshall, J. K. (2016). The Toronto consensus for the treatment of *H. pylori* infection in adults. *Gastroenterology*, 151(1), 51-69.
50. Fox, J. G., & Megraud, F. (2006). Helicobacter. *Manual of clinical microbiology: Volume 1*, (Ed. 9), 947-962.
51. Fujimoto, Y., Furusyo, N., Toyoda, K., Takeoka, H., Sawayama, Y., & Hayashi, J. (2007). Intrafamilial transmission of *H. pylori* among the population of endemic areas in Japan. *Helicobacter*, 12(2), 170-176.
52. Gardy, J. L., & Loman, N. J. (2018). Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nature Reviews Genetics*, 19(1), 9-20.
53. Gerrits, M. M. et al. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *H. pylori*. *Helicobacter* 11, 181–187 (2006).
54. Gerrits, M. M., de Zoete, M. R., Arents, N. L., Kuipers, E. J., & Kusters, J. G. (2002). 16S *rARN* mutation-mediated tetracycline resistance in *H. pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(9), 2996-3000.
55. Graham DY. *H. pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology*. 2015;148:719-31.

56. Graham-Lomax, K., & Graham, D. Y. (2005). Contemporary Diagnosis and Management of H Pylori-associated Gastrointestinal Diseases. Handbooks in Health Care.
57. Graham, D. Y., & Liou, J. M. (2021). Primer for development of guidelines for *H. pylori* therapy using antimicrobial stewardship. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*.
58. Gerrits, M.M.; Godoy, A.P.O.; Kuipers, E.J.; Ribeiro, M.L.; Stoof, J.; Mendonça, S.; Van Vliet, A.H.M.; Jr, J.P.; Kusters, J.G. Multiple Mutations in or Adjacent to the Conserved Penicillin-Binding Protein Motifs of the Penicillin-Binding Protein 1A Confer Amoxicillin Resistance to *H. pylori*. *Helicobacter* 2006, 11, 181–187, doi:10.1111/j.1523-5378.2006.00398.x.
59. Glupczynski, Y. O. U. R. I., Labbe, M., Hansen, W., Crokaert, F., & Yourassowsky, E. (1991). Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *H. pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(9), 2072-2075.
60. Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Pilliod, D. S. (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, 1-3.
61. Goodwin, C. S., & Worsley, B. W. (1993). Microbiology of *H. pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, 22(1), 5-19.
62. Goodwin, A.; Kersulyte, D.; Sisson, G.; Van Zanten, S.J.O.V.; Berg, D.E.; Hoffman, P.S. Metronidazole resistance in *H. pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase.

- Mol. Microbiol. 1998, 28, 383–393, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00806.x.
63. Guzmán, J., Castillo, D., Ojeda, M., & Sauvain, M. (2019). Susceptibilidad antimicrobiana y mutaciones en el gen *ARNr 23S* de *H. pylori* en pacientes dispépticos. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, 36, 270-274.
64. Hansomburana, P.; Anantapanpong, S.; Sirinthornpunya, S.; Chuengyong, K.; Rojborwonwittaya, J. Prevalence of single nucleotide mutation in clarithromycin resistant gene of *H. pylori*: A 32-months prospective study by using hybridization real time polymerase chain reaction. *J. Med Assoc. Thail. = Chotmaihet thangphaet* 2012, 95.
65. Hao, Q.; Li, Y.; Zhang, Z.J.; Liu, Y.; Gao, H. New mutation points in *ARNr 23S* gene associated with *H. pylori* resistance to clarithromycin in northeast China. *World journal of gastroenterology*. 2004, 10,1075.
66. Hendriksen, R. S., Munk, P., Njage, P., Van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., ... & Aarestrup, F. M. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature communications*, 10(1), 1-12.
67. Hirata, K., Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Muraoka, H., Saito, Y., ... & Hibi, T. (2010). Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *H. pylori*. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 25, S75-S79.
68. Hiyama, T., Tanaka, S., Shima, H., Kose, K., Kitadai, Y., Ito, M., ... & Chayama, K. (2003). Somatic mutation of mitochondrial DNA in *H. pylori*-

- associated chronic gastritis in patients with and without gastric cancer. *International journal of molecular medicine*, 12(2), 169-174.
69. Hoffman, P. S., Goodwin, A., Johnsen, J., Magee, K., & Veldhuyzen van Zanten, S. J. (1996). Metabolic activities of metronidazole-sensitive and-resistant strains of *H. pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *Journal of bacteriology*, 178(16), 4822-4829.
70. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *H. pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017;153:420-9.
71. Hombach, M., Zbinden, R., & Böttger, E. C. (2013). Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the sirscan automated zone lecturer. *BMC microbiology*, 13(1), 1-8.
72. Hou, C., Yin, F., Wang, S., Zhao, A., Li, Y., & Liu, Y. (2022). *H. pylori* biofilm-related drug resistance and new developments in its anti-biofilm agents. *Infection and Drug Resistance*, 1561-1571. Hu, Y., Zhu, Y., & Lu, N. H. (2017). Novel and Effective Therapeutic Regimens for *H. pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 168. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00168>
73. *H. pylori* and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. *Helicobacter*, 1-15.
74. IARC. (1994). Schistosomes, liver flukes and *H. pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 61, 1-241.

75. International Agency for Research on Cancer. (2012). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Part B: Biological agents. Obtenido de <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100B.pdf>.
76. Jenks, P.J.; Ferrero, R.L.; Labigne, A. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *H. pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999, 43,753–758.
77. Jeong, J. Y., Mukhopadhyay, A. K., Dailidienė, D., Wang, Y., Velapatiño, B., Gilman, R. H., ... & Berg, D. E. (2000). Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *H. pylori*. *Journal of Bacteriology*, 182(18), 5082-5090.
78. Jiang, Z. X., Nong, B., Liang, L. X., Yan, Y. D., & Zhang, G. (2019). Differential diagnosis of *H. pylori*-associated gastritis with the linked-color imaging score. *Digestive and Liver Disease*, 51(12), 1665-1670.
79. Jorgensen, M. A., Trend, M. A., Hazell, S. L., & Mendz, G. L. (2001). Potential involvement of several nitroreductases in metronidazole resistance in *H. pylori*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392(2), 180-191.
80. Khalifa, M. M., Sharaf, R. R., & Aziz, R. K. (2010). *H. pylori*: a poor man's gut pathogen?. *Gut pathogens*, 2(1), 1-12.
81. Kwon, D. H., Peña, J. A., Osato, M. S., Fox, J. G., Graham, D. Y., & Versalovic, J. (2000). Frameshift mutations in *rdxA* and metronidazole resistance in North American *H. pylori* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(5), 793-796.

82. Kwon, D.H.; Hulten, K.; Kato, M.; Kim, J.J.; Lee, M.; El-Zaatari, F.A.K.; Osato, M.S.; Graham, D.Y. DNA Sequence Analysis of *rdxA* and *frxA* from 12 Pairs of Metronidazole-Sensitive and -Resistant Clinical *H. pylori* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2609–2615, doi:10.1128/aac.45.9.2609-2615.2001.
83. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
84. Kim, J.M.; Kim, J.S.; Kim, N.; Kim, Y.-J.; Kim, I.Y.; Chee, Y.J.; Lee, C.-H.; Jung, H.C. Gene mutations of *ARNr 23S* associated with clarithromycin resistance in *H. pylori* strains isolated from Korean patients. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 18, 1584–1589.
85. Katoh, K. & Toh, H. (2008) Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinformatics*, 9, 212.
86. Kim, N., Kim, J. J., Choe, Y. H., Kim, H. S., Kim, J. I., & Chung, I. S. (2009). Diagnosis and treatment guidelines for *H. pylori* infection in Korea. *The Korean journal of gastroenterology= Taehan Sohwagi Hakhoe chi*, 54(5), 269-278.
87. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *H. pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:449-90.
88. Lacey, S. L., Moss, S. F., & Taylor, G. W. (1993). Metronidazole uptake by sensitive and resistant isolates of *H. pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 32(3), 393-400.

89. Latham, S. R., Labigne, A., & Jenks, P. J. (2002). Production of the *RdxA* protein in metronidazole-susceptible and-resistant isolates of *H. pylori* cultured from treated mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *49*(4), 675-678.
90. Lauener FN, Imkamp F, Lehours P, Buissonnière A, Benejat L, Zbinden, R.; et al. Genetic determinants and prediction of antibiotic resistance phenotypes in *H. pylori*. *Journal of clinical medicine*. 2019, 8, 53.
91. Lee, J. Y., & Kim, N. (2014). Future trends of *H. pylori* eradication therapy in Korea. *The Korean Journal of Gastroenterology*, *63*(3), 158-170.
92. Lim, S. G., Park, R. W., Shin, S. J., Yoon, D., Kang, J. K., Hwang, J. C., ... & Lee, K. M. (2016). The relationship between the failure to eradicate *H. pylori* and previous antibiotics use. *Digestive and Liver Disease*, *48*(4), 385-390.
93. Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., ... & Achtman, M. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *H. pylori*. *Nature*, *445*(7130), 915-918.
94. Liu, Z. Q., Zheng, P. Y., & Yang, P. C. (2008). Efflux pump gene *hefA* of *H. pylori* plays an important role in multidrug resistance. *World journal of gastroenterology: WJG*, *14*(33), 5217.
95. Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., & Hearst, J. E. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, *16*(1), 45-55.
96. MacCannell, D. (2016). Next generation sequencing in clinical and public health microbiology. *Clinical Microbiology Newsletter*, *38*(21), 169-176.

97. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Atherton, J., Axon, A. T., Bazzoli, F., ... & European Helicobacter Study Group. (2012). Management of *H. pylori* infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut*, *61*(5), 646-664.
98. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., ... & El-Omar, E. M. (2017). Management of *H. pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*, *66*(1), 6-30.
99. Malfertheiner, P., Megraud, F., Rokkas, T., Gisbert, J. P., Liou, J. M., Schulz, C., ... & El-Omar, E. M. (2022). Management of *H. pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*, *71*(9), 1724-1762.
100. Mahmoudi, L., Sharifzadeh, F., Mousavi, S., Pourabbas, B., & Niknam, R. (2015). Susceptibility testing of *H. pylori*: Comparison of E-test and disk diffusion for metronidazole and mutations in *rdxA* gene sequences of *H. pylori* strains. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, *1*(4), 235-242.
101. Maljkovic Berry, I., Melendrez, M. C., Bishop-Lilly, K. A., Rutvisuttinunt, W., Pollett, S., Talundzic, E., ... & Jarman, R. G. (2020). Next generation sequencing and bioinformatics methodologies for infectious disease research and public health: approaches, applications, and considerations for development of laboratory capacity. *The Journal of infectious diseases*, *221*(Supplement_3), S292-S307.
102. Marais, A., Mendz, G. L., Hazell, S. L., & Mégraud, F. (1999). Metabolism and genetics of *H. pylori*: the genome era. *Microbiology and molecular biology reviews*, *63*(3), 642-674.

103. Marshall, B., & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The lancet*, 323(8390), 1311-1315.
104. Marshall, B., & Goodwin, C. (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 37(1), 68-68.
105. Martínez-Júlvez, M., Rojas, A. L., Olekhovich, I., Angarica, V. E., Hoffman, P. S., & Sancho, J. (2012). Structure of Rdx A—an oxygen-insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in *Helicobacter pylori*. *The FEBS journal*, 279(23), 4306-4317.
106. Marques, B., Donato, M. M., Cardoso, O., Luxo, C., Martinho, A., & Almeida, N. (2019). Study of *rdxA* and *frxA* genes mutations in metronidazole-resistant and-susceptible *H. pylori* clinical isolates from the central region of Portugal. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 17, 300-304.
107. Mascellino, M. T., Porowska, B., De Angelis, M., & Oliva, A. (2017). Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in *H. pylori* infection. *Drug design, development and therapy*, 11, 2209–2220. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S136240>
108. McColl, K. E. (2010). *H. pylori* infection. *New England Journal of Medicine*, 362(17), 1597-1604.
109. Megraud, F. (2007). *H. pylori* and antibiotic resistance. *Gut*, 56(11), 1502-1502.

110. Mégraud, F., & Lehours, P. (2007). *H. pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clinical microbiology reviews*, 20(2), 280-322.
111. Megraud, F., Coenen, S., Versporten, A., Kist, M., Lopez-Brea, M., Hirschl, A. M., ... & Glupczynski, Y. (2013). *H. pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, 62(1), 34-42.
112. Ménard, A., Santos, A., Mégraud, F., & Oleastro, M. (2002). PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the *ARNr 23S* gene, associated with *H. pylori* resistance to clarithromycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(4), 1156-1157.
113. Megraud, F. (1997). Resistance of *H. pylori* to antibiotics. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 11(S1), 43-53.
114. Miyachi, H., Miki, I., Aoyama, N., Shirasaka, D., Matsumoto, Y., Toyoda, M., ... & Kasuga, M. (2006). Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *H. pylori* in Japan. *Helicobacter*, 11(4), 243-249.
115. Mishra S. Is *H. pylori* good or bad? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.2013;32:301-4.
116. Miftahussurur, M.; Syam, A.F.; Nusi, I.A.; Makmun, D.; Waskito, L.A.; Zein, L.H.; Akil, F.; Uwan, W.B.; Simanjuntak, D.; Wibawa, I.D.N.; et al. Surveillance of *H. pylori* Antibiotic Susceptibility in Indonesia: Different Resistance Types among Regions and with Novel Genetic Mutations. *PLoS ONE* 2016, 11, e0166199, doi:10.1371/journal.pone.0166199.

117. Moodley, Y., Linz, B., Bond, R. P., Nieuwoudt, M., Soodyall, H., Schlebusch, C. M., ... & Achtman, M. (2012). Age of the association between *H. pylori* and man. *PLoS pathogens*, 8(5), e1002693.
118. Moore, R. A., Beckthold, B., & Bryan, L. E. (1995). Metronidazole uptake in *H. pylori*. *Canadian journal of microbiology*, 41(8), 746-749.
119. Mori, H., Suzuki, H., Matsuzaki, J., Masaoka, T., & Kanai, T. (2018). Acquisition of double mutation in *gyrA* caused high resistance to sitafloxacin in *H. pylori* after unsuccessful eradication with sitafloxacin-containing regimens. *United European gastroenterology journal*, 6(3), 391-397.
120. Morgan DR, Torres T, Sexton R, et al. Risk of recurrent *H. pylori* infection 1 year after initial eradication therapy in 7 Latin American communities. *JAMA*. 2013;309(6):578–586.
121. Morris, A., & Nicholson, G. (1987). Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *American Journal of Gastroenterology*, 82(3).
122. Montalban C, Norman F. Treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: *H. pylori* eradication and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6:361-71.
123. Mobley, H, Cortesia, M., Rosenthal, L & Jones B. (1988) Characterization of Urease from *Campylobacter pylori*. *Journal of clinical microbiology*, 26(5), 831-836.
124. More, R.A.; Beckthold, B.; Wong, S.; Kureishi, A.; Bryan, L.E. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-

- resistant mutants of *H. pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39, 107–111, doi:10.1128/aac.39.1.107.
125. Miendje Deyi VY, Van den Borre C, Fontaine V. Comparative evaluation of 3 selective media for primary isolation of *H. pylori* from gastric biopsies under routine conditions. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68(4):474-6.
126. Muñoz, A. B., Trespalacios-Rangel, A. A., & Vale, F. F. (2021). An American lineage of *H. pylori* prophages found in Colombia. *Helicobacter*, 26(2), e12779.
127. Murakami, K., Okimoto, T., Kodama, M., Tanahashi, J., Fujioka, T., Ikeda, F., ... & Kobayashi, I. (2009). Sitafloxacin activity against *H. pylori* isolates, including those with *gyrA* mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(7), 3097-3099.
128. Olano, M., Chu, M., Guzmán, J., Castillo, D., & Sauvain, M. (2021). Rendimiento diagnóstico del cultivo y susceptibilidad de *H. pylori* en pacientes peruanos: resultados de un laboratorio centinela. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38, 406-411.
129. Okamoto, T.; Yoshiyama, H.; Nakazawa, T.; Park, I.-D.; Chang, M.-W.; Yanai, H.; Okita, K.; Shirai, M. A change in *PBP1* is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *H. pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, 50, 849–856, doi:10.1093/jac/dkf140.
130. O'Connor, A., Gisbert, J. P., O'Morain, C., & Ladas, S. (2015). Treatment of *H. pylori* Infection 2015. John Wiley & Sons Ltd, *Helicobacter*, 20, 54–61.

131. Olano Paitan, M (2018).EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A CINCO ANTIMICROBIANOS DE REFERENCIA EN CEPAS DE *H. pylori* AISLADAS DE PACIENTES DISPÉPTICOS RECLUTADOS EN EL HOSPITAL CAYETANO HEREDIA.
132. Oleastro, M., Ménard, A., Santos, A., Lamouliatte, H., Monteiro, L., Barthélémy, P., & Mégraud, F. (2003). Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *H. pylori*. *Journal of clinical microbiology*, *41*(1), 397-402
133. Mégraud, F., & Lehours, P. (2007). *H. pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(2), 280-322
134. Okamoto, T.; Yoshiyama, H.; Nakazawa, T.; Park, I.-D.; Chang, M.-W.; Yanai, H.; Okita, K.; Shirai, M. A change in *PBP1* is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *H. pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, *50*, 849–856, doi:10.1093/jac/dkf140.
135. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;*118*:3030-44.
136. Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, *25*(7), 1043-1055.

137. Perez-Perez, G. I., Rothenbacher, D., & Brenner, H. (2004). Epidemiology of *H. pylori* infection. *Helicobacter*, 9, 1-6.
138. Picazo, J., García, J., Cantón, R., García, E., Elías, J., Sánchez, G., & Vila, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 4-54.
139. Piccolomini, R., Di Bonaventura, G., Catamo, G., Carbone, F., & Neri, M. (1997). Comparative evaluation of the E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *H. pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *Journal of clinical microbiology*, 35(7), 1842-1846.
140. Pilco P, Payet E, Cáceres E. Cáncer gástrico en Lima metropolitana [Gastric cancer in Lima]. *Rev Gastroenterol Peru*. 2006 Oct-Dec;26(4):377-85. Spanish. PMID: 17211488.
141. Kumar, S., Nguyen, T. H., Nahar, S., Sarker, N., Baker, S., Bulach, D., ... & Rahman, M. (2021). A comparative whole genome analysis of *H. pylori* from a human dense South Asian setting. *Helicobacter*, 26(1), e12766.
142. Qureshi, N. N., Gallaher, B., & Schiller, N. L. (2014). Evolution of amoxicillin resistance of *H. pylori* in vitro: characterization of resistance mechanisms. *Microbial drug resistance*, 20(6), 509-516.
143. Pohl, D., Keller, P. M., Bordier, V., & Wagner, K. (2019). Review of current diagnostic methods and advances in *H. pylori* diagnostics in the

- era of next generation sequencing. *World journal of gastroenterology*, 25(32), 4629.
144. Porras C, Nodora J, Sexton R, Ferreccio C, Jiménez S, Domínguez RL, et al. Epidemiology of *H. pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). *Cancer Causes. Control.* 2013;24:209-15.
145. Qureshi, N. N., Gallaher, B., & Schiller, N. L. (2014). Evolution of amoxicillin resistance of *H. pylori* in vitro: characterization of resistance mechanisms. *Microbial drug resistance*, 20(6), 509-516.
146. Ramírez-Bulla, P., Mercado-Reyes, M., Trespalacios-Rangel, A. A., Avila-Coy, J., & Otero-Regino, W. (2012). Estado actual de la resistencia de *H. pylori* a tetraciclina: revisión sistemática de la literatura. *Universitas scientiarum*, 17(2), 216-229.
147. Reshetnyak, V. I., & Reshetnyak, T. M. (2017). Significance of dormant forms of *H. pylori* in ulcerogenesis. *World journal of gastroenterology*, 23(27), 4867.
148. Reshetnyak, V. I., & Reshetnyak, T. M. (2017). Significance of dormant forms of *H. pylori* in ulcerogenesis. *World journal of gastroenterology*, 23(27), 4867–4878. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i27.4867>.
149. Rimbara, E.; Noguchi, N.; Kawai, T.; Sasatsu, M. Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *H. pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 61, 995–998, doi:10.1093/jac/dkn051.

