



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA
DE *HELICOBACTER PYLORI* EN
PACIENTES DISPÉPTICOS DEL
HOSPITAL Y LA CLÍNICA MÉDICA
CAYETANO HEREDIA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

MANUEL ENRIQUE CHU MENDOZA
LIMA – PERÚ

2021

ASESOR

PhD. Michel Sauvain

JURADO DE TESIS

PhD. Jorge Arevalo Zelada

PRESIDENTE

MSc. Teresa Barreto Gaviria

VOCAL

PhD. Pablo Tsukayama Cisneros

SECRETARIO

DEDICATORIA

A los profesionales involucrados en investigaciones clínicas

en el campo de la resistencia antimicrobiana.

A mis padres por su constante apoyo y consejos.

A mi amada esposa Claudia por su apoyo y por ser mi motivación.

AGRADECIMIENTO

A Michel Sauvain, Denis Castillo, Jesús Guzmán y Alejandro Bussalleu por su

apoyo, tiempo y sus recomendaciones.

TABLA DE CONTENIDOS

I.	Introducción	1
II.	Planteamiento del problema	4
III.	Justificación del estudio	5
IV.	Objetivos	6
V.	Antecedentes y marco teórico	7
	5.1 Tratamientos de la infección	9
	5.2 Resistencia antimicrobiana	11
	5.3 Resistencia a Claritromicina	12
	5.4 Resistencia a Amoxiciclina	13
	5.5 Resistencia a Metronidazol	13
	5.6 Resistencia a Levofloxacino	14
	5.7 Resistencia a Tetraciclina	15
VI.	Materiales y método	17
VII.	Resultados	27
VIII.	Discusión	46
IX.	Conclusiones	57
X.	Referencias bibliográficas	59
	Anexos	

RESUMEN

El presente trabajo de investigación es un estudio del tipo descriptivo y de corte transversal, en el cual se procesaron 1500 biopsias gástricas colectadas de 500 pacientes dispépticos con el objetivo de aislar y cultivar cepas de *H. pylori*, determinar los perfiles de resistencia in vitro e identificar mutaciones genéticas en los genes *ARNr23S*, *pbp1*, *gyrA*, *rdxA* y *ARNr16S* para determinar la significancia estadística y las razones de prevalencias entre la resistencia antimicrobiana a Claritromicina, Amoxicilina, Levofloxacino, Metronidazol y Tetraciclina respectivamente. Como resultados se obtuvieron una prevalencia del 54.6% de pacientes dispépticos con *H. pylori* con una resistencia antimicrobiana de: Claritromicina 35.2%, Amoxicilina 65.3%, Metronidazol 68.9%, Levofloxacino 72.1% y Tetraciclina 7.8%. Además, se identifican las mutaciones A2143G, A2142G y A2142C dentro del gen *ARNr23S* y N87I, D91G, N87K, D91N y D91Y dentro del gen *gyrA*, relacionadas significativamente con la resistencia a Claritromicina y Levofloxacino respectivamente y una alta diversidad genética en los genes *pbp1* y *rdxA*, con mutaciones que no muestran una relación significativa con la alta resistencia a Amoxicilina y Metronidazol respectivamente. Finalmente se reporta la presencia de mutaciones en las posiciones 926-928 del gen *ARNr16S*, sin presentar una relación significativa con la baja resistencia a Tetraciclina.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, resistencia antimicrobiana, mutaciones genéticas, pacientes dispépticos.

ABSTRACT

The present research work is a descriptive and cross-sectional study, in which 1500 gastric biopsies collected from 500 dyspeptic patients were processed with the aim of isolating and cultivating *H. pylori* strains, determining the resistance profiles in vitro and identify genetic mutations in the *rRNA23S*, *pbp1*, *gyrA*, *rdxA* and *rRNA16S* genes to determine the statistical significance and prevalence ratios between antimicrobial resistance to Clarithromycin, Amoxicillin, Levofloxacin, Metronidazole and Tetracycline respectively. As results, a prevalence of 54.6% of dyspeptic patients with *H. pylori* was obtained with antimicrobial resistance of: Clarithromycin 35.2%, Amoxicillin 65.3%, Metronidazole 68.9%, Levofloxacin 72.1% and Tetracycline 7.8%. In addition, mutations A2143G, A2142G and A2142C are identified within the *rRNA23S* and N87I, D91G, N87K, D91N and D91Y genes within the *gyrA* gene, significantly related to resistance to Clarithromycin and Levofloxacin respectively and a high genetic diversity in the genes *pbp1* and *rdxA*, with mutations that do not show a significant relationship with high resistance to Amoxicillin and Metronidazole respectively. Finally, the presence of mutations in positions 926-928 of the *rRNA16S* gene is reported, without presenting a significant relationship with low resistance to Tetracycline.

Key words: *Helicobacter pylori*, antimicrobial resistance, genetic mutations, dyspeptic patients.

I. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria patógena Gram negativa y microaerofílica que tiene la capacidad de tolerar el pH ácido del estómago, crecer y colonizar sobre su superficie epitelial y ocasionar una inflamación aguda o crónica, resultando en un daño progresivo de la mucosa gástrica (Tirado-Hurtado et al., 2018).

Fueron los investigadores Robin Warren y Barry Marshall, quienes en 1984 lograron aislar y cultivar por primera vez esta bacteria a partir de biopsias gástricas colectadas de pacientes con gastritis crónica y úlceras pépticas. Este descubrimiento fue el punto de partida para una revolución concerniente a los conceptos y al manejo de las enfermedades gastroduodenales (Marshall y Warren, 1984). Desde entonces numerosos estudios han reportado la relación directa entre la infección causada por *H. pylori* y el desarrollo de enfermedades gástricas como gastritis, úlceras pépticas, adenocarcinomas gástricos y linfomas gástricos (Sugano et al., 2015). Consecuentemente en 1994, la Organización Mundial de la Salud, categorizó a *H. pylori* como agente carcinógeno dentro del grupo 1, debido a su relación directa con el desarrollo de adenocarcinomas gástricos, linfomas tipo MALT y en última instancia cáncer gástrico (International Agency for Research on Cancer, 2012).

H. pylori es una de las bacterias patógenas más comunes para el humano, con una prevalencia en alrededor del 50% de la población del mundo. Hooi et al, estimaron que había aproximadamente 4.4 mil millones de individuos infectados en el 2015 a nivel mundial, con variaciones de prevalencia observadas en diferentes áreas geográficas de acuerdo a las condiciones de vida entre regiones y países.

Diversos consensos médicos recomiendan la erradicación de *H. pylori* con el fin de disminuir la incidencia de enfermedades gástricas relacionadas, existiendo tratamientos basados en la combinación de uno o más antibióticos con un inhibidor de la bomba de protones (IBP). Uno de los más prescritos y empíricamente seleccionado es la denominada terapia triple, que consiste en la administración de Claritromicina, Amoxicilina (o Metronidazol para el caso de pacientes alérgicos a las penicilinas) y un IBP por un periodo de 14 días. Este tratamiento ha mostrado ser altamente eficaz desde los años 1990s, mostrando tasas de erradicación por encima del 90%. Sin embargo, en los últimos años la eficacia de este tratamiento ha disminuido, reportando en la actualidad tasas de erradicación por debajo del 80%. Del mismo modo, para los casos de poblaciones que presenten una alta resistencia a Claritromicina se recomienda la denominada terapia cuádruple, que consiste en la administración de Metronidazol, Tetraciclina, Subsalicilato de Bismuto y un IBP. Sin embargo, el éxito de este tratamiento se mantiene aún controversial, reportando tasas de erradicación variables entre poblaciones. Otros tratamientos empleados para la erradicación de *H. pylori* son: la terapia secuencial, que consiste en 5 días de Amoxicilina y un IBP, seguido de 5 días de Claritromicina, Metronidazol y un IBP, la terapia concomitante, que consiste en Claritromicina, Metronidazol, Amoxicilina y un IBP, la terapia híbrida, que consiste en 7 días de Amoxicilina y un IBP, seguido de 7 días de Claritromicina, Metronidazol, Amoxicilina y un IBP y la terapia de rescate, que consiste en Amoxicilina, Levofloxacino y un IBP (Malfertheiner et al., 2016).

Si bien existen varios esquemas de tratamientos contra la infección causada por *H. pylori*, esta bacteria es reconocida por ser de difícil erradicación debido

principalmente a la alta resistencia antimicrobiana que puede expresar. Recientes reportes confirman que las tasas de resistencia antimicrobiana de *H. pylori* se han incrementado, mientras que los porcentajes de su erradicación han disminuido. Esta resistencia puede disminuir la eficacia de los tratamientos y aumentar la recurrencia de la infección. Por ejemplo, se ha reportado que la resistencia a Claritromicina reduce el éxito de la terapia triple en un 50%, la resistencia a Levofloxacino de 20% a 40% y la resistencia a Metronidazol en un 25% (Arslan et al., 2017)

H. pylori presenta una remarcable diversidad genética causada principalmente por las altas tasas de mutaciones y recombinaciones en su genoma. Se ha reportado que la frecuencia de estas mutaciones, las cuales aumentan 10 veces durante la fase aguda de la infección, es mas alta que en otras bacterias, comparable únicamente con los virus de ARN (Linz et al., 2014). Recientes reportes sugieren que los mecanismos de resistencia antimicrobiana expresados por *H. pylori* se producen a partir de la plasticidad evidencia de su genoma. Mutaciones en genes como *ARNr23S*, *pbp1*, *rdxA*, *gyrA* y *ARNr16S* podrían estar relacionadas con la resistencia a Claritromicina, Amoxicilina, Metronidazol, Levofloxacino y Tetraciclina respectivamente (Smith et al., 2014).

Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron aislar cepas de *H. pylori* de pacientes dispépticos del Hospital Cayetano Heredia y la Clínica Médica Cayetano Heredia mediante la técnica de cultivo microbiológico para determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana y caracterizar la resistencia antimicrobiana a nivel molecular en las cepas de *H. pylori* aisladas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la diversidad estructural de los antibióticos que pueden ser usados para combatir la infección causada por *H. pylori*, la resistencia antimicrobiana que expresa esta bacteria es uno de los factores más importantes que ocasionan la falla terapéutica. Los altos porcentajes de resistencia antimicrobiana son considerados un problema de salud pública que requieren de atención a nivel mundial, debido a la alta prevalencia de esta infección y al desarrollo de enfermedades gástricas relacionadas como gastritis, úlceras pépticas, adenocarcinomas gástricos y linfomas gástricos (Malfertheiner et al., 2016).

Adicionalmente los requerimientos específicos para el aislamiento y cultivo microbiológico de *H. pylori*, bacteria considerada de difícil crecimiento en el laboratorio, dificultan la oportuna realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Por lo tanto, los tratamientos contra la infección de *H. pylori*, que en muchos casos fueron seleccionados empíricamente, no son siempre los más apropiados. Todo esto contribuye a que las tasas de erradicación de la infección disminuyan, mientras que los perfiles de resistencia antimicrobiana se incrementen (Tirado-Hurtado et al., 2018).

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En el Perú, la incidencia de cáncer gástrico está en alrededor de 15.8 por cada 100 000 habitantes, siendo la segunda enfermedad del tipo oncológica más común en varones y la tercera en mujeres. Asimismo, el cáncer gástrico en el Perú es uno de los más agresivos y frecuentes de su tipo, representando el 14.7 % de las causas de mortalidad por cáncer en varones y 13.4 % en mujeres (Boehnke et al., 2017).

La infección causada por *H. pylori* es un factor de riesgo importante para el desarrollo de diversas enfermedades gástricas como gastritis, dispepsia funcional, úlceras pépticas y úlceras duodenales y en última instancia cáncer gástrico. Actualmente esta bacteria está categorizada como agente carcinógeno del grupo 1 por la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer, 2012) y la Organización mundial de la Salud (WHO, 2017).

Desafortunadamente, se ha evaluado que, en el Perú, el 13% de los pacientes diagnosticados con *H. pylori* no son tratados, mientras que los pacientes que reciben el tratamiento, el 21.7% son refractarios al tratamiento de primera línea y 32.5% se pierden en el seguimiento, favoreciendo el aumento de la resistencia antimicrobiana de *H. pylori* y el desarrollo de enfermedades gástricas relacionadas. Además, se reporta que el 60% de los pacientes diagnosticados con *H. pylori* tienen un alto riesgo de contraer cáncer gástrico (Tirado-Hurtado et al., 2018).

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de investigación fue caracterizar la resistencia antimicrobiana a nivel molecular en una muestra de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos del Hospital Cayetano Heredia y la Clínica Médica Cayetano Heredia en respuesta a diferentes antibióticos: Claritromicina, Amoxicilina, Metronidazol, Levofloxacino y Tetraciclina.

Objetivos específicos

- Determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana *in vitro* en las cepas aisladas de *H. pylori* a partir de pacientes dispépticos reclutados del Hospital y la Clínica Médica Cayetano Heredia.
- Identificar las mutaciones genéticas dentro de los genes relacionados con los mecanismos de resistencia antimicrobiana de *H. pylori*.
- Explorar la asociación entre la resistencia antimicrobiana *in vitro* y las mutaciones genéticas identificadas en las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos.

V. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

H. pylori es una bacteria Gram negativa de forma espiral o ligeramente curvada, mide entre 2.5-4.0 µm de largo y 0.5-1.0 µm de ancho y posee de 2 – 6 flagelos en uno de sus polos, esta bacteria muestra una remarcable movilidad en soluciones viscosas y los flagelos juegan un rol central en esta movilidad (International Agency for Research on Cancer, 2012). En ciertas circunstancias *H. pylori* puede evolucionar de su forma helicoidal típica y presentar una forma cocoidal. Algunos autores sugieren que es una forma de organismo vivo, mientras que otros concluyen que son organismos degenerados (Reshetnyak y Reshetnyak, 2017).

H. pylori, es una bacteria patógena para el humano, que coloniza e infecta sobre la superficie epitelial del lumen del estómago. Para adaptarse a su ambiente extremadamente ácido, *H. pylori* produce una gran cantidad de ureasa. La ureasa de *H. pylori* presenta la más alta actividad específica entre las ureasas bacterianas (Moblely et al., 1988).

Los genomas de tres cepas de *H. pylori* fueron completamente secuenciados: la cepa 26695 a partir de un paciente con gastritis crónica, la cepa J99 a partir de un paciente con úlcera duodenal y la cepa HPAG1 a partir de un paciente con gastritis atrófica crónica. Las cepas 26695, J99 y HPAG1, tienen un cromosoma circular de 1667867 pares de bases (pb), 1643831 pb y 1596366 pb, respectivamente. HPAG1 además tiene un único plásmido de 9369 pb. La comparación de las secuencias de estos tres genomas, revelan una organización genética similar en las tres cepas. Sin embargo, confirman que *H. pylori* es una bacteria altamente heterogénea con una alta diversidad genómica, la cual es el resultado de una alta tasa de mutaciones y de recombinaciones. Los pacientes pueden estar infectados a veces con múltiples

cepas y *H. pylori* puede cambiar fenotípicamente y genotípicamente durante la colonización en un único hospedero (International Agency for Research on Cancer, 2012).

