

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Detección molecular de resistencia a claritromicina en
Helicobacter pylori en muestras de heces

Proyecto de investigación

Claudio Felipe Maldonado Herrera

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 20 de mayo del 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Detección molecular de resistencia a claritromicina en *Helicobacter pylori* en
muestras de heces**

Claudio Felipe Maldonado Herrera

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio Machado, PhD

Firma del profesor

Quito, 20de mayo del2016

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Claudio Maldonado Herrera

Código:

00101175

Cédula de Identidad:

1717484123

Lugar y fecha:

Quito, 20 de mayo del2016

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa catalasa y oxidasa positiva, forma parte de la microbiota normal de la faringe y el cardias gástrico. Cuando se encuentra en el estómago está asociado a la mayoría de gastritis, úlceras duodenales/gástricas y cáncer gástrico asociado al linfoma de MALT. Se puede tratar de manera efectiva, cuando se lo detecta a tiempo, el tratamiento se basa en una triple combinación de metronidazol, claritromicina y amoxicilina. Uno de los mayores problemas asociados con esta bacteria es la prevalencia que puede ser desde la colonización en la niñez hasta la muerte del hospedador. Uno de los mecanismos de persistencia es la resistencia a antibióticos, se ha descrito mutaciones (A2142C/G y A2143G) que se encuentran en el gen 23S rRNA del dominio V de la peptidiltransferasa la cual le confiere resistencia a claritromicina. El objetivo de este estudio es de detectar las mutaciones que confieren resistencia a claritromicina, de manera rápida eficiente, con alta relevancia clínica y no invasiva. Encontramos que las muestras de heces pueden ser extraídas para generar un templado adecuado para realizar PCR Real time. La A2143G fue la mutación más prevalente, seguida por la A2142G y la resistencia fue del 43%. Las curvas de melting fueron comprobadas por medio de secuenciación, en donde se encontró los cambios puntuales en el genoma del 23S rRNA además de corroborar la detección de cepas combinadas.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, cáncer gástrico, 23S rRNA, PCR Real time, claritromicina

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a gram negative catalase and oxidase positive, is part of pharynx and gastric cardiamicroflora. In the stomach is highly associated with chronic gastritis, duodenal and gastric ulcers, also to gastric cancer MALT lymphoma associated. It can be treated effectively, when it is detected at early stages, treatment is based on a triple combination of metronidazole, clarithromycin and amoxicillin. One of the biggest problems associated is the prevalence that can be held from childhood until the death of the host. Antibiotic resistance, is one of the described persistence mechanisms, there have been mutations (A2142C/G and A2143G) found 23S rRNA gene in the V domain peptidyltransferase which confers resistance to clarithromycin. The objective of this study is to detect the mutations that confer resistance to clarithromycin, efficient quickly with high clinical relevance and non-invasively. We found that stool samples can be extracted to generate adequate template for Real time PCR. The A2143G mutation was the most prevalent, followed by A2142G and resistance value was 43%. Melting curves were confirmed by sequencing, where single nucleotide polymorphism in 23S rRNA genome were found, in addition to corroborating detect combined strains.

Keywords: *Helicobacter pylori*, gastric cancer, 23SrRNA, Real time PCR, clarithromycin

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	8
1.1 Historia.....	8
1.2 Fisiología y Estructura.....	9
1.3 Factores de patogenicidad e inmunidad.....	9
1.4 Epidemiología.....	11
1.5 Enfermedades clínicas.....	12
1.6 Diagnóstico de laboratorio.....	12
1.7 Tratamiento, prevención y control.....	14
2. Justificación.....	15
3. Objetivos	17
4. Materiales y Métodos	18
4.1 Colección de muestras.....	18
4.2 Extracción de ADN.....	18
4.3 Cuantificación deADN.....	19
4.4 Detección de mutaciones puntuales en el gen 23s rRNA de Helicobacter pylori por PCR Real-Time.....	19
4.5 Preparación de la master mix.....	20
4.6 Purificación de productos de PCR y secuenciación.....	21
4.7 Análisis de las secuencias.....	21
5. Resultados	22
6. Discusión.....	30
6.1 Extraaciónde ADN en heces.....	30
6.2 Detección de mutaciones en PCR Real-Time.....	32
6.3 Prevalencia de la resistencia.....	36
6.4 Mutaciones en el gen 23s rRNA.....	37
6.5 Ventajas de PCR Real-Time vs otras metodologías.....	39
7. Conclusiones.....	41
8. Recomendaciones.....	42
9. Referencias.....	43
Anexos.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla # 1: Tabla de primers y sondas para la región 23s rRNA.....	20
Tabla # 2: Resultado de la extracción de ADN.....	22
Tabla # 3: Comparación estadística de PCR Real time vs CerTest.....	24
Tabla # 4: Resultados de las mutaciones y prevalencia de resistencia en muestras positivas.....	25
Tabla # 5: Resultados de las mutaciones y prevalencia de resistencia en muestras negativas.....	26
Tabla # 6: Resultado de la cuantificación de ADN.....	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico #1: Corrida representativa de las curvas de melting.....	23
Gráfico #2: Caso de secuenciación muestra 184.....	27
Gráfico #3: Caso de secuenciación muestra 334.....	27
Gráfico #4: Caso de secuenciación muestra 21.....	28
Gráfico #5: Caso de secuenciación muestra 315.....	29
Gráfico #6: Caso de secuenciación muestra 277.....	30
Gráfico #7-11: Corridas de muestras de ADN en LightCycler 2.0	49
Gráfico #12: Secuenciación completa de las muestras representativas.....	52
Gráfico #13: Esquema de mutaciones en la región 23S rRNA.....	53

|

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia

En 1983 se detectan por primera vez bacterias gramnegativas helicoidales en la superficie de la mucosa gástrica en pacientes con gastritis de tipo B. En un estudio realizado por Warthin-Starry se aisló y detectó con tinción de plata estas bacterias en 98% de los pacientes con gastritis crónica y el 80% de los pacientes con úlcera gástrica (Warren & Marshall, 1983). Luego de varios intentos, se logró cultivar la bacteria a partir de muestra de biopsias con la metodología de Skirrow para aislamiento de *Campylobacter*spp. (Skirrow, 1977). Debido a esto y al parecido se agrupa a esta bacteria en el género *Spirillum*, como *Campylobacter pylori* (Marshall & Godwin, 1987). En 1989 se logra reconocer variantes debido al análisis de la secuencia 16s rRNA, la composición de ácidos grasos celulares y la presencia de flagelos polares para agruparlos en un nuevo género denominado *Helicobacter* (Goodwin, y otros, 1989). Hoy en día se han caracterizado 30 especies, cuya taxonomía es muy complicada y cambiante (Liou, y otros, 2015). Existen helicobacterias entéricas como *Helicobacter cinaedii* y *Helicobacter fennelliae* que causan proctitis, proctocolitis o enteritis. Además de eso también se ha aislado del intestino y el estómago de muchos mamíferos y aves como *H. canis*, *H. pullorum* y *H. bizzozeroni* además de estar asociado a humanos (Marshall, 2002; Sherris, Ryan & Ray, 2004). Por otro lado las helicobacterias gástricas como *Helicobacter pylori* se ha asociado a gastritis, úlceras pépticas, adenocarcinoma gástrico y linfomas de linfocitos B del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT, del inglés Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) (Parsonnet, y otros, 1991).