150. Rizvanov, A. A., Haertlé, T., Bogomolnaya, L., & Talebi Bezmin Abadi, A. (2019). *H. pylori* and its antibiotic heteroresistance: A neglected issue in published guidelines. *Frontiers in microbiology*, 10, 1796.
151. Roldán, I. J., Castaño, R., & Navas, M. C. (2019). Mutaciones del gen ARN ribosómico 23S de *H. pylori* asociadas con resistencia a claritromicina en pacientes atendidos en una unidad de endoscopia de Medellín, Colombia. *Biomédica*, 39, 117-129.
152. Rodvold KA (1999). Clinical safety profile of fluoroquinolones. *Crit. Illness* 14: 28-40
153. Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., & Cunliffe, W. J. (1998). 16S *rARN* mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(7), 1702-1705.
154. Rubio, A., & Pérez-Pulido, A. J. (2021). Protein-Coding Genes of *H. pylori* Predominantly Present Purifying Selection though Many Membrane Proteins Suffer from Selection Pressure: A Proposal to Analyze Bacterial Pangenomes. *Genes*, 12(3), 377.
155. Saracino, I. M., Pavoni, M., Zullo, A., Fiorini, G., Lazzarotto, T., Borghi, C., & Vaira, D. (2021). Next generation sequencing for the prediction of the antibiotic resistance in *H. pylori*: a literature review. *Antibiotics*, 10(4), 437.
156. Savoldi, A., Carrara, E., Graham, D. Y., Conti, M., & Tacconelli, E. (2018). Prevalence of Antibiotic Resistance in *H. pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions.

157. Schistosomes, liver flukes and *H. pylori*. MIARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. MIARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:1-241.
158. Secka, O., Berg, D. E., Antonio, M., Corrah, T., Tapgun, M., Walton, R., ... & Thomas, J. E. (2013). Antimicrobial susceptibility and resistance patterns among *H. pylori* strains from The Gambia, West Africa. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(3), 1231-1237.
159. Seemann, T. (2015). Snippy: fast bacterial variant calling from NGS lectures.
160. Şen, N., Yılmaz, Ö., Şımşek, İ., Küpelioğlu, A. A., & Ellıdokuz, H. (2005). Detection of *H. pylori* DNA by a simple stool PCR method in adult dyspeptic patients. *Helicobacter*, 10(4), 353-359.
161. Skirrow, M. B. (1994). Diseases due to Campylobacter, Helicobacter and related bacteria. *Journal of comparative pathology*, 111(2), 113-149.
162. Smiley, R., Bailey, J., Sethuraman, M., Posecion, N., & Showkat Ali, M. (2013). Comparative proteomics analysis of sarcosine insoluble outer membrane proteins from clarithromycin resistant and sensitive strains of *H. pylori*. *Journal of Microbiology*, 51(5), 612-618.
163. Smith, S. M., O'Morain, C., & McNamara, D. (2014). Antimicrobial susceptibility testing for *H. pylori* in times of increasing antibiotic resistance. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(29), 9912.

164. Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial genomics*, 7(11).
165. Stone, G. G., Shortridge, D., Flamm, R. K., Versalovic, J., Beyer, J., Idler, K., ... & Tanaka, S. K. (1996). Identification of a *ARNr 23S* gene mutation in clarithromycin-resistant *H. pylori*. *Helicobacter*, 1(4), 227-228.
166. Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. Growth of *H. pylori* in various liquid and plating media. *Lett Appl Microbiol*. 2000;30(3):192-6.
167. Stepanian Rozo, J. Análisis de genómica comparativa en aislamientos colombianos de *H. pylori*: enfoque asociado a virulencia, resistencia antibiótica y estructura poblacional.
168. Suganuma, M., Kurusu, M., Suzuki, K., Nishizono, A., Murakami, K., Fujioka, T., & Fujiki, H. (2005). New tumor necrosis factor- α -inducing protein released from *H. pylori* for gastric cancer progression. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 131(5), 305-313.
169. Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E. J., Graham, D. Y., El-Omar, E. M., Miura, S., ... & Malfertheiner, P. (2015). Kyoto global consensus report on *H. pylori* gastritis. *Gut*, 64(9), 1353-1367
170. Suzuki, H., & Mori, H. (2018). World trends for *H. pylori* eradication therapy and gastric cancer prevention strategy by *H. pylori* test-and-treat. *Journal of gastroenterology*, 53(3), 354-361.

171. Soll AH. Consensus conference. Medical treatment of peptic ulcer disease. Practice guidelines. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. JAMA. 1996;275:622-9.
172. Taylor, D. E., Ge, Z., Purych, D., Lo, T., & Hiratsuka, K. (1997). Cloning and sequence analysis of two copies of a *ARNr 23S* gene from *H. pylori* and association of clarithromycin resistance with *ARNr 23S* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(12), 2621-2628.
173. Teh, X., Khosravi, Y., Ching Lee, W., Ruey Leow, A., Fai Loke, M., Vadivelu, J., & Lee Goh, K. (2014). Functional and Molecular Surveillance of *H. pylori* Antibiotic Resistance in Kuala Lumpur. PLoS ONE, 9(7): e101481
174. Tirado-Hurtado, I., Carlos, C., Lancho, L., Alfaro, A., Ponce, R., Schwarz, L. J., ... & Fajardo, W. (2019). *H. pylori*: history and facts in Peru. *Critical reviews in oncology/hematology*, 134, 22-30.
175. Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., ... & Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *H. pylori*. *Nature*, 388(6642), 539-547.
176. Thung, I., Aramin, H., Vavinskaya, V., Gupta, S., Park, J. Y., Crowe, S. E., & Valasek, M. A. (2016). The global emergence of *H. pylori* antibiotic resistance. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 43(4), 514-533.
177. Thompson, S. A., & Blaser, M. J. (1995). Isolation of the *H. pylori* *recA* gene and involvement of the *recA* region in resistance to low pH. *Infection and immunity*, 63(6), 2185-2193.

178. Trespacios, A. A., Rimbara, E., Otero, W., Reddy, R., & Graham, D. Y. (2015). Improved allele-specific PCR assays for detection of clarithromycin and fluoroquinolone resistant of *H. pylori* in gastric biopsies: identification of N87I mutation in *GyrA*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 81(4), 251-255.
179. Trespacios, A. A., Otero, W., Caminos, J. E., Mercado, M. M., Ávila, J., Rosero, L. E., ... & Graham, D. Y. (2013). Phenotypic and genotypic analysis of clarithromycin-resistant *H. pylori* from Bogotá DC, Colombia. *Journal of Microbiology*, 51(4), 448-452.
180. Tshibangu-Kabamba, E., Ngoma-Kisoko, P. D. J., Tuan, V. P., Matsumoto, T., Akada, J., Kido, Y., ... & Yamaoka, Y. (2020). Next-generation sequencing of the whole bacterial genome for tracking molecular insight into the broad-spectrum antimicrobial resistance of *H. pylori* clinical isolates from the Democratic Republic of Congo. *Microorganisms*, 8(6), 887.
181. Tshibangu-Kabamba, E., & Yamaoka, Y. (2021). *H. pylori* infection and antibiotic resistance—from biology to clinical implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 613-629.
182. Tsugawa, H., Suzuki, H., Satoh, K., Hirata, K., Matsuzaki, J., Saito, Y., ... & Hibi, T. (2011). Two amino acids mutation of ferric uptake regulator determines *H. pylori* resistance to metronidazole. *Antioxidants & redox signaling*, 14(1), 15-23.
183. Ubukata, H., Nagata, H., Tabuchi, T., Konishi, S., Kasuga, T., & Tabuchi, T. (2011). Why is the coexistence of gastric cancer and duodenal

- ulcer rare? Examination of factors related to both gastric cancer and duodenal ulcer. *Gastric Cancer*, 14(1), 4-12.
184. Van Doorn, L.-J.; Debets-Ossenkopp, Y.J.; Marais, A.; Sanna, R.; Megraud, F.; Kusters, J.G.; Quint, W.G.V. Rapid Detection, by PCR and Reverse Hybridization, of Mutations in the *H. pylori* *ARNr 23S* Gene, Associated with Macrolide Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43, 1779–1782, doi:10.1128/aac.43.7.1779.
185. Vester, B., & Douthwaite, S. (2001). Macrolide resistance conferred by base substitutions in *ARNr 23S*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(1), 1-12.
186. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*.1983;1:1273-5.
187. WHO. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Obtenido de <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
188. Wingett, S. W., & Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *FI000Research*, 7.
189. Zafra-Tanaka, JH, Tenorio-Mucha, J., Villarreal-Zegarra, D., Carrillo-Larco, R. y Bernabe-Ortiz, A. (2020). Mortalidad relacionada con el cáncer en Perú: Tendencias de 2003 a 2016. *PloS uno* , 15 (2), e0228867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228867>.
190. Zhen-Hua, Z.; De-Qiang, H.; Yong, X.; Lin-Lin, L.; Nong-Hua, L. Characterization of *ARNr 23S* gene mutation in primary and secondary

clarithromycin-resistant *H. pylori* strains from East China. *Turk. J. Gastroenterol.* 2009, 24, 5–9, doi:10.4318/tjg.2013.0525.

191. Zhu, Z. H., Huang, D. Q., Xie, Y. O. N. G., Liu, L., & Lu, N. H. (2013). Characterization of *ARNr 23S* gene mutation in primary and secondary clarithromycin-resistant *H. pylori* strains from East China. *Turk J Gastroenterol*, 24(1), 5-9.
192. Binh, T. T., Suzuki, R., Trang, T. T. H., Kwon, D. H., & Yamaoka, Y. (2015). Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in *H. pylori* using next-generation sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(4), 2343-2348.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en *H. pylori*

Antibióticos	Modo de resistencia	Target farmacológico	Mecanismo de resistencia	Revisión bibliográfica
Clarithromicina	Resistencia mediada por diana de fármacos	Mutaciones puntuales en el bucle de peptidil transferasa del dominio V del gen <i>ARNr 23S</i>	Evita cambios estructurales y la disociación del peptidil-ARNt del ribosoma, lo que conduce al alargamiento de la cadena peptídica naciente	Vester & Douthwaite; 2001; Versalovic et al., 1996; Occhialini et al., 1997
	Resistencia mediada por diana de fármacos	Mutaciones con sentido erróneo, inserción o deleción en los genes <i>infB</i> (factor de iniciación de la traducción IF-2) y el gen <i>rpl22</i> (proteína ribosómica L22)	Protección putativa del dominio ribosómico	Bina et al., 2017; Liu et al 2008; Binh et al., 2014; Miftahussurur et al., 2016
Levofloxacino	Resistencia mediada por diana de fármacos	<i>GyrA</i> y <i>GyrB</i> con alteraciones de secuencia (mutaciones) dentro o fuera de QRDR (por sus siglas en inglés)	Protección del superenrollamiento cromosómico durante la síntesis, transcripción y división celular del ADN	Mori et al., 2018; Miyachi et al., 2006
Amoxicilina	Resistencia mediada por diana de fármacos	Alteración de PBP's (<i>PBP1A</i> , <i>PBP2</i> , <i>PBP3</i> y <i>PBP4</i>) causada por mutaciones con sentido erróneo, deleciones e inserciones cerca de los motivos (SXXK, SXN y KTG)	Una proteína de unión a penicilina alterada por una mutación estructural conduce a una reducción en la afinidad de unión a moléculas de amoxicilina. En consecuencia, se previene el efecto del fármaco sobre la unión de los péptidos durante las últimas etapas de la síntesis de peptidoglicanos en la formación de la pared celular.	Gong. & Yuan,2018; Tshibangu-Kabamba,2020;

	Limitación de la captación de fármacos	Alteración de porinas <i>HopC</i> y <i>HofH</i> causadas por mutaciones con sentido erróneo	Disminución putativa de la permeabilidad de la membrana al fármaco.	Gerrits et al., 2006; Hu et al., 2016; DeLoney & Schiller, 2000
Metronidazol	Desintoxicación de drogas	<i>FrxA</i> y/o <i>RdxA</i> con alteración en la estabilidad de la molécula, dimerización o unión del mononucleótido de flavina por cambio de marco, mutación sin sentido (del inglés nonsense mutation) o mutaciones con cambio de sentido (del inglés missense mutation), inserciones y deleciones (del inglés indels)	Las mutaciones en nitroreductasa (<i>FrxA</i>) y/o las nitroreductasas NAD(P)H nitroreductasa (<i>RdxA</i>) insensibles al oxígeno reducen o suprimen la reducción enzimática del metronidazol que conduce a la acumulación intracelular de profármaco inactivo.	Jeong et al., 2000; Kwon et al., 2000; Martínez et al., 2012
		Regulación negativa de la expresión de <i>RdxA</i> probablemente por mutaciones en la región promotora relacionada	Activación reductora de fármacos reducida o suprimida por regulación negativa de nitroreductasas insensibles al oxígeno.	Hoffman et al., 1996;
		Hiperactividad del 'ciclo fútil' del oxígeno; regulación positiva de <i>SodB</i> por inactivación de la actividad de <i>Fur</i> debido a la mutación sin sentido o con sentido erróneo de <i>Fur</i> , y sustitución de un solo par de bases en la región promotora de <i>sodB</i> .	Regeneración de compuestos inactivos de fármacos mediante el aumento del ciclo inútil de oxígeno y fármacos; protección contra reacciones oxidativas.	Choi et al., 2011;

	Resistencia mediada por diana de fármacos	Regulación positiva del efector de reparación del ADN (<i>RecA</i>) debido a mutaciones con cambio de sentido (del inglés missense mutation)	Protección del ADN del daño por ROS y derivados de fármacos tóxicos.	Thompson, & Blaser, 1995
Tetraciclina	Resistencia mediada por diana de fármacos	<i>ARNr 16S</i> con un dominio de unión a tetraciclina alterado por sustituciones de pares de bases simples, dobles o triples	Protección del paso de elongación de la cadena peptídica durante la síntesis de proteínas	Ross et al., 1998; Dailidienne et al., 2002
Múltiples fármacos (por ejemplo, amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, claritromicina)	Salida de drogas	Regulación positiva o sobreexpresión de los sistemas de eflujo de la familia de división de nodulación de resistencia (RND), Hef ABC, DEF y GHI que permite la salida de los fármacos (por ejemplo: tetraciclina, metronidazol, claritromicina y amoxicilina)	Reducción de la concentración intracelular del fármaco por debajo de las dosis letales	Boyanova et al., 2019; Hirata et al., 2010; Lacey, et al., 1993; Moore et al., 1995
		Sobreexpresión del sistema de eflujo de superfamilia de facilitadores principales (MFS) que permite la salida de fármacos (por ejemplo: amoxicilina, claritromicina, tetraciclina, metronidazol, furazolidona)	Reducción de la concentración intracelular del fármaco por debajo de las dosis letales	Boyanova et al., 2019; Hirata et al., 2010;

Anexo 2. Mutaciones en genes asociados a la resistencia a la claritromicina reportados en cepas *H. pylori*.

Gen	Mecanismo de resistencia	Mutaciones de resistencia putativa	Bibliografía
<i>ARNr 23S</i>	Las mutaciones en el <i>ARNr 23S</i> , permite que el fármaco no pueda unirse al dominio V del ARN 23S, y con ello protege el paso de translocación mRNA-tRNA durante la síntesis de proteínas.	Mutaciones dentro del dominio V del <i>ARNr 23S</i> : A2142C/G y A2143G.	Versalovic et al., 1996; De Francesco et al., 2009; Hulten et al., 1997; Hansomburana et al., 2012; Garrido et al 2007; Alfaresi et al, 2005
		Otras mutaciones que confieren en menor nivel a la resistencia a claritromicina: ubicadas dentro o fuera del dominio V (por ejemplo, T1942C, G1939A, C2147G, G2172T, T2182C, A2116G, A2144G/T, A2115G, G2111A, T2717C, T2289C, G2224A, C2245T)	Khan et al., 2004; Kim et al., 2002; Hansomburana et al., 201; Hulten et al., 1997
<i>rpl22</i>	Las mutaciones en las proteínas ribosomales perturban la conformación de los residuos en los dominios II, III y V del ARN23S y con ello afectan la unión de los antibióticos	226_228delGTG, T265_T266insTTCCATGTA	Bin et al., 2014
<i>InfB</i>		G160A	

*ins: inserción

Anexo 3. Mutaciones en genes asociados a la resistencia a amoxicilina reportados en aislados clínicos de cepas de *H. pylori*.

Gen o secuencia	Mecanismo de resistencia	Mutaciones de resistencia putativa	Bibliografía
<i>pbp1A</i>	Mutaciones en el motivo de PBP o adyacentes, que conduce a una reducción en la afinidad de unión a moléculas de amoxicilina. Esto permite prevenir el efecto sobre la unión de las subunidades de peptidoglucanos.	V45I, T337_S338insN, S338R, F366L, V374L, Y401_S402insY, S402G, N404S, S405N, S414R, L423F, S455N, K464insE, V469 (M/A), A474T, N504D, D535N, S543 (H/R), T556S, T558S, N562(D/H/Y, N562(D/H), N562Y, T593(A/G/K/P/S),G595(del /A/S),A599(T/P/V), Y637Ter.	Tshibangu-Kabamba et al., 2021; Gong et al., 2018; Hu et al., 2016.
<i>pbp2</i>		V312M, V313A, G353R, A296V/N, S494(H/A), V541M, E572G.	Rimbara et al., 2008
<i>pbp3</i>		F233L, A499V, E536K.	Rimbara et al., 2008
<i>pbp4</i>		Y266H, Y267H	Rimbara et al., 2008
<i>hofH</i>	Aumento de la actividad de bombas de eflujo, que permite disminuir el nivel del antibiótico intracelular.	G22W	Bina et al., 2000
<i>hefC</i>		D131E, L378F	
<i>hopC</i>	La disminución de la permeabilidad de la membrana impide la absorción del antibiótico.	R302H	Co y Schiller, 2006

*i: inserción

*del: deleción

*Ter: Codones de terminación

Anexo4. Mutaciones en genes asociados a la resistencia a metronidazol reportados en aislados clínicos de cepas de *H. pylori*.

Gen o nombre de la secuencia	Mecanismo de resistencia	Mutaciones de resistencia putativa	Bibliografía
rdxA	Afecta a la actividad enzimática de NADPH nitroreductasa insensible al oxígeno y con ello afectan la activación del fármaco.	Mutaciones que conduce un cambio de marco de lectura en codones funcionales bien definidos basados en estudios experimentales (por ejemplo, R16, H17, S18, C19, K20, R41, L42, S43, Y47, Q50, V55, M56, N73, I142, A143, G145, G149, C159, G162, G163, V192, K198, K200, K202, L209).	Martínez-Júlvez et al., 2012
	Produce el truncamiento de la expresión de la proteína NADPH nitroreductasa insensible al oxígeno.	Mutaciones sin sentido o de cambio de lectura en cualquier posición de codón (codones stop prematuro), deleciones de secuencias grandes (por ejemplo, K2_M21del, R131_K166del, K168_V172del, L137_I142del, N178_L185del; G189_R200del, S92_Q146del) que conducen codones stop prematuro. Inserciones de secuencias grandes, mutaciones sin sentido observadas en aislados clínicos (por ejemplo: A22S, E27Q/V, T31E, D59N, R90K, H97T/Y, P106S, S108A, A118S/T, R131K y G189C) y mutaciones hipotéticas en la región promotora.	Gong y Yuan, 2018; Hu et al., 2016; Latham et al., 2002; Kim et al., 2009

<i>frxA</i>	Las mutaciones afectan la actividad enzimática de NAD (P) H-flavina oxidoreductasa, por lo que el metronidazol no se reduce.	Mutaciones en codones funcionales bien definidos después de estudios experimentales (por ejemplo: K17, R13, A15, K20, Q164, G165, R206) y mutaciones nulas en cualquier posición de codón .	Tsugawa et al., 2011; Martínez-Júlvez et al., 2012
<i>sodB</i>	La mutación en las secuencias consenso del promotor de <i>SodB</i> , permite sobreexpresión de esta proteína y con ello la protección de radicales de oxígeno.	A-5C	Tsugawa et al., 2011

Anexo 5. Mutaciones en genes asociados a la resistencia a levofloxacinio reportados en cepas *H. pylori*.