H. pylori es considerada una bacteria de difícil cultivo in vitro, debido a sus requerimientos específicos de cultivo: microaerofilia, medios de cultivo selectivos, suplementos y el tiempo de incubación de hasta 10 días a partir del procesamiento de las biopsias gástricas (Mégraud y Lehpours, 2007).

Esta bacteria está ampliamente diseminada a nivel mundial, presenta una prevalencia de infección de alrededor el 60% y es considerada como una de las bacterias patógenas más comunes para el humano (Keilberg y Ottemann, 2016). Las prevalencias más altas de infección, se encuentran en África (79.1%), Latinoamérica (63.4%) y Asia (54.7%) mientras que las prevalencias más bajas se encuentran en Norteamérica (37.1%) y Oceanía (24.4%) (Hooi et al., 2017).

Los detalles de los modos de transmisión y las rutas de diseminación son todavía poco conocidos. Sin embargo, los principales modos de transmisión son fecal-oral y oral-oral. A pesar de que la mayoría de individuos infectados son asintomáticos, la infección causada por *H. pylori* puede persistir durante toda la vida del paciente si no se administra un tratamiento eficaz (Peretz et al., 2014).

Actualmente, está ampliamente aceptado que las enfermedades gastroduodenales más comunes como la gastritis, úlceras pépticas y duodenales, tengan como agente causal a *H. pylori* y que su tratamiento este basado en la aplicación de antibióticos (Mégraud y Lehours, 2007).

5.1 Tratamientos de la infección por *H. pylori*

Los tratamientos contra la infección causada por *H. pylori* están basados en el uso combinado de antibióticos junto con un supresor de la acidez gástrica. Debido a que esta bacteria se localiza sobre la superficie ácida de la mucosa gástrica, requiere de un supresor de la acidez gástrica, generalmente un inhibidor de la bomba de protones (IBP) como: omeprazol, lansoprazol, esomeprazol, pantoprazol o rabeprazol que mantengan un pH neutro para aumentar así la eficacia de los antibióticos (Arslan et al., 2017).

La terapia triple estándar es el tratamiento más comúnmente prescrito y empíricamente seleccionado a nivel mundial. Consiste en la administración de tres drogas: Claritromicina, Amoxicilina (o Metronidazol para el caso de pacientes alérgicos a las penicilinas) y un IBP durante un periodo de 14 días. Este tratamiento ha mostrado ser altamente eficaz desde los años 1990s (eficacia >90%). Sin embargo, la eficacia de la terapia triple actualmente está disminuyendo, reportando una tasa de erradicación por debajo del 80%, debido a las altas tasas de resistencia antimicrobiana principalmente para Claritromicina (Martins et al., 2019).

En poblaciones que presentan una alta resistencia a Claritromicina se recomienda prescribir la denominada terapia cuádruple. Esta terapia cuádruple es también un tratamiento empírico que consiste en la administración de 4 medicamentos: Metronidazol, Tetraciclina, Subsalicilato de Bismuto y un IBP y es considerado un tratamiento de segunda línea para la erradicación de *H. pylori*. Sin embargo el éxito de esta terapia se mantiene aún en controversia, reportándose tasas de erradicación que son variables entre diferentes poblaciones a nivel mundial (Malfertheiner et al., 2016).

Entre otros tratamientos que también son aplicados para la erradicación de *H. pylori*, esta presente la terapia secuencial, que consiste en la administración de 5 días de Amoxicilina y un IBP, seguido por 5 días más de otros antibióticos que usualmente son Claritromicina o Metronidazol. También se encuentra la terapia concomitante, similar a la terapia secuencial, que comprende la administración de hasta 14 días de tres antibióticos: Claritromicina, Metronidazol y Amoxicilina, pero a diferencia de la terapia secuencial, los tres antibióticos son administrados solo con un IBP. Adicionalmente, se puede aplicar también la llamada terapia híbrida, que consiste en la administración por 7 días de Amoxicilina y un IBP como en la primera fase de la terapia secuencial, seguido por 7 días de Claritromicina, Metronidazol, Amoxicilina y un IBP como en la terapia concomitante (O'Connor et al., 2015).

Según Sugano et al., 2015 los tratamientos iniciales referidos como de “primera línea” deberían de ofrecer la mayor probabilidad de éxito. Sin embargo, son muchos los factores que podrían ocasionar el fallo de un tratamiento y limitar así la erradicación de la bacteria, como, por ejemplo:

- La alta carga bacteriana.
- El incumplimiento en la dosis y la duración del tratamiento.
- La no disponibilidad de antibióticos que pueden actuar a pesar del pH bajo del estómago.
- La incapacidad de los fármacos de penetrar la capa de la mucosa gástrica que está en contacto con el patógeno,
- La resistencia antimicrobiana, que es una de las principales razones que ocasionan el fallo de un tratamiento (Sugano et al., 2015).

5.2 Resistencia antimicrobiana

Los perfiles de resistencia antimicrobiana de *H. pylori* pueden predecir la eficacia de un tratamiento. Por ejemplo, se ha reportado que la resistencia a Claritromicina reduce el éxito de la terapia triple en alrededor del 50%, la resistencia a Levofloxacino de 20 a 40% y la resistencia a Metronidazol en un 25% (Camargo et al., 2014).

Los altos porcentajes de resistencia antimicrobiana probablemente estén relacionados con el inadecuado uso de antibióticos especialmente para controlar infecciones de las vías respiratorias. En países en donde el uso general 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. Del mismo modo, la resistencia a Metronidazol es mucho más alta en países en desarrollo que en países desarrollados. Por ejemplo, en México, la tasa de resistencia a Metronidazol es de 76% en contraste con el 9-12% de resistencia reportada en Japón. Por lo tanto, la resistencia antimicrobiana reportada para *H. pylori*, es variable alrededor del mundo (Camargo et al., 2014).

En los laboratorios clínicos de rutina, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana que se usan para determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana, están basadas principalmente en métodos fenotípicos que se realizan a partir de cultivos microbiológicos de la bacteria. Sin embargo, para el caso de *H. pylori*, las pruebas como E-test y dilución en agar, presentan como principal desventaja el tiempo prolongado requerido para la incubación de la bacteria (48-96 horas). Por lo tanto, el requerimiento de una prueba mas rápida mejoraría la eficacia de los tratamientos (Arslan et al., 2017).

Los mecanismos de resistencia antimicrobiana expresados por *H. pylori* han sido reconocidos a partir de mutaciones en sitios específicos dentro del genoma de la bacteria. Por lo tanto, el uso de pruebas de susceptibilidad basadas en pruebas moleculares, podría ser una herramienta clave para determinar la resistencia de las cepas a los diferentes antibióticos previo a la administración de (Teh et al., 2014) (Smith et al., 2014).

5.3 Resistencia a Claritromicina

Clarithromicina es un macrólido generalmente usado contra *H. pylori* debido a su fácil absorción en la mucosa gástrica y a su mayor estabilidad a pH ácido que otros macrólidos. Este antibiótico presenta una actividad bacteriostática que se inicia al unirse reversiblemente a la horquilla 35 del dominio II y a la peptidil transferasa del dominio V de la molécula del ARNr 23S de la subunidad ribosomal 50S bacteriana, produciendo una interferencia de la síntesis proteica promoviendo la liberación prematura de los peptidil ARNt (Camargo et al., 2014).

Las cepas de *H. pylori* pueden llegar a expresar mecanismos de resistencia a Claritromicina evidenciados principalmente por mutaciones puntuales dentro del gen *ARNr 23S* que impiden la unión del antibiótico con la subunidad ribosomal 50S bacteriano. Específicamente las mutaciones en los nucleótidos A2142G y A2143G del gen *ARNr 23S* son las más comunes observadas, mientras que la mutación A2142C es menos común en cepas resistentes de *H. pylori*. La frecuencia de las mutaciones A2142G y A2142C son significativamente mayores en cepas con valores altos de MIC (MIC >64mg/L) mientras que la mutación A2143G es encontrada en cepas con valores de MIC más bajos (2-64mg/L) (Smith et al., 2014).

5.4 Resistencia a Amoxicilina

Amoxicilina es un importante componente de la terapia triple contra la infección por *H. pylori*. Este antibiótico semisintético de acción bactericida que pertenece al grupo de los betalactámicos actúa uniéndose a las proteínas de unión de las penicilinas conocidas como PBPs (penicillin-binding proteins), las cuales ya no pueden intervenir en el paso final de la síntesis de peptidoglicanos y por lo tanto se inhibe la síntesis de la pared celular de la bacteria (Hu et al., 2016).

Se ha reportado que la resistencia a Amoxicilina de *H. pylori* parece estar relacionada con mutaciones en los genes *pbp* principalmente dentro o adyacentes a los dominios conservados SXN402-404 y KTG555-557, los cuales pertenecen al gen *pbp1* de *H. pylori*. Además, se ha reportado que mutaciones en los genes *pbp2* y *pbp3* también podrían contribuir a una alta resistencia a este antibiótico. Estas mutaciones producen cambios conformacionales en las proteínas que reducen la afinidad del antibiótico (Amoxicilina). No obstante, estos mecanismos de resistencia no están completamente estudiados y comprendidos (Arslan et al., 2017).

5.5 Resistencia a Metronidazol

Metronidazol es un importante nitroimidazol sintético con acción bactericida que actúa contra microorganismos microaerofílicos. Para producir la actividad antimicrobiana, el Metronidazol se reduce por la acción de las nitroreductasas, como la piruvato flavodoxin reductasa, mediante la transferencia de un único electrón, esto se lleva a cabo dentro del citosol del microorganismo, un mecanismo que es particularmente activo en bacterias anaeróbicas. Esta reducción del grupo

nitro del Metronidazol genera radicales libres que finalmente producen metabolitos tóxicos para la bacteria que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y captan el DNA de la célula bacteriana resultando en la muerte celular (Hu et al., 2016).

Los distintos mecanismos de resistencia a Metronidazol aún no han sido completamente explicados. Los mecanismos de resistencia reportados en cepas de *H. pylori* resistentes están relacionados con mutaciones dentro del gen *rdxA* (que codifica a una NADPH nitroreductasas) y en el gen *frxA* (que codifica a una NADPH flavina oxireductasa. Se ha reportado que mutaciones en el gen *rdxA* parecen ser los factores más importantes para la resistencia a Metronidazol. (Chisholm, 2004) Con una importante concordancia en un estudio reciente se reporta la detección de sustituciones en 13 aminoácidos que están presentes en cepas de *H. pylori* resistentes a Metronidazol (Arslan et al., 2017).

5.6 Resistencia a Levofloxacino

Levofloxacino es un antibiótico del grupo de las quinolonas de acción bactericida generalmente escogido en la terapia de rescate para la erradicación de la infección por *H. pylori*. Como otras quinolonas, Levofloxacino actúa inhibiendo la actividad de la topoisomerasa II (DNA girasa) y la topoisomerasa IV. La primera es necesaria para el súper enrollamiento del ADN y la segunda es responsable para la separación del ADN replicado antes de la división celular. Una inhibición en la función de cualquiera de estas enzimas está asociada a la muerte celular bacteriana (Arslan et al., 2017).

En general, las mutaciones en los genes que codifican la DNA girasa (genes *gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) son las responsables de la resistencia

a este antibiótico. Dentro del genoma de *H. pylori* solo se encuentran genes de la DNA girasa, por lo tanto, para este caso, la resistencia a Levofloxacino en *H. pylori* estará ligada solo a mutaciones puntuales dentro de estos genes (*gyrA* y *gyrB*). Según lo revisado por Arslan et al., 2017, las mutaciones más frecuentes encontradas relacionadas con la resistencia a Levofloxacino están localizadas en los codones 87 y 91 del gen *gyrA*. Por ejemplo, la mutación N87 *gyrA* es la más frecuente mutación detectada en Japón, mientras que D91 *gyrA* es la más frecuente observada en Hong Kong. Mutaciones en el codón 91 causan niveles bajos de resistencia a Levofloxacino, pero mutaciones en el codón 87 causan altos niveles de resistencia. Las mutaciones encontradas en el gen *gyrB* han sido identificadas en cepas resistentes, sin embargo, solo en un 4.4% de mutaciones evaluadas comparadas con el 83.8% de mutaciones en el gen *gyrA* (Arslan et al., 2017).

5.7 Resistencia a Tetraciclina

Tetraciclina es un antibiótico bacteriostático utilizado generalmente en la terapia cuádruple contra la infección causada por *H. pylori*, mostrando resultados satisfactorios con respecto a su erradicación. Tetraciclina actúa uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma, impidiendo la unión del aminoacil ARNt al sitio A, eventualmente inhibiendo la biosíntesis de proteínas (Arslan et al., 2017).

Según Hu et al., 2016 la resistencia a Tetraciclina expresada en cepas de *H. pylori* está principalmente basada en mutaciones puntuales dentro del gen *ARNr16S* bacteriano, específicamente en las posiciones 926-928. Estas mutaciones están localizadas en el sitio primario de unión de la Tetraciclina, reduciendo la afinidad del antibiótico con el ribosoma finalmente con un efecto inhibitorio (Hu et al., 2016). Algunos estudios muestran que la resistencia a Tetraciclina puede ocurrir

también en ausencia de mutaciones en el gen *ARNr16S* sugiriendo que la resistencia a Tetraciclina es multifactorial, posiblemente debido a una disminución en la permeabilidad de la membrana. Se ha detectado una disminución en la acumulación de Tetraciclina en cepas sin estas mutaciones a igual que en cepas con estas mutaciones (Arslan et al., 2017).

VI. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Tipo y diseño de estudio

El presente trabajo de investigación es un estudio del tipo descriptivo y de corte transversal, en el cual se trabajó con una muestra de 1500 biopsias gástricas colectadas de 500 pacientes dispépticos reclutados de un centro de salud público (Hospital Cayetano Heredia) y privado (Clínica Médica Cayetano Heredia) con el objetivo de aislar y cultivar cepas de *H. pylori*, determinar los perfiles de resistencia in vitro e identificar mutaciones genéticas en los genes *ARNr23S*, *pbp1*, *gyrA*, *rdxA* y *ARNr16S* para determinar la significancia estadística y las razones de prevalencias entre la resistencia antimicrobiana a Claritromicina, Amoxicilina, Levofloxacino, Metronidazol y Tetraciclina respectivamente.

6.2 Población de estudio

La población de estudio estuvo conformada por 500 pacientes adultos diagnosticados con síntomas de dispepsia, quienes estuvieron próximos a realizarse el procedimiento de endoscopia digestiva alta. Los pacientes dispépticos fueron reclutados voluntariamente para participar en el estudio desde enero del 2016 hasta febrero del 2017 en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Cayetano Heredia y de la Clínica Médica Cayetano Heredia, de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión diseñados para el estudio.