1.2 Fisiología y estructura

La especie *Helicobacteres* un bacilo gram negativo con forma espiral en la mucosa gástrica y en cultivos recientes, mientras que en cultivos de mayor edad adopta una morfología cocoide debido a que no encuentra situaciones favorables para crecer (Amieva & El-Omar, 2008). Presenta un tamaño de 0.5-1 μm de ancho y 2.4 μm de largo. Todas las especies encontradas en este género son móviles debido a la acción de sus flagelos polares con una característica “movilidad sacacorchos”, esta movilidad se encuentra gestionada por las grandes cantidades de ureas (Di Lorenzo, 2005). Los flagelos se encuentran recubiertos de una membrana lipídica, lo que le permite estar protegida (Lipkin, 2010). Además la alta movilidad en el medio viscoso de la bacteria le permite posicionarse en lugares con pH neutro, lo cual le confiere un patrón de supervivencia a los ácidos gástricos (Amieva & El-Omar, 2008).

Helicobacter spes una bacteria catalasa y oxidasa positiva, no fermentadora ni oxida los carbohidratos aun así puede metabolizar algunos aminoácidos (Mladenova, Durazzo, & Pellicano, 2006). El crecimiento de estas bacterias es en un medio relativamente complejo que posee: sangre, suero, carbón, almidón o yema de huevo; además de condiciones microaerófilas y un intervalo de temperatura entre 30-37°C (Makristathis, Hirschl, Russmann, & Koletzko, 2007). Para que el cultivo se considere negativo se necesita hasta 10 días por esta razón se lo identifica con técnicas ajenas al cultivo (Mégraud, Bessède, & Lehours, 2014).

1.3 Factores de patogenicidad e inmunidad

Múltiples factores aumentan el factor de riesgo para las complicaciones principales, los cuales contribuyen a la colonización gástrica, inflamación, alteración de la producción del ácido gástrico y destrucción tisular.

Entre los factores de virulencia que influyen a la colonización de la mucosa gástrica se encuentran:

- Ureasa: principal mecanismo para protegerse del pH ácido, hidrolizando la urea (Bauerfiend, Garner, Dunn, & Mobley, 1997).
- Sistemas antioxidantes: *H. pylori* es una bacteria microaerofílica que puede presentar vulnerabilidad al O₂, la bacteria posee con varios mecanismos de detoxificación (Long, Luo, Li, Zeng, & Li, 2009).
- Flagelos: le dan gran movilidad a las bacterias compuesto por dos hasta seis flagelinas (Ramírez, Mendoza, Leey, & Guerra, 2002).
- Adhesinas: gestionan la adherencia a las células epitelio gástrico por medio de múltiples receptores. El HpaA (del inglés *Helicobacter pylori* adhesin A) es la principal proteína de la membrana externa de *H. pylori*, que también se une a la superficie de los neutrófilos y es muy utilizado para ensayos serológicos y para vacunas (Nyström & Svennerholm, 2007). BabA (del inglés *Blood Antigen Binding Adhesión*) se une a las células epiteliales gástricas a través de los antígenos de Lewis, lo cual genera una respuesta inmune generando una gastritis crónica y participa en la distribución de los factores de virulencia (Olfat, Zheng, & Oleastro, 2005).

Las lesiones a nivel tisular se dan por la acción de la ureasa, mucinasa, fosfolipasas además de la actividad de la VacA (del inglés *Vacuolating Cytotoxin A*) Esta toxina entra a las células por endocitosis y produce lesiones por la formación de vacuolas, lo que genera la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial. El VacA aumenta la respuesta inflamatoria de la mucosa lo que provoca la producción del VEGF (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) y genera procesos de desarrollo de tumores. *H. pylori* aumento el riesgo de carcinogénesis gástrica por la sobreexpresión de COX-2, una enzima responsable de la inflamación, y la activación de NF- κ B, que activa la respuesta

inmune basada en ADN de las células del epitelio, los cuales conllevan a una gastritis atrófica y neoplasia gastrointestinal cuando estos confunden la señalización (Rudnicka & Chimela, 2004).

El otro factor extremadamente importante es el CagA (del inglés *Cytotoxin-Associated Gene A*) está asociada a los síntomas con mayor gravedad como: gastritis severa, atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico (García, 2010). Este gen codifica a una estructura asemejada a una jeringa que inyecta la proteína al huésped e interfiere gravemente con el citoesqueleto celular (Agudo, Pérez-Pérez, Alarcón, & Lopez-Brea, 2010). Existen mutaciones puntuales que conllevan a la eliminación de la estructura de secreción tipo IV, lo que provoca que ingrese la proteína CagA a la célula pero aumenta la producción de la interleucina 8 (IL-8), lo que hace que se sumen cantidades de neutrófilos que forman proteasas y oxígeno radical lo cual se piensa que contribuye a la gastritis y úlceras gástricas (Chiarini, y otros, 2009).

1.4 Epidemiología

Helicobacter pylori desde que fue aislado en 1984 se ha encontrado en el 70-100% de los pacientes con gastritis, úlceras gástricas y úlceras duodenales. Su tasa más alta se encuentra en países en vías del desarrollo, donde el 70-90% de la población ya es colonizada antes de los 10 años (Scaletsky y otros, 2011). En Ecuador se reporta 89,5% (Gómez, Álvarez, Zapatier, & Vargas, 2005). El ser humano es el principal reservorio de *H. pylori*, la presencia de este microorganismo se ha comprobado que persiste para toda la vida si el paciente no recibe un tratamiento eficaz (Chiarini, y otros, 2009). A pesar de que la transmisión no se encuentra muy bien caracterizada, muchas pistas conllevan a que se produzca por vía gastro-oral, oral-oral y fecal-oral; también se ha encontrado que forma parte de la microbiota normal del esófago y del

cardias gástrico, por lo cual se ha estudiado no erradicar las colonias no patógenas (Mladenova, Durazzo, & Pellicano, 2006).

1.5 Enfermedades clínicas

En cuanto a la enfermedad producida por *H. pylori* va a depender mucho de donde se encuentra localizada la colonización (Amieva & El-Omar, 2008). Por ejemplo si se infiltra en los neutrófilos y en células mononucleares de la mucosa gástrica desarrolla una gastritis. La agudización de este síntoma provoca náusea, vómitos e hipocloridria. Cuando la gastritis se vuelve crónica la enfermedad se limita a donde existen menos células secretoras de ácido clorhídrico, moco y enzimas digestivas (antro) y luego afecta a todo el estómago (pangastritis) cuando se suprime el ácido (Wroblewski, Peek, & Wilson, 2010). De acuerdo con esto del 10-15% con gastritis desarrollan úlceras pépticas. Las úlceras se suelen encontrar en la zona media entre el cuerpo y el antro (úlcera gástrica) causando el 85% de estas o la parte más próxima duodeno (úlcera duodenal) causando el 95% (Lipkin, 2010). Al aumentar la gastritis genera que la mucosa gástrica se vaya degradando y esto genera un factor de riesgo para el cáncer gástrico en 100 veces, a través del aumento los factores de patogenicidad CagA y elevado IL-1 (Trajlikov y otros, 2007). Y por último las infecciones por *H. pylori* se asocian a las infiltraciones en el antro del estómago del tejido linfoide, produciendo una población de linfocitos B que evolucionan a un linfoma de MALT (Toshiro, Okazaki, & Tamaki, 2004).