Gen o secuencia target	Mecanismo de resistencia	Mutaciones de resistencia putativa
<i>gyrA</i>	Las mutaciones en el gen <i>gyrA</i> , permite que la droga no se una a esta enzima ADN <i>gyrAsa</i> , lo que conduce a una protección del superenrollamiento cromosómico durante la síntesis, transcripción y división celular del ADN.	Mutaciones dentro del QRDR _{A71_Q110} (V77A, S83A, D86N, N87A/K/I/Y/T, A88N/P/V, D91G/N/A/H/Y, A92T, D99V, R103H).
		Mutaciones fuera del motivo QRDR _{A71_Q110} (H57Y, S63P, V65I, A129T, R130K, D155N, D161N, V172I, P188S, D192N, A199V/I).
<i>gyrB</i>	Las mutaciones en el gen <i>gyrB</i> , permite que la droga no se una a esta enzima ADN <i>gyrAsa</i> , lo que conduce a una protección del superenrollamiento cromosómico durante la	Mutaciones dentro del motivo QRDR _{E415_S454} (por ejemplo: D435N, V437L, F438S, S429T).

	síntesis, transcripción y división celular del ADN.	
--	---	--

Anexo 6. Mutaciones en genes asociados a la resistencia a tetraciclina reportados en aislados clínicos de *H. pylori*.

Gen	Mecanismo de resistencia	Mutaciones de resistencia putativa	Bibliografía
<i>ARNr 16S</i>	Las mutaciones permiten que el antibiótico no se una al ARN 16S, y con ello inhibe su efecto inhibidor	Mutaciones dentro del sitio de unión a tetraciclina (por ejemplo: AGA926_928(TTC/GGC), AG926_927GT, GA927_928TC, A926 (C/G/T), A928C, A939C)	Dadashzadeh et al., 2014; Nonaka et al., 2005

Anexo 7. Cálculo del tamaño del mínimo muestral

Se considero un nivel de significancia al 5% ($\alpha=0.05$) y potencia de 80% ($1-\beta$) que equivale a $\lambda(1,1-\beta,\alpha)$ con su valor de 7.849.

-Hipótesis:

H0=Existe una concordancia aceptable entre los resultados de la microdilución y secuenciación del genoma completo(K1=0.3)

Ha=Existe una concordancia considerable significativa de la microdilución y secuenciación del genoma completo (K2=Kappa esperado)

-Formula:

Fórmula para el tamaño de muestra
$N = \lambda(1,1 - \beta, \alpha) \left\{ \frac{[\pi(1 - \pi)(K_1 - K_0)]^2}{\pi^2 + \pi(1 - \pi)K_0} + \frac{2[\pi(1 - \pi)(K_1 - K_0)]^2}{\pi(1 - \pi)(1 - K_0)} + \frac{[\pi(1 - \pi)(K_1 - K_0)]^2}{(1 - \pi)^2 + \pi(1 - \pi)K_0} \right\}^{-1}$
Detalles de la fórmula
λ = el parámetro de no centralidad denotado
α = nivel de significancia
β = la potencia o la probabilidad acumulada
$\lambda(1,1 - \beta, \alpha)$ = grados de libertad
π = prevalencia
K_1 = concordancia de la hipótesis alterna o del investigador
K_0 = concordancia de la hipótesis nula

-Cálculo de tamaño mínimo muestral por antibiótico evaluado:

FÁRMACO	T muestra mínimo	Beta=precisión	Poder	Kappa referencia- estudio madre	Intervalo de confianza(95%)	p valor
Claritromicina	32	0.2	0,80	0,760	(0.6734;0.8630)	<0.05
Levofloxacino	40	0.2	0.80	0,65	(0.5438;0.7652)	<0.05
Amoxicilina	40	0.84921	0.15079	-0,01	(-0,1997;-0.1702)	0.8760
Metronidazol	40	0.76123	0.23877	0.1074	(-0.0501;0.2649)	0.6502
Tetraciclina	40	0.84999	0.15001	-0,0013	(-0,0604;-0,0114)	0.6502

Anexo 8. Aceptación del comité de ética



VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

CAR-DUARI-238-23

Lima, 16 de agosto del 2023

Señor(a) investigador(es)
Landa Flores, Mishell
Presente. -

Es grato dirigirme a usted para expresarle un cordial saludo y a la vez informarle que hemos recibido el proyecto de investigación titulado: **"Análisis genómico de la resistencia antibiótica y su concordancia genotipo/fenotipo en cepas aisladas de *Helicobacter pylori*" SIDISI 211483**, el cual ha sido revisado y registrado en la Dirección Universitaria de Asuntos Regulatorios de la Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia debido a que por sus características no requiere evaluación por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Humanos ni por el Comité Institucional de Ética para Uso de Animales.

Este proyecto puede iniciar su ejecución. Los cambios o enmiendas al protocolo presentado solo deben ejecutarse luego de una nueva evaluación y autorización por esta dirección. Adicionalmente, agradecemos tenga a bien presentar el informe de cierre del proyecto al concluir la ejecución de este.

Atentamente,

Dra. Cinthia Hurtado Esquen
Directora
Dirección Universitaria de Asuntos
Regulatorios de la Investigación

/cv

Anexo 9. Pruebas de susceptibilidad fenotípicas

La prueba de microdilución en caldo permitió determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Kwon et al., 2000). Se emplearon placas de 96 pozos en donde se evaluaron las cepas aisladas de pacientes y la cepa de referencia ATCC 43504, acorde a las directrices del centro de referencia CLSI (CLSI, 2012). Para ello, se utilizó un inóculo de 10^7 o 10^8 UFC/ml de *H. pylori* equivalente a 02 McFarland en caldo BHI suplementado con 10% de suero fetal bovino SFB y 1% de IsoVitalex (BBL). Los antimicrobianos amoxicilina, claritromicina, levofloxacina, metronidazol y tetraciclina (Sigma-Aldrich) fueron agregados al medio con las concentraciones de: 0.06 $\mu\text{g} / \text{ml}$ – 0.48 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 0.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ - 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 0.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ – 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ – 64 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y 0.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ - 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$. respectivamente. Las cuatro diluciones seriadas para cada ATM se consideraron en base a los puntos de corte recomendados por la EUCAST (EUCAST, 2017).

Posteriormente, se incubaron las bacterias a 37°C en una atmósfera de 5% de O_2 , 10% de CO_2 , durante 72 horas. Luego del tiempo de incubación, las placas fueron examinadas visualmente para determinar la CMI. La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que muestra una completa inhibición de crecimiento visible en el cultivo. Las cepas fueron categorizadas sensibles (S) o resistentes (R) según los puntos de corte, amoxicilina: $S \leq 0.12 \mu\text{g}/\text{ml}$, $R > 0.12 \mu\text{g}/\text{ml}$, claritromicina: $S \leq 0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$, $R > 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$;

levofloxacino: $S \leq 1 \mu\text{g/ml}$, $R > 1 \mu\text{g/ml}$,
metronidazol: $S \leq 8 \mu\text{g/ml}$, $R > 8 \mu\text{g/ml}$ y tetraciclina: $S \leq 1 \mu\text{g/ml}$, $R > 1 \mu\text{g/ml}$.
recomendados por la EUCAST. Los ensayos fueron realizados por triplicado
considerándose los controles de calidad de la CMI de los ATMs sobre la cepa de
H. pylori ATCC 43504 según las recomendaciones de la CLSI

<i>gyrA</i>	5- AGCTTATTCCATGAGCGTG A3 y 5- TCAGGCCCTTTGACAA ATTC-3	Resistencia a Levofloxaci no	582	Moore et al., 1995
<i>rdxA</i>	5- GCAGGAGCATCAGATAGT TCT3 y 5 - GGGATTTTATTGTATGCTA CAA3	Resistencia a Metronidaz ol	886	Jeong et al., 2000
16s	5'- ATAGACGGGGACCCGCAC AAG3 y 5'- TGGCAAGCCAGACTCC A-3	Resistencia a Tetraciclina	120	Dadashza deh et al. 2014

Anexo 11. Protocolo para la extracción de ADN a partir de cepas aisladas
de
H. pylori

1. Tener un cultivo fresco de hasta 2×10^9 bacterias en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml y centrifugar por 10 min a 5000 g. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180 μ l de buffer de digestión. Agregar 20 μ l de la solución proteinasa K y mezclar completamente en vortex.
3. Incubar la muestra a 56°C homogenizando en vortex ocasionalmente por alrededor de 30 min.
4. Agregar 20 μ l de la solución RNasa A, mezclar con vortex e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
5. Agregar 200 μ l de solución de lisis. Mezclar con vortex alrededor de 15 segundos.
6. Agregar 400 μ l de etanol al 50% y mezclar con vortex.
7. Transferir la muestra lisada a una columna de purificación insertada en un tubo colector. Centrifugar por 1 min a 6000 g. descartar el tubo colector conteniendo la solución residual. Colocar la columna en un nuevo tubo de colector.
8. Agregar 500 μ l de solución de lavado I. Centrifugar por 1 min a 800 g. descartar la solución residual y colocar la columna otra vez en el tubo colector.

9. Agregar 500µl de la solución de lavado II. Centrifugar por 3 min a máxima velocidad ($\geq 12000g$). Descartar el tubo colector conteniendo la solución residual y transferir la columna de purificación a un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5ml.
10. Agregar 200µl del buffer de elución al centro de la columna de purificación para extraer el ADN genómico. Incubar por 2 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min a 8000g.
11. Descartar la columna de purificación. Usar el ADN inmediatamente o almacenarlo a $-20^{\circ}C$.

Anexo 12. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Tipo de variable (según su naturaleza)	Tipo de variable (según su relación)	Escala de medición	Indicador	Definición operacional
Mutación puntual en los genes <i>ARNr 23S</i>	Alteración genética causada por la sustitución de un solo nucleótido en el gen <i>ARNr 23S</i>	Cualitativa (Dicotómica)	Independiente	Nominal	Clarithromicina (<i>ARNr 23S</i>) A2142G, A2142C, A2143G	1.Presencia 2.Ausencia
Mutación puntual en el gen <i>pbp1A</i>	Alteración genética causada por la sustitución de un solo nucleótido en el gen <i>pbp1</i>	Cualitativa (Dicotómica)	Independiente	Nominal	Amoxicilina (<i>pbp1</i>) -I141L, G242 (S,D). (<i>pbp2</i>) -I259T (<i>pbp3</i>) - D2N, A50S, F490Y, A541T y V374I (<i>pbp4</i>) -Y266H	1.Presencia 2.Ausencia

Mutación puntual en el gen <i>gyrA</i>	Alteración genética causada por la sustitución de un solo nucleótido en el gen <i>gyrA</i> .	Cualitativa (Dicotómica)	Independiente	Nominal	Levofloxacino (<i>gyrA</i>) N87K,N87I,D91G,D91N, D91Y	1.Presencia 2.Ausencia
Mutación puntual en el gen <i>gyrB</i>	Alteración genética causada por la sustitución de un solo nucleótido en el gen <i>gyrB</i> .	Cualitativa (Dicotómica)	Independiente	Nominal	Levofloxacino (<i>gyrB</i>) -R484K, S479G	1.Presencia 2.Ausencia
Mutación puntual en el gen <i>rdxA</i>	Alteración genética causada por la sustitución de un solo nucleótido en el gen <i>rdxA</i> .	Cualitativa (Dicotómica)	Independiente	Nominal	Metronidazol (<i>rdxA</i>) Aparición de secuencias parada, cambios en el marco de lectura, inserciones y deleciones. Mutaciones: D59N,R131K,R90K,I160 F,H97T,L62V,K131R,A1 18(S,T),V204I,R168(H,C ,A80T,Q197K.	1.Presencia 2.Ausencia

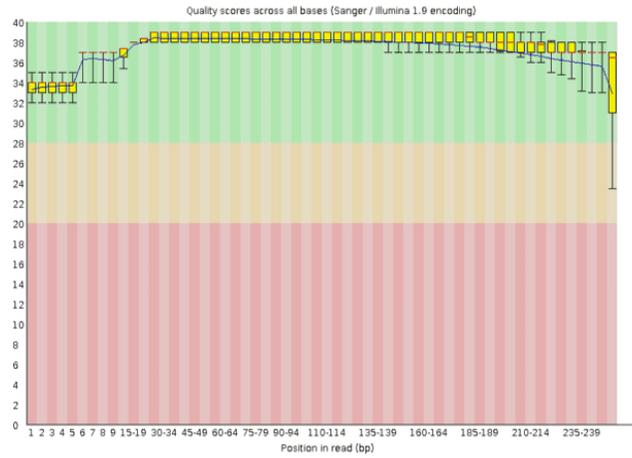
Mutación puntual en el gen <i>frxA</i>	Alteración genética causada por la sustitución de un solo nucleótido en el gen <i>rdxA</i>	Cualitativa (Dicotómica)	Independiente	Nominal	Metronidazol (<i>frxA</i>) Aparición de secuencias parada, cambios en el marco de lectura, inserciones y deleciones.	1.Presencia 2.Ausencia
Mutación puntual en el gen <i>ARNr 16S</i> .	Alteración genética causada por la sustitución de un solo nucleótido en el gen <i>ARN16S</i>	Cualitativa (Dicotómica)	Independiente	Nominal	Tetraciclina (<i>ARNr 16S</i>) AGA (926-928) GGA,AGA (926-928) CGA,AGA (926-928) AGC,AGA (926-928) GGC	1.Presencia 2.Ausencia

Variable	Definición conceptual	Tipo de variable (según su naturaleza)	Tipo de variable (según su relación)	Escala de medición	Indicador	Definición operacional
Resistencia antimicrobiana a Claritromicina	Proceso en el cual los microorganismos desarrollan resistencia a los fármacos de referencia.	Cualitativa (Dicotómica)	Dependiente	Nominal	Concentración mínima inhibitoria (MIC)(ug/ml)	1.Sensible 2.Resistente
Resistencia antimicrobiana a Amoxicilina		Cualitativa (Dicotómica)	Dependiente	Nominal	Concentración mínima inhibitoria (MIC)(ug/ml)	1.Sensible 2.Resistente

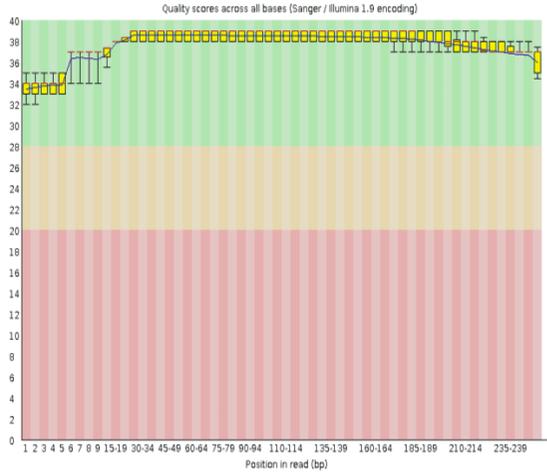
Resistencia antimicrobiana a Levofloxacino,		Cualitativa (Dicotómica)	Dependiente	Nominal	Concentración mínima inhibitoria (MIC)(ug/ml)	1.Sensible 2.Resistente
Resistencia antimicrobiana a Metronidazol.		Cualitativa (Dicotómica)	Dependiente	Nominal	Concentración mínima inhibitoria (MIC)(ug/ml)	1.Sensible 2.Resistente
Resistencia antimicrobiana a Tetraciclina.		Cualitativa (Dicotómica)	Dependiente	Nominal	Concentración mínima inhibitoria (MIC)(ug/ml)	1.Sensible 2.Resistente