6.2.1 Criterios de inclusión

Como criterios de inclusión para el reclutamiento de pacientes se tuvo: pacientes adultos diagnosticados con dispepsia que presenten indicación para realizarse endoscopia digestiva alta y la extracción de biopsia gástrica. Por lo

tanto, para ser categorizados como pacientes dispépticos, los pacientes tuvieron que presentar por lo menos 2 de los siguientes síntomas:

- Sensación de plenitud.
- Plenitud epigástrica postprandial.
- Sensación de ardor.
- Acidez estomacal.
- Regurgitación.
- Náuseas.
- Vómitos.
- Dolor epigástrico postprandial.

6.2.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron para el presente estudio, pacientes que no cumplían con los criterios de inclusión antes mencionados y que a pesar de ser diagnosticados con dispepsia no tengan indicación para realizarse endoscopia digestiva alta y la extracción de biopsia. Asimismo, pacientes que presentaron las siguientes características:

- Pacientes en estado de gestación.
- Madres lactantes.
- Pacientes con discapacidad física o mental.
- Pacientes con historia clínica de enfermedades como cáncer gástrico, úlcera péptica activa, síndrome de Zollinger-Ellison.

- Pacientes que hayan sido tratados con antibióticos o antisecretores gástricos en los 2 meses previos a la endoscopia.

El reclutamiento de pacientes dispépticos para el estudio estuvo enmarcado dentro del proyecto de investigación: "Prototipo de Laboratorio centinela para controlar la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos en el Perú", financiado por Ciencia Activa (CONV-000117-2015-FONDECYT). Los pacientes reclutados firmaron el documento de consentimiento para participar en el estudio de investigación. La colecta de biopsias gástricas contó con la aprobación del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código de inscripción 63157. Constancia N° 590-26-15).

6.3 Biopsias gástricas

Las biopsias gástricas se colectadas durante el examen de endoscopia digestiva alta de cada paciente dispéptico. Se extrajeron 3 biopsias gástricas procedentes de las zonas del estómago del antro, cuerpo y pliegue angular. Cada biopsia gástrica se almacenó dentro de crioviales estériles, conteniendo 1 ml del medio de transporte caldo BHI (Brain Heart Infusion) con 20% de glicerol. Los crioviales se rotularon con el centro de salud, el código de paciente, la zona del estómago y la fecha de colecta. Las biopsias gástricas se transportaron al Laboratorio Centinela para controlar la resistencia de *Helicobacter pylori* dentro del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt y fueron criopreservadas a -70°C.

6.4 Cultivo microbiológico de *H. pylori*

El cultivo microbiológico de *H. pylori* se realizó a partir del procesamiento de cada biopsia gástrica colectada de los pacientes dispépticos. Se descriopreservaron las

biopsias gástricas hasta alcanzar temperatura ambiente y se homogenizaron utilizando disgregadores celulares de 40µm (Cell strainer Nylon Falcon®). Se utilizó 100µl de cada biopsia gástrica y se sembró en placas Petri con medio de cultivo selectivo para el cultivo de *H. pylori* compuesto por agar BHI suplementado con 10% de sangre de cordero desfibrinada, Isovitalax®, Anfotericina B y Skirrow® (Vancomicina, Trimetropina y Polimixina B). Los medios de cultivo sembrados se incubaron en jarras de anaerobiosis inyectadas con una mezcla de gases de 5% de O₂, 10% de CO₂ para mantener las condiciones de microaerofilia y se incubaron a una temperatura de 37°C. Se evaluó el crecimiento de colonias pequeñas, circulares y traslucidas presuntivas para *H. pylori*, después de cada 5, 7 y 10 días de incubación. Posteriormente, las colonias presuntivas de *H. pylori* se confirmaron mediante pruebas bioquímicas de ureasa, oxidasa y catalasa (*H. pylori* es una bacteria ureasa, oxidasa y catalasa positiva); además se realizaron tinciones Gram y observaciones microscópicas, para evaluar la presencia de bacilos curvados Gram negativos para confirmar el cultivo positivo de *H. pylori*. Finalmente, a partir de los cultivos positivos se realizaron repiques en medios de cultivo frescos con el propósito de obtener un cultivo de *H. pylori* puro y aumentar las concentraciones bacterianas necesarias para las posteriores pruebas.

El proceso de cultivo microbiológico de las cepas de *H. pylori* se realizó bajo los criterios de buenas prácticas de laboratorio, procesando de manera independiente cada biopsia y utilizando una cabina de bioseguridad clase II-A2 para evitar la contaminación de los cultivos.

6.5 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Se realizaron las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de microdilución en caldo en las cepas aisladas de *H. pylori*, para determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana. Las bacterias se cultivaron en medio de líquido con concentraciones seriadas de los antibióticos más comúnmente usados para en el tratamiento: Amoxicilina, Claritromicina, Levofloxacino, Tetraciclina y Metronidazol. Los cultivos en medio líquido se prepararon con Caldo BHI suplementado con suero fetal bovino al 10% e Isovitalax® al 1%. Las cepas de *H. pylori* se cultivaron en una concentración de 10^7 bacterias/ml en placas de cultivo de 96 pocillos con las concentraciones seriadas de los antibióticos por triplicado. Las placas se colocaron dentro de jarras inyectadas con una mezcla de gases de 5% de O₂, 10% de CO₂ y balance de nitrógeno para guardar las condiciones de microaerofilia y se incubaron a 37°C por un periodo de 72 horas.

Al término del periodo de incubación se evaluaron las placas según el crecimiento bacteriano de cada pocillo por turbidez y se determinaron los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) para cada antibiótico. Para determinar el valor de MIC, se evaluó la mínima concentración de cada antibiótico que produce una inhibición completa del crecimiento bacteriano observado a simple vista.

Para determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana para cada antibiótico, se compararon los valores resultantes de MIC con los valores de puntos de corte para cada antibiótico referenciados por la EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility). De esta manera se determinaron cepas resistentes (R) cuando los valores de MIC son mayor que el punto de corte o cepas sensibles (S) cuando los valores de MIC son menores. **Anexo 1.**

Para las pruebas de Microdilución en Caldo se utilizaron controles positivos para evidenciar el crecimiento de *H. pylori* en el medio de cultivo, controles blancos sin inocular para asegurar la esterilidad del medio de cultivo y controles de especificidad para verificar solo el crecimiento de *H. pylori*. Adicionalmente se realizó, el análisis de una cepa de *H. pylori* de referencia (ATCC 43504) con valores de MIC estandarizados (MIC de 0.015 µg/ml para Claritromicina; 0.015 µg/ml para Amoxicilina; 64 µg/ml para Metronidazol; 0.125 µg/ml para Levofloxacino y 0.12 µg/ml para Tetraciclina) para asegurar la calidad de los resultados por cada lote de pruebas evaluadas.

Al finalizar las pruebas de Microdilución en Caldo, las cepas obtenidas del control de crecimiento específico de *H. pylori*, se confirmaron con las pruebas bioquímicas y se almacenaron en Caldo BHI con glicerol al 20% a -70°C, para su posterior análisis molecular.

6.6 Pruebas moleculares

Una vez obtenidos los perfiles de resistencia antimicrobianos, se realizaron las pruebas moleculares para identificar las mutaciones genéticas en las cepas aisladas de *H. pylori*. Se evaluó la presencia de mutaciones en los genes *ARNr23S*, *pbp1*, *gyrA*, *rdxA* y *ARNr16S* para determinar su relación con la resistencia antimicrobiana para Claritromicina, Amoxicilina, Levofloxacino, Metronidazol y Tetraciclina respectivamente. Las pruebas moleculares se llevaron a cabo en el laboratorio de la Unidad de Epidemiología Molecular (UEM) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

6.6.1 Extracción de ADN a partir de cepas aisladas de *H. pylori*

El proceso de extracción de ADN se realizó a partir de un cultivo puro de cepas aisladas *H. pylori*, usando el kit comercial GeneJET Genomic DNA (Thermo Scientific Cat. No #K0722) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y (protocolo de purificación para bacterias Gram negativas). Las cepas se descriopreservaron hasta alcanzar temperatura ambiente, preparando una suspensión con de 2×10^9 bacterias, para luego realizar la lisis celular y la extracción del ADN genómico mediante columnas de purificación con membranas de sílica. **Anexo 2.**

6.6.2 Amplificación por PCR convencional

Se realizó la amplificación de ADN mediante la técnica de PCR convencional de las regiones específicas para los genes relacionados con los mecanismos de resistencia antimicrobiana para cada uno de los 5 antibióticos evaluados. Se utilizaron primers o cebadores con secuencias específicas de nucleótidos para cada antibiótico. **Anexo 3.**

6.6.3 Amplificación del gen *ARNr 23S*.

Se amplificaron fragmentos de 425 pares de bases que se encuentra dentro del dominio V del gen *ARNr 23S*, para evaluar la presencia de mutaciones genéticas puntuales asociados a la resistencia para Claritromicina en las cepas de *H. pylori*. Se usaron los primers específicos HP23F y HP23R. **Anexo 4.**

6.6.4 Amplificación del gen *pbp1*.

Se amplificaron fragmentos de 2385 pares de bases del gen *pbp1*, para evaluar la presencia de mutaciones genéticas puntuales asociadas a la resistencia para Amoxicilina. Se usaron los primers específicos PBP1F y PBP1R. **Anexo 5.**

6.6.5 Amplificación del gen *gyrA*.

Se amplificaron fragmentos de 582 pares de bases del gen *gyrA*, para evaluar la presencia de mutaciones genéticas puntuales asociadas a la resistencia para Levofloxacino. Se usaron los primers específicos *gyrAF* y *gyrAR*. **Anexo 6.**

6.6.6 Amplificación del gen *rdxA*.

Se amplificaron fragmentos de aproximadamente 886 pares de bases del gen *rdxA*, para evaluar la presencia de mutaciones genéticas puntuales asociadas a la resistencia para Metronidazol. Se usaron los primers específicos *rdxAF* y *rdxAR*. **Anexo 7.**

6.6.7 Amplificación del gen *ARNr16S*.

Se amplificaron fragmentos de aproximadamente 120 pares de bases del gen *ARNr 16S*, para evaluar la presencia de mutaciones genéticas puntuales asociadas a la resistencia para Metronidazol. Se usaron los primers específicos *16SF* y *16SR*. **Anexo 8.**

6.7 Electroforesis de productos amplificados.

Los productos amplificados por PCR de cada muestra se evaluaron mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa. Se utilizaron 5 ul de cada muestra para realizar la corrida de electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los parámetros de la corrida fueron de 45 voltios por 1 hora.

6.8 Secuenciamiento de ADN a partir de productos de PCR

Los productos de ADN amplificados por PCR se dispensaron en placas de 96 pocillos y se enviaron a la empresa Macrogen Korea para su secuenciamiento mediante la técnica de secuenciamiento por electroforesis capilar (CES), previo

servicio de purificación de muestras amplificadas. Los resultados de secuenciamiento fueron descargados de la plataforma de MacroGen en formato ab1 y los cromatogramas de las secuencias fueron editados utilizando el software Seqtrace 0.9.0. para generar secuencias consenso para cada producto.

6.9 Alineamiento múltiple de secuencias consenso

Se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias consenso para la identificación de mutaciones genéticas relacionados con la resistencia antimicrobiana para cada uno de los 5 antibióticos. Se consideró la secuencia de referencia obtenida de la cepa ATCC 43504 como control y el alineamiento múltiple de las secuencias se realizó mediante el algoritmo de ClustalW con el software Mega versión 10.0.5, además se incluyeron las secuencias de cepas resistentes y cepas sensibles para cada antibiótico, descargadas el Genbank, como controles en el análisis del alineamiento.

6.11 Análisis estadístico

El presente trabajo de investigación tuvo como variable dependiente el perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas de *H. pylori* y como variable independiente la presencia de mutaciones genéticas identificadas.

Se realizó el cálculo del poder estadístico del tamaño muestral para cada grupo de genes evaluados, donde se consideró la prevalencia de cepas resistentes que presentaron mutaciones (Prevalencia 1) y la prevalencia para aquellos aislados que presentaron mutaciones, pero fueron sensibles (Prevalencia 2). Las prevalencias fueron obtenidas a partir de un ensayo piloto con una submuestra de la cohorte conformada por aislados de pacientes dispépticos con infección por *H. pylori* (n=20). Se utilizó el comando POWER en el software Stata/SE versión 15.1 para

determinar el poder estadístico. Además, se utilizó un análisis bivariado aplicando la prueba ji-cuadrado con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ y el modelo de regresión de Poisson con ajuste de estándares robustos para determinar la significancia estadística y las razones de prevalencias entre la resistencia antimicrobiana de *H. pylori* y las mutaciones genéticas identificadas para cada antibiótico.

VII. RESULTADOS

7.1 Cultivo microbiológico de *H. pylori*

A partir del cultivo microbiológico de 1500 biopsias gástricas colectadas del antro, cuerpo y pliegue angular del estómago de 500 pacientes dispépticos, se obtuvo como resultado el porcentaje de pacientes dispépticos infectados con *H. pylori*.

Tabla 1. Distribución de los pacientes dispépticos según los resultados del cultivo microbiológico de *H. pylori*.

	Positivos	Negativos	Total
Pacientes dispépticos reclutados	273	227	500
	54.6%	45.4%	100%

Según los resultados obtenidos del cultivo microbiológico de *H. pylori* y de acuerdo a la distribución de frecuencias de los pacientes dispépticos, se muestra que 273 pacientes dispépticos presentaron biopsias gástricas positivas para *H. pylori* representando el 42.2% del total de pacientes dispépticos evaluados, mientras que 227 pacientes dispépticos presentaron biopsias gástricas negativas para *H. pylori* representando el 45.4% de pacientes dispépticos evaluados, reportando una prevalencia de infección del 54.6% de pacientes dispépticos con *H. pylori* mediante la técnica de cultivo microbiológico.

Tabla 2. Distribución de pacientes dispépticos según el número de biopsias positivas.

	Número de biopsias positivas			Total
	3 zonas	2 zonas	1 zona	
Pacientes dispépticos reclutados	211	42	20	500
	42.2%	8.4%	4.0%	100%

Adicionalmente se determinó la frecuencia de pacientes dispépticos según el número de biopsias gástricas positivas para *H. pylori*, de acuerdo a las tres zonas del estómago evaluadas (antro, cuerpo y pliegue angular). Se obtuvo que, del total de pacientes dispépticos evaluados, 211 presentaron resultados de biopsias positivas en las 3 zonas del estómago evaluadas, 42 presentaron resultados de biopsias positivas en 2 zonas del estómago y 20 presentaron resultados de biopsias positivas en una sola zona del estómago, representando el 42.2%, 8.4% y 4% respectivamente.

Tabla 3. Distribución de las zonas del estómago evaluadas según el número de biopsias positivas.

Cultivos positivos	n	Porcentaje
Antro	247	33.5%
Cuerpo	242	32.8%
Pliegue angular	248	33.6%
Total	737	100%

Con respecto a la distribución de las zonas del estómago evaluadas según el cultivo microbiológico de *H. pylori*, los resultados muestran que la zona con mayor presencia de *H. pylori* fue la zona del pliegue angular del estómago obteniendo 248

muestras positivas, la zona del antro del estómago con 247 muestras positivas y la zona del cuerpo con 242 muestras positivas.