1.6 Diagnóstico de laboratorio

Hace muchos años se recomendó por Skirrow (1997) la evaluación histológica de los efectos *H. pylori* en la mucosa gástrica (El-Zimaity, y otros, 2013). Se utiliza altamente como práctica de rutina y se extrae muestras de tejido gastro-intestinal de diferentes partes del estómago (cuerpo y antro) por medio de la biopsia dirigida a través de la endoscopia digestiva (Mégraud, Bessède, & Lehours, 2014). Este tipo de estudio aunque es muy sensible,

posee una especificidad muy baja debido a que no se logra aislar adecuadamente *H.pylori* y genera falsos negativos en la observación de este tejido(Batts, y otros, 2013).

Existen varios tipos de pruebas para detectar a *H.pylori*, uno de los primeros es de detección de antígenos, estos métodos son de poco costo y rápidos poseen anticuerpos mono y policlonales para un antígeno de la pared del microorganismo que se une a estos y genera un cambio de pH por el inmuno complejo(Formichella, y otros, 2013). El HPSA (del inglés *Helicobacter pylori StoolAntigen*) es uno de los antígenos más utilizados en algoritmos a lo largo del mundo junto con el test de urea en aliento (Falsafi, Walizadh, Sepehr, & Najafi, 2005). Otro ejemplo es CerTest*H. pylori* Cardque utiliza anticuerpos policlonales de conejo y constituye una prueba inmunocromatografica para la detección cualitativa de la bacteria en heces Los problemas con estas técnicas rápidas es que pueden poseer reacción cruzada con otras bacterias y dar falsos positivos así como también pueden dar falsos negativos debido a la baja presencia de la bacteria cuando se encuentra en tratamiento(Korkmaz, y otros, 2013).Se pueden utilizar muestras de heces y biopsias haciéndolo un método tanto invasivo como no invasivo, en la muestra de biopsia existe el problema de que sea mal tomada y no se encuentre colonizado en esa parte porque normalmente la prueba se la realiza con las sobras que se separaron para métodos más importantes como la histología por ejemplo (Andrews, y otros, 2001).

En cuanto a otro método no invasivo es la prueba de urea en aliento debido a que *H. pylori* hidroliza la urea por acción de la ureasa, la cual se queda en la sangre y es liberada por los pulmones(Pathak, y otros, 2014). La desventaja de esta técnica radica en la detección después de una infección o para los pacientes en tratamiento ya no se puede detectar de manera eficaz (López-Brea & Alarcón, 2006).

1.7 Tratamiento, prevención y control

El tratamiento aunque se han probado algunas vacunas, el tratamiento sigue siendo a base a antibióticos con la triple terapia muy conocida con un inhibidor de la bomba de protones omeprazol, un macrólido como la claritromicina y un beta-lactámico que se debe administrar durante 7-10 días. En el Ecuador se suministra 20 mg de omeprazol, 500mg de claritromicina y 1 g de amoxicilina (Robles-Jara, Robles-Medranda, Moncayo, Landivar, & Parrales, 2008). El fracaso del tratamiento radica en la resistencia a claritromicina la cual se ha detectado que se debe a mutaciones en el dominio 23S rRNA (Versalovic, y otros, 1996). En el mundo existe una resistencia del 10-40% a la claritromicina (Xiong, Tong, Wang, & Mao, 2012). Las pruebas de susceptibilidad como el E-test no avanzarían para hacer un estudio del 50% de la población humana contagiada por *H.pylori*. El desarrollo de pruebas rápidas y de bajo costo para la detección de la susceptibilidad es una parte clave de la prevención y control del cáncer gástrico. A pesar de que existe la posibilidad de hacerlo por cultivo microbiológico, añadiendo la prueba para susceptibilidad a varios medicamentos. El famoso E-test o HELIS el cual utiliza un disco de susceptibilidad con las múltiples drogas utilizadas en el tratamiento en donde nos entrega como resultado un MIC (del inglés *Minimum Inhibitory Concentration*) para el tratamiento con resultados como susceptible, susceptible dependiendo de la dosis, intermedio, no susceptible y resistente (Megraud y otros, 2013). El problema es que puede tener falsos negativos debido a que la bacteria puede morir desde que se toma la muestra hasta el cultivo y además toma 21 días además de los 7 días de cultivo de tiempo respuesta (Theel, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de cáncer gástrico en Ecuador es 29 de cada 100 000 casos por año, representando uno de los índices más altos en latino América(Debets-Ossenkopp, y otros, 2003). El mayor factor de riesgo encontrado en estos caso es la presencia de *Helicobacter pylori*(Chiarini, y otros, 2009). La infección puede ser tratada con antimicrobianos el cual normalmente es efectivo. Sin embargo, poco se conoce de los patrones de resistencia a susceptibilidad de medicamentos en el Ecuador. El único estudio reportado fue en el 2003 y reveló una resistencia del 80,9% a metrodinazol y 9.5% a claritromicina(Debets-Ossenkopp, y otros, 2003). Por dicha razón se ha cambiado el tratamiento a una combinación de estos dos medicamentos más amoxicilina(Alarcón, Domingo, & López-Brea, 1999).Se ha encontrado que el metrodinazol aún si confiere resistencia tiende a ser eficiente, mientras que la claritromicina no puede hace ningún efecto en presencia de la resistencia(Fariña, y otros, 2007). La persistencia de esta bacteria es muy común en pacientes dispépticos lo que puede llevar a una gastritis crónica, una úlcera péptica y una atrofia gástrica lo que conlleva a un cáncer gástrico(Noguchi, y otros, 2007)La susceptibilidad se la ha venido realizando por medio de pruebas inespecíficas y de larga tiempo respuesta como el E-test(Oleastro, y otros, 2003). Se han detectado frecuentemente tres mutaciones (A2142/3G y A2142C) que confieren resistencia a claritromicina(Versalovic , y otros, 1996). Es de suma importancia el desarrollo de técnicas mucha más específicas y sensibles para la detección de la resistencia. Muchos de los métodos son invasivos para el paciente debido a que requiere una muestra de biopsia gástrica obtenida por raspado endoscópico. Al igual que otras técnicas no se ha utilizado el diagnóstico para seguimiento de los pacientes con susceptibilidad a estos medicamentos. La puesta a punto de una prueba de diagnóstico en PCR Real-time en muestras de heces, representaría un método no invasivo, como rápido y de alta relevancia clínica. La cual puede ser adquirida por el ecuatoriano común y puede ayudar a mejorar el tratamiento de la enfermedad y disminuir el porcentaje de cáncer gástrico presente en el país.

3. OBJETIVOS

General: Detección de resistencia molecular a claritromicina en *Helicobacter pylori* con muestras de heces.

Específicos:

1. Implementación de un método de extracción ADN bacteriano para heces.

2. Implementación de un método de PCR Real time en la plataforma Light Cycler 2.0 Roche.
3. Detección de mutaciones que confieren resistencia a claritromicina por medio del análisis de curvas de melting.
4. Purificación y amplificación del fragmento amplificado por PCR Real time.
5. Secuenciación de los fragmentos anteriormente purificados y amplificados por medio de la plataforma 3500 Applied Biosystems.
6. Evaluación de los resultados obtenidos con estudios previos para la validación del mismo como posible prueba diagnóstica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colección de muestras

La colección de las muestras se la realizó por medio de una caja de recolección de heces estéril de BrandSD. Luego se procesó las muestras por medio del

CerTestBiotec®*H.pylori*(Biotec). Los resultados positivos se los detectó por medio del cambio de color en la tirilla de blanco a positivo. Dichas muestras se aislaron y se refrigeraron a 8°C.