Anexo 13. Quality score

A: Raw lecturas

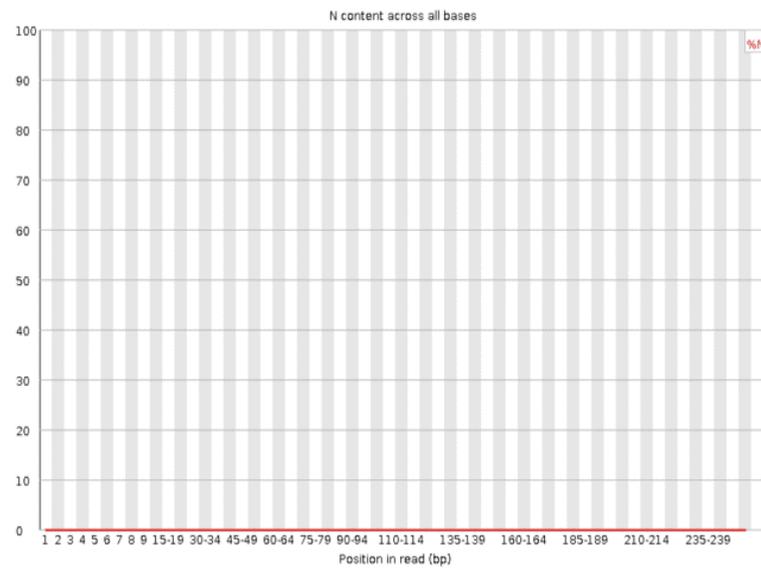


B: Trimmed lecturas

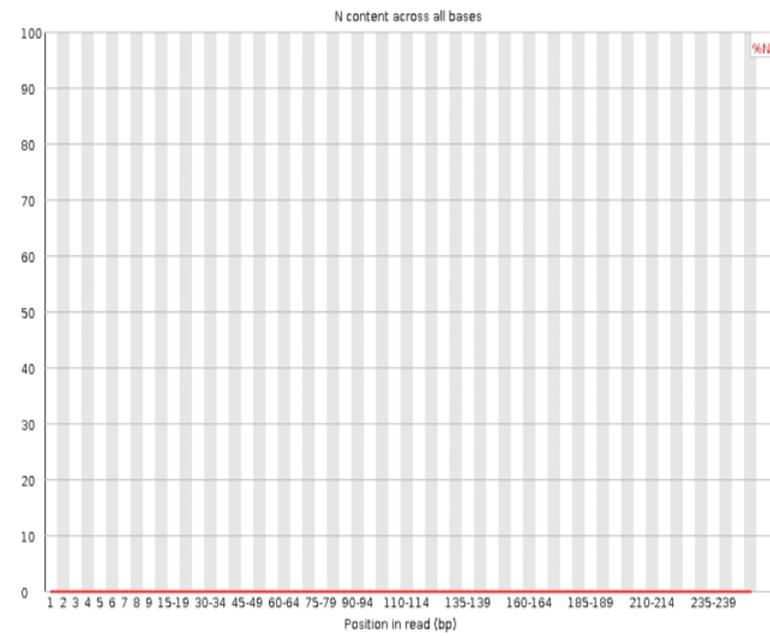


Anexo 14. N content

A:Raw lecturas

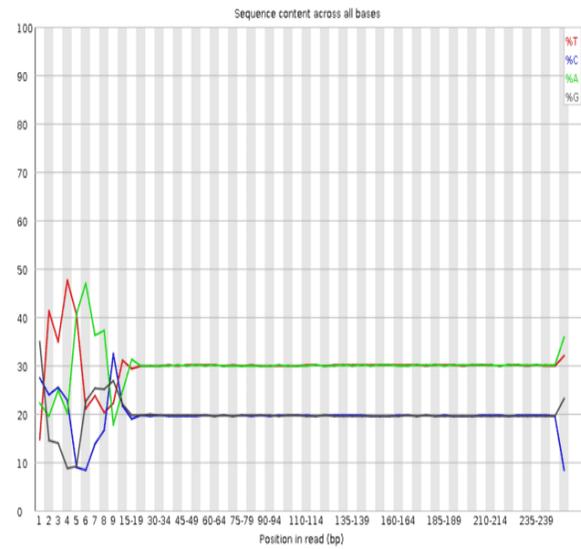


B:Trimmed lecturas



Anexo 15. Seq content

A:Raw lecturas

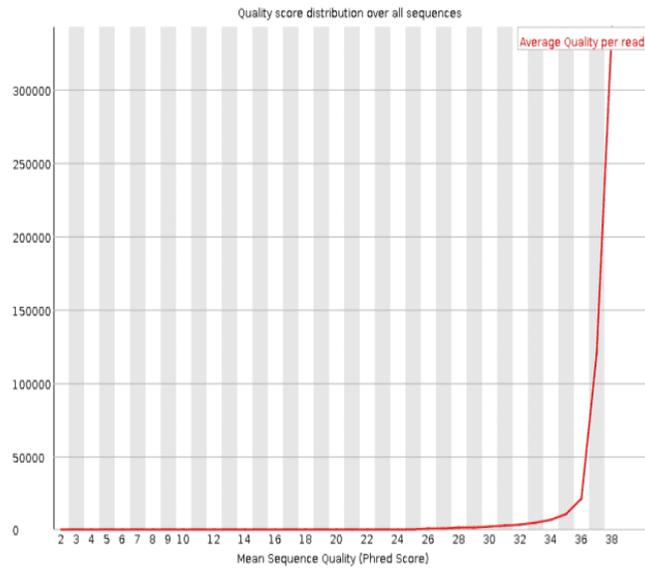


B:Trimmed lecturas

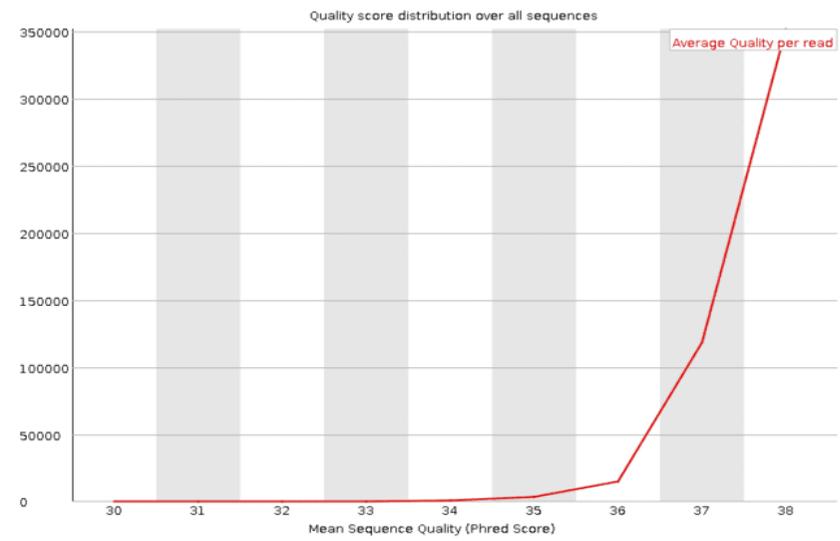


Anexo 16. Quality Scores

A: Raw data

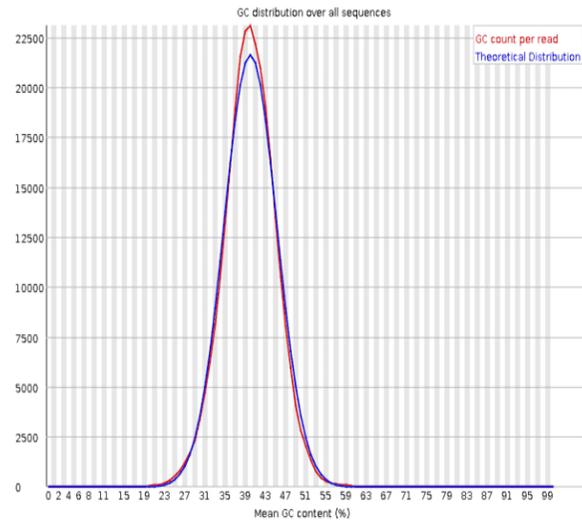


B: Trimmed data

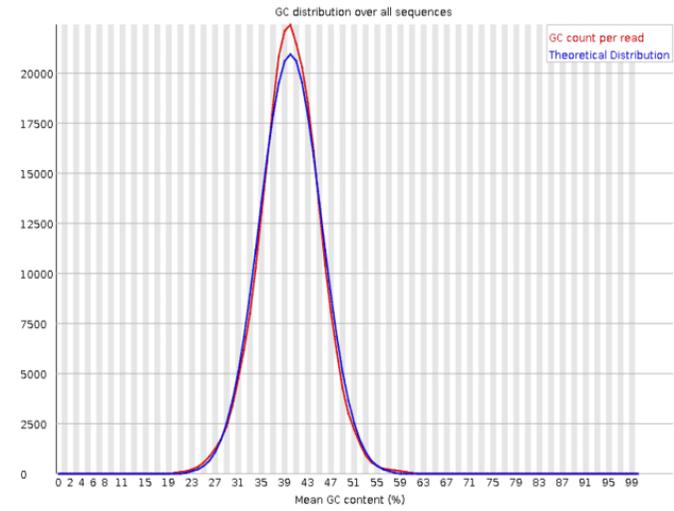


Anexo 17. GC content

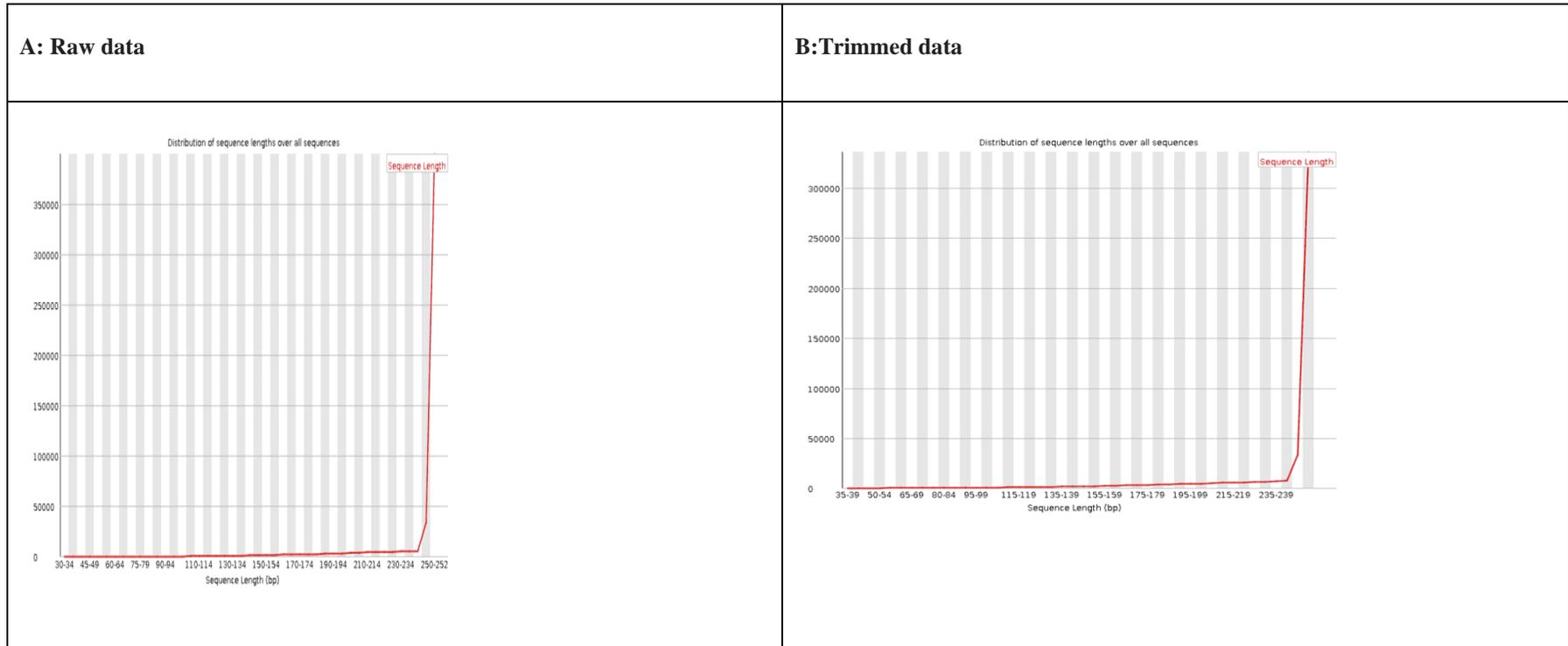
A: Raw data



B: Trimmed data



Anexo 18. Content



Anexo 19. Evaluación de calidad por Quast

Assembly	# contigs	Largest contig	Total length	GC (%)	N50	L50	# N's per 100 kbp	# misassemblies	# misassembled contigs	Genome fraction (%)
PER_UPCH_1	28	408173	1641480	38.83	192703	3	0	32	9	58,14
PER_UPCH_3	31	303742	1640430	38.82	103185	6	0	28	28	58,277
PER_UPCH_4	38	256230	1629680	39.08	98254	5	0	3	2	36,518
PER_UPCH_6	58	180477	1675170	38.84	99970	6	0	28	11	63,764
PER_UPCH_7	27	248727	1633453	38.96	102775	5	0	24	9	63,852
PER_UPCH_8	106	155696	1671832	39.19	45605	11	0	8	6	49,431

PER_UPCH_9	59	211953	1684871	38.78	128097	5	0	17	9	66
PER_UPCH_10	51	134323	1644285	38.9	61694	10	0	15	8	55,05
PER_UPCH_11	58	303500	1691403	38.78	115365	6	0	35	14	69,424
PER_UPCH_12	40	226215	1661849	39.01	106242	6	0	0	0	25,346
PER_UPCH_13	34	336397	1626616	38.92	83717	4	0	38	10	67,794
PER_UPCH_14	39	414151	1646456	38.9	80498	6	0	24	10	60,88
PER_UPCH_15	42	229800	1617470	38.99	96443	6	0	20	8	61,925
PER_UPCH_16	32	359878	1673741	38.96	104981	5	0	1	1	31,975
PER_UPCH_17	65	252361	1670794	38.97	83878	6	0	6	1	43,28

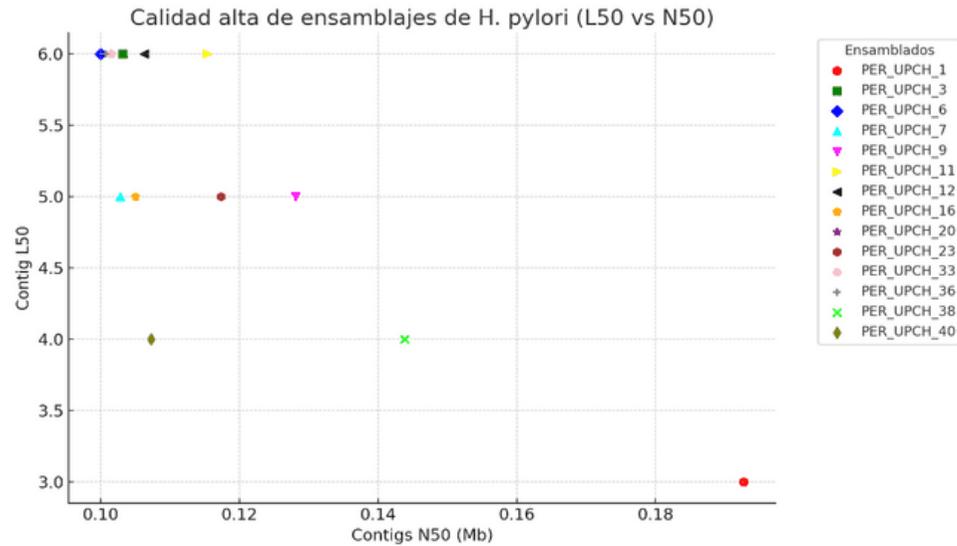
PER_UPCH_18	52	169398	1679582	38.79	82590	23	0	21	11	62,75
PER_UPCH_19	940	40101	2792222	38.88	4703	166	0	20	18	68,637
PER_UPCH_20	35	250635	1655402	38.83	101470	6	0	33	10	71,325
PER_UPCH_21	58	134049	1629879	38.95	74232	9	0	29	15	60,612
PER_UPCH_22	216	92508	1817854	38.82	28880	20	0	19	13	64,696
PER_UPCH_23	44	266501	1680909	38.8	117350	5	0	23	8	61,164
PER_UPCH_24	338	32137	1583788	38.98	7983	64	0	10	8	64,816
PER_UPCH_25	257	75142	1818748	38.78	20282	26	0	18	14	67,22
PER_UPCH_26	38	271986	1651461	38.92	99370	5	0	18	6	58,91

PER_UPCH_27	52	199198	1676607	38.72	57904	8	0	17	13	60,162
PER_UPCH_28	44	233587	1633911	38.76	85131	5	0	23	7	56,73
PER_UPCH_29	50	220758	1647558	38.9	61089	8	0	20	10	56,893
PER_UPCH_30	338	102327	1824286	38.84	23741	23	0	16	13	64,203
PER_UPCH_31	43	142426	1623138	38.95	73377	8	0	33	14	63,977
PER_UPCH_32	46	299755	1678735	38.7	92506	6	0	30	14	68,765
PER_UPCH_33	52	255641	1648240	38.94	101475	6	0	22	9	66,543
PER_UPCH_34	55	244615	1688817	38.82	67569	8	0	29	13	56,5
PER_UPCH_35	46	241919	1676420	38.67	78125	7	0	26	15	65,856

PER_UPCH_36	33	216748	1626935	38.94	100718	6	0	24	12	64,975
PER_UPCH_37	113	81198	1603226	39.03	24328	21	0	19	15	63,366
PER_UPCH_38	37	300311	1732769	39.18	143833	4	0	25	7	66,881
PER_UPCH_39	50	224796	1626245	39.19	79026	7	0	0	0	8,058
PER_UPCH_40	31	339123	1610101	38.97	107243	4	0	32	10	66
PER_UPCH_41	49	265331	1668524	38.67	90557	5	0	22	10	55,896
PER_UPCH_42	39	138067	1666619	38.95	78042	8	0	14	8	58,072
PER_UPCH_43	73	137837	1674161	38.95	52083	12	0	9	7	57,086
PER_UPCH_44	50	213909	1694127	38.75	86754	7	0	27	10	64,773

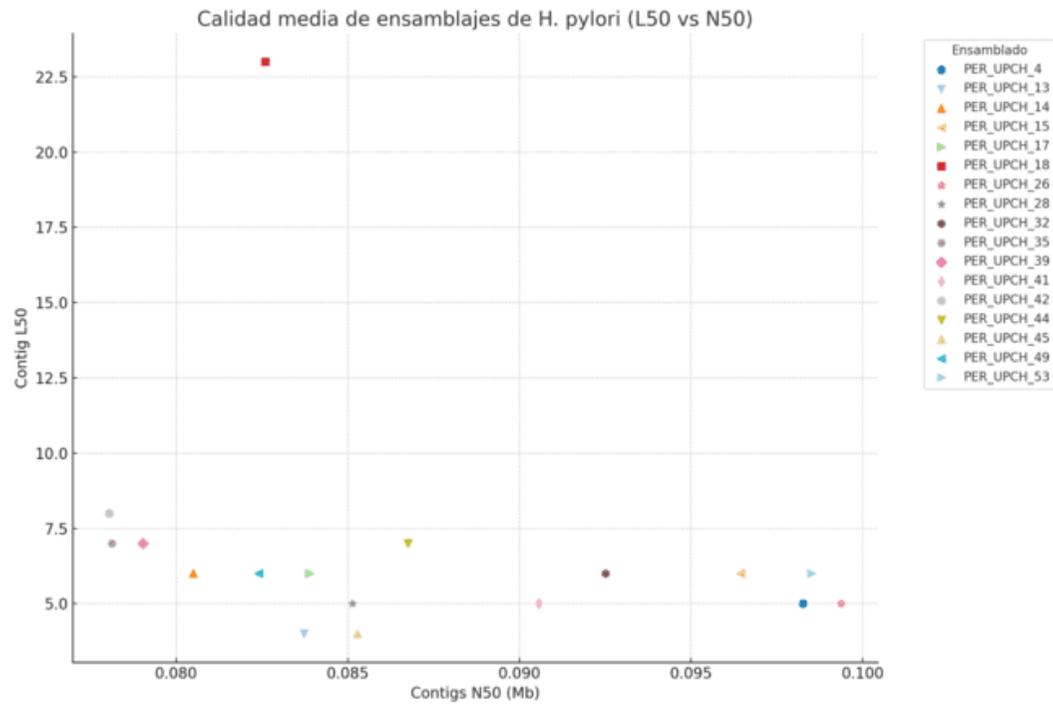
PER_UPCH_45	33	370554	1626224	38.92	85276	4	0	28	11	61,814
PER_UPCH_46	46	184429	1628033	38.92	66180	9	0	40	18	67,299
PER_UPCH_47	28	502438	1639649	38.88	136220	3	0	25	8	600,840
PER_UPCH_48	43	315153	1634472	38.92	72895	5	0	31	13	66,242
PER_UPCH_49	42	373892	1660804	38.92	82395	6	0	23	8	61,16
PER_UPCH_50	47	243334	1676751	38.77	71334	8	0	25	13	66,000
PER_UPCH_51	40	241751	1632586	38.98	111780	6	0	28	8	64,33
PER_UPCH_52	37	341870	1679351	38.95	107726	6	0	0	0	28,397
PER_UPCH_53	35	206022	1581335	39.11	98501	6	0	20	10	61,065

Anexo 20. Relación N50/L50 de los ensamblados de *H. pylori* de alta calidad.



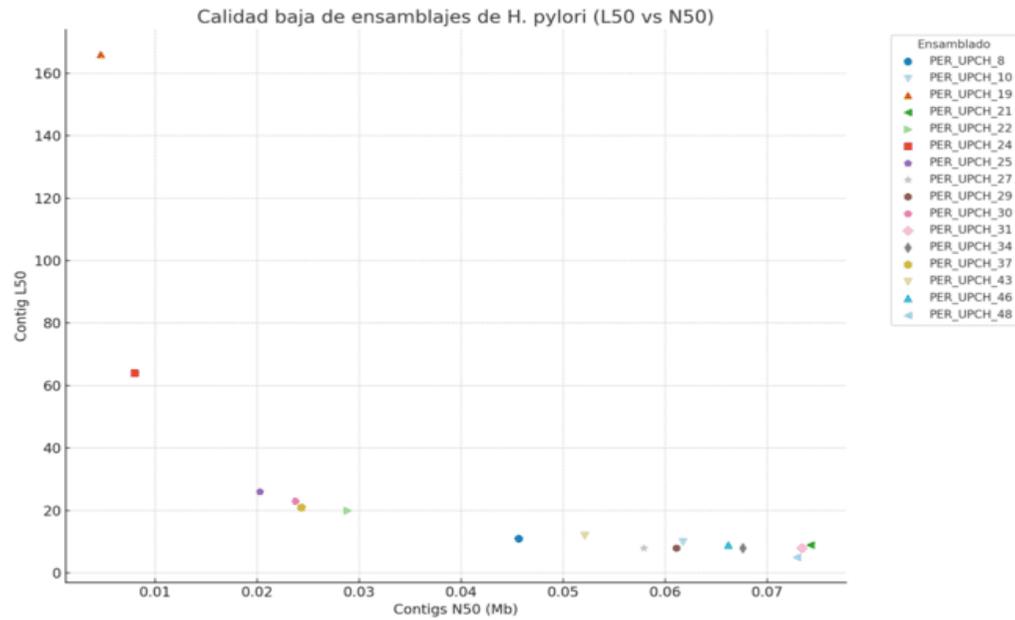
Los ensamblajes de alta calidad se destacaron con colores únicos, demostrando una distribución que tiende hacia la parte inferior derecha de la gráfica. Esta orientación sugiere que dichos ensamblajes poseen una combinación óptima de alta longitud de N50 y bajo número de L50, característicos de ensamblajes genómicos de elevada calidad. Por otro lado, ensamblajes posicionados más hacia abajo en la gráfica reflejan una mayor eficiencia en el cubrimiento del genoma (mayor cobertura), necesitando un menor número de contigs para cubrir la mitad del tamaño del genoma.