7.2 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

De acuerdo a las biopsias gástricas positivas y a la viabilidad de los cultivos de *H. pylori*, se obtuvo una muestra de 219 cepas aisladas de *H. pylori*. A partir de esta muestra de cepas aisladas de *H. pylori* se realizaron las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para la determinación de los perfiles de resistencia antimicrobiana para cada uno de los antibióticos evaluados.

Tabla 4. Distribución de las cepas aisladas de *H. pylori* según la resistencia antimicrobiana.

Antibióticos	Cepas evaluadas	Resistentes (%)	Sensibles (%)
Claritromicina	219	77 (35.2)	142 (64.8)
Amoxicilina*	219	143 (65.3) *	76 (34.7) *
Amoxicilina**	219	86 (39.3) **	133 (60.7) **
Levofloxacino	219	158 (72.1)	61 (27.9)
Metronidazol	219	151 (68.9)	68 (31.1)
Tetraciclina	219	17 (7.8)	202 (92.2)

*De acuerdo a los valores de puntos de corte de EUCAST; ** De acuerdo a los valores de puntos de corte de estudios Latinoamericanos.

De acuerdo a la distribución de cepas aisladas de *H. pylori*, se muestra que los porcentajes de resistencias más altos fueron para Levofloxacino y Metronidazol con 72.1% y 68.9% respectivamente, mientras que para Claritromicina se obtuvo un 35.2% de resistencia. Para el caso de Amoxicilina, de acuerdo a los valores de puntos de corte de EUCAST se obtuvo un porcentaje de resistencia del 65.3% y de

acuerdo a los valores de puntos de corte de estudios Latinoamericanos se obtuvo un porcentaje del 39.3%. Finalmente, para el caso de Tetraciclina se obtuvo un porcentaje de resistencia del 7.8%.

7.3 Análisis del poder estadístico

Se realizó el cálculo del poder estadístico del tamaño muestral para cada grupo de genes evaluados y se consideró las prevalencias obtenidas a partir de un ensayo piloto con una submuestra de la cohorte en estudio (n=20); donde se consideró la prevalencia de cepas resistentes que presentaron mutaciones (Prevalencia 1) y la prevalencia para aquellos aislados que presentaron mutaciones, pero fueron sensibles (Prevalencia 2).

Tabla 5. Distribución del poder estadístico del tamaño muestral para cada grupo de genes evaluados.

Antibiótico	Tamaño muestral (cepas evaluadas)	Prevalencia 1	Prevalencia 2	Poder estadístico (%)
Claritromicina	194	75.0	25.0	96.5
Amoxicilina	111	99.0	0.75	97.2
Levofloxacino	195	92.3	42.8	99.6
Metronidazol	147	99.0	0.75	99.3
Tetraciclina	147	0.1	0.05	16.9

7.3 Pruebas moleculares

Mediante el secuenciamiento de productos amplificados y el análisis múltiple de secuencias, se identificaron mutaciones genéticas en 5 grupos de genes: *ARNr23S*, *pbp1*, *gyrA*, *rdxA* y *ARNr16S* de las cepas aisladas de *H. pylori*.

7.3.1 Mutaciones identificadas en el gen *ARNr23S*

A partir del alineamiento múltiple de secuencias del gen *ARNr23S*, se identificaron 10 tipos de mutaciones genéticas dentro del dominio V de este gen (Anexo 9).

Tabla 6. Distribución de las mutaciones identificadas en el gen *ARNr23S* según la resistencia para Claritromicina.

Mutaciones	Cepas resistentes		Cepas sensibles		Total
	n	%	n	%	
G1940A	2	2.7%	1	1.4%	3
C1944T	1	1.4%	2	2.7%	3
G1959A	1	1.4%	1	1.4%	2
G1964A	1	1.4%	0	0.0%	1
T1965C	2	2.7%	0	0.0%	2
C2131T	1	1.4%	0	0.0%	1
A2143G	28	38.4%	3	4.1%	31
A2142G	25	34.2%	0	0.0%	25
A2142C	2	2.7%	0	0.0%	2
C2173T	1	1.4%	2	2.7%	3
Total	64	87.7%	9	12.3%	73

De acuerdo a la distribución de frecuencias de las mutaciones identificadas en el gen *ARNr23S*, se observa que 64 mutaciones fueron identificadas en cepas resistentes; representado el 87.7% del total de mutaciones, mientras que 9

mutaciones fueron identificadas en cepas sensibles, representando el 12.3% del total de mutaciones.

Dentro del grupo de cepas resistentes, se observa que las mutaciones A2143G y A2142G fueron las más prevalentes, representando el 38.4% y 34.2% respectivamente del total de mutaciones identificadas. Además, se observa que, dentro del grupo de cepas sensibles, la mutación A2143G se muestra como la más prevalente, identificada en 3 cepas y representando el 4.1% del total de mutaciones identificadas.

7.3.2 Mutaciones identificadas en el gen *pbp1*

A partir del alineamiento múltiple de secuencias del gen *pbp1*, se identificaron tres tipos de mutaciones genéticas ubicadas en las posiciones de los aminoácidos 69, 141 y 242 del gen evaluado. Anexo 10.

Tabla 7. Distribución de las mutaciones identificadas en el gen *pbp1* según la resistencia para Amoxicilina.

Mutaciones	Cepas resistentes		Cepas sensibles		Total
	n	%	n	%	
A69V	0	0.0%	1	1.2%	1
I141L	32	38.1%	16	19.0%	48
G242(S, D)	21	25.0%	14	16.7%	35
Total	53	63.1%	31	36.9%	84

De acuerdo a la distribución de frecuencias de las mutaciones identificadas en el gen *pbp1*, se observa que 53 mutaciones fueron identificadas en el grupo de cepas resistentes, representado el 63.1% del total de mutaciones, mientras que

31 mutaciones fueron identificadas en cepas sensibles, representando el 36.9% del total de mutaciones.

Dentro del grupo de cepas resistentes para Amoxicilina, se observa que las mutaciones I141L y G242(S,D) fueron las más prevalentes, representado el 38.1% y 25.0% del total de mutaciones identificadas. Sin embargo, también se reportan prevalencias altas de estas mutaciones en el grupo de cepas sensibles, con porcentajes del 19.0% y 16.7% del total de mutaciones identificadas.

7.3.3 Mutaciones identificadas en el gen *gyrA*

A partir del alineamiento múltiple de secuencias del gen *gyrA*, se identificaron 5 tipos de mutaciones genéticas ubicadas en los aminoácidos 87 y 91 de este gen.

Tabla 8. Distribución de las mutaciones identificadas en el gen *gyrA* según la resistencia para Levofloxacino.

Mutaciones	Cepas resistentes		Cepas sensibles		Total
	n	%	n	%	
N87K	26	20.6%	1	0.8%	27
N87I	38	30.2%	1	0.8%	39
D91G	26	20.6%	4	3.2%	30
D91N	20	15.9%	1	0.8%	21
D91Y	9	7.1%	0	0.0%	9
Total	119	94.4%	7	5.6%	126

De acuerdo a la distribución de frecuencias de las mutaciones identificadas en el gen *gyrA*, se observa que 119 mutaciones fueron identificadas en el grupo de cepas resistentes, representado el 94.4% del total de mutaciones; mientras que 7 mutaciones fueron identificadas en el grupo de cepas sensibles, representando el 5.6% del total de mutaciones.

Dentro del grupo de cepas resistentes con respecto a Levofloxacino, se observa que las mutaciones N87I, N87K, D91G y D91Y fueron las más prevalentes, representando el 30.2%, 20.6%, 20.6% y 15.9% del total de mutaciones identificadas, mientras que la mutación D91Y fue identificada en 9 cepas resistentes representando el 7.1% del total de mutaciones. Dentro del grupo de cepas sensibles, la mutación D91G fue la más prevalente identificada en 4 cepas sensibles representando el 3.2%% del total de mutaciones, mientras que las mutaciones N87K, N87I y D91N fueron identificadas cada una en una cepa sensible, representando el 0.8% del total de las mutaciones.

7.3.4 Mutaciones identificadas en el gen *rdxA*

A partir del alineamiento múltiple de secuencias del gen *rdxA*, se identificaron 7 tipos de mutaciones genéticas ubicadas en las posiciones de aminoácidos 16, 62, 80, 118, 131, 197 y 204 dentro de este gen.

Tabla 9. Distribución de las mutaciones identificadas en el gen *rdxA* según la resistencia para Metronidazol.

Mutaciones	Cepas resistentes		Cepas sensibles		Total
	n	%	n	%	
L62V	60	24.6%	30	12.3%	90
K131R	49	20.1%	16	6.6%	65
A118(S, T)	22	9.0%	10	4.1%	32
V204I	18	7.4%	7	2.9%	25
R16(H, C)	15	6.1%	4	1.6%	19
A80T	7	2.9%	0	0.0%	7
Q197K	4	1.6%	2	0.8%	6
Total	175	71.7%	69	28.3%	244

De acuerdo a la distribución de frecuencias de las mutaciones identificadas en el gen *rdxA*, se observa que 175 mutaciones fueron identificadas en cepas resistentes, representado el 71.7% del total de mutaciones, mientras que 69 mutaciones fueron identificadas en cepas sensibles, representando el 28.3% del total de mutaciones.

Dentro del grupo de cepas resistentes, las mutaciones L62V y K131R fueron las más prevalentes, representando el 24.6% y 20.1% del total de mutaciones identificadas. Sin embargo, también se reportan prevalencias altas de estas mutaciones en el grupo de cepas sensibles con porcentajes del 12.3% y 6.6% del total de mutaciones identificadas.

7.3.4 Mutaciones identificadas en el gen *ARNr16S*

A partir del alineamiento múltiple de secuencias del gen *ARNr16S*, se pudo identificar 4 tipos de mutaciones genéticas ubicadas en la posición del triplete 926-928 dentro de este gen.

Tabla 11. Distribución de las mutaciones identificadas en el gen *ARNr16S* según la resistencia para Tetraciclina.

Mutaciones	Cepas resistentes		Cepas sensibles		Total
	n	%	n	%	
AGA (926-928) GGA	0	0.0%	3	42.9%	3
AGA (926-928) CGA	0	0.0%	2	28.6%	2
AGA (926-928) AGC	0	0.0%	1	14.3%	1
AGA (926-928) GGC	0	0.0%	1	14.3%	1
Total	0	0.0%	7	100.0%	7

De acuerdo a la distribución de frecuencias de las mutaciones identificadas en el gen *ARNr16S*, no se identificaron mutaciones genéticas en el grupo de cepas

resistentes. Las 7 mutaciones identificadas se encuentran en el grupo de cepas sensibles, representado el 100.0% del total de mutaciones para este gen. La mutación AGA(926-928)GGA fue identificada en 3 cepas sensibles representando el 42.9% del total de mutaciones genéticas identificadas. Además, se identifican las mutaciones AGA(926-928)CGA en 2 cepas y las mutaciones AGA(926-928)AGC y AGA(926-928)GGC ambas solo en una cepa sensible para Tetraciclina.

7.4 Asociación entre la resistencia antimicrobiana y las mutaciones genéticas

Se determinó la asociación entre las mutaciones genéticas identificadas y los perfiles de resistencia antimicrobiana evaluados para cada uno de los antibióticos evaluados: Claritromicina, Amoxicilina, Levofloxacino, Metronidazol y Tetraciclina. Para evaluar la asociación se empleó el análisis estadístico mediante la prueba ji-cuadrado con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ en la distribución de frecuencias.

7.4.1 Resistencia a Claritromicina

A partir de la prueba ji-cuadrado aplicada con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, se determinó la asociación entre los perfiles de resistencia antimicrobiana para Claritromicina y los 10 tipos de mutaciones genéticas identificadas en el gen *ARNr23S*.

Tabla 12. Distribución de las cepas aisladas de *H. pylori* según la asociación entre la resistencia antimicrobiana a Claritromicina y las mutaciones identificadas en el gen *ARNr23S*.

Mutaciones	Cepas resistentes	Cepas sensibles	Total	p
Mutación G1940A				0.276
Con mutaciones	2	1	3	
	66.7%	33.3%	100.0%	
Sin mutaciones	69	122	191	
	36.1%	63.9%	100.0%	
Mutación C1944T				0.906
Con mutación	1	2	3	
	33.3%	66.7%	100.0%	
Sin mutación	70	121	191	
	36.6%	63.4%	100.0%	
Mutación G1959A				0.692
Con mutaciones	1	1	2	
	50.0%	50.0%	100.0%	
Sin mutaciones	70	122	192	
	36.5%	63.5%	100.0%	
Mutación G1964A				0.187
Con mutaciones	1	0	1	
	100.0%	0.0%	100.0%	
Sin mutaciones	70	123	193	
	36.3%	63.7%	100.0%	
Mutación T1965C				0.061
Con mutaciones	2	0	2	
	100.0%	0.0%	100.0%	
Sin mutaciones	69	123	192	
	35.9%	64.1%	100.0%	
Mutación C2131T				0.187
Con mutaciones	1	0	1	
	100.0%	0.0%	100.0%	
Sin mutaciones	70	123	193	
	36.3%	63.7%	100.0%	
Mutación A2142G				<0.001
Con mutaciones	25	0	25	
	100.0%	0.0%	100.0%	
Sin mutaciones	46	123	169	
	27.2%	72.8%	100.0%	
Mutación A2142C				0.061
Con mutaciones	2	0	2	
	100.0%	0.0%	100.0%	
Sin mutaciones	69	123	192	
	35.9%	64.1%	100.0%	
Mutación A2143G				<0.001
Con mutaciones	28	3	31	
	90.3%	9.7%	100.0%	

Sin mutaciones	43	120	163	
	26.4%	73.6%	100.0%	
<hr/>				
Mutación C2173T				0.906
Con mutaciones	1	2	3	
	33.3%	66.7%	100.0%	
Sin mutaciones	70	121	191	
	36.6%	63.4%	100.0%	

De acuerdo a estos resultados, se reporta que las mutaciones más prevalentes, A2143G y A2142G, identificadas en 31 y 25 cepas respectivamente, están significativamente relacionadas con la resistencia antimicrobiana para Claritromicina ($p < 0.05$). Se reporta también, que las 8 mutaciones restantes, observadas con menores frecuencias, no presentan una relación significativa con los valores de cepas resistentes para este antibiótico ($p > 0.05$).

7.4.1 Resistencia a Amoxicilina

A partir de la prueba ji-cuadrado aplicada con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se determinó la asociación entre los perfiles de resistencia antimicrobiana para Amoxicilina y cada uno de los 3 tipos de mutaciones genéticas identificadas en el gen *pbp1*.

Tabla 13. Distribución de las cepas aisladas de *H. pylori* según la asociación entre la resistencia antimicrobiana a Amoxicilina y las mutaciones identificadas en el gen *pbp1*.