4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se la realizó por medio del High Pure Viral NucleicAcid Kit (Roche LifeScience) Kit Viral Roche añadiéndoles un paso previo a la extracción, el cual fue diluir a la muestra de heces fecales en 1,2 ml de tampón fosfato salino o PBS (del inglés *PhosphateBuffer Solution*) a una concentración de 1 M. Luego de añadir dicho buffer se procedió a dar unvortex, por 1 min, alrededor de unas 3 veces, hasta que el color de la solución se vuelva de color café claro o marrón. Se dejó reposar un tiempo aproximado de 5 min hasta que el baño seco suba hasta la temperatura necesaria para la extracción. Luego se procedió a utilizar 200 µl de esta mezcla para extraer del ADN con 50 µl de pK(del inglés *ProteinKinase*, provista por el kit) y se añadióuna mezcla de Lysis Buffer y polyA en un microtubo de 1,5 ml libre de nucleasas. Luego se incubó a 70°C por 10 min y se agregó 100 µl del Lysis Buffer. Se transfirió a una columna la totalidad de la mezcla y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min.Luego se agregó 500 µl de Inhibitor Renoval Buffer y se repitió la centrifugación a la misma velocidad y tiempo. Se cambió el tubo de recolección y se deja el filtro, siguiente a esto se procede a realizar 2 lavados con Wash Buffer y se eludióla muestra en 100 µl de Elution Buffer (EB)también provisto por el kit.

4.3 Cuantificación de ADN

Luego de obtenermuestra de ADN se procedió a cuantificar la misma por medio del equipo NanoQuant por espectrofotometría el cual mide la absorbancia. En este equipo se realiza un blanqueamiento de la placa añadiendo 2 µl de EB a cada uno de los pocillos de igual número de las muestras que se van a cuantificar. Luego del blanqueamiento se añadió 2 µl de la muestra

y se volvió a insertar la placa en el equipo. Los resultados de la cuantificación pasan directamente a una hoja de Excel donde nos entrega la absorbancia a 260 nm de longitud de onda que nos entrega la cantidad de ADN de la muestra en ng/μl y la relación entre 260/280 para medir la calidad del ADN.

En cuanto a la preservación de la muestra de ADN se mantuvo en una congeladora a -20°C, en un microtubo de 1,5 ml libre de nucleasas.

4.4 Detección de mutaciones puntuales en el gen 23S rRNA de *Helicobacter pylori* por PCR Real-time

El PCR Real-time se lo realizó por medio de una amplificación de una región conocida con sondas fluorescentes, directamente del ADN bacteriano obtenido de las muestras de heces. Simultáneamente en el método se incluyó la detección simultánea de las mutaciones por medio de sondas y posterior a eso el análisis de las curvas de melting. Un fragmento de 267pbse amplifico utilizando los primers HPYS y HPYA previamente descritos por (Ménard, Oleastro, Santos, & Mégraud, 2002). Los primers fueron analizados para especificidad 3´terminal para asegurarse que son específicos para *H.pylori*. El producto amplificado fue detectado por dos sondas: una sonda fluorescente marcada con el fluoróforo LC-Red 640 y fosforilada en 3´ (5´-GGCAAGACGGAAAGACC-3´; nucleótidos 2504 hasta 2520), la cual la cual hibrida con la región en donde se encuentran las posiciones de las mutaciones del gen 23S rRNA, y la sonda de anclaje que se hibrida tres bases arriba y fue marcada con fluoresceína en el extremo 3´ (5´-TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCC-3´; nucleótidos 2473 hasta 2501) de la cepa de *H. pylori* UA802 (Taylor, Zhongming, Purych, Lo, & Hiratsuka, 1997) (Número de acceso del GenBank: U27270). Los primers se los mandaron a sintetizar por AppliedBiosystems y las sondas por TibMolBiolSyntheselaborpurificados al 100% por HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Tanto los primers como las sondas fueron comprobadas y verificadas por BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/U27270>).

Tabla 1: Tabla de primers y sondas para la región 23S rRNA

Primer	Secuencia (5' a 3')	Posición	Producto PCR	No. Acceso Gen Bank
HPYS	AGG TTA AGA GGA TGC GTC AGT C	2303-2324	267 pb	881379
HPYA	CGC ATG ATA TTC CCA TTA GCA GT	2547-2569	267 pb	881379
Sonda				
LC Red 640	GGCAAGACGGAAAGACC	2504-2520		U27270
Fluoresceína	TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTAC CC	2473-2501		U27270

4.4 Preparación de la master mix

Debido a que se utilizó el LightCycler termociclador (Roche Diagnostics) las reacciones fueron llevadas en unos capilares en un volumen de 20 μ l con 5 μ l de templado con ADN, 4 μ l de FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostic) 0,4 μ l de sonda (20 μ M/sonda) y 0,4 μ l de primer forward y reverse. La amplificación de PCR comprende un ciclo una denaturación inicial a 95°C por 10 min, seguido por 50 ciclos de amplificación (con una temperatura de transición de 20°C/s) el cual consiste en 95°C por 0s, el annealing at 60°C por 10 s y una extensión a 72°C por 17 s. Después de la amplificación se realiza un enfriamiento a 4°C por 30 s. Por cada corrida se incluyó un control sin templado con H₂O y un pool genético bacteriano a una concentración de 100 ng/ μ l. Este pool genético está caracterizado por microorganismos proveniente de heces como *Clostridium* sp., EHEC (del inglés Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*), EPEC (del inglés Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) de la mucosa respiratoria como *Mycobacterium* sp., el cual no incluye ninguna cepa de *H. pylori* o de *Helicobacter* sp.

En cuanto al análisis de las curvas de melting se lo realizó en un rango de temperatura de 40 a 70°C, la lectura se lo realiza a 640 nm con el mismo software integrado de LightCycler2.0.

4.6 Purificación de productos de PCR y secuenciación

Para el análisis por secuenciación se aislaron 5 muestras que representaban los casos más comunes en los resultados del análisis de las curvas de melting. Luego se realizó una amplificación por medio del LightCycler, en el cual no se utilizó las sondas y se cubrió esa cantidad con H₂O y se utilizó el mismo programa ya creado para la PCR Real-time. Luego se prosiguió a realizar un gel de agarosa al 2% para verificación de la banda en 267 pb en una cámara de electroforesis. Se realizó una purificación de los productos de la PCR por precipitación con acetato de sodio- etanol. Después se utilizó 1,5 µl de producto para realizar la PCR de secuenciación con Big Dye Terminator Master Mix. Siguiendo a esto se purificaron los productos de secuenciación con por precipitación EDTA-etanol. La electroforesis capilar de los productos purificados en el equipo 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

4.7 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas en el Genetic Analyzer se alinearon con la secuencia con de la cepa UA802. El software realizó la comparación y encontró las variantes en cada uno de las muestras y la marcó con la letra del cambio perteneciente a un nucleótido mutado o SNP (del inglés *Single Nucleotide polymorphism*). Posterior a esto se utilizó el diagrama de IUPAC/IUB (del inglés *International Union of Biochemistry/International Union of Pure and Applied Biochemistry*) propuesto por el programa Seqscape v3.0 para la interpretación de las letras que asignó el programa. Simultáneo a esto se fue comparando con las curvas de melting para cada una de las muestras.