Anexo 21. Relación N50/L50 de los ensamblados de *H. pylori* de media calidad.



También se determinó que los ensambles de calidad media estaban entre los percentiles 33 y 67 en términos de longitud N50 con un grado de fragmentación mayor que el grupo anterior, pero aún con contigs de longitud aceptable. Esto indicó que estos ensamblajes tuvieron una calidad intermedia. Es decir, a pesar de tener un grado de fragmentación más alto que los ensamblajes de mejor calidad, estos contigs aún poseen longitudes que se consideran aceptables para ser de calidad intermedia

Anexo 22. Relación N50/L50 de los ensamblados de *H. pylori* de baja calidad.



Por otro lado, se determinó la relación de N50 y L50 de aquellos que estaban en el tercio inferior de la longitud N50, lo cual indica una calidad más baja con contigs más cortos y una mayor fragmentación. Los genomas en este grupo son: PER_UPCH_2, PER_UPCH_8, PER_UPCH_10, PER_UPCH_19, PER_UPCH_21, PER_UPCH_22, PER_UPCH_24, PER_UPCH_25, PER_UPCH_27, PER_UPCH_29, PER_UPCH_30, PER_UPCH_31, PER_UPCH_34, PER_UPCH_37, PER UPCH-43, PER UPCH-46, PER UPCH-48 y PER UPCH-50 .

Anexo 23. Evaluación de contaminación y completitud de CHECKM2

Assembly	Completeness	Contamination	Completeness_Model_Used	Translation_Table_Used	Coding_Density	Contig_N50	Average_Gene_Length	Genome_Size	GC_Content	Total_Coding_Sequences	Strain_heterogeneity
PER_UPC_H_1	100.0	0.01	Neural Network (Specific Model)	11	0,92	192703	323.617.268.041.237	1641480	0.39	1552	100.00
PER_UPC_H_3	100.0	0.01	Neural Network (Specific Model)	11	0,92	103185	32.323.037.323.037.300	1640430	0.39	1554	100.00
PER_UPC_H_4	99.99	0.01	Neural Network	11	0,91	98254	319.555.051.813.471	1629680	0.39	1544	0.00

			(Specific Model)								
PER_UPC H_6	100.0	0.34	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	99970	316.489.427.860.697	1675170	0.39	1608	100.00
PER_UPC H_7	99.99	0.05	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	102775	32.217.803.768.681	1633453	0.39	1539	100.00
PER_UPC H_8	100.0	2.34	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	45605	315.825.625	1671832	0.39	1600	86.49

PER_UPC H_9	99.99	0.07	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	128097	3.170.725.356.478.610	1684871	0.39	1613	0.00
PER_UPC H_10	99.98	0.02	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	61694	32.031.917.631.917.600	1644285	0.39	1554	0.00
PER_UPC H_11	99.99	0.0	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	115365	31.969.738.480.697.300	1691403	0.39	1606	0.00
PER_UPC H_12	99.99	0.01	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	106242	32.053.188.775.510.200	1661849	0.39	1568	0.00

PER_UPC H_13	99.99	0.01	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	83717	324.494.418.910.046	1626616	0.39	1523	0.00
PER_UPC H_14	99.99	0.05	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	80498	3.178.291.905.672.400	1646456	0.39	1569	0.00
PER_UPC H_15	99.99	0.02	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	96443	3.241.302.631.578.940	1617470	0.39	1520	0.00
PER_UPC H_16	100.0	0.1	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	104981	32.078.164.556.962.000	1673741	0.39	1580	100.00

PER_UPC H_17	99.99	1.68	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	83878	3.177.566.037.735.840	1670794	0.39	1590	66.67
PER_UPC H_18	99.99	0.01	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	82590	3.190.406.504.065.040	1679582	0.39	1599	0.00
PER_UPC H_19	100.0	58.71	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	4703	2.519.483.372.921.610	2792222	0.39	3368	95.60
PER_UPC H_20	100.0	0.15	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	101470	3.220.702.426.564.490	1655402	0.39	1566	0.00

PER_UPC H_21	100.0	0.04	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	74232	3.155.722.506.393.860	1629879	0.39	1564	0.00
PER_UPC H_22	99.94	7.72	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	28880	2.987.040.650.406.500	1817854	0.39	1845	95.77
PER_UPC H_23	99.97	0.78	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	117350	32.499.302.473.050.000	1680909	0.39	1577	100.00
PER_UPC H_24	97.5	0.04	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	7983	2.848.603.417.796.110	1583788	0.39	1697	0.00

PER_UPC H_25	99.98	03.05	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	20282	2.945.703.624.733.470	1818748	0.39	1876	95.24
PER_UPC H_26	99.99	0.0	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	99370	3.206.555.697.823.300	1651461	0.39	1562	0.00
PER_UPC H_27	100.0	0.04	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	57904	3.191.851.851.851.850	1676607	0.39	1593	0.00
PER_UPC H_28	100.0	0.24	Neural Network (Specific Model)	11	0,92	85131	31.505.797.101.449.200	1633911	0.39	1587	0.00

PER_UPC H_29	99.98	0.0	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	61089	32.059.601.798.330.100	1647558	0.39	1557	0.00
PER_UPC H_30	99.95	8.8	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	23741	2.854.858.174.316.650	1824286	0.39	1939	100.00
PER_UPC H_31	99.99	0.1	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	73377	31.535.654.952.076.600	1623138	0.39	1565	0.00
PER_UPC H_32	99.99	0.05	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	92506	3.177.084.893.882.640	1678735	0.39	1602	0.00

PER_UPC H_33	99.99	0.56	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	101475	3.201.203.585.147.240	1648240	0.39	1562	100.00
PER_UPC H_34	99.99	0.18	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	67569	3.194.722.741.433.020	1688817	0.39	1605	100.00
PER_UPC H_35	99.99	0.05	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	78125	3.164.274.143.302.180	1676420	0.39	1605	0.00
PER_UPC H_36	100.0	0.15	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	100718	3.267.694.848.084.540	1626935	0.39	1514	0.00

PER_UPC H_37	99.98	0.03	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	24328	3.101.826.252.377.930	1603226	0.39	1577	100.00
PER_UPC H_38	100.0	1.57	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	143833	31.859.178.743.961.300	1732769	0.39	1656	100.00
PER_UPC H_39	99.99	0.0	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	79026	3.168.859.536.082.470	1626245	0.39	1552	0.00
PER_UPC H_40	99.99	0.34	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	107243	3.226.363.636.363.630	1610101	0.39	1518	0.00

PER_UPC H_41	100.0	0.17	Neural Network (Specific Model)	11	0,92	90557	31.786.230.529.595.000	1668524	0.39	1605	100.00
PER_UPC H_42	99.99	0.06	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	78042	322.290.527.654.164	1666619	0.39	1573	0.00
PER_UPC H_43	99.99	0.05	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	52083	3.182.689.180.737.960	1674161	0.39	1599	100.00
PER_UPC H_44	99.99	0.02	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	86754	3.211.276.595.744.680	1694127	0.39	1598	66.67

PER_UPC H_45	100.0	0.07	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	85276	32.338.602.220.770.700	1626224	0.39	1531	0.00
PER_UPC H_46	100.0	0.01	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	66180	3.178.508.997.429.300	1628033	0.39	1556	0.00
PER_UPC H_47	99.99	0.01	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	136220	32.597.915.309.446.200	1639649	0.39	1535	0.00
PER_UPC H_48	99.99	0.03	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	72895	32.229.545.454.545.400	1634472	0.39	1540	0.00

PER_UPC H_49	99.99	0.0	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	82395	32.060.152.768.936.900	1660804	0.39	1571	0.00
PER_UPC H_50	99.99	0.1	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	71334	31.696.004.993.757.800	1676751	0.39	1602	0.00
PER_UPC H_51	99.99	0.08	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	111780	3.206.884.715.025.900	1632586	0.39	1544	0.00
PER_UPC H_52	99.99	0.11	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	107726	31.885.078.369.905.900	1679351	0.39	1595	0.00

PER_UPC H_53	99.99	0.16	Neural Network (Specific Model)	11	0,91	98501	320.290.751.829.674	1581335	0.39	1503	0.00
-----------------	-------	------	--	----	------	-------	---------------------	---------	------	------	------

Anexo 24. Evaluación de completitud mediante BUSCO

Directory	Complete BUSCOs (C)	Complete and single-copy BUSCOs (S)	Complete and duplicated BUSCOs (D)	Fragmented BUSCOs (F)	Missing BUSCOs (M)
PER_UPCH_1	102	102	0	9	13
PER_UPCH_3	102	102	0	9	13
PER_UPCH_4	101	101	0	10	13
PER_UPCH_6	101	101	0	10	13
PER_UPCH_7	101	101	0	10	13
PER_UPCH_8	100	99	1	10	14

PER_UPCH_9	103	103	0	8	13
PER_UPCH_10	103	103	0	8	13
PER_UPCH_11	101	101	0	9	14
PER_UPCH_12	102	102	0	9	13
PER_UPCH_13	99	99	0	12	13
PER_UPCH_14	103	103	0	8	13
PER_UPCH_15	102	102	0	8	14
PER_UPCH_16	102	102	0	9	13

PER_UPCH_17	97	96	1	14	13
PER_UPCH_18	101	101	0	10	13
PER_UPCH_19	86	35	51	24	14
PER_UPCH_20	102	102	0	9	13
PER_UPCH_21	101	101	0	10	13
PER_UPCH_22	100	86	14	11	13
PER_UPCH_23	103	103	0	8	13
PER_UPCH_24	97	97	0	11	16

PER_UPCH_25	100	97	3	11	13
PER_UPCH_26	102	102	0	9	13
PER_UPCH_27	103	103	0	8	13
PER_UPCH_28	100	100	0	10	14
PER_UPCH_29	101	101	0	10	13
PER_UPCH_30	100	89	11	12	12
PER_UPCH_31	99	99	0	11	14
PER_UPCH_32	104	104	0	6	14

PER_UPCH_33	100	100	0	11	13
PER_UPCH_34	101	101	0	10	13
PER_UPCH_35	103	103	0	7	14
PER_UPCH_36	100	100	0	11	13
PER_UPCH_37	99	99	0	12	13
PER_UPCH_38	101	101	0	10	13
PER_UPCH_39	105	105	0	6	13
PER_UPCH_40	100	100	0	10	14

PER_UPCH_41	101	101	0	10	13
PER_UPCH_42	100	100	0	9	15
PER_UPCH_43	100	100	0	9	15
PER_UPCH_44	103	103	0	8	13
PER_UPCH_45	103	103	0	8	13
PER_UPCH_46	100	100	0	10	14
PER_UPCH_47	101	101	0	9	14
PER_UPCH_48	101	101	0	10	13

PER_UPCH_49	104	104	0	8	12
PER_UPCH_50	103	103	0	8	13
PER_UPCH_51	100	100	0	11	13
PER_UPCH_52	103	103	0	8	13
PER_UPCH_53	101	101	0	10	13

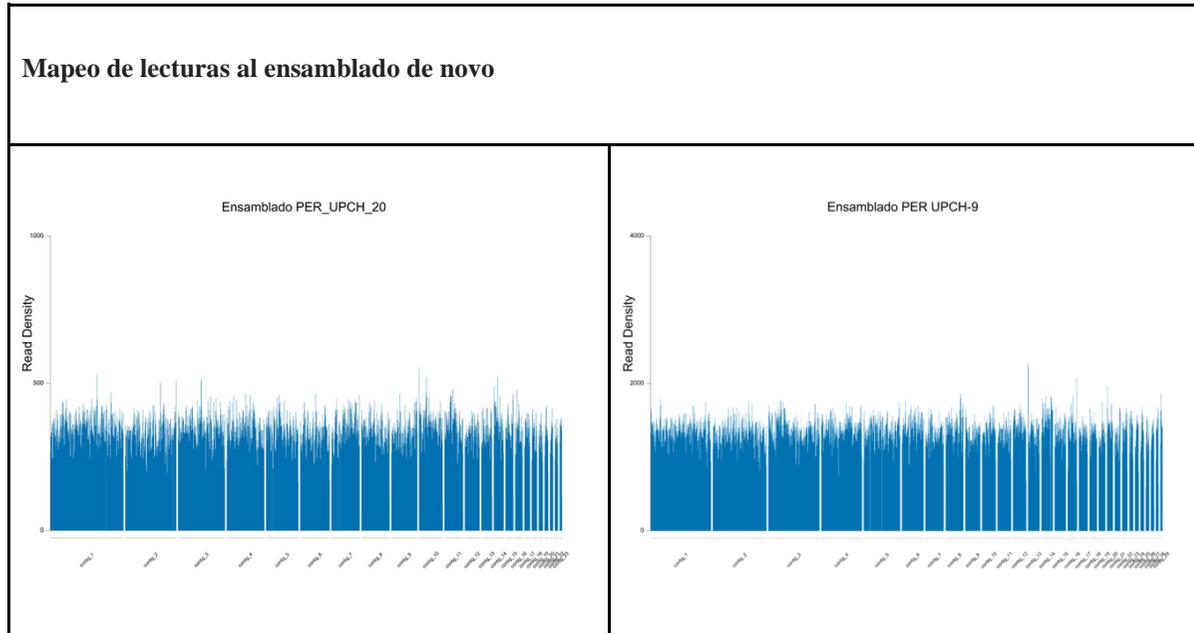
Anexo 25. Mapeo de lecturas al ensamblado *de novo*

	Total de Lecturas	0 veces alineados	1 vez alineados	Más de 1 vez alineados	Tasa de alineación total
PER_UPCH_1	491409	26.70	72.25	1.06	99.59
PER_UPCH_3	272290	32.64	66.33	1.04	99.79
PER_UPCH_4	314456	42.41	57.04	0.55	99.81
PER_UPCH_6	322244	21.84	76.93	1.23	99.66
PER_UPCH_7	495379	25.44	73.42	1.14	99.67
PER_UPCH_8	255560	31.17	65.61	3.22	99.59
PER_UPCH_9	985677	13.21	85.75	1.04	99.40
PER_UPCH_10	579095	12.01	87.32	0.67	99.66
PER_UPCH_11	182074	20.50	75.34	4.16	97.74
PER_UPCH_12	397834	27.64	71.76	0.60	99.89
PER_UPCH_13	566702	17.63	81.50	0.88	99.93
PER_UPCH_14	1161793	8.00	91.25	0.75	99.33
PER_UPCH_15	131428	14.47	84.97	0.56	99.18
PER_UPCH_16	368813	13.30	85.42	1.28	99.79
PER_UPCH_17	485243	23.53	74.89	1.58	99.61
PER_UPCH_18	468082	21.86	77.30	0.83	99.70
PER_UPCH_19	314158	21.66	31.94	46.39	99.06
PER_UPCH_20	242003	21.63	77.61	0.76	99.69
PER_UPCH_21	438756	21.99	77.15	0.86	99.88
PER_UPCH_22	628532	21.37	72.54	6.09	99.46

PER_UPCH_23	293615	20.05	78.34	1.62	99.71
PER_UPCH_24	49548	16.90	82.47	0.64	97.13
PER_UPCH_25	1039164	18.87	74.68	6.44	99.56
PER_UPCH_26	405953	37.20	61.95	0.85	99.63
PER_UPCH_27	132057	20.39	78.57	1.04	99.59
PER_UPCH_28	221470	27.93	71.25	0.82	99.85
PER_UPCH_29	358874	26.75	72.64	0.61	99.87
PER_UPCH_30	455361	24.31	69.43	6.27	99.54
PER_UPCH_31	394759	25.30	73.82	0.88	99.84
PER_UPCH_32	469331	17.43	81.61	0.96	99.64
PER_UPCH_33	408813	25.79	72.50	1.72	99.81
PER_UPCH_34	210310	12.09	86.27	1.64	99.54
PER_UPCH_35	407892	23.75	75.50	0.75	99.87
PER_UPCH_36	630198	16.65	82.45	0.90	99.51
PER_UPCH_37	46794	25.64	73.60	0.77	99.29
PER_UPCH_38	563329	19.21	79.13	1.66	99.24
PER_UPCH_39	563887	19.83	78.67	1.50	99.59
PER_UPCH_40	417458	23.28	76.05	0.67	99.73
PER_UPCH_41	461601	24.44	74.64	0.92	99.81
PER_UPCH_42	394179	23.79	75.05	1.16	99.84
PER_UPCH_43	483780	21.16	77.78	1.06	99.77
PER_UPCH_44	393115	21.52	76.99	1.48	99.83
PER_UPCH_45	278356	33.59	65.57	0.84	99.89
PER_UPCH_46	385860	24.88	74.32	0.80	99.87

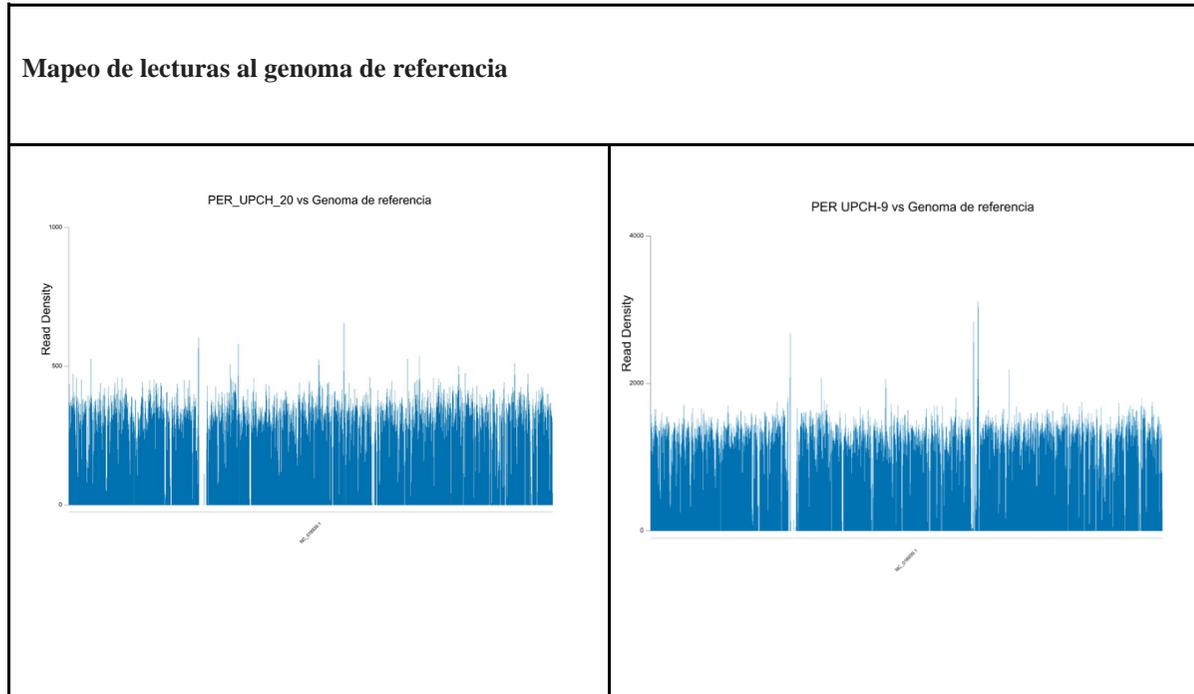
PER_UPCH_47	379973	26.98	72.21	0.81	99.93
PER_UPCH_48	311903	37.35	61.83	0.82	99.83
PER_UPCH_49	479606	14.15	84.47	1.38	99.91
PER_UPCH_50	343322	30.68	68.48	0.84	99.82
PER_UPCH_51	257962	30.86	68.20	0.94	99.78
PER_UPCH_52	316522	25.56	73.21	1.23	99.90
PER_UPCH_53	354601	28.55	70.82	0.63	99.90

Anexo 26. Mapeo de lecturas a los ensamblados de alta calidad PER_UPCH_20 y PER_UPCH_9.