Mutaciones	Cepas resistentes	Cepas sensibles	Total	p
<hr/>				
Mutación I141L				
Con mutaciones	32	16	48	
	66.7%	33.3%	100.0%	0.393
Sin mutaciones	37	26	63	

	58.7%	41.3%	100.0%	
Mutación G242(S,D)				
Con mutación	21	14	35	
	60.0%	40.0%	100.0%	0.750
Sin mutación	48	28	76	
	63.2%	36.8%	100.0%	
Mutación A69V				
Con mutaciones	0	1	100.0%	
	0.0%	100.0%	100.0%	0.198
Sin mutaciones	69	41	110	
	62.7%	37.3%	100.0%	

De acuerdo a estos resultados, se observa que los perfiles de resistencia antimicrobiana para Amoxicilina no muestran una relación significativa con ninguna de las 3 mutaciones identificadas en el gen *pbp1* ($p > 0.05$). A pesar

7.4.1 Resistencia a Levofloxacin

A partir de la prueba ji-cuadrado aplicada con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se determinó la asociación entre los perfiles de resistencia antimicrobiana para Levofloxacin con cada uno de los 5 tipos de mutaciones genéticas identificadas en el gen *gyrA*.

Tabla 14. Distribución de las cepas aisladas de *H. pylori* según la asociación entre la resistencia antimicrobiana a Levofloxacin y las mutaciones identificadas en el gen *gyrA*.

Mutaciones	Cepas resistentes	Cepas sensibles	Total	p
Mutación N87K				
Con mutaciones	26	1	27	
	96.3%	3.7%	100.0%	0.002
Sin mutaciones	114	54	168	
	67.9%	32.1%	100.0%	
Mutación N87I				<0.001

Con mutación	38	1	39	
	97.4%	2.6%	100.0%	
Sin mutación	102	54	156	
	65.4%	34.6%	100.0%	
<hr/>				
Mutación D91G				
Con mutaciones	26	4	30	
	86.7%	13.3%	100.0%	0.049
Sin mutaciones	114	51	165	
	69.1%	30.9%	100.0%	
<hr/>				
Mutación D91N				
Con mutación	20	1	21	
	95.2%	4.8%	100.0%	0.011
Sin mutación	120	54	174	
	69.0%	31.0%	100.0%	
<hr/>				
Mutación D91Y				
Con mutaciones	9	0	9	
	100.0%	0.0%	100.0%	0.054
Sin mutaciones	131	55	186	
	70.4%	29.6%	100.0%	

De acuerdo a estos resultados, se observa que las mutaciones más prevalentes N87I, N87K, D91G y D91N, presentan una relación significativa con la resistencia antimicrobiana a Levofloxacino, con un valor de $p < 0.05$. Mientras que la mutación D91Y identificada solo en 9 cepas resistentes a Levofloxacino, no muestra tener una relación significativa con la resistencia a Levofloxacino, con un valor de $p > 0.05$.

7.4.1 Resistencia a Metronidazol

A partir de la prueba ji-cuadrado aplicada con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se determinó la asociación entre los perfiles de resistencia antimicrobiana para Metronidazol con cada uno de los 7 tipos de mutaciones genéticas identificadas en el gen *rdxA*.

Tabla 15. Distribución de las cepas aisladas de *H. pylori* según la asociación entre la resistencia antimicrobiana a Metronidazol y las mutaciones identificadas en el gen *rdxA*.

Mutaciones	Cepas resistentes	Cepas sensibles	Total	p
Mutación L62V				
Con mutaciones	60	30	90	0.657
	66.7%	33.3%	100.0%	
Sin mutaciones	40	17	57	
	70.2%	29.8%	100.0%	
Mutación K131R				
Con mutación	49	16	65	0.089
	75.4%	24.6%	100.0%	
Sin mutación	51	31	82	
	62.2%	37.8%	100.0%	
Mutación A118(S,T)				
Con mutaciones	22	10	32	0.921
	68.8%	31.3%	100.0%	
Sin mutaciones	78	37	115	
	67.8%	32.2%	100.0%	
Mutación V204I				
Con mutación	18	7	25	0.640
	72.0%	28.0%	100.0%	
Sin mutación	82	40	122	
	67.2%	32.8%	100.0%	
Mutación R16(H,C)				
Con mutaciones	15	4	19	0.274
	78.9%	21.1%	100.0%	
Sin mutaciones	85	43	128	
	66.4%	33.6%	100.0%	
Mutación A80T				
Con mutación	7	0	7	0.063
	100.0%	0.0%	100.0%	
Sin mutación	93	47	140	
	66.4%	33.6%	100.0%	
Mutación Q197K				
Con mutaciones	4	2	6	0.942
	66.7%	33.3%	100.0%	
Sin mutaciones	96	45	141	
	68.1%	31.9%	100.0%	

De acuerdo a estos resultados, se observa que las mutaciones más prevalentes L62V, K131R, A118(S,T), V204I y R16(H,C) no presentan una relación significativa con la resistencia antimicrobiana a Metronidazol, con un valor de $p > 0.05$. Asimismo, la mutación A80T identificada solo en 7 cepas resistentes y la la mutación Q197K, identificada en 4 cepas resistentes y 2 cepas sensibles, tampoco muestran una relación significativa ($p > 0.05$).

7.4.1 Resistencia a Tetraciclina

A partir de la prueba ji-cuadrado aplicada con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se determinó la asociación entre los perfiles de resistencia antimicrobiana para Tetraciclina con cada uno de los 4 tipos de mutaciones genéticas identificadas en el gen *ARNr16S*.

Tabla 16. Distribución de las cepas aisladas de *H. pylori* según la asociación entre la resistencia antimicrobiana a Tetraciclina y las mutaciones identificadas en el gen *ARNr16S*.

Mutaciones	Cepas resistentes	Cepas sensibles	Total	p
Mutación AGA(926-928)GGA				
Con mutaciones	0	3	3	0.770
	0.0%	100.0%	100.0%	
Sin mutaciones	4	140	144	0.770
	2.8%	97.2%	100.0%	
Mutación AGA(926-928)CGA				
Con mutación	0	2	2	0.812
	0.0%	100.0%	100.0%	
Sin mutación	4	141	145	0.812
	2.8%	97.2%	100.0%	
Mutación AGA(926-928)AGC				0.867

Con mutaciones	0	1	1	
	0.0%	100.0%	100.0%	
Sin mutaciones	4	142	146	
	2.7%	97.3%	100.0%	
<hr/>				
Mutación AGA(926-928)GGC				
Con mutación	0	1	1	
	0.0%	100.0%	100.0%	0.867
Sin mutación	4	142	146	
	2.7%	97.3%	100.0%	

De acuerdo a estos resultados, se observa que las mutaciones AGA(926-928)GGA, AGA(926-928)CGA, AGA(926-928)AGC y AGA(926-928)GGC, identificadas todas en cepas sensibles, no muestran tener una relación significativa con la resistencia a tetraciclina, con un valor de $p > 0.05$.

7.5 Razones de prevalencia entre la resistencia antimicrobiana y las mutaciones genéticas identificadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis bivariado aplicando el modelo de regresión de Poisson con ajuste de estándares robustos, se obtuvieron las razones de prevalencias entre las mutaciones genéticas identificadas y las resistencias antimicrobianas de *H. pylori* para cada uno de los antibióticos evaluados.

Tabla 17. Distribución de las cepas aisladas de *H. pylori* según las razones de prevalencia entre la resistencia antimicrobiana y las mutaciones genéticas identificadas.

	Cepas resistentes	Cepas sensibles	RP	IC 95%	p
Claritromicina					
A2143G	28	3	3.4	[2.6-4.5]	<0.001

A2142G	25	0	3.7	[2.9-4.7]	<0.001
G1940A	2	1	1.8	[0.8-4.2]	0.145
C1944T	1	2	0.9	[0.2-4.6]	0.908
C2173T	1	2	0.9	[0.2-4.6]	0.908
A2142C	2	0	2.8	[2.3-3.4]	<0.001
G1959A	1	1	1.4	[0.3-5.6]	0.659
T1965C	2	0	2.8	[2.3-3.4]	0.000
G1964A	1	0	2.8	[2.3-3.3]	0.000
C2131T	1	0	2.8	[2.3-3.3]	0.000
<hr/>					
Amoxicilina					
I141L	32	16	1.1	[0.9-1.5]	0.390
G242(S, D)	21	14	1.0	[0.7-1.3]	0.755
A69V	0	1	0.0	[0.0-0.0]	0.000
<hr/>					
Levofloxacino					
N87I	38	1	1.5	[1.3-1.7]	<0.001
D91G	26	4	1.3	[1.1-1.5]	0.011
N87K	26	1	1.4	[1.2-1.6]	<0.001
D91N	20	1	1.4	[1.2-1.6]	<0.001
D91Y	9	0	1.4	[1.3-1.6]	<0.001
<hr/>					
Metronidazol					
L62V	60	30	1.0	[0.8-1.2]	0.654
K131R	49	16	1.2	[1.0-1.5]	0.086
A118(S, T)	22	10	1.0	[0.8-1.3]	0.921
V204I	18	7	1.1	[0.8-1.4]	0.624
R16(H, C)	15	4	1.2	[0.9-1.6]	0.199
A80T	7	0	1.5	[1.3-1.7]	<0.001
Q197K	4	2	1.0	[0.6-1.8]	0.943
<hr/>					
Tetraciclina					
AGA(926-928)GGA	0	3	0.0	[0.0-0.0]	<0.001
AGA(926-928)CGA	0	2	0.0	[0.0-0.0]	<0.001
AGA(926-928)AGC	0	1	0.0	[0.0-0.0]	<0.001
AGA(926-928)GGC	0	1	0.0	[0.0-0.0]	<0.001

RP: razón de prevalencia; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; p: probabilidad.

Para el caso de Claritromicina las mutaciones A2143G y A2142G identificadas en el gen *ARNr23S* presentaron una razón de prevalencia de 3.4 y 3.7 respectivamente resultados estadísticamente significativos con un valor de $p < 0.05$. Así mismo, las

mutaciones A2142C, T1965C, G1964A y C2131T mostraron tener una razón de prevalencia de 2.8, resultados estadísticamente significativos con valores de $p < 0.05$ y las mutaciones G1940A, C1944T, C2173T y G1959A por debajo de 2.8, resultados estadísticamente no significativos con valores de $p > 0.05$.

Para el caso Amoxicilina, las mutaciones I141L y G242(S,D) presentan razones de prevalencia de 1.1 y 1.0, resultados no significativos estadísticamente con valores de $p > 0.05$.

Para el caso de Levofloxacino, se evidencia que las prevalencias de las 5 mutaciones identificadas en el gen *gyrA*, presentan una asociación significativa con respecto a la resistencia para Levofloxacino, con una razón de prevalencia entre 1.3 y 1.5 ($p < 0.05$).

Para el caso de Metronidazol, las mutaciones L62V, K131R, A118(S, T), V204I, R16(H, C) y Q197K presentan razones de prevalencia entre 1.0 y 1.2, resultados estadísticamente no significativos con un valor de $p > 0.05$. Sin embargo, la mutación A80T, identificada en 7 cepas resistentes, presenta una razón de prevalencia de 1.5 con un valor de $p < 0.05$.

Para el caso de Tetraciclina, las mutaciones AGA(926-928)GGA, AGA(926-928)CGA, AGA(926-928)AGC y AGA(926-928)GGC, identificadas todas en cepas sensibles, presentan razones de prevalencia de 0.0, resultados con valores de $p > 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación representa uno de los primeros estudios en el cual se utiliza la técnica de cultivo microbiológico para evaluar la prevalencia de la infección causada por *H. pylori* en una población de pacientes dispépticos peruanos. Se procesaron 1500 biopsias gástricas colectadas del antro, cuerpo y pliegue angular del estómago de 500 pacientes dispépticos, obteniendo como resultado una prevalencia de infección del 54.6%. La prevalencia de infección por *H. pylori*, que obtuvimos en un sistema de salud privado como la Clínica Médica Cayetano Heredia y público como el Hospital Cayetano Heredia, se asemeja a lo reportado por Pareja et al., 2017 en su estudio de seroprevalencia de infección de *H. pylori* en una población de Lima – Perú. En este último estudio, calcularon una prevalencia de 63.6% mediante la prueba de inmunoserología rápida por la técnica de inmunocromatografía de flujo lateral. Estas prevalencias se asemejan con lo reportado por Oporto et al., 2019, en su estudio de prevalencia de infección de *H. pylori* evaluado en los sistemas de salud público y privado del sur de Chile, quienes obtuvieron una prevalencia del 45.4% y a lo reportado por Hooi et al., 2017, quienes calcularon una prevalencia del 63.4% a nivel de Latinoamérica. Estos estudios nos enseñan que la prevalencia de infección causada por *H. pylori* muestra diferencias significativas dentro y entre países. Algunos estudios han reportado que los niveles socioeconómicos bajos están asociados con un incremento en la prevalencia de infección de *H. pylori*. Por lo tanto, aunque la prevalencia de la infección causada por *H. pylori* es variable alrededor del mundo, generalmente en países desarrollados es más baja que en países en desarrollo. (Tirado-Hurtado, y otros, 2018). Los países reportados con los porcentajes de prevalencias más altos son los países africanos (Nigeria 89.7%, Sudáfrica 86.8% y República Democrática del Congo 77.4%) y los

países del este de Asia (China 80.4%, Taiwán 68.3% y Corea 64.7%) (Hooi et al., 2017).

La infección causada por *H. pylori* es considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades gastrointestinales y en última instancia el cáncer gástrico, siendo esta bacteria categorizada como agente carcinógeno del grupo 1 mostrando tener un papel predominante en la etiología del cáncer gástrico (Constanza Camargo, et al., 2014). El Perú, es un país en el cual se reporta la incidencia del cáncer gástrico en alrededor de 15.8 por cada 100 000 habitantes, siendo ésta la segunda enfermedad del tipo oncológica más común en varones y la tercera en mujeres, representando el 14.7 % de las causas de mortalidad por cáncer en varones y 13.4 % en mujeres. (Boehnke, et al., 2017). Por lo tanto, la elección del tratamiento contra la infección de *H. pylori* es importante para la erradicación y la disminución de enfermedades gastrointestinales relacionadas con esta infección.

La técnica de cultivo microbiológico es aún poco usada como método de diagnóstico para la infección causada por *H. pylori*. Esto debido al extenso tiempo de incubación de las muestras de biopsias gástricas y al requerimiento específico de microaerofilia para el desarrollo de colonias típicas de *H. pylori*. Incluso siendo esta bacteria considerada de difícil crecimiento *in vitro*; la aplicación de esta técnica microbiológica nos dio la oportunidad de emplear los cultivos bacterianos para realizar posteriormente las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y así poder caracterizar la resistencia con respecto a los antibióticos más comúnmente usados en el tratamiento de la infección.

Entonces, después de haber establecido las condiciones óptimas para el cultivo microbiológico de *H. pylori* a partir del procesamiento de las biopsias gástricas, el siguiente objetivo fue determinar la resistencia antimicrobiana a nivel fenotípico. En este contexto, la posibilidad de poder cultivar la bacteria fue indispensable para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de microdilución en caldo a partir de cada cepa aislada, obteniendo los perfiles de resistencia antimicrobiana para 5 antibióticos y posteriormente mediante las técnicas moleculares, identificar las mutaciones genéticas relacionadas.