5. RESULTADOS

En cuanto a los primeros resultados de la optimización de la prueba, se obtuvo que tanto la concentración como la calidad del ADN por medio de la extracción con el High Pure Viral

NucleicAcid Kit fue satisfactoria, obteniendo una buena base de templado para las investigaciones futura como PCR Real time y secuenciación, además de que no presentó ninguna dificultad en la metodología previamente explicada. De 50 muestras que se realizó las 50 muestras superaron una concentración mayor a 20 ng/μl requerida por la PCR y una calidad mayor a 1,7 (260/280) que nos muestra contaminación proteica (Lins, Lima, & Magalhaes, 2010). El resultado de la concentración y calidad de ADN de todas las muestras se encuentran en el **Anexo 7**.

Tabla No2 Resultado de la extracción de ADN por medio del High Pure Viral NucleicAcidKit.

No. De Muestras	Concentración >20 ng/μl para PCR	Calidad (260/280) > 1,7
50	50	50

La amplificación y detección de las mutaciones por medio de las curvas de melting como podemos observar en el **gráfico No 2**, se lo realizó de manera correcta, en cuanto a los resultados. El gráfico entrega las curvas de melting para las siguientes mutaciones A2142G, A2143G, A2142C y Wild Type. Donde se encontró que en base a resultados de previos estudios (Oleastro, y otros, 2003; Fontana, y otros, 2003; Garcia, 2010) las curvas varían en 0.3-0.8°C según (Oleastro, y otros, 2003) y las temperaturas corresponden a 53 °C que equivalen a temperaturas desde 52.2-52.7°C (A2142G), 53.6°C desde 53°C en adelante (A2143G), 57°C a 57,10°C en adelante (A2142C) y 60°C desde 60,5°C a 60,7°C (Wild Type). (**Véase Gráfico No2**)

A lo que respecta a la amplificación por PCR Real time, de las 50 muestras que se corrieron, 44 de ellas fueron positivas para CerTest 3 negativas para el mismo y 3 se utilizaron a partir del pool genético para verificar cada uno de los experimentos en PCR. Obtuvimos 35 de 44 muestras positivas para PCR Real time y 12 negativas. Entregándonos una sensibilidad del 74% y una especificidad de 100% para la prueba PCR Real time con respecto al CerTest (**Véase Tabla No.3**)

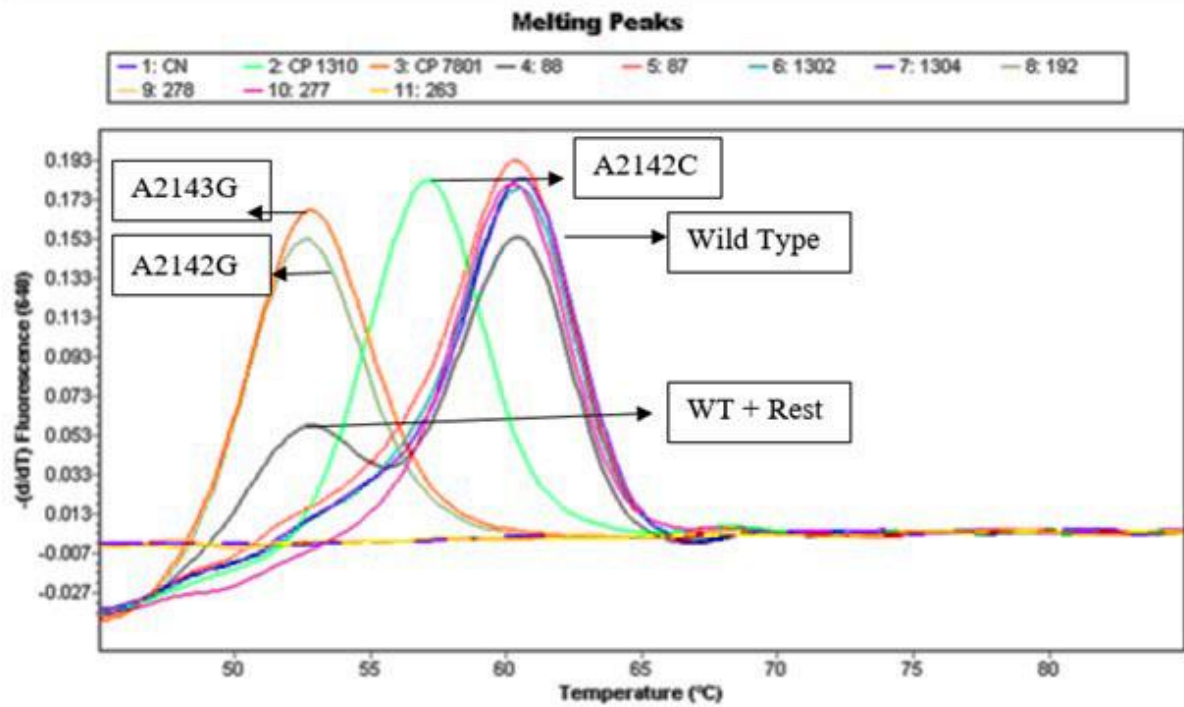


Gráfico No 1. Curvas de melting del fragmento de 267 pb del gen de ARNr 23S con las mutaciones A2142G, A2143G, A2142C y Wild Type. Los valores en el eje y representan la primera derivada negativa del cambio en la fluorescencia $-(dF/dT)$ para la variación de la temperatura en grados Celsius.

La mutación que mostró mayor prevalencia fue la A2143G con 7 muestras de 44 analizadas, a pesar de que la A2142G también presentó 6 del total de las muestras cuyo resultado fue positivo para CerTest, la A2143G también estuvo presente en 2 muestras en donde se encuentran 2 picos en el melting correspondientes a 53°C y 60°C , como se puede observar en el gráfico No.2 en el caso de la muestra 88. La muestra 88 presenta una combinación de Wild Type positivo (WT+) resistencia previamente en concordancia por lo presentado por (Oleastro, y otros, 2003). Así mismo también existen 2 muestras con la combinación de WT + A2142G. Por último, la mutación A2142C la cual tiende a ser la menos prevalente como lo reportado en estudio previos (Liou, y otros, 2015), se obtuvo que 1 muestra del total desplegó dicha mutación, además también se encontró en combinación con la A2142G como se puede

observar en el **Anexo 2** en la muestra 21. Dichos resultados concuerdan con estudios previos de muestras tanto de biopsias como de heces, teniendo la misma prevalencia de mutaciones con lo encontrado con este experimento como se puede observar en la **Tabla No 4**.

Tabla No 3. Comparación de los resultados cualitativos de PCR Real time vs CerTest de muestras con una calculadora clínica en línea (<http://www.vassarstats.net/clin1.html>)(Newcombe, 1998)

PCR Real time	Condiciones por CerTest		Total
	Ausencia	Presencia	
Test positivo	0	35	35
Test negativo	3	12	15
Total	3	47	50
		95% intervalo de confianza	
	Valor estimado	Limite bajo	Limite alto
Prevalencia	94%	82%	98%
Sensibilidad	74%	59%	85%
Especificidad	100%	31%	100%

En cuanto al porcentaje global de la resistencia tenemos que el 43% (19 de 44 muestras positivas por PCR Real time) de las muestras analizadas obtuvieron mutaciones las cuales confieren resistencia a la claritromicina (Véase **Tabla No 4**). Por el otro lado como se puede observar en la **Tabla No 5**, de las muestras consideradas negativas incluyen las muestras sin ningún amplicón por PCR Real time, las cuales también salieron negativas para el análisis CerTest, y las otras tres muestras de control negativo con el pool genético citado anteriormente.