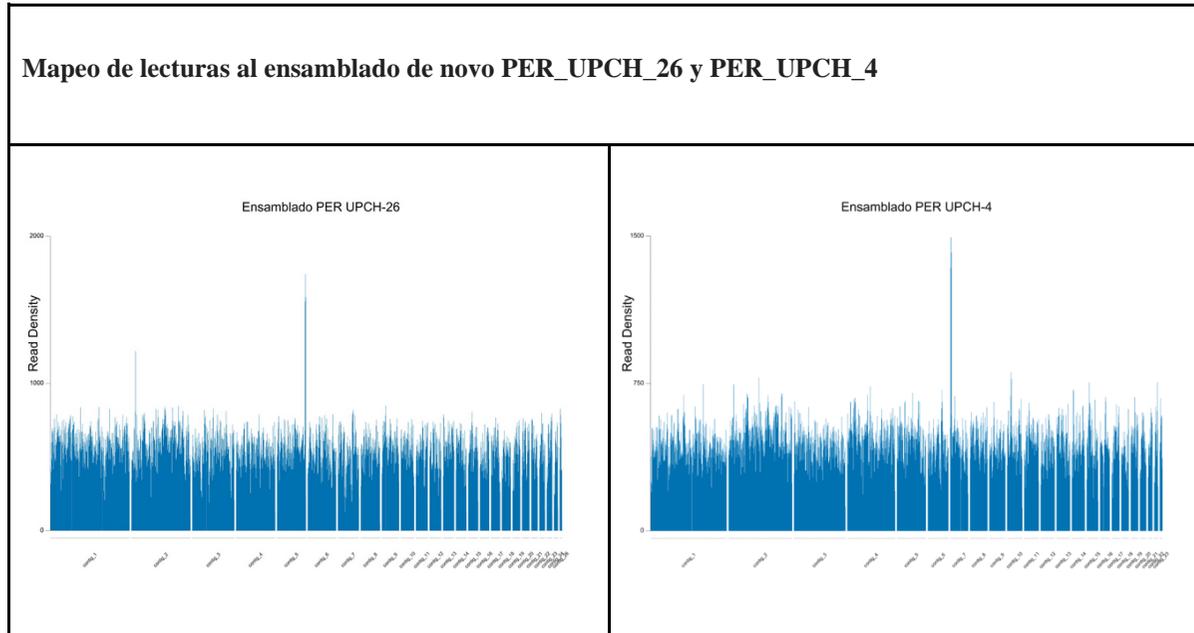
La evaluación del mapeo de lecturas sobre los ensamblajes de novo PER_UPCH_20 y PER_UPCH_9 muestra una cobertura uniforme a lo largo del genoma, indicando un ensamblaje de buena calidad. Se observaron picos de alta densidad de lecturas, que podrían corresponder a regiones genómicas conservadas, duplicaciones o artefactos de secuenciación.

Anexo 27. Mapeo de lecturas de los ensamblados de alta calidad PER_UPCH_20 y PER_UPCH_9 al genoma de referencia



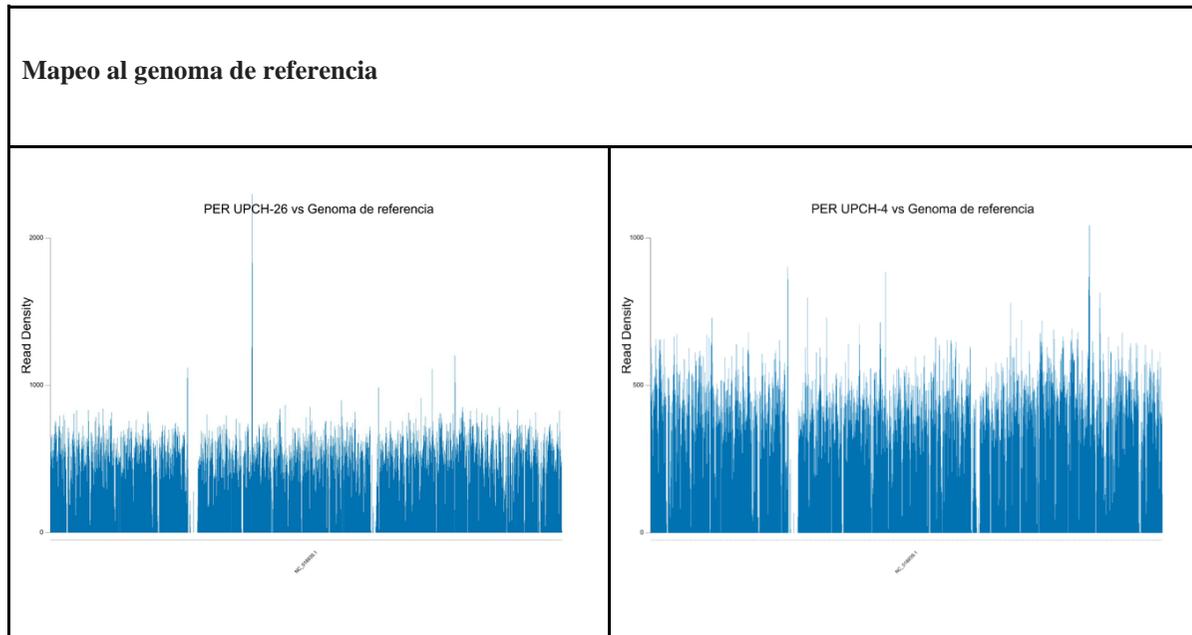
Se muestran una cobertura uniforme a lo largo del genoma de referencia, lo que indica que los ensamblados PER_UPCH_20 y PER_UPCH_9 son de alta calidad. Los picos de alta densidad observados en ambos gráficos pueden ser de interés para estudios posteriores, ya que pueden representar regiones genómicas conservadas, duplicaciones, o artefactos de secuenciación. La uniformidad en la cobertura sugiere que los ensamblados representan fielmente el genoma objetivo, con pocas regiones significativamente subrepresentadas o sobrerrepresentadas.

Anexo 28. Mapeo de lecturas a los ensamblados de media calidad PER_UPCH_26 y PER_UPCH_4.



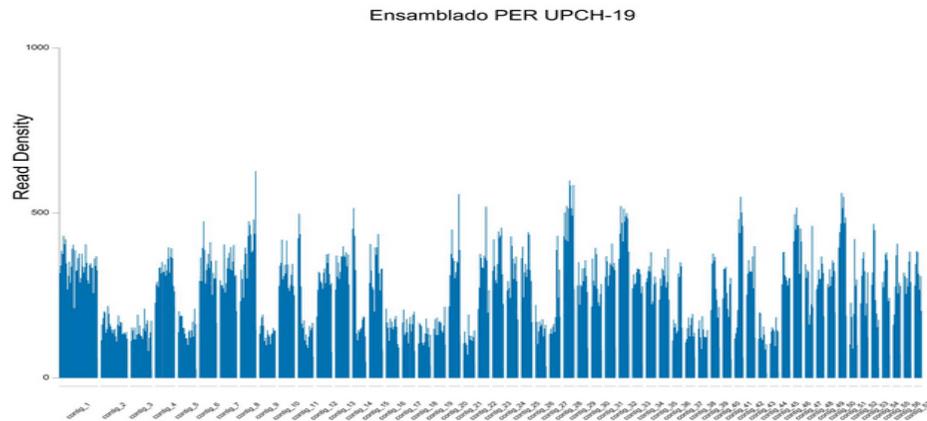
El mapeo de lecturas a los ensamblajes PER_UPCH-4 y PER_UPCH-26, mostró una cobertura uniforme con picos de alta densidad de lecturas. Estos picos sugieren regiones con alta actividad transcripcional, duplicaciones o elementos estructurales complejos, destacando áreas de interés biológico o médico.

Anexo 29. Mapeo de lecturas a los ensamblados de media calidad PER_UPCH_26 y PER_UPCH_4 al genoma de referencia.



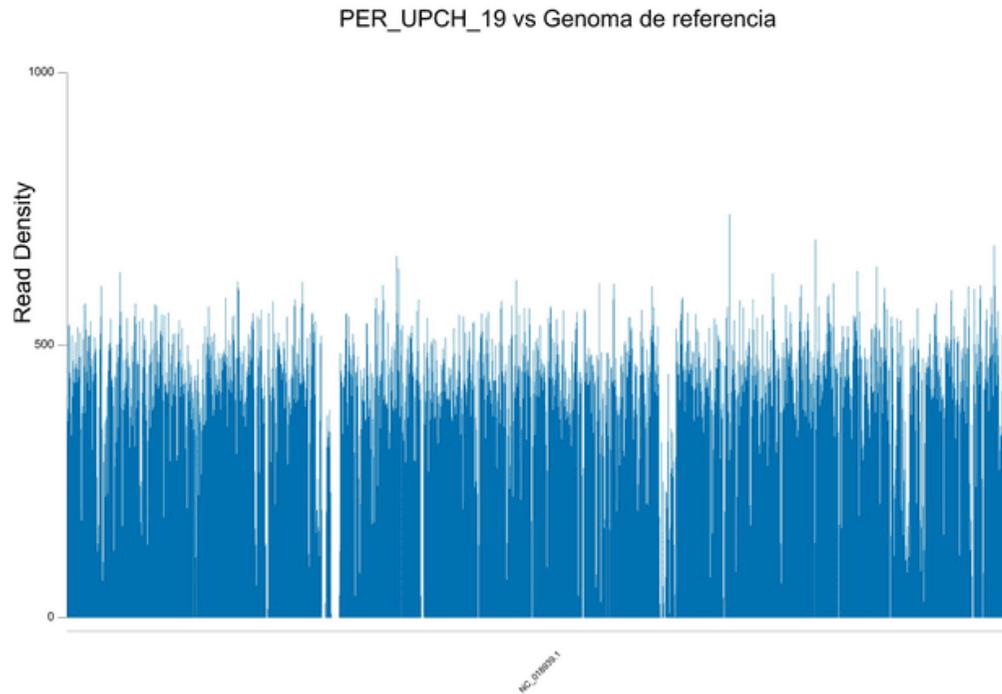
La mayor parte del ensamblaje muestra una cobertura adecuada, lo que indica que el mapeo de las lecturas en crudo fue eficiente y representa con fidelidad la estructura genómica del genoma de referencia. No obstante, las variaciones en la densidad de lecturas, especialmente las áreas de menor densidad, son igualmente importantes, pues podrían señalar regiones donde el mapeo es menos eficiente, posiblemente por características intrínsecas de las secuencias como regiones repetitivas o secuencias ricas en GC.

Anexo 30. Mapeo de lecturas al ensamblado de baja calidad del ensamblado PER_UPCH_19.



Se observa una heterogeneidad notable en la distribución de lecturas a lo largo del ensamblado, con picos que alcanzan hasta 1000 unidades de densidad. Esta variabilidad en la cobertura indicó diferencias en la representación de diversas regiones del ensamblado. La heterogeneidad en la cobertura de secuenciación observada en el ensamblado PER UPCH-19 plantea desafíos significativos que afectan la calidad y precisión de los análisis genómicos. Las regiones con baja cobertura son susceptibles a errores en el ensamblado, lo que puede llevar a representaciones genómicas fragmentadas o incorrectas. Esta variabilidad también complica la detección de variantes genéticas, especialmente aquellas sutiles o en regiones complejas, reduciendo la sensibilidad del análisis

Anexo 31. Mapeo de lecturas del ensamblado de baja calidad PER_UPCH_9 al genoma de referencia.



Luego se comparó las lecturas del ensamblado PER_UPCH_19 contra el genoma de referencia, y se observó mayor uniformidad. Los picos notables en la densidad de lecturas sugieren ser regiones de variación estructural entre PER_UPCH-19 y el genoma de referencia, o potencialmente regiones donde el genoma de referencia contiene elementos repetitivos que capturaron más lecturas.

Anexo 32. Anotación de ensamblados de *Helicobacter pylori* mediante Backta

Ensamblado	Length	GC	N ratio	coding density	tRNAs	tmRNAs	rRNAs	ncRNAs	ncRNAs	CRISPR arrays	CDSs	pseudogenes	hypotheticals	signal peptides	sORFs	gaps	oriCs	oriVs	oriTs
PER_UPC_H_1	1641480	38.8	0.0	91.9	36	1	3	10	2	0	1534	9	25	0	5	0	2	0	0
PER_UPC_H_3	1640430	38.8	0.0	91.9	36	1	3	10	2	0	1534	9	25	0	5	0	2	0	0
PER_UPC_H_4	1629680	39.1	0.0	90.4	36	1	3	9	1	0	1515	6	17	0	4	0	1	0	0
PER_UPC_H_6	1675170	38.8	0.0	90.0	37	1	3	10	0	0	1555	11	22	0	4	0	1	0	0

PER_UPC H_7	163345 3	39. 0	0.0	91.0	36	1	3	8	2	0	1519	6	11	0	3	0	2	0	0
PER_UPC H_8	167183 2	39. 2	0.0	87.9	37	1	4	9	1	0	1525	5	33	0	8	0	2	0	0
PER_UPC H_9	168487 1	38. 8	0.0	90.1	36	1	3	7	1	0	1567	9	20	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_10	164428 5	38. 9	0.0	90.1	36	1	3	9	1	0	1515	9	18	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_11	169140 3	38. 8	0.0	90.4	36	1	3	6	1	0	1558	6	20	0	5	0	4	0	0
PER_UPC H_12	166184 9	39. 0	0.0	90.3	36	1	3	9	0	0	1539	8	12	0	8	0	2	0	0

PER_UPC H_13	162661 6	38. 9	0.0	91.0	36	1	3	5	1	0	1492	3	14	0	4	0	2	0	0
PER_UPC H_14	164645 6	38. 9	0.0	90.4	36	1	3	8	2	0	1540	5	20	0	4	0	2	0	0
PER_UPC H_15	161747 0	39. 0	0.0	90.6	36	1	3	9	2	0	1482	6	17	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_16	167374 1	39. 0	0.0	90.8	36	1	3	8	1	0	1556	8	21	0	4	0	2	0	0
PER_UPC H_17	167079 4	39. 0	0.0	89.9	37	1	3	10	1	0	1548	9	24	0	7	0	2	0	0
PER_UPC H_18	167958 2	38. 8	0.0	90.1	36	1	3	7	1	0	1552	5	18	0	6	0	2	0	0

PER_UPC H_20	165540 2	38. 8	0.0	90.9	37	1	3	8	1	0	1534	2	12	0	7	0	2	0	0
PER_UPC H_21	162987 9	38. 9	0.0	90.2	36	1	3	7	1	0	1518	7	18	0	3	0	2	0	0
PER_UPC H_22	181785 4	38. 8	0.0	84.7	40	1	3	6	1	0	1678	12	79	0	8	0	2	0	0
PER_UPC H_23	168090 9	38. 8	0.0	90.5	36	1	3	5	2	1	1545	6	18	0	6	0	2	0	0
PER_UPC H_24	158378 8	39. 0	0.0	79.9	34	1	3	6	1	0	1449	16	97	0	6	0	2	0	0
PER_UPC H_25	181874 8	38. 8	0.0	82.6	37	1	3	7	1	0	1642	9	75	0	7	0	3	0	0

PER_UPC H_26	165146 1	38. 9	0.0	90.6	36	1	3	10	1	0	1531	10	20	0	6	0	2	0	0
PER_UPC H_27	167660 7	38. 7	0.0	90.1	36	1	3	8	1	0	1555	7	22	0	7	0	3	0	0
PER_UPC H_28	163391 1	38. 8	0.0	91.1	36	1	3	8	2	0	1546	19	30	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_29	164755 8	38. 9	0.0	90.1	36	1	3	8	1	0	1519	11	13	0	6	0	2	0	0
PER_UPC H_30	182428 6	38. 8	0.0	81.2	38	1	3	9	2	0	1658	12	83	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_31	162313 8	38. 9	0.0	90.8	36	1	3	7	2	0	1527	5	22	0	8	0	2	0	0

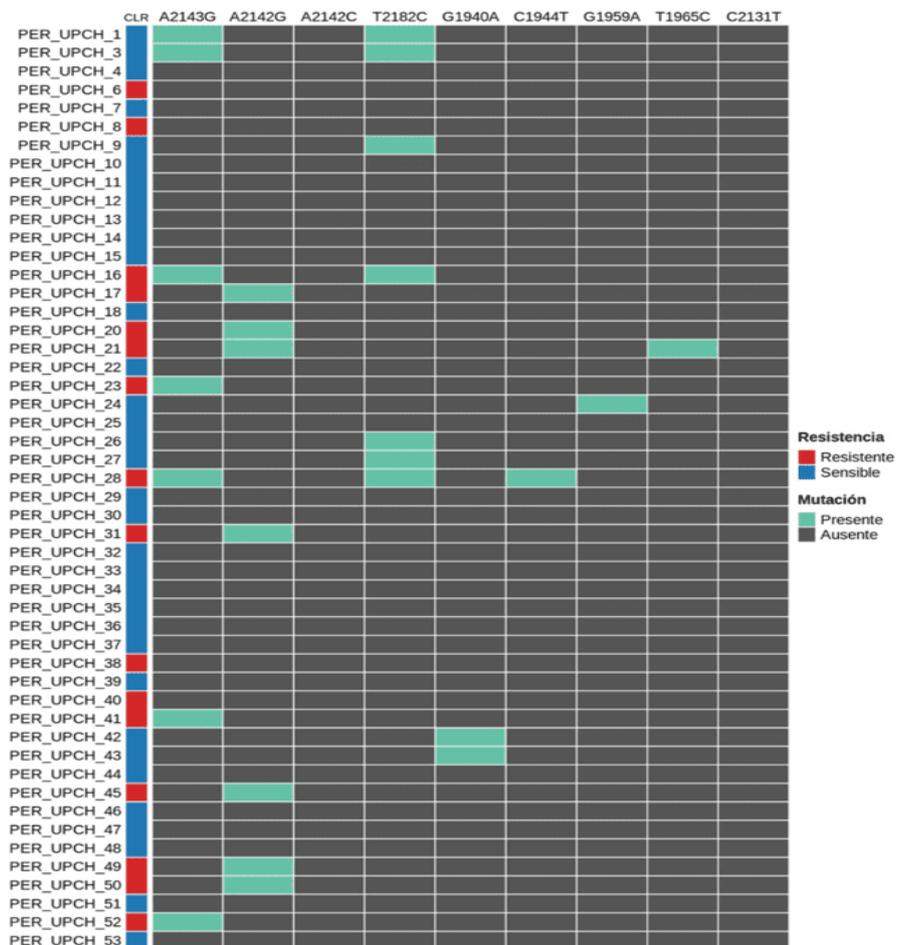
PER_UPC H_32	167873 5	38. 7	0.0	90.2	36	1	3	8	1	0	1565	7	24	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_33	164824 0	38. 9	0.0	90.4	36	1	3	11	1	0	1519	3	20	0	7	0	2	0	0
PER_UPC H_34	168881 7	38. 8	0.0	89.9	36	1	3	9	1	0	1564	9	20	0	7	0	2	0	0
PER_UPC H_35	167642 0	38. 7	0.0	90.3	36	1	3	8	1	0	1568	11	26	0	8	0	2	0	0
PER_UPC H_36	162693 5	38. 9	0.0	90.8	36	1	3	9	2	0	1498	5	10	0	6	0	2	0	0
PER_UPC H_37	160322 6	39. 0	0.0	87.5	36	1	3	8	2	0	1485	8	29	0	7	0	1	0	0

PER_UPC H_38	173276 9	39. 2	0.0	90.7	36	1	3	8	1	0	1630	10	47	0	7	0	2	0	0
PER_UPC H_39	162624 5	39. 2	0.0	90.1	36	1	3	6	1	0	1517	17	25	0	4	0	3	0	0
PER_UPC H_40	161010 1	39. 0	0.0	91.1	36	1	3	8	2	0	1492	4	10	0	3	0	3	0	0
PER_UPC H_41	166852 4	38. 7	0.0	90.9	36	1	4	8	1	0	1560	7	23	0	6	0	2	0	0
PER_UPC H_42	166661 9	39. 0	0.0	90.6	36	1	3	11	1	0	1540	10	27	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_43	167416 1	38. 9	0.0	89.9	36	1	3	11	1	0	1537	10	27	0	6	0	2	0	0

PER_UPC H_44	169412 7	38. 8	0.0	90.2	36	1	3	11	1	0	1561	6	20	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_45	162622 4	38. 9	0.0	90.8	36	1	3	6	1	0	1502	3	22	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_46	162803 3	38. 9	0.0	90.1	36	1	3	10	1	0	1513	10	16	0	3	0	2	0	0
PER_UPC H_47	163964 9	38. 9	0.0	91.3	36	1	3	7	1	0	1508	8	12	0	6	0	2	0	0
PER_UPC H_48	163447 2	38. 9	0.0	90.2	36	1	3	7	1	0	1501	4	17	0	3	0	2	0	0
PER_UPC H_49	166080 4	38. 9	0.0	90.2	36	1	3	9	2	0	1543	14	21	0	6	0	2	0	0

PER_UPC H_50	167675 1	38. 8	0.0	89.9	36	1	3	9	1	0	1570	10	32	0	5	0	2	0	0
PER_UPC H_51	163258 6	39. 0	0.0	90.7	36	1	3	8	1	0	1523	6	23	0	8	0	2	0	0
PER_UPC H_52	167935 1	39. 0	0.0	90.5	36	1	3	8	1	0	1570	7	21	0	6	0	1	0	0
PER_UPC H_53	158133 5	39. 1	0.0	91.1	36	1	3	7	1	0	1474	8	16	0	7	0	2	0	0

Anexo 33. Mapa de calor de mutaciones en *ARNr 23S* relacionadas con la resistencia a claritromicina



En la primera columna se reporta el perfil de susceptibilidad fenotípico de cada cepa. Las columnas subsiguientes indican la presencia o ausencia de mutaciones específicas asociadas con la resistencia a la claritromicina.