Los mayores porcentajes de resistencia antimicrobiana obtenidos en el presente estudio fueron Claritromicina 35.2%, Amoxicilina 39.3%, Metronidazol 68.9% y Levofloxacino 72.1%. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Boehnke et al., 2017, quienes aplicando la técnica de tiras E-test para la determinación in vitro de la resistencia antimicrobiana, reportaron unas resistencias a Claritromicina 35.5%, Amoxicilina 35.5%, Metronidazol 61.8% y Levofloxacino 53.9%. Estos resultados demuestran que los aislados clínicos de *H. pylori* obtenidos en ambos estudios son resistentes a uno o más de los antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de la infección.

Sin embargo, para la emplear la técnica de microdilución en caldo, se tuvo como principal requerimiento la disponibilidad de cultivos puros de *H. pylori*, con una concentración adecuada de bacterias de 10^7 bacterias/ml. Por lo que, se realizaron repiques de las cepas aisladas en medios de cultivo frescos para aumentar su concentración. Por lo tanto, esta metodología podría estar omitiendo el estudio de bacterias causantes de infecciones policlonales mixtas que podrían estar colonizando en un mismo paciente dispéptico.

De acuerdo a los resultados de las pruebas moleculares realizadas en el gen *ARNr23S*, se identificaron 57 cepas aisladas de *H. pylori* con la presencia de 10 tipos de mutaciones genéticas dentro de este gen. Al realizar la asociación entre las mutaciones genéticas identificadas y la resistencia antimicrobiana a Claritromicina, se observan dos tipos de mutaciones significativamente relacionadas con la resistencia a este antibiótico: la mutación A2143G y A2142G. Ambas mutaciones fueron identificadas en 28 y 25 cepas de *H. pylori*, con razones de prevalencia de 3.4 y 3.7 respectivamente ($p < 0.05$). Por lo tanto, estos resultados nos indican una alta probabilidad de que una cepa que tenga estas mutaciones sea resistente a Claritromicina. Este antibiótico tiene una acción bacteriostática que interfiere con la síntesis de las proteínas a través de su unión reversible con el dominio V del *ARNr23S* en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. La presencia de las mutaciones A2143G, A2142G, y A2142C tiene como consecuencia una disminución de la afinidad del antibiótico por el ribosoma, acumulativamente resultando en la ausencia de unión de Claritromicina por la subunidad ribosomal 50S. Por lo tanto, estas mutaciones estarían limitando la interacción del antibiótico con su blanco, siendo las más reportadas y explicando casi el 90% de la resistencia primaria a Claritromicina en países occidentales.

Así mismo, en nuestro estudio también se evidencia un alto porcentaje de cepas resistentes que no presentan ninguna de las mutaciones conocidas. Por lo tanto, se considera que existen otros tipos de mecanismos que probablemente estén siendo involucrados en la resistencia a este antibiótico ampliamente usado para el tratamiento de la infección de *H. pylori*. La expresión y activación de bombas de eflujo, las cuales son capaces de eliminar drogas del interior de las células bacterianas, pueden tener significancia también en el desarrollo de la resistencia a

Claritromicina. Además la presencia de las proteínas de membrana externa conocidas como OMPs (outer membrane proteins) han sido reportadas como relacionadas a la resistencia antimicrobiana en muchas bacterias Gram negativas, sugiriendo que las mutaciones en los genes *infB* o *rdl22* tendrían un efecto acumulativo en la resistencia a Claritromicina (Hu et al., 2016).

Con respecto a la resistencia para Amoxicilina, se reporta un 65.3% de cepas resistentes a este antibiótico, este porcentaje disminuye si aplicamos el valor de cutoff de ≥ 1 ($\mu\text{g/mL}$) referido en trabajos de investigación a nivel sudamericano (Trespacios, et al., 2010). En este caso, la resistencia para este antibiótico es de 39.3%. Resultado semejante a lo obtenido por Boehnke et al., 2017, observando que la resistencia para este antibiótico (resistencia del 32.9%) se mantiene relativamente alta para ser un antibiótico usado en la primera línea de tratamiento. Resultados de resistencia alta, también reportados en países africanos, en donde el uso de Amoxicilina es desmedido debido principalmente a su bajo costo en formulación oral tanto en zonas urbanas como rurales. Jaka et al., 2018 en su trabajo de revisión, que engloba 26 artículos científicos a nivel del continente africano, reportan que la resistencia a Amoxicilina se encuentra en un 72.6% (95% IC: 68.6-76.6), resultados obtenidos usando principalmente la técnica de difusión de disco y el E-test en 1530 aislados de *H. pylori*. Por lo tanto, la resistencia para Amoxicilina, podría estar explicada debido al uso indiscriminado que se le da a este antibiótico, incluso en el tratamiento denominado “terapia triple” que es seleccionado empíricamente y es reportado con tasas de erradicación cada vez más bajas; contribuyendo también al aumento de la resistencia. No obstante, estos resultados muestran discrepancia cuando los comparamos con lo reportado por Trespacios et al 2010, quienes reportan una resistencia a Amoxicilina relativamente baja del

3.8% en pacientes dispépticos colombianos aplicando el método de dilución en agar para evaluar la resistencia antimicrobiana, también discrepan con los resultados de resistencia obtenidos en el trabajo de Guzmán, 2016, quien obtuvo una resistencia a Amoxicilina del 4.6%, en una muestra de pacientes dispépticos reclutados de la Clínica Médica Cayetano Heredia. Probablemente estas diferencias en los resultados nos evidencian la heterogeneidad de las poblaciones de pacientes dispépticos y una posible relación de los niveles de resistencia antimicrobiana basada en el uso desmedido de este antibiótico para combatir otras infecciones bacterianas.

De acuerdo a la caracterización molecular de la resistencia a Amoxicilina, se evidencia una múltiple sustitución de nucleótidos dentro del gen *pbp1*, identificando principalmente 2 mutaciones del tipo no sinónimas con una alta prevalencia. La mutación I141L identificada en 48 cepas con una prevalencia del 43.2% y la mutación G242(S, D) identificada en 35 cepas con una prevalencia del 31.5%. Sin embargo, estas mutaciones no muestran tener una relación significativa con la resistencia a amoxicilina ($p > 0.05$). A diferencia de otros trabajos, no se identificó la mutación N562Y, considerada como la más común a nivel de cepas resistentes, reportada por Rimbara et al., 2007. Tampoco se identificó la mutación T556S reportada por Matteo et al., 2008, en cepas resistentes. Sin embargo, se evidencia una alta variabilidad genética reportada para este gen y la posible actuación de otro mecanismo u otra mutación que esté implicada en la resistencia para este antibiótico.

Otro antibiótico que mostró un alto porcentaje de resistencia antimicrobiana fue Levofloxacino, reconocido por ser una quinolona de amplio espectro, utilizada

dentro de los tratamientos alternativos para *H. pylori*. Según los resultados del presente estudio, la resistencia a levofloxacino alcanza un 72.1%, resultado que se asemeja a lo reportado en los trabajos de Guzmán 2016 y Boehnke et al., 2017, quienes obtuvieron resistencias de 45.5% y 53.9% respectivamente, ambos trabajos realizados también en cepas de *H. pylori* extraídas de pacientes dispépticos peruanos reclutados de la Clínica Médica Cayetano Heredia y del Hospital Cayetano Heredia respectivamente. Se evidencia entonces un incremento en la resistencia para este antibiótico en el tiempo. Este incremento podría estar explicado debido al uso constante de quinolonas como tratamiento para otras infecciones bacterianas, entre las que se incluyen infecciones de las vías urinarias y respiratorias (Redgrave et al., 2014). Adicionalmente, mediante las pruebas moleculares, se identificaron 5 mutaciones genéticas importantes: N87I, D91G, N87K, D91N y D91Y; ubicadas en el gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la DNA girasa. Estas mutaciones ocasionan una sustitución de aminoácidos en la región QRDR (región determinante de la resistencia a quinolonas) y estarían interfiriendo en el mecanismo de acción del antibiótico. De acuerdo al análisis de asociación entre las mutaciones genéticas identificadas y la resistencia antimicrobiana Levofloxacino, se reporta una relación significativa con las mutaciones N87I, D91G, N87K, D91N con valores de $p < 0.05$; con excepción de la mutación D91Y, esta última solo identificada en 9 cepas resistentes. De acuerdo al análisis de razones de prevalencia, las cepas que presenten estas mutaciones tienen 1.3 a 1.5 veces más probabilidad de expresar resistencia a este antibiótico con valores de $p < 0.05$. Estos resultados, se asemejan a los reportado por Miftahussurur et al 2016, quienes también reportan las mutaciones en las posiciones 87 y 91 como las mutaciones más predominantes en cepas resistentes a Levofloxacino,

relacionadas con la resistencia para Levofloxacino. Sin embargo, en el trabajo de Hanafi et al., 2016, en donde inducen a 5 cepas sensibles a Levofloxacino a desarrollar resistencia a este antibiótico, reportan que las mutaciones en estas posiciones no demuestran una relación significativa con la resistencia, sin embargo, este estudio realizado solo 5 cepas con una resistencia inducida in vitro a Levofloxacino podría no reflejar lo que sucede in vivo con cepas de *H. pylori* y su resistencia antimicrobiana.

Con respecto a Metronidazol, se reporta un porcentaje de resistencia de 69.9%, porcentaje que se asemeja a lo reportado por Boehnke et al., 2017, quienes obtuvieron un 61.8% de resistencia en cepas aisladas de pacientes dispépticos del Hospital Cayetano Heredia. Sin embargo, estos resultados difieren a lo reportado por Guzmán 2016, quien obtuvo un 29.6% de cepas resistentes en su trabajo de investigación realizado en pacientes dispépticos reclutados exclusivamente de la Clínica Médica Cayetano Heredia. De acuerdo al análisis genético realizado en una muestra de 147 cepas, se pudieron identificar 4 tipos de mutaciones más prevalentes: L62V, K131R, A118(S, T) y V204I dentro del gen *rdxA* con una frecuencia del 61.2%, 44.2%, 21.8% y 17.0% respectivamente. De acuerdo a estos resultados se evidencia una alta diversidad genética en las secuencias del gen *rdxA* de las cepas aisladas de *H. pylori*. Sin embargo, según el análisis de asociación realizado entre las mutaciones genéticas identificadas y la resistencia antimicrobiana a Metronidazol, no se muestran valores significativos de asociación en ninguna de estas mutaciones ($p > 0.05$). Por lo tanto, las altas frecuencias de mutaciones genéticas reportadas en el presente estudio no presentan una relación significativa con la alta resistencia antimicrobiana para Metronidazol. Posiblemente otros mecanismos de resistencia estén implicados en la resistencia de estas cepas.

Estos resultados se asemejan a los reportados por Kim et al., 2009, quienes reportan que la resistencia a Metronidazol podría estar asociado a otros factores distintos a las mutaciones en el gen *rdxA*, sugiriendo que la asociación entre las mutaciones en este gen y la resistencia a Metronidazol es todavía controversial y otros factores de resistencia podrían estar involucrados, como la actividad incrementada de enzima que reparan el ADN, reducción de la captación y aumento de salida del antibiótico y reducción de la actividad de las nitroreductasas.

Por último, los resultados de resistencia antimicrobiana para Tetraciclina en el presente trabajo se mantienen relativamente bajos (7.8%). Estos resultados se asemejan a lo reportado por Boehnke et al 2017 quienes obtuvieron un 3.9% de resistencia empleando la técnica del E-test en cepas de *H. pylori* aisladas también aisladas de pacientes dispépticos peruanos. Por lo tanto, ambos resultados podrían estar indicando que la resistencia a Tetraciclina se ha conservado relativamente baja con relación a los demás antibióticos. Esto probablemente debido a que este antibiótico, solo es recetado en tratamientos de segunda o tercera línea para la erradicación de *H. pylori* y no como tratamiento de primera línea, ya que no forma parte de la denominada terapia triple (tratamiento empíricamente más recetado contra la infección por *H. pylori*). Con el uso de técnicas moleculares se evaluaron 147 cepas de *H. pylori*, logrando identificar mutaciones genéticas puntuales dentro del gen *ARNr16S* en la posición de nucleótidos 926-928 en 7 cepas. Dadashzadeh et al., 2014 en su trabajo de medida de la resistencia a Tetraciclina en cepas de *H. pylori* también aisladas de pacientes dispépticos, reportan que las mutaciones en el gen *ARN 16S* en la posición 926-928 están presentes solo en cepas resistentes. Sin embargo, al evaluar la relación entre la resistencia a Tetraciclina reportada en el presente trabajo y la distribución de las frecuencias de mutaciones identificadas, no

se observa una relación significativa ($p > 0.05$). La cantidad de cepas resistentes a este antibiótico es relativamente baja en comparación con los otros antibióticos evaluados. Además, debido a la prevalencia baja de cepas resistentes a este antibiótico, se reportó 4 cepas resistentes en una muestra de 147.

Para el caso de cepas sensibles que presentaron las mutaciones evaluadas en el presente estudio, como es el caso de las cepas sensibles para Claritromicina que presentaron la mutación A2143G, si bien es un grupo reducido de cepas ($n=3$), esto podría explicarse de acuerdo a las diferencias reportadas entre los distintos tipos pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para *H. pylori*. Piccolini et al., 1997 en su evaluación comparativa de pruebas de susceptibilidad de *H. pylori*, reportan que los métodos E-test, dilución en agar y microdilución en caldo, muestran una buena concordancia para la determinación de la resistencia antimicrobiana de *H. pylori*. No obstante, una de las diferencias entre los cultivos en medio sólido (E-test y dilución en agar) y los cultivos en medio líquido (microdilución en caldo), es la posibilidad de cultivar *H. pylori* con suplementos provenientes de la sangre, aprovechando la actividad hemolítica de esta bacteria. A pesar de que el método de microdilución en caldo es suplementado con suero fetal bovino al 10% e Isovitalax® al 1% para el cultivo de *H. pylori*, este método no es considerado el “gold estándar” para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana en *H. pylori*, como lo es el E-test.

Sin embargo, la capacidad de evaluar múltiples antibióticos bajo diferentes concentraciones en una misma placa de cultivo, es uno de los principales beneficios del método de microdilución en caldo. Esta capacidad se aprovechó para evaluar la resistencia antimicrobiana in vitro para 5 antibióticos, que son los antibióticos más

usados en los tratamientos de erradicación, bajo diferentes concentraciones y en una muestra de 219 cepas aisladas de *H. pylori*, obteniendo resultados que se asemejan con otros estudios a nivel sudamericano (Boehnke et al., 2017). Entonces, consideramos que el método de microdilución en caldo es una alternativa adecuada para la evaluación de la resistencia antimicrobiana para un gran número de cepas, especialmente si consideramos que *H. pylori* es una bacteria catalogada de difícil cultivo in vitro, debido a sus requerimientos de microaerofilia y a su tiempo prolongado de incubación (Tirado et al., 2018).