Tabla No 4. Resultado de las mutaciones prevalencia y resistencia de las muestras positivas.

No. de Muestras	PCR Real- Time							
	Wild Type	A(214)2)G	A(214)3)G	A(214)2)C	WT + A(2143)G	WT + A(2142)G	A(2142)C + A(2142)G	Negativo
					Tm = 60	Tm = 60		
	Tm=6	Tm=5	Tm=5	Tm=5	+ Tm = 53,6	+ Tm = 53	Tm = 57	
	0	3	3.6	7			+ Tm = 53	

De las secuencias obtenidas en el software Data Analysis se observó los picos asignados y detectados para cada uno de las bases, estos resultados se exportaron dichas secuencias hacia una base de datos y se integró al sistema SeqScape 3.0. Se utilizó la secuencia del Gen Bank U27270 como la secuencia referencia y presentaron los siguientes resultados.

En el caso de la muestra 184 se obtuvo una curva de melting de 53°C lo que representa un cambio de una adenina por una guanina o A2142G como se puede observar en el Anexo 2. En el gráfico No.3, se observa una sola mutación que corresponde a una A→G de la muestra 18 que corresponde a un cambio de aminoácidos de adenina por guanina, como se observa en el recuadro.

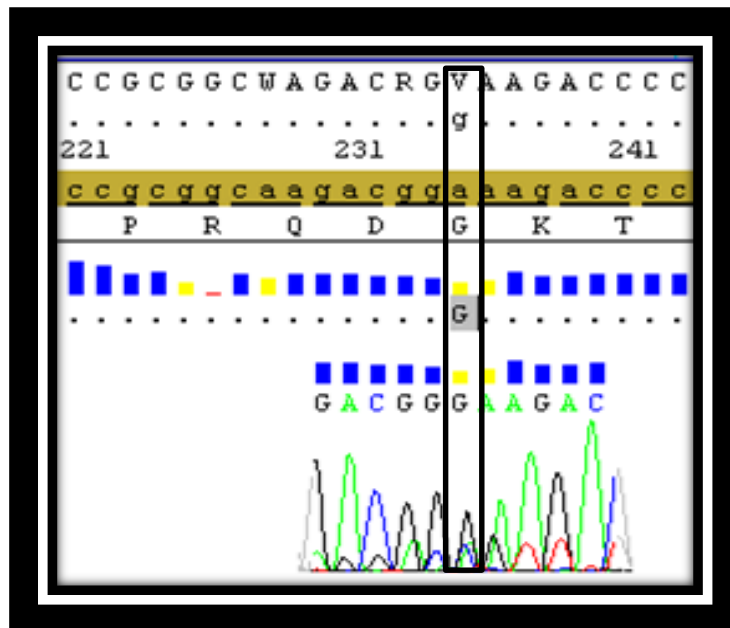


Gráfico No.2 Secuenciación del fragmento de 267 pares de bases de la muestra 184. En café la secuencia de referencia del Gen Bank (Acceso No: U27270). Recuadro cambio de una A→G definido por un pico de color negro en el primer forward (HPYS) y primer reverse (HPYA) en la posición 2142.

La muestra 334 (ver Anexo 3) presentó un pico alrededor de 53°C lo que corresponde a una mutación en la posición 2143 A→G. En el resultado de la secuenciación se corroboró dicha mutación como podemos observar en el gráfico No.3 señalado en el recuadro.

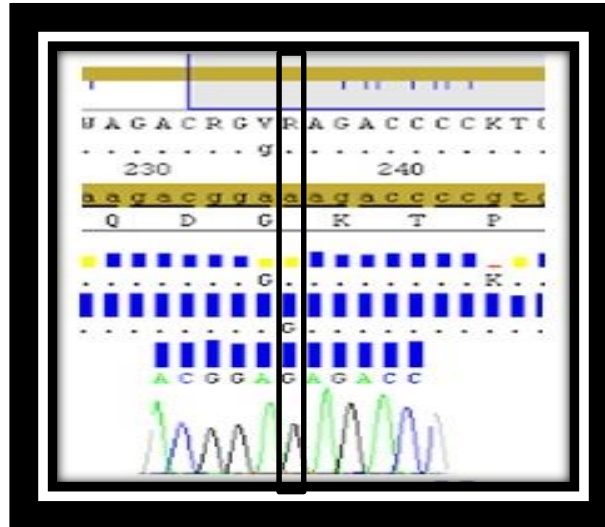


Gráfico No.3 Secuenciación del fragmento de 267 pares de bases de la muestra 334. En café la secuencia de referencia del Gen Bank (Acceso No: U27270). Recuadro cambio de una A→G definido por un pico de color negro en el primer forward (HPYS) y primer reverse (HPYA) en la posición 2143.

Mientras que la muestra 21 fue la única que mostró 2 mutaciones, específicamente, en la posición 2142 A→G ($T_m = 53^\circ\text{C}$) y de adenina por citosina o A→C ($T_m=57^\circ\text{C}$) como se puede observar en el Anexo 2, con un pico muy pronunciado en 57°C y otro no tanto en 53°C . Esto fue corroborado por los resultados de la secuenciación de dicha muestra cómo podemos observar en el Gráfico No.4. Cuando existe una variante en base a la secuencia de referencia de C y G en las diferentes lecturas de los primers, se asigna una S, como se puede observar en el diagrama de UIPAC en el Gráfico No.4.

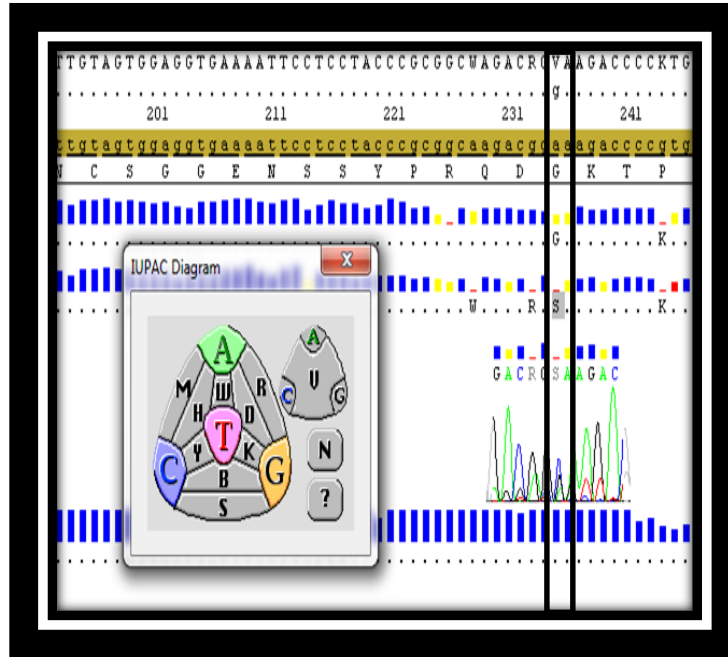


Gráfico No.4 Secuenciación del fragmento de 267 pares de bases de la muestra 21. En café la secuencia de referencia del Gen Bank (Acceso No: U27270). Recuadro negro cambio de una A→C definido por un pico de color azul y cambio de una A→G definido por un pico de color negro. En otra ventana el diagrama IUPAC utilizado por el programa para asignar las variantes.