Anexo 34. Genotipos potenciales de CLR-R codificados en aislados clínicos de *H. pylori*

Genotipo	Fenotipo CLA-S*		Fenotipo CLA-R*	
	n0	n1	n0	n1
Mutaciones dentro del dominio V	27	7	2	14
A2142G	34	0	9	7
A2143G	32	2	11	5
T2182C	29	5	14	2
Mutaciones fuera del dominio V	31	3	14	2
C1944T	34	0	15	1
G1959A	33	1	16	0
T1965C	34	0	15	1
G1940A	32	2	16	0

(*) n0: n° de aislados sin el genotipo; n1: n° de aislados que codifican el genotipo

(**) Las mutaciones se muestran como sustituciones de nucleótidos en las secuencias genéticas. Los genotipos aquí indicados se identificaron

durante el cribado del gen *ARNr 23S* completo para detectar mutaciones específicas que se habían relacionado con CLA-R (es decir,

T1942C, G1939A, C2147G, G2172T, T2182C, A2116G, A2142G, A2143G, A2144G/T, A2115G, G2111A, A2142C,

T2717C, T2289C, G2224A y C2245T) No pudo detectarse ningún genotipo putativo adicional codificador de CLA-R en el gen *rpl22* (es decir,

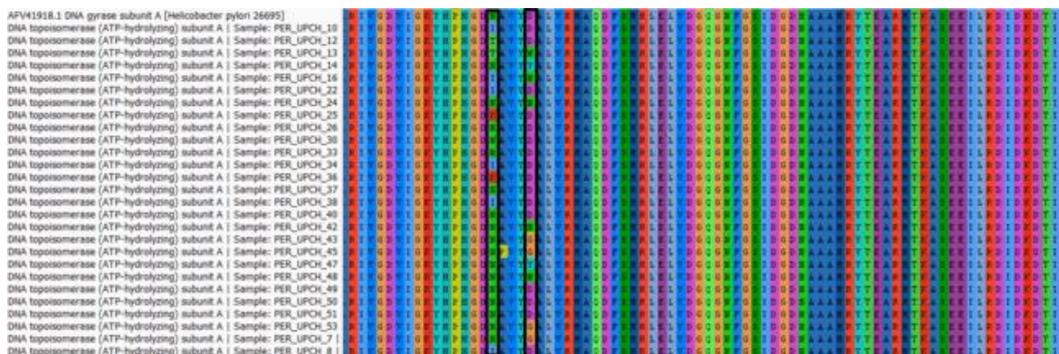
T265_T266insTTCCATGTA y 226_228delGTG) en contraste con el gen *infB*, que mostró una mutación G160A

Anexo 36. Genotipos potenciales de LEV-R codificados en aislados clínicos de *H. pylori*

Genotipo	Fenotipo LEV-S*		Fenotipo LEV-R*	
	n0	n1	n0	n1
<i>gyrA</i>				
Mutaciones dentro y fuera del QRDR				
Mutaciones del QRDR (A71 to Q110)	3	4		
Mutations en el codon N87	4	2	22	21
N87I	6	1	32	11
N87K	7	0	35	8
N87T	6	1	41	2
Mutations en el codon D91	7	0	23	20
D91G	7	0	34	9
D91N	7	0	35	8
D91Y	7	0	40	3
Mutaciones fuera del QRDR				
Mutations en el codon V199A	1	5	18	25
Mutations en el codon V199M	7	0	42	1
<i>gyrB</i>				
D481E	7	0	42	1
R579C	7	0	42	1

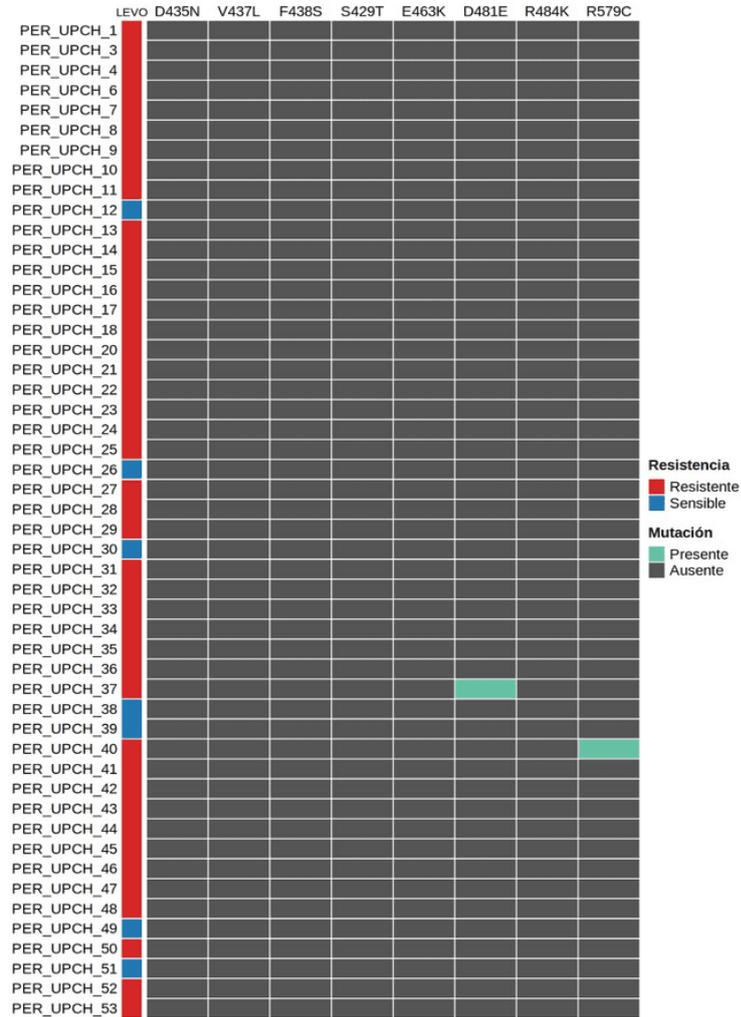
(*): n0: nº de aislados sin el genotipo; n1: nº de aislados que codifican el genotipo

Anexo 37. Alineamiento de la proteína *gyrA* de referencia de *H. pylori* y las proteínas de *H. pylori* de este estudio.



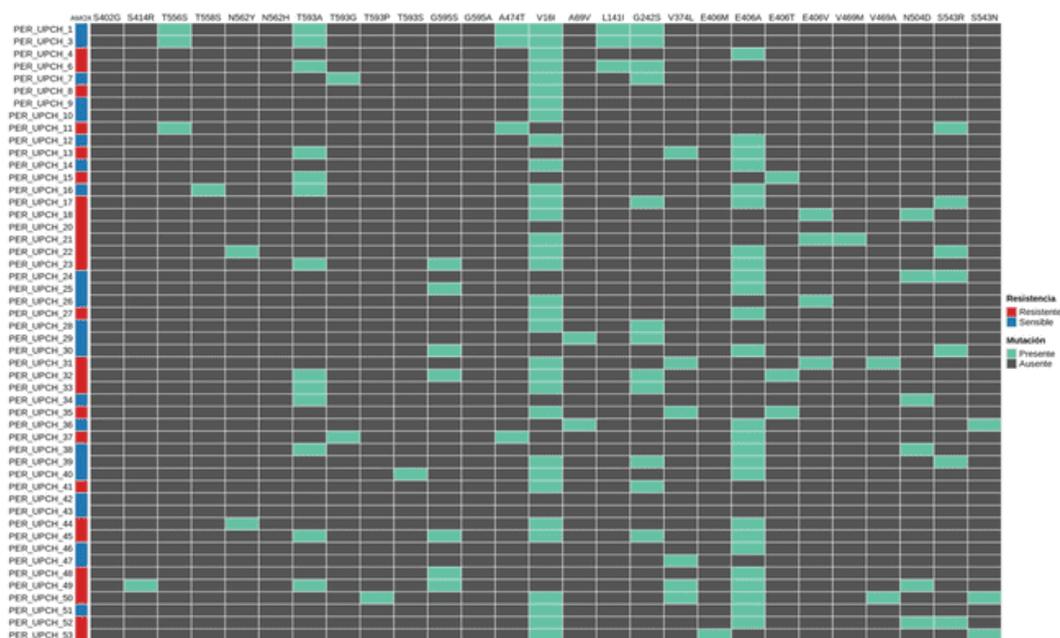
Se muestra un alineamiento múltiple de secuencia de aminoácido *gyrA* donde se observa sustituciones en la posición 87 y 91.

Anexo 38. Mapa de calor de mutaciones en gen *gyrB* relacionados con la resistencia a levofloxacino.



En la primera columna se reporta el perfil de susceptibilidad fenotípico de cada cepa. Las columnas subsiguientes indican la presencia o ausencia de mutaciones específicas asociadas con la resistencia a levofloxacino.

Anexo 39. Mapa de calor de mutaciones en los motivos *PBP1A* (SXXK, SXN y KTG) y cercanos a ellos en ensamblados de *H. pylori*



En la primera columna se reporta el perfil de susceptibilidad fenotípico de cada cepa. Las columnas subsiguientes indican la presencia o ausencia de mutaciones específicas asociadas con la resistencia a amoxicilina.

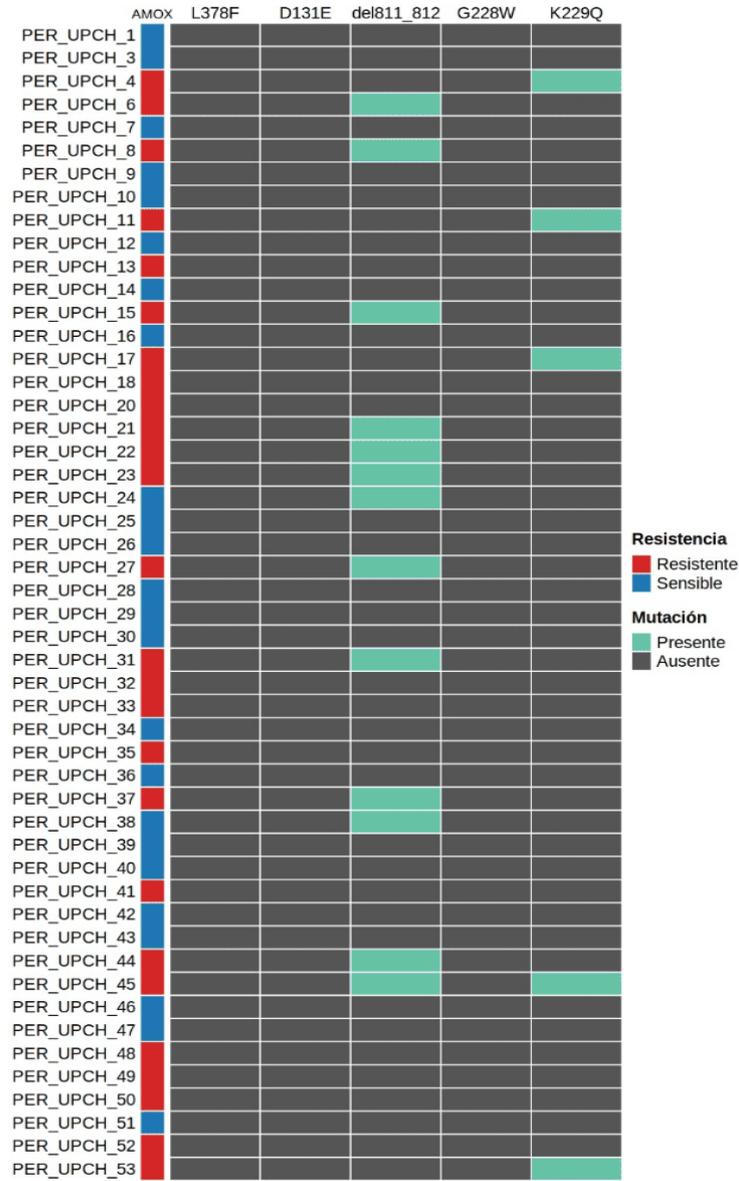
**Anexo 40. Genotipos potenciales de AMX-R codificados en aislados clínicos
de *H. pylori***

Genotipo	Fenotipo AMOX-S*		Fenotipo AMOX-R*	
	n0	n1	n0	n1
<i>pbp1</i> gene				
Mutacion en el codon V16I	11	13	7	19
Mutacion en el codon A69V	22	2	26	0
Mutacion en el codon L141I	22	2	25	1
Mutacion en el codon G242S	18	6	20	6
Mutacion en el codon V374L	23	1	21	5
Mutaciones en el codon E406M/A/T/V	11	13	8	17
Mutacion en el codon E406M	24	0	25	1
Mutacion en el codon E406A	12	12	13	13
Mutacion en el codon E406T	24	0	23	3
Mutacion en el codon E406V	23	1	23	3
Mutacion en el codon S414R	24	0	25	1
Mutacion en el codon V469M/A	24	0	22	3
Mutacion en el codon V469M	24	0	25	1
Mutacion en el codon V469A	24	0	24	2
Mutacion en el codon A474T	22	2	24	2
Mutacion en el codon N504D	21	3	23	3
Mutations at codon S543 (H/R)	21	3	22	4
Mutacion en el codon S543R	21	3	22	4
Mutations of the PBP-motif KTG555_557	22	2	25	1
T556S	22	2	25	1
Mutations at codon T558S	23	1	26	0
Mutations at codon N562 (D/H/Y)	22	2	22	3
Mutations at codon N562D	22	2	25	1
Mutations at codon N562Y	24	0	24	2
Mutations at codon T593(A/G/P/S)	17	7	16	10
Mutations at codon T593A	19	5	18	8
Mutations at codon T593G	23	1	25	1
Mutations at codon T593P	24	0	25	1
Mutations at codon T593S	23	1	26	0
Mutations at codon G595S	22	2	21	5
<i>pbp2</i> gene				
S494N	18	6	19	7
A541V	24	0	25	1
HefC				
del811_812	22	2	15	11
HofH				

K229Q	24	0	21	5
-------	----	---	----	---

(*) n0: n° de aislados sin el genotipo; n1: n° de aislados que codifican el genotipo

Anexo 42. Mapa de calor de mutaciones relacionadas a bombas de eflujo (*hofH*, *hefC* y *hopC*) en ensamblado de *H. pylori*.



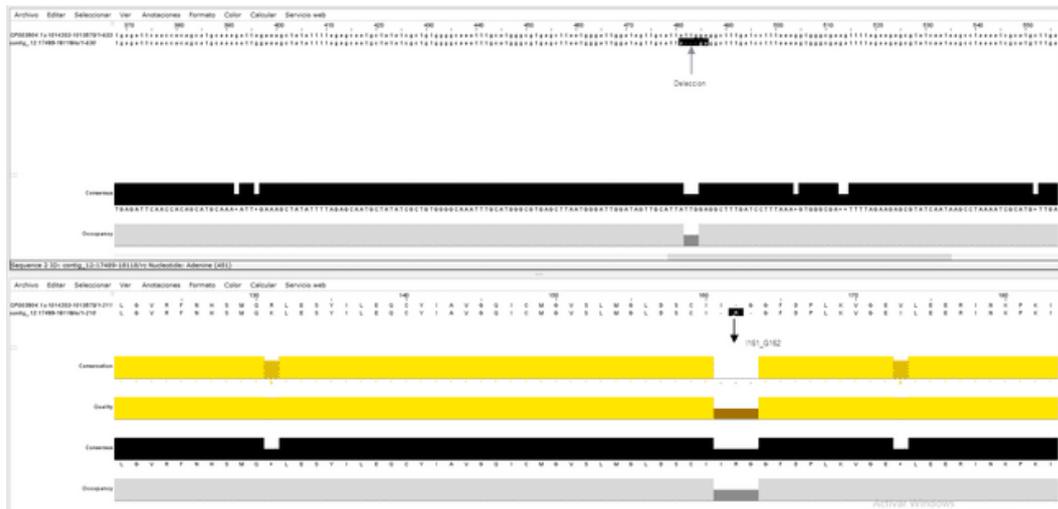
En la primera columna se reporta el perfil de susceptibilidad fenotípico de cada cepa. Las columnas subsiguientes indican la presencia o ausencia de mutaciones específicas asociadas con la resistencia a amoxicilina

Anexo 44. Mapa de calor de mutaciones en el gen *rdxA* en ensamblados de *H. pylori*



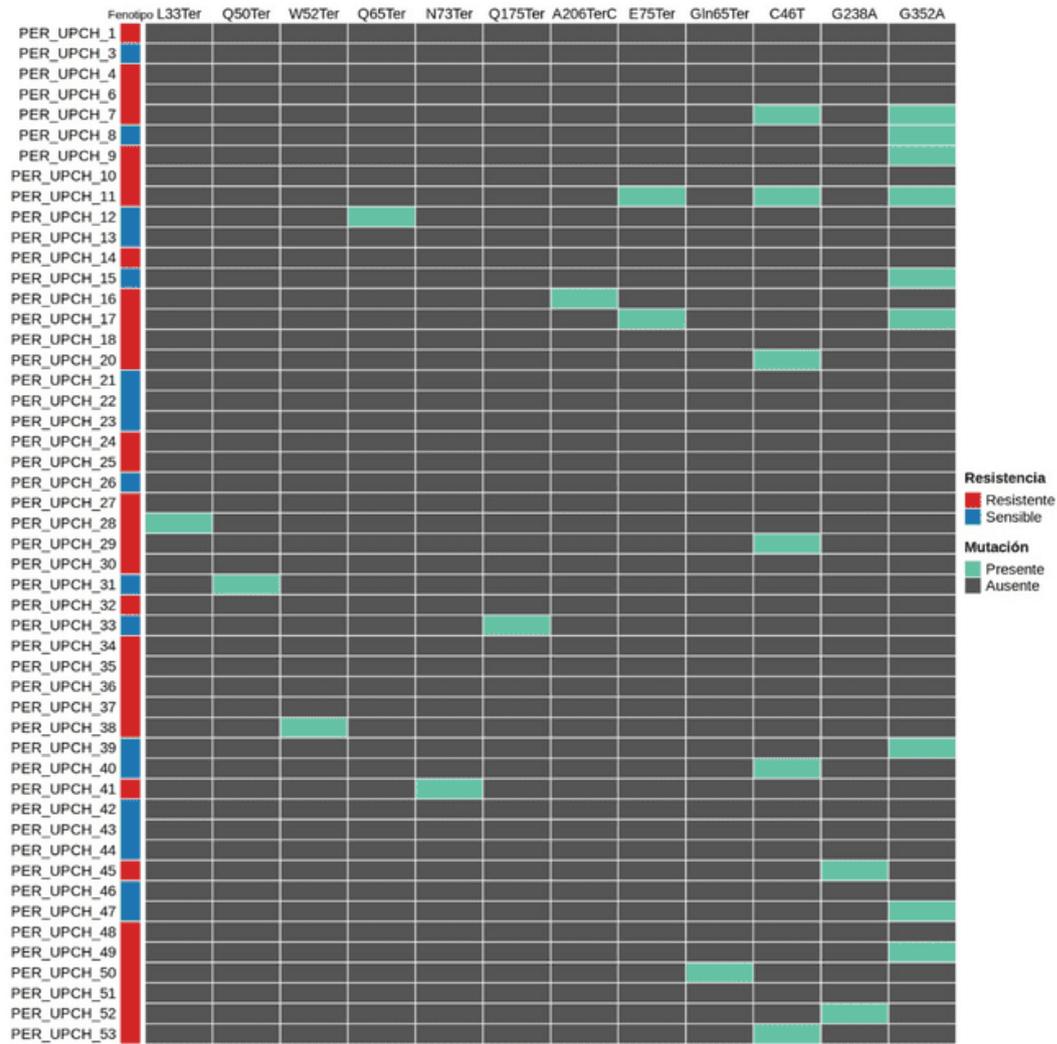
En la primera columna se reporta el perfil de susceptibilidad fenotípico de cada cepa. Las columnas subsiguientes indican la presencia o ausencia de mutaciones específicas asociadas con la resistencia a metronidazol.