IX. CONCLUSIONES

- Se determinó la prevalencia de infección de *H. pylori* en 54.6% mediante la técnica de cultivo microbiológico a partir del procesamiento de 1500 biopsias gástricas colectadas de 500 pacientes dispépticos reclutados voluntariamente desde enero del 2016 hasta febrero del 2017 en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Cayetano Heredia y de la Clínica Médica Cayetano Heredia.
- Con respecto a la resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas de *H. pylori*, se evidencia una alta resistencia a los antibióticos más comúnmente usados para el tratamiento de la infección. Se reporta una resistencia antimicrobiana para Claritromicina de 35.2%, Amoxicilina de 65.3%, Metronidazol de 68.9%, Levofloxacino de 72.1% y Tetraciclina de 7.8%.
- Las mutaciones genéticas A2143G, A2142G y A2142C identificadas en el gen *ARNr23S* y las mutaciones N87I, D91G, N87K, D91N y D91Y en el gen *gyrA*, muestran tener una relación significativa con la resistencia a Claritromicina y Levofloxacino respectivamente. Además, se reporta un alto porcentaje de cepas resistentes que no presentan ninguna de estas mutaciones evaluadas, evidenciando la presencia de otros mecanismos que podrían estar relacionados con la resistencia a estos antibióticos.
- Se reporta una alta diversidad genética en los genes *pbp1* y *rdxA*, con mutaciones que no muestran una relación significativa con la alta resistencia a Amoxicilina y Metronidazol respectivamente. Del mismo modo se reporta la presencia de mutaciones en las posiciones 926-928 del gen *ARNr16s*, sin

presentar una relación significativa con la baja resistencia determinada para Tetraciclina.

- La caracterización de las mutaciones puntuales identificadas en el dominio V del gen *ARNr 23S* y del gen *gyrA*, pueden contribuir a explicar los perfiles de resistencia altos reportados para los antibióticos Claritromicina y Levofloxacino respectivamente, ayudando a mejorar la información para la elección de los tratamientos más efectivos en la elección de un tratamiento.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arslan , N., Yilmaz, O., & Demiray-Gurbuz, E. (2017). Importance of antimicrobial susceptibility testing for the management of eradication in *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*, 23(16), 2854-2869.
2. Bastos, J., Peleteiro, Rita Barros, Alves, L., Severo, M., Pina, M., . . . Lunet, N. (2013). Sociodemographic Determinants of Prevalence and Incidence of *Helicobacter pylori* Infection in Portuguese Adults. *Helicobacter*, 1-10.
3. Bayona Rojas, M. A. (2013). Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología*.
4. Blanchard, T., & Nedrud, J. (2012). Laboratory Maintenance of *Helicobacter* Species. En *Current Protocols in Microbiology* (pág. Unit 8B.1). Wiley Online Library.
5. Boehnke, K., Valdivieso, M., Bussalleu, A., Sexton, R., Thompson, K., Osorio, S., . . . Xi, C. (2017). Antibiotic resistance among *Helicobacter pylori* clinical isolates in Lima, Peru. *10*.
6. Camargo, C., García, A., Riquelme, A., Otero, W., Camargo, C., Hernandez-García, T., Rabkin, C. (2014). The Problem of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A Systematic Review in Latin America. *Am J Gastroenterol*, April ; 109(4): 485–495.
7. Dadashzadeh, K., Milani, M., Rahmati, M., & Akbarzadeh, A. (2014). Real-Time PCR Detection of 16S rRNA Novel Mutations Associated with *Helicobacter pylori* Tetracycline Resistance in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 883-886.
8. Debowski, A., Walton, S., Chua, E.-G., & Alfred Chin- Yen Tay. (2017). *Helicobacter pylori* gene silencing in vivo demonstrates urease is essential for chronic infection. *PLOS Pathogens*, 13(6).

9. Demiray-Gurbuz, E., Yılmaz, O., Olivares, A., Gonen, C., Sarioglu, S., Soy Turk, M., Perez Perez, G. (Enero de 2017). Rapid identification of *Helicobacter pylori* and assessment of clarithromycin susceptibility from clinical specimens using FISH. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 3, 29-37.
10. Eusebi, L., Zagari, R., & Bazzoli, F. (2014). Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 19(1), 1-5.
11. Ferreira Menoni, S. M., Alves Bonon, S. H., Robilota, J. M., & Botelho Costa, S. C. (2013). PCR-Based Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* in Endoscopic Biopsy Samples from Brazilian Patients. *Gastroenterology Research and Practice*.
12. Ferreira, S. M., Alves Bonon, S. H., Robilota, J. M., & Botelho Costa, S. C. (2013). PCR-Based Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* in Endoscopic Biopsy Samples from Brazilian Patients. *Gastroenterology Research and Practice*.
13. Ford, A., Delaney, B., Forman, D., & Moayyedi, P. (2006). Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients. *The Cochrane Collaboration*, 1-13.
14. Garza-González, E., Perez-Perez, G., Maldonado-Garza, H., & Bosques-Padilla, F. (2014). A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World Journal of Gastroenterology*, 20(6), 1438-1449.
15. Gerrits, M. M., Godoy, A. P., Kuipers, E. J., Ribeiro, M. L., Stoof, J., Mendonça, S., Kusters, J. G. (2006). Multiple Mutations in or Adjacent to the Conserved Penicillin Binding Protein Motifs of the Penicillin-Binding Protein 1A Confer Amoxicillin Resistance to. *Helicobacter*, 11, 181-187.
16. Goode, M., Cheong, S., Li, N., Ray, W., & Bartlett, C. (2015). Collection and Extraction of Saliva DNA for Next Generation Sequencing. *J Vis Exp*, 1-13.
17. Guzman L. (2016). Actividad antimicrobiana de un nuevo péptido aislado de *Tetramorium bicarinatum* sobre cepas caracterizadas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes peruanos. Tesis de Maestría. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú.

18. Hanafi, A., Lee, W., Loke, M., Teh, X., Shaari, A., Dinarvand, M., . . . Lee, K. (2016) Molecular and Proteomic Analysis of Levofloxacin and Metronidazole Resistant *Helicobacter pylori*. *Front. Microbiol.* 7:2015. doi: 10.3389/fmicb.2016.02015
19. Hooi, J., Lai, W., Ng, W., Suen, M., Underwood, F., Tanyingoh, D., Ng, S. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2017.04.022
20. Hosking, S., Chung, S., & Yung, M. (1994). Duodenal ulcer healing by eradication of *Helicobacter pylori* without anti-acid treatment: randomised controlled trial. *The Lancet* , 343, 508-510.
21. Hu, Y., Zhang, M., Lu, B., & Dai, J. (2016). *Helicobacter pylori* and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. *Helicobacter*, 1-15.
22. Ierardi, E., Giorgio, F., Iannone, A., Losurdo, G., Principi, M., Barone, M., Di Leo, A. (2017). Noninvasive molecular analysis of *Helicobacter pylori* : Is it time for tailored first-line therapy? *World J Gastroenterol*, 23(14), 2453-2458.
23. 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>
24. Keilberg, D., & Ottemann, K. (2016). How *Helicobacter pylori* senses, targets and interacts with the gastric epithelium. *Environmental Microbiology*, 18(3), 791-806.
25. Kim, S., Joo, Y., Lee, H., Chung, I., Yoo, Y., Merrell, D., & Cha J. (2009) Genetic analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional rdxA. *The Journal of Antibiotics* (2009) 62, 43–50
26. Kumar Patel, S., Bhan Pratap, C., Kumar Jain, A., Kumar Gulati, A., & Nath, G. (2014). Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World J Gastroenterol*, 12847–12859.
27. Kusters J., van Vliet A. & Kuipers E. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*,19(3) 449-490.

28. Linz, B., Windsor, H., McGraw, J., Hansen, L., Gajewski, J., Tomsho, L., . . . Marshall, B. (2014). A mutation burst during the acute phase of *Helicobacter pylori* infection in humans and rhesus macaques. *NATURE COMMUNICATIONS*, 1-8. doi:10.1038/ncomms5165 |www.nature.com/naturecommunications
29. Ma, J.-L., Zhang, L., Brown, L., Li, J.-Y., Shen, L., Pan, K.-F., . . . Gail, M. (2012). Fifteen-Year Effects of *Helicobacter pylori*, Garlic, and Vitamin Treatments on Gastric Cancer Incidence and Mortality. *Brief Communication | JNCI*, 104(6), 488-492.
30. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Atherton, J., Axon, A., Bazzoli, F., . . . Kuipers, E. (2016). Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht V/ Florence Consensus Report. *Gut*, 61, 646-664.
31. Marshall, B., & Warren, J. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*, 1311-1315.
32. Martins, G., Sanches, B., Moretzsohn, L., Lima, K., Cota, B., & Coelho, L. (2016). Molecular detection of clarithromycin and fluoroquinolones resistance in *Helicobacter pylori* infection, directly applied to gastric biopsies, in an urban brazilian population. *Arq Gastroenterol*, 53(2).
33. Matteo, M. J., Granados, G., Olmos, M., Wonaga, A., & Catalano, M. (2008). *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 474-477.
34. Mégraud, F., & Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 280-322.
35. Miftahussurur, M., Shrestha, P. K., Subsomwong, P., Sharma, R. P., & Yamaoka, Y. (2016). Emerging *Helicobacter pylori* levofloxacin resistance and novel genetic mutation in Nepal. *BMC Microbiology*, 15(256).
36. Mobley, H, Cortesia, M., Rosenthal, L & Jones B. (1988) Characterization of Urease from *Campylobacter pylori*. *Journal of clinical microbiology*, 26(5), 831-836.

37. Ndip, R., MacKay, W., Farthing, M., & Weaver, L. (2003). Culturing *Helicobacter pylori* from Clinical Specimens. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 616-622.
38. O'Connor, A., Gisbert, J. P., O'Morain, C., & Ladas, S. (2015). Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2015. *John Wiley & Sons Ltd, Helicobacter*, 20, 54–61.
39. Oporto M., Pavez M., Troncoso C., Cerda A., Hofmann E, Sierralta A, Barrientos L. (2019). Prevalence of Infection and Antibiotic Susceptibility of *Helicobacter pylori*: An Evaluation in Public and Private Health Systems of Southern Chile. *Pathogens*. 2019 Nov 9;8(4):226.
40. Pacheco, S., Ogata, S., Machado, R., da Silva, F., Pardo, M., & Kawakami, E. (2013). Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by Means of Reduced-Dose 13C-Urea Breath Test and Early Sampling of Exhaled Breath. *JPGN*, 57(5), 607-611.
41. Pareja, A., Mejía, N., Javier, P., García, P., & Francisco, J. (2017). Seroprevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en población adulta de Lima, Perú 2017. *Horizonte Médico*, 17(2), 55–58. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2017.v17n2.8>
42. Peretz, A., Paritsky, M., Nasser, O., Diana, B., Glyatman, T., Segal, S., & On, A. (2014). Resistance of *Helicobacter pylori* to tetracycline, amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in Israeli children and adults. *The Journal of Antibiotics*, 67, 555-557.
43. 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 *Helicobacter pylori* Strains to 20 Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1842–1846
44. Ramírez Ramos, A., & Sánchez Sánchez, R. (2009). *Helicobacter pylori* 25 años después (1983 -2008): Epidemiología, Microbiología, Patogenia, Diagnóstico y Tratamiento. *Rev. Gastroenterol. Perú*, 158-170.

45. Rasheed, F., Campbell, B., Alfizah, H., Varro, A., Rabaab, Z., Yamaoka, Y., & Pritchard, D. (2014). Analysis of Clinical Isolates of *Helicobacter pylori* in Pakistan Reveals High Degrees of Pathogenicity and High Frequencies of Antibiotic Resistance. *Helicobacter*, 19(5), 387-399.
46. Rasheed, F., Campbell, B., Alfizah, H., Varro, A., Zahra, R., Yamaoka, Y., & Pritchard, D. (2014). Analysis of Clinical Isolates of *Helicobacter pylori* in Pakistan Reveals High Degrees of Pathogenicity and High Frequencies of Antibiotic Resistance. *John Wiley & Sons Ltd, Helicobacter*, 19(5): 387–399.
47. Reshetnyak, V., & Reshetnyak T. (2017). Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. *World J Gastroenterol* 2017; 23(27): 4867-4878.
48. Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8).
49. Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T., & Sasatsu, M. (2007). Correlation between Substitutions in Penicillin Binding Protein 1 and Amoxicillin Resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol*, 51(10), 939–944.
50. Sethi, A., Chaudhuri, M., Kelly, L., & Hopman, W. (2013). Prevalence of *Helicobacter pylori* in a First Nations population in northwestern Ontario. *Canadian Family Physician • Le Médecin de famille canadien*, 59, 182-187.
51. Smith, S., O'Morain, C., & McNamara, D. (2014). Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. *World J Gastroenterol*, 20(29), 9912-9921.
52. Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E., Graham, D., El-Omar, E., Miura, S., . . . Malfertheiner, P. (2015). Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, 1353-1367.
53. Tanih, N. F., Ndip, L. M., & Ndip, R. N. (2011). Characterisation of the genes encoding resistance to metronidazole (rdxA and frxA) and clarithromycin (the 23S-

- rRNA genes) in South African isolates of *Helicobacter pylori*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 105(3), 251–259.
54. Tanih, N., Dube, C., Green, E., Mkwetshana, N., Clarke, A., Ndip, L., & Ndip, R. (2009). An African perspective on *Helicobacter pylori*: prevalence of human infection, drug resistance, and alternative approaches to treatment. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 103(3), 189–204.
 55. Teh, X., Khosravi, Y., Ching Lee, W., Ruey Leow, A., Fai Loke, M., Vadivelu, J., & Lee Goh, K. (2014). Functional and Molecular Surveillance of *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance in Kuala Lumpur. *PLoS ONE*, 9(7): e101481.
 56. Tirado-Hurtado, I., Carlos, C., Lancho, L., Alfaro, A., Ponce, R., Schwarz, L., Fajardo, W. (2018). *Helicobacter pylori*: History and facts in Peru. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.12.005>
 57. Trespalacios, A. A., Regino, W. O., & Mercado Reyes, M. (2010). *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in Colombian patients. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 25(1), 29-36.
 58. Vannarath, S., Vilaichone, R.-k., Rasachak, B., Mairiang, P., Yamaoka, Y., & Mahachai, V. (2016). Antibiotic Resistant Pattern of *Helicobacter Pylori* Infection Based on Molecular Tests in Laos. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 285-287.
 59. Vilaichone, R.-k., Panarat, W., Aekpongpaist, S., & Mahachai, V. (2014). Clinical characteristics and *Helicobacter pylori* status of gastric cancer in Thailand. *Asian pacific journal of cancer prevention*, 15, 9005-8.
 60. 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/>
 61. Xin, Y., Manson, J., Govan, L., Harbour, R., Bennison, J., Watson, E., & Wu, O. (2016). Pharmacological regimens for eradication of *Helicobacter pylori*: an

- overview of systematic reviews and network meta-analysis. *BMC Gastroenterology*, 16:80.
62. Zagari , R., Romano, M., Ojetti , V., Stockbrugger, R., Gullini , S., Annibale , B., . . . Caselli , M. (2015). Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Italy: The III Working Group Consensus Report 2015. *Digestive and Liver Disease*.
63. Zhang, M. (2015). High antibiotic resistance rate: A difficult issue for *Helicobacter pylori* eradication treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 21(48), 13432-13438.
64. Zullo , A., Hassan , C., Cristofari , F., Andriani , A., De Francesco, V., Ierardi, E., Vaira, D. (2010). Effects of *Helicobacter pylori* Eradication on Early Stage Gastric Mucosa–Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, 2010, 105-110.