Otra de las combinaciones que encontramos en los resultados fue la combinación entre WT + A2142G, como podemos observar en el caso de la muestra 315 en el Anexo3 Tenemos un pico pronunciado en 60°C y otro menor en 53°C lo que representaría una cepa WT y otra mutación de A→G en la posición 2142, lo cual fue correlacionado con los resultados que mostró la secuenciación como se puede observar en el Gráfico 5, en donde se define una R como resultado el cual según el diagrama IUPAC significa que tenemos tanto una A y como una guanina o G.

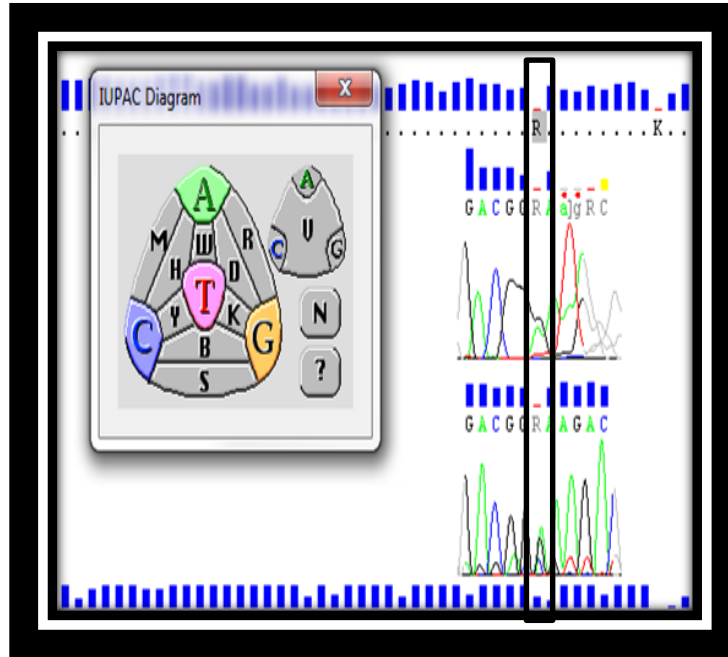


Gráfico No.5 Secuenciación del fragmento de 267 pares de bases de la muestra 315. En café la secuencia de referencia del Gen Bank (Acceso No: U27270). Recuadro negro cambio de una A→G definido por un pico de color negro y concordancia con la secuencia referencia de la A en la posición 2142. En otra ventana el diagrama IUPAC utilizado por el programa para asignar las variantes.

Además de correr todas las variantes previamente mencionadas, también se agregó una muestra de WT como se puede observar en el Anexo 1. La muestra 277 presentó un pico en 60°C el cual no representa una variante según la secuencia de referencia como se puede notar en la Gráfica No 6, en donde ninguna parte de la secuencia de la muestra se determinó una variante. Todas las alineaciones de las secuencia se puede observar en el Anexo 6 para mayor observación del fragmento completo de 267 pb.

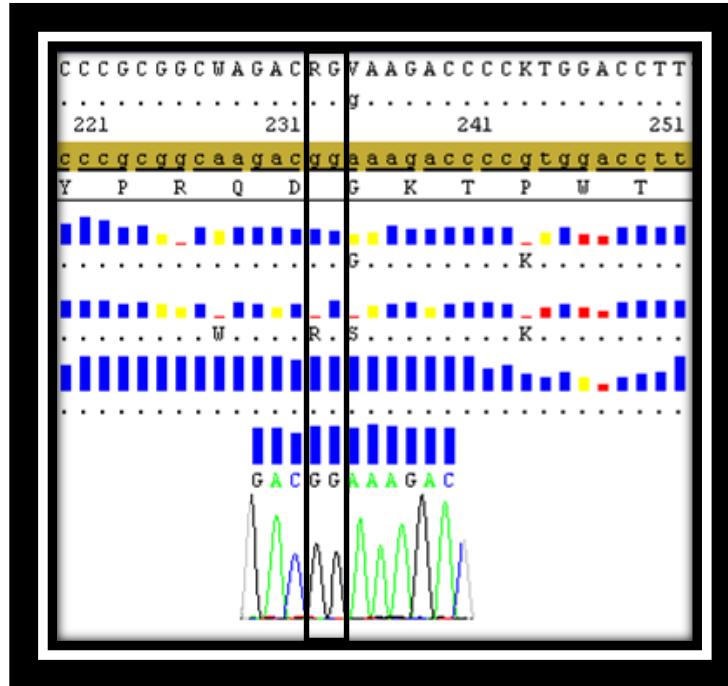


Gráfico No.6 Secuenciación del fragmento de 267 pares de bases de la muestra 277. En café la secuencia de referencia del Gen Bank (Acceso No: U27270). Recuadro negro la secuencia analizada sin variantes en la posición 2142 y 2143 marcadas por una curva de color verde correspondiente a una A.

6. DISCUSIÓN

Este trabajo tiene como objetivo la implementación y optimización de un método el cual detecta las diferentes mutaciones en la zona codificadora de la peptidil- transferasa del 23S ARN ribosomal que confieren resistencia a la claritromicina, un método que ya ha sido implementado en países como Colombia (Alvarez, y otros, 2009) y Brasil (Fontana , y otros, 2003) para el control y tratamiento de *H.pylori*.

6.1 Extracción de ADN en heces

La optimización del método radica en la utilización del PCR Real time como herramienta principal para la detección de las mutaciones(Mégraud, Besséde, & Lehours, 2014).Desde hace mucho tiempo se ha utilizado la sensibilidad y la especificidad de la PCR Real Time para

diagnóstico médico de varios tipos de microorganismos, como bacterias y virus, causantes de una variedad de enfermedades infecciosas (Belak, 2009; Monno, 2012; Lins, 2010). La técnica posee ventajas como la rapidez de los resultados y la detección de mínimas cantidades de ADN (Lipkin, 2010). A pesar de esto, existen un número de factores que se pueden generar a la hora de la amplificación, que pueden hacer que falle la reacción, los cuales pueden ser causados por algunos problemas en la extracción de ADN por ejemplo. En el caso de las heces es muy probable que se encuentre el grupo hemo y sus derivados metabólicos así como polisacáridos (Monteiro, 1997). Como pudimos observar en los resultados, el Kit Viral de Roche para la extracción de ADN mostró una gran eficiencia con la adición de un paso previo de preparación con PBS, el cual proporcionó una buena matriz para la suspensión celular parecido al protocolo utilizado por Schabereiter, y otros (2004). Este paso se lo realizó en base a estudios con *H. pylori* en los cuales utilizaban dicha matriz (Monteiro, 1997). No se evaluó la extracción aumentando las perlas Magna Beans ya que la concentración y la calidad de las muestras fueron las adecuadas para el método deseado (ver Tabla No.1). La cantidad requerida para el uso de la PCR con una concentración mínima de 20 ng/ul de ADN y una calidad de 1,7 o mayor presentados por las muestras (García, 2010).