Anexo 45. Alineamiento de la secuencia de la proteína *rdxA* del ensamblado PER_UPCH_6 y de la cepa de referencia *H. pylori* 26695.



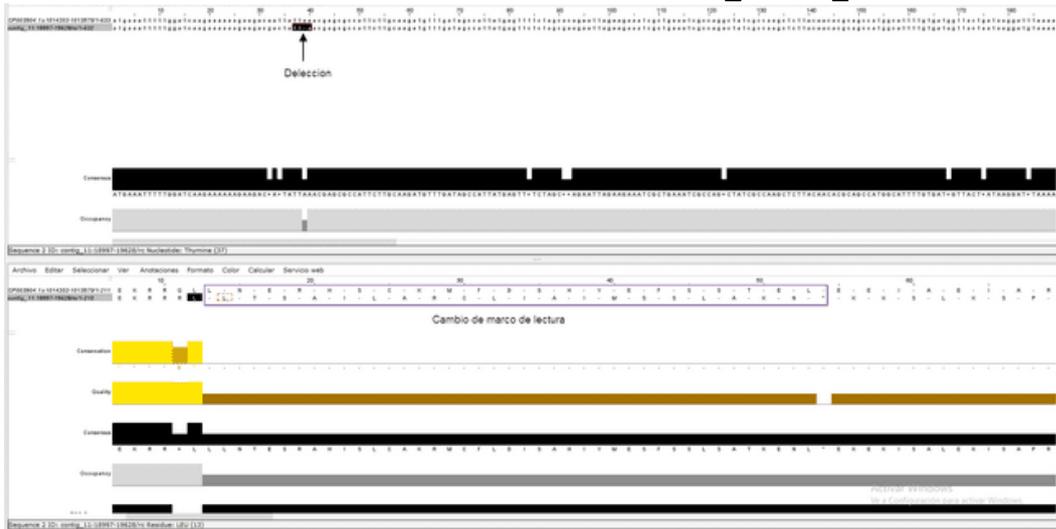
Se muestra una deleción 482_484(del TTG, posiciones eliminadas) lo que afectó a los aminoácidos en la posición 161 y 162, y se insertó un aminoácido arginina en su lugar.

Anexo 46. Mapa de calor de codones stop prematuro en *rdxA*



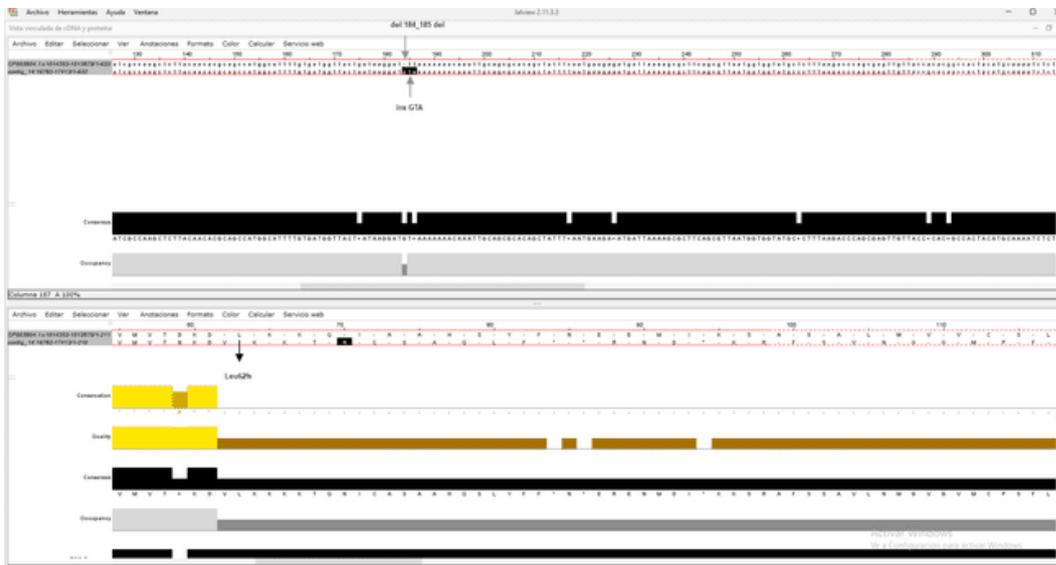
En la primera columna se reporta el perfil de susceptibilidad fenotípico de cada cepa. Las columnas subsiguientes indican la presencia o ausencia de codones stop prematuro relacionadas con la resistencia a metronidazol

Anexo 47. Frameshift variant en el ensamblado PER_UPCH_28.



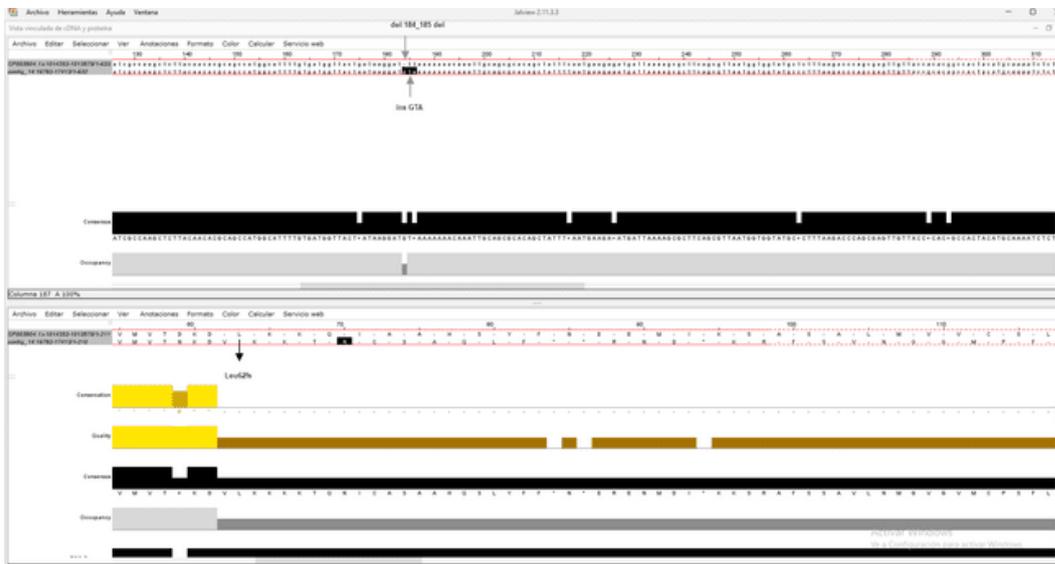
Frameshift variant en el ensamblado PER_UPCH_28. Se observa un cambio de marco de lectura desde la posición 14 causada por la eliminación de una adenina en la posición 41 del cDNA.

Anexo 48. Frameshift variant en el ensamblado PER_UPCH_41



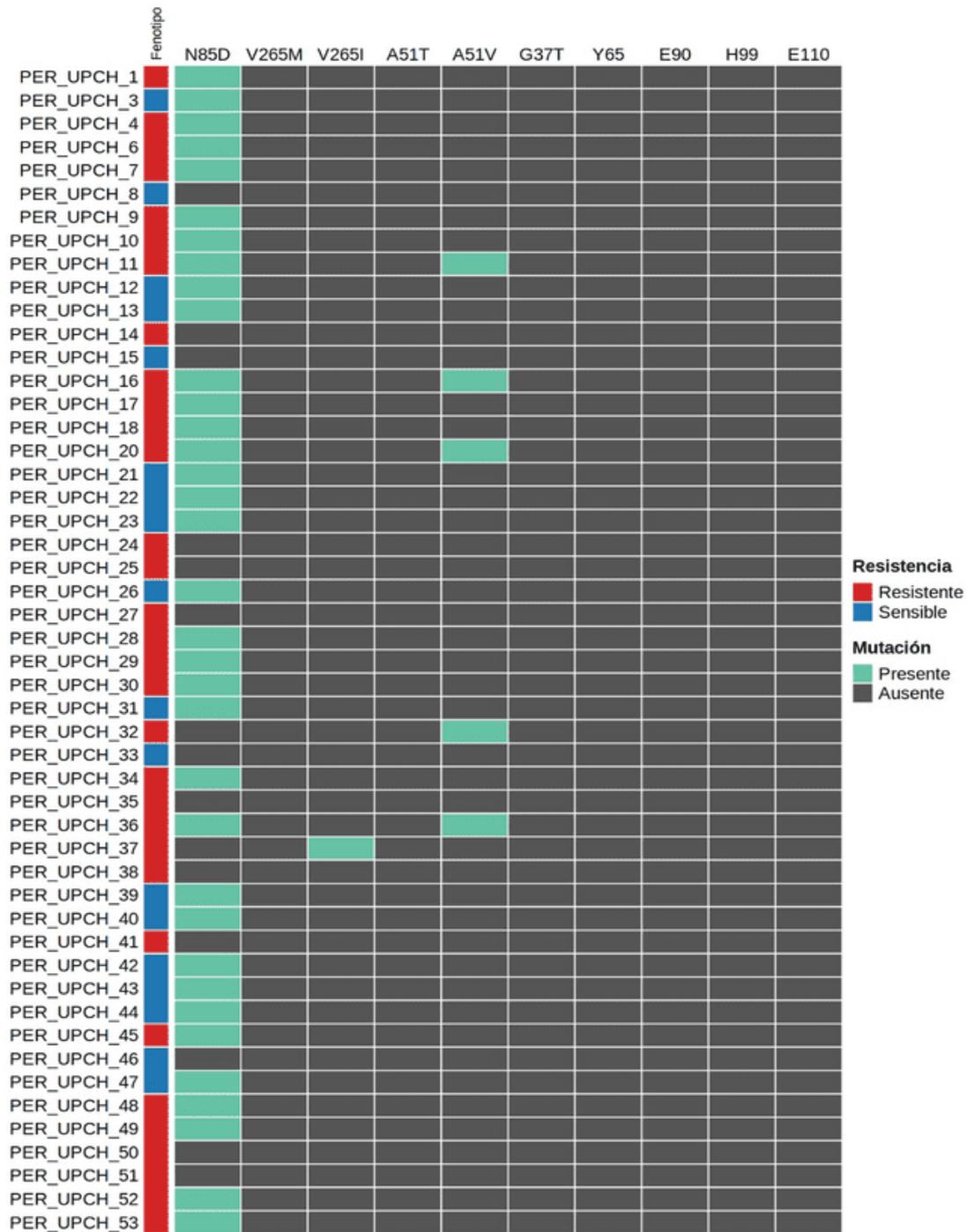
Se observó un cambio de marco de lectura desde la posición 62 de la proteína causado por la eliminación de dos timinas y la inserción de GTA 184_185.

Anexo 49. Frameshift variant en el ensamblado PER_UPCH_50:



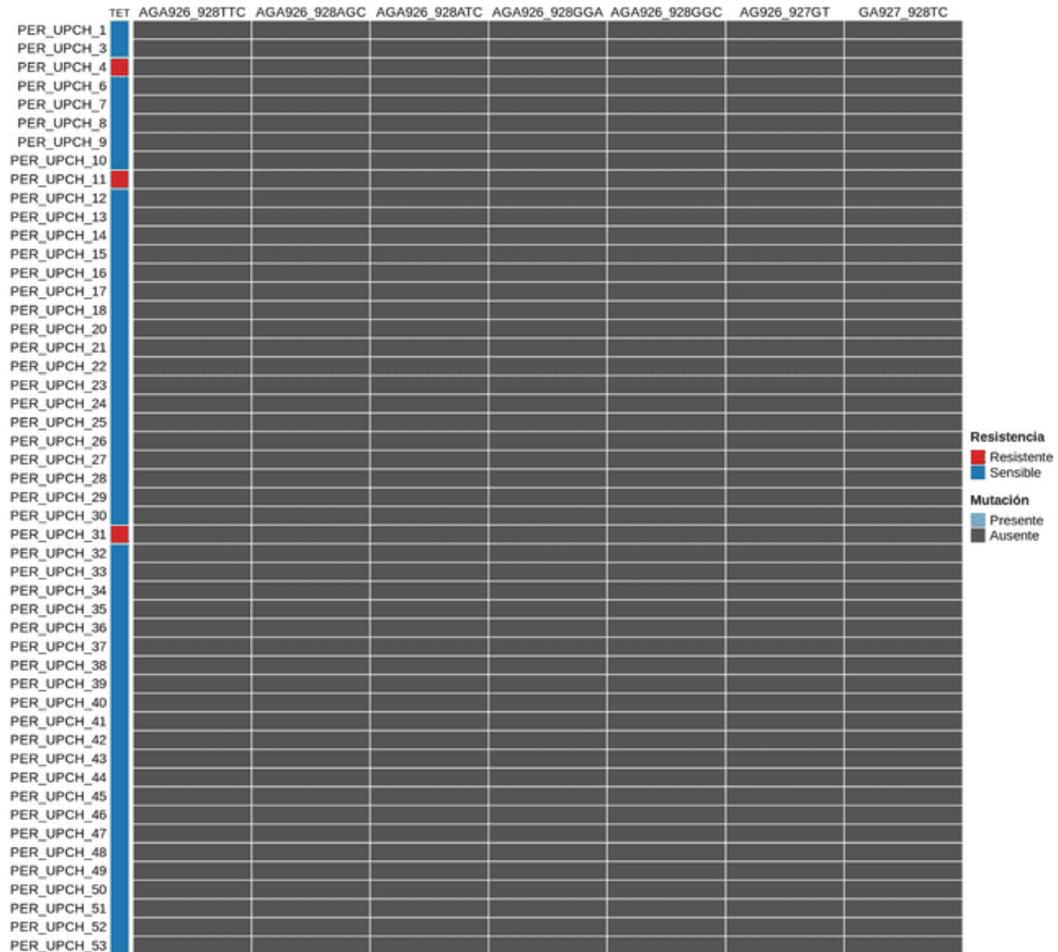
El ensamblado PER_UPCH_50 presentó una mutación compleja c.192dupA p.Gln65fs, caracterizada por la duplicación de una adenina en la posición 192 del cDNA. Esta duplicación provocó un desplazamiento del marco de lectura a partir de la glutamina en la posición 65 de la proteína, alterando toda la secuencia de aminoácidos subsiguiente. Este tipo de cambio, conocido como "frameshift", pudo tener varias consecuencias importantes: la producción de una secuencia de aminoácidos completamente diferente, la generación de un codón de parada prematuro que terminaba la traducción de manera anticipada, y la creación de una proteína truncada potencialmente no función.

Anexo 51. Mapa de calor de mutaciones en *rclc*, *HP0370* y *HP918* genes putativos relacionados a la resistencia a metronidazol.



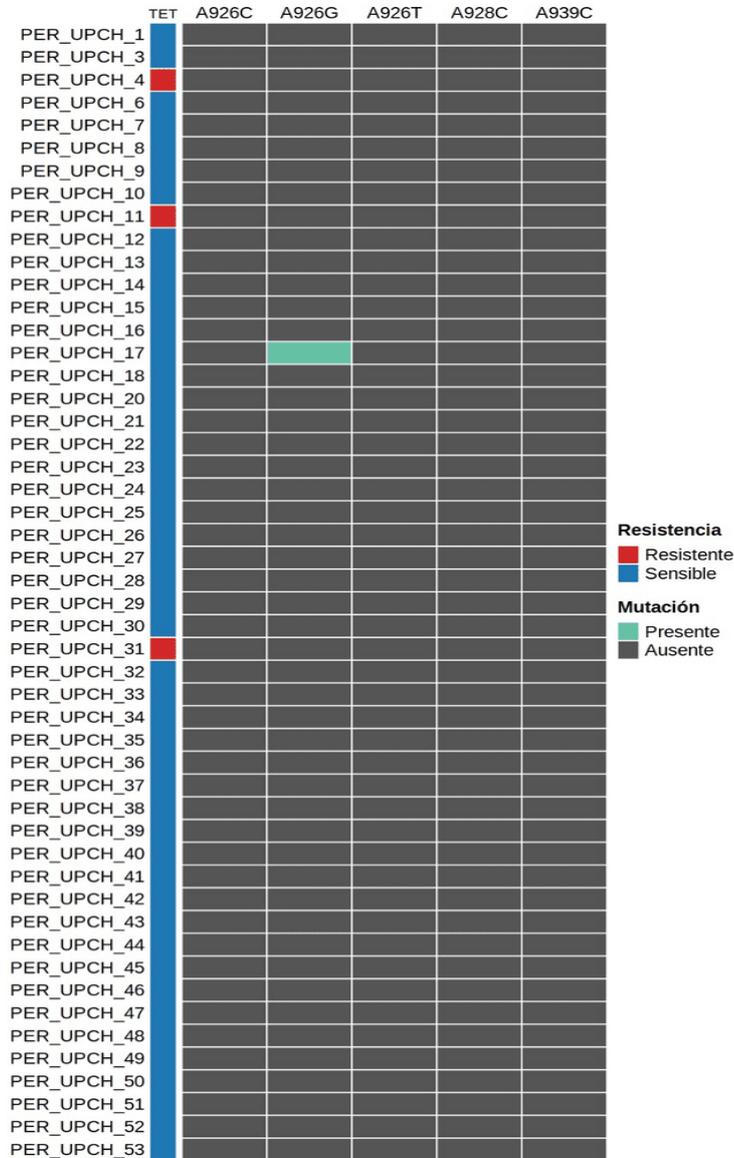
En la primera columna se reporta el perfil de susceptibilidad fenotípico de cada cepa. Las columnas subsiguientes indican la presencia o ausencia de mutaciones específicas relacionadas con la resistencia a metronidazol

Anexo 52. Mapa de calor de mutaciones 926 a 928 del ARNr 16S relacionados a la resistencia de tetraciclina en *H. pylori*.



En la primera columna se reporta el perfil de susceptibilidad fenotípico de cada cepa. Las columnas subsiguientes indican la presencia o ausencia de mutaciones específicas asociadas con la resistencia a tetraciclina

Anexo 53. Mapa de calor de mutaciones en las posiciones 926 al 928 del ARNr 16S relacionados a la resistencia de tetraciclina en *H. pylori*.



En la primera columna se reporta el perfil de susceptibilidad fenotípico de cada cepa. Las columnas subsiguientes indican la presencia o ausencia de mutaciones específicas asociadas con la resistencia a tetraciclina.