ANEXOS

**Anexo 1. Valores de referencia de puntos de cortes para *H. pylori* según
EUCAST**

Criterios de difusión de disco para pruebas de resistencia antimicrobiana de *H. pylori*.

Antibiótico	MIC break-point (ug/ul)	
	S ≤	R >
Claritromicina	0.25	0.5
Amoxicilina	0.125	0.125
Levofloxacino	1	1
Metronidazol	8	8
Tetraciclina	1	1

Anexo 2. Protocolo para la extracción de ADN a partir de cepas aisladas de

H. pylori

La extracción de ADN a partir de cepas aisladas de *H. pylori* se realizó usando el kit de purificación GeneJET Genomic DNA (Thermo Scientific Cat. No #K0722).

Componentes del kit:

GeneJET Genomic DNA	Cantidad
Solución de proteinasa K	5 x 1.2 ml
Solución RNasa A	5 x 1 ml
Solución de digestión	55 ml
Solución de lisis	2 x 60 ml
Buffer de lavado I (concentrado)	40 ml
Buffer de lavado II (concentrado)	40ml
Buffer de elución (10 mM Tris-Cl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA)	150 ml
Columnas de purificación GeneJET Genomic DNA	250
Tubos de colección	250

Materiales adicionales y equipamiento requerido:

- Micropipetas y tips.
- Vortex.
- Etanol (96-100%).
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.
- Microcentrífuga.
- Plataforma de calentamiento.
- Guantes descartables.

Procedimiento de purificación de ADN genómico para bacterias Gram negativas:

1. Preparar los buffers de lavado I y II, adicionando los volúmenes indicados de etanol al 96 – 100%:

	Buffer de lavado I	Buffer de lavado II
Buffer concentrado	40 ml	40 ml
Etanol (96-100%)	120 ml	120 ml
Volumen total	160 ml	160 ml

2. Centrifugar por 10 min a 5000 g una muestra de cultivo bacteriano fresco de hasta 2×10^9 bacterias contenidas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y descartar el sobrenadante.

3. Resuspender el precipitado en 180 μ l de solución de digestión, agregar 20 μ l de la solución de proteinasa K y mezclar completamente usando vortex.
4. Incubar la muestra por 30 min a 56°C mezclando ocasionalmente con vortex.
5. Agregar 20 μ l de la solución RNasa A, mezclar con vortex e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
6. Agregar 200 μ l de solución de lisis y mezclar con vortex alrededor de 15 segundos.
7. Agregar 400 μ l de etanol al 50 % y mezclar con vortex.
8. 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 y colocar la columna en un nuevo tubo de colector.
9. Agregar 500 μ l de buffer de lavado I, centrifugar por 1 min a 8000 g, descartar la solución residual y colocar la columna otra vez en el tubo colector.
10. Agregar 500 μ l de la solución de lavado II, centrifugar por 3 min a máxima velocidad (≥ 12000 g), descartar el tubo colector conteniendo la solución residual y transferir la columna de purificación a un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 ml.
11. Agregar 200 μ l del buffer de elución en el centro de la columna de purificación para extraer el ADN genómico, incubar por 2 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min a 8000 g.
12. Descartar la columna de purificación. Usar el ADN inmediatamente o almacenarlo a -20°C.

Anexo 3. Lista de primers para las pruebas moleculares

Código	Secuencia	Antibiótico	Producto (pb)	Referencias
hp23	5-CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3 5-CTCCATAAGA GCCAAAGCCC-3	Resistencia a Claritromicina	425	Hu et al 2016, Teh et al 2014
pbp1	5'-TGCGAACACCCTTTTAAAT-3 y 5-GCGACAATAAGAGTGGCA-3	Resistencia a Amoxicilina	2385	Hu et al 2016, Betancourt 2013, Kim et al 2013
gyrA	5-AGCTTATTCATGAGCGTGA-3 y 5-TCAGGCCCTTTGACAAATTC-3	Resistencia a Levofloxacin	582	Teh et al 2014
rdxA	5 - GCAGGAGCATCAGATAGTTCT-3 y 5 - GGGATTTTATTGTATGCTACAA-3	Resistencia a Metronidazol	886	Arlam et al 2017
16S	5'- ATAGACGGGGACCCGCACAAG-3 y 5'- TGGCAAGCCAGACTCCA-3	Resistencia a Tetraciclina	120	Hu et al 2016

Anexo 4. Protocolo para la amplificación del gen de resistencia a Claritromicina por PCR convencional.

Para la amplificación del gen de resistencia a Claritromicina *ARNr 23S* se utilizó el kit de PCR convencional innuTaq HOTA DNA Polymerase (Analytikjena, Cat. No. 845-EZ-3000500) y el kit de mezcla de nucleótidos inNucleotide Mix 12.5mM (Analytikjena, Cat. No. 845-AS-9000100).

Preparación de reactivos para la PCR:

1. Descongelar los reactivos que conforman los kits de PCR y mezcla de nucleótidos, mezclar y centrifugar brevemente todos los componentes.
2. Preparar el master mix de acuerdo a las siguientes concentraciones y volúmenes de acuerdo al número de reacciones que se requieran:

Componente	Concentración stock	Concentración final requerida	Master mix para 1 reacción (µl)
Agua grado PCR	-	-	34.5
Buffer Hot Star	10x	1x	5
dNTP Mix	12.5mM	0.25mM	1
Primer forward	10mM	0.4mM	2
Primer reverse	10mM	0.4mM	2
DNA polimerasa	-	-	0.5
ADN extraído	-	-	5
Volumen total	-	-	50

Condiciones de la PCR:

Paso	Ciclo	Perfil	Temperatura	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	95°C	4 min
2	38	Desnaturalización	95°C	30 seg
		Alineamiento	60°C	30 seg
		Extensión	72°C	1 min
3	1	Extensión final	72°C	10 min

Anexo 5. Protocolo para la amplificación del gen de resistencia a Amoxicilina por PCR convencional.

Para la amplificación del gen de resistencia a Amoxicilina *pbp1* se utilizó el kit de PCR convencional innuTaq HOT-A DNA Polymerase (Analytikjena, Cat. No. 845-EZ-3000500) y el kit de mezcla de nucleótidos inNucleotide Mix 12.5mM (Analytikjena, Cat. No. 845-AS-9000100).

Preparación de reactivos para la PCR:

1. Descongelar los reactivos que conforman los kits de PCR y mezcla de nucleótidos, mezclar y centrifugar brevemente todos los componentes.
2. Preparar el master mix de acuerdo a las siguientes concentraciones y volúmenes de acuerdo al número de reacciones que se requieran:

Componente	Concentración stock	Concentración final requerida	Master mix para 1 reacción (µl)
Agua grado PCR	-	-	34.5
Buffer Hot Star	10x	1x	5
dNTP Mix	12.5mM	0.25mM	1
Primer forward	10mM	0.4mM	2
Primer reverse	10mM	0.4mM	2
DNA polimerasa	-	-	0.5
ADN extraído	-	-	5
Volumen total	-	-	45

Condiciones de la PCR:

Paso	Ciclo	Perfil	Temperatura	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	95°C	4 min
2	36	Desnaturalización	95°C	30 seg
		Alineamiento	62°C	30 seg
		Extensión	72°C	2 min 15 seg
3	1	Extensión final	72°C	10 min

**Anexo 6. Protocolo para la amplificación del gen de resistencia a
Levofloxacino por PCR convencional.**

Para la amplificación del gen de resistencia a Levofloxacino *gyrA* se utilizó el kit de PCR convencional innuTaq HOT-A DNA Polymerase (Analytikjena, Cat. No. 845-EZ-3000500) y el kit de mezcla de nucleótidos inNucleotide Mix 12.5mM (Analytikjena, Cat. No. 845-AS-9000100).

Preparación de reactivos para la PCR:

1. Descongelar los reactivos que conforman los kits de PCR y mezcla de nucleótidos, mezclar y centrifugar brevemente todos los componentes.
2. Preparar el master mix de acuerdo a las siguientes concentraciones y volúmenes de acuerdo al número de reacciones que se requieran:

Componente	Concentración stock	Concentración final requerida	Master mix para 1 reacción (µl)
Agua grado PCR	-	-	34.5
Buffer Hot Star	10x	1x	5
dNTP Mix	12.5mM	0.25mM	1
Primer forward	10mM	0.4mM	2
Primer reverse	10mM	0.4mM	2
DNA polimerasa	-	-	0.5
ADN extraído	-	-	5
Volumen total	-	-	50

Condiciones de la PCR:

Paso	Ciclo	Perfil	Temperatura	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	95°C	4 min
2	35	Desnaturalización	95°C	30 seg
		Alineamiento	53°C	30 seg
		Extensión	72°C	30 seg
3	1	Extensión final	72°C	10 min

**Anexo 7. Protocolo para la amplificación del gen de resistencia a
Metronidazol por PCR convencional.**

Para la amplificación del gen de resistencia a Metronidazol *rdxA* se utilizó el kit de PCR convencional innuTaq HOT-A DNA Polymerase (Analytikjena, Cat. No. 845-EZ-3000500) y el kit de mezcla de nucleótidos inNucleotide Mix 12.5mM (Analytikjena, Cat. No. 845-AS-9000100).

Preparación de reactivos para la PCR:

1. Descongelar los reactivos que conforman los kits de PCR y mezcla de nucleótidos, mezclar y centrifugar brevemente todos los componentes.
2. Preparar el master mix de acuerdo a las siguientes concentraciones y volúmenes de acuerdo al número de reacciones que se requieran:

Componente	Concentración stock	Concentración final requerida	Master mix para 1 reacción (µl)
Agua grado PCR	-	-	34.5
Buffer Hot Star	10x	1x	5
dNTP Mix	12.5mM	0.25mM	1
Primer forward	10mM	0.4mM	2
Primer reverse	10mM	0.4mM	2
Hot star DNA polimerasa	-	-	0.5
ADN extraído	-	-	5
Volumen total	-	-	50

Condiciones de la PCR:

Paso	Ciclo	Perfil	Temperatura	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	95°C	4 min
2	35	Desnaturalización	95°C	45 seg
		Alineamiento	50°C	45 seg
		Extensión	72°C	1 min
3	1	Extensión final	72°C	10 min

Anexo 8. Protocolo para la amplificación del gen de resistencia a Tetraciclina por PCR convencional

Para la amplificación del gen de resistencia a Tetraciclina *ARNr 16S* se utilizó el kit de PCR convencional innuTaq HOT-A DNA Polymerase (Analytikjena, Cat. No. 845-EZ-3000500) y el kit de mezcla de nucleótidos inNucleotide Mix 12.5mM (Analytikjena, Cat. No. 845-AS-9000100).

Preparación de reactivos para la PCR:

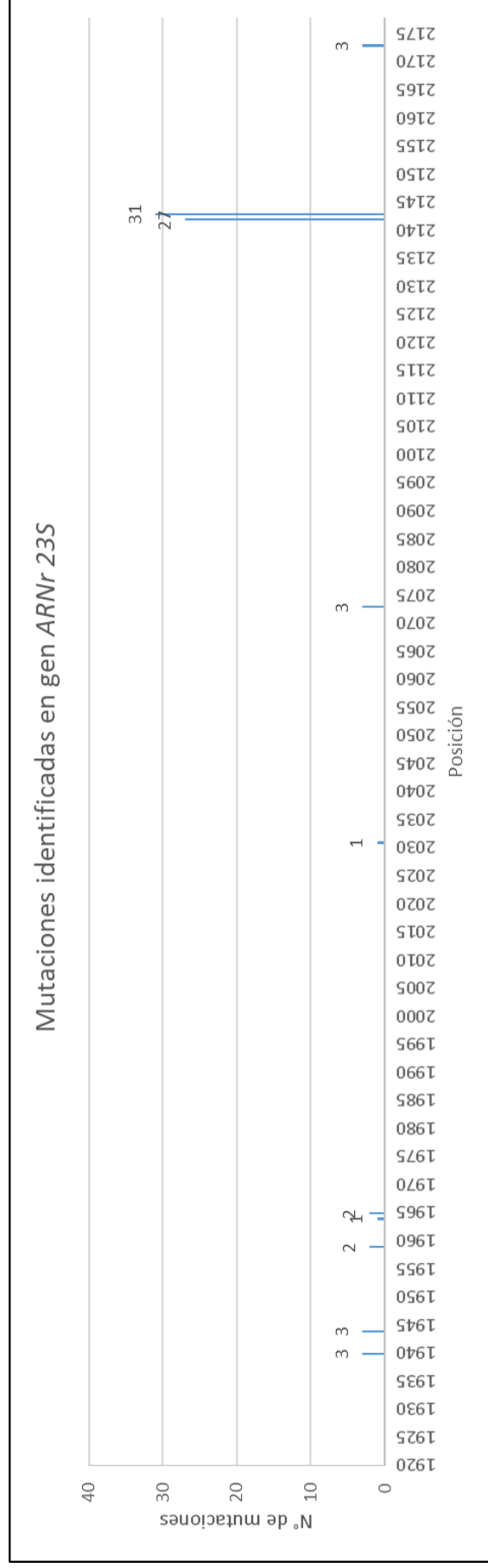
1. Descongelar los reactivos que conforman los kits de PCR y mezcla de nucleótidos, mezclar y centrifugar brevemente todos los componentes.
2. Preparar el master mix de acuerdo a las siguientes concentraciones y volúmenes de acuerdo al número de reacciones que se requieran:

Componente	Concentración stock	Concentración final requerida	Master mix para 1 reacción (µl)
Agua grado PCR	-	-	34.5
Buffer Hot Star	10x	1x	5
dNTP Mix	12.5mM	0.25mM	1
Primer forward	10mM	0.4mM	2
Primer reverse	10mM	0.4mM	2
DNA polimerasa	-	-	0.5
ADN extraído	-	-	5
Volumen total	-	-	50

Condiciones de la PCR:

Paso	Ciclo	Perfil	Temperatura	Tiempo
1	1	Desnaturalización inicial	95°C	4 min
2	40	Desnaturalización	95°C	30 seg
		Alineamiento	55°C	30 seg
		Extensión	72°C	30 min
3	1	Extensión final	72°C	10 min

Anexo 9. Distribución de mutaciones identificadas en el gen *ARNr23S*



Anexo 10. Distribución de mutaciones identificadas en el gen *pbp1A*