A pesar de obtener una buena referencia en la cuantificación del ADN también podemos corroborar dicha eficiencia de la extracción en las curvas de melting y de amplificación en el PCR Real-Time. Las curvas tanto de amplificación como de melting no presentan interferencia, no obstante, si existió un caso de la muestra 1861 como se puede observar en el anexo 4 y 5, que se tuvo que repetir debido a que la curva de melting salía a una temperatura menor a las estimada. Posterior a esto la corrida se repitió, logrando una curva de melting esperada entre algunas de las mutaciones o cepa WT. Aun así no se podría atribuir totalmente a la extracción de ADN sino también a algunos problemas en la preparación del Master Mix, como por ejemplo falta de reactivo o mal pipeteo de las cantidades mediada por el operador (Monteiro, 1997). Otra

de las observaciones importante dentro de la extracción del ADN es que las muestras pueden ser eficientemente extraídas, pero la estabilidad no rinde mucho más de unas 3-4 corridas en Light Cycler, como se observó en el caso de los controles positivos. Los controles salieron del mismo estudio para corroborar las nuevas muestras con las mutaciones puntuales. Esto puede ser debido a que el ADN se degrada por el cambio de -20°C a temperatura ambiente y los controles deberían ser cambiados (Makristathis, Hirschl, Russmann, & Koletzko, 2007).

6.2 Detección de mutaciones en PCR Real-time

En cuanto a la amplificación por PCR Real time, tenemos que comenzar por el hecho de que no se evaluó muchas muestras debido a que el objetivo no fue comparar las técnicas como otros estudios en Portugal (Oleastro, y otros, 2003), China (Liu y otros, 2011), Brasil (Garcia, 2010) y Colombia (Correa y otros, 2000). (Correa et al, 2000), sino solo optimizar el método, teniendo en cuenta que se ha probado estas mutaciones varias veces en diferentes estudios en lo que respecta a resistencia a claritromicina (Malfertheiner y otros, 2012). A pesar de que varios de estos estudios como el de Oleastro y otros (2003) utilizaron muestras de biopsias para validar el método y compararon con el E-TEST, al contrario de nuestra metodología, que se utilizó heces y no se comparó con ningún método, debido que se utilizó el CerTest únicamente para discriminar en primera instancia los pacientes presuntivos de *H.pylori*. Justificado por la razón de que se presente un cuadro clínico con un paciente cuyo tratamiento está siendo inefectivo y se ha vuelto a detectar a la bacteria por algunos métodos entre los que están histológicos, endoscópicos, inmunológicos, serológicos o moleculares (Megraud y otros, 2013). Esto requeriría entender porque el tratamiento sigue siendo inefectivo pudiéndose agravar las implicaciones clínicas por la persistencia de *H. pylori*. Lo que nuestra metodología solucionaría de manera rápida y efectiva si se trata un caso de resistencia o no. El cual sugeriría en caso de ser positivo para las mutaciones, un cambio en el tratamiento que el paciente recibe, lo que ninguna de las técnicas anteriores podría sugerir. Por ende es

imposible comparar esta metodología con la prueba de antígeno CerTest, además de ya haber sido validada por muchos otros autores, como Fontana, y otros (2003); Lopez-Brea & Alarcón (2006); Oleastro, y otros (2003) y Taylor, y otros (1997), que ante el método de disco E-test o HELIS, obtuvieron muy buenos resultados.

En comparación con el CerTest tenemos que es una prueba inmunocromatográfica que detecta antígeno por medio de un inmunocomplejo, dicho antígeno puede presentar reacción cruzada (Megraud y otros, 2013) por dicha razón como se ha expuesto en varios artículos justifica nuestro porcentaje de concordancia del 80%, en el caso de las muestras positivas. El 20% de discrepancia se puede dar debido a que la prueba del CerTest puede generar muchos falsos positivos, que para PCR son totalmente negativas o Wild Type que se incluyen en dicho porcentaje de discordancia muy cercano al 16% que presenta (Liu et al, 2011). En el caso de las muestras positivas también encontraron falsos negativos en ensayos inmunocromatográficos debido a la baja sensibilidad de estas pruebas porque pueden ser que las cepas susceptibles se encuentren en baja cantidad (Oleastro, y otros, 2003). Cuando por el otro lado el PCR Real time puede detectar hasta un 10% de las cepas mutadas con referencia a la WT (van Doorn y otros, 2001) y detectar falsos negativos de la inmunocromatografía la cual no posee tanta sensibilidad. Este caso no ocurrió en el ensayo debido a que solo utilizamos 3 muestras negativas para CerTest no obstante no se descarta la posibilidad de encontrar casos de pacientes con una prueba inmunocromatográfica negativa y alguna mutación de resistencia presente en una pequeña cantidad de las cepas presentes por PCR Real Time.

En cuanto a la prevalencia de las mutaciones, se encontró que la A2143G estuvo presente en el 16% en nuestro estudio, siendo la mutación con mayor prevalencia como lo reportado en Europa (Agudo, y otros, 2010) y América (García, 2010). Por otro lado comparado con China en donde aún existe discrepancia entre si es A2144G o A2143G en donde igual está

presente (Xiong, y otros, 2012). Discrepando totalmente con África en donde la A2144G se ubica como la más importante (Mansourk, Burucoo, & Zribi, 2010).

La A2142G fue la segunda mutación más prevalente en el estudio, teniendo una prevalencia de 14% en las muestras estudiadas. Esta mutación al igual que la anterior, es muy difícil de analizar en el melting debido a que se encuentra con una separación de apenas 0,5°C con la A2143G, como se puede observar en la Fig.1. La diferencia en las curvas de melting se da debido a la hibridación de las sondas a diferente temperatura de melting. La temperatura de melting se define como la temperatura en la cual el 50% de mi fragmento se encuentra en forma de hebra simple, el cual varía dependiendo de la concentración de bases nitrogenadas presente en el fragmento(Fontana , y otros, 2003). Por ende la fluorescencia se emite y es detectada a diferentes temperaturas en este caso. Muchos de los estudios previos no han detectado específicamente en la curva meltingla mutación en cuestión y se ha reportado como A2142/3G porOleastro y otros (2003); Marais y otros (1999) y van Doorn y otros (1999). En el caso de nuestro estudio se comprobó dichas mutaciones por medio de la secuenciación de Sanger por ciclos térmicos, lo cual nos permitió validar tanto las curvas de melting para utilizarlas como referencia sostenible de la diferencia en el análisis. En el Anexo 3 por ejemplo podemos observar una corrida cuyo análisis podría ser complicado y se ha vuelto muy difícil diferenciar las dos mutaciones A2142G y A2143G para otros estudios.Al realizar la secuenciación, nos permite(**Ver Gráfico 3**)determinar que una temperatura alrededor de los 53°C, que el análisis de las curvas de melting mostraba la mutación correcta , ya que luego la secuenciación corroboró dichos resultadoscomo lo hizo (Noguchi, y otros, 2007). En el Gráfico No.3 podemos diferenciar claramente cómo se presenta una muestra que posee con una mutación en la posición 2142 y otra por una mutación en 2143 (recuadro negro) cuyas bases cambian de A→G pero en diferente posición con respecto a la secuencia de referencia.

En cuanto a la mutación A2142C se ha descrito como la menos prevalente (López-Brea & Alarcón, 2006), la cual estuvo presente sorpresivamente en nuestro estudio, debido a que estadísticamente por el número de cepas estudiadas, era muy poco probable que esta mutación se diera. Por otro lado se encontró al igual combinada con otra mutación en el caso de la muestra 21. Esto muy parecido a varios estudios realizados con PCR Real-Time los cuales concuerdan con la mezcla de genotipos que se presentan debido a la alta sensibilidad presentada por los primers y sondas de este método Scaletsky y otros (2011); Xiongy y otros (2012); López-Brea & Alarcón (2006) y Lee y otros (2013). Las combinaciones son producto de la alta sensibilidad que muestra la técnica como podemos corroborar por casos en los que presentaron dos picos diferentes una correspondiente a WT y otro a una mutación (Oleastro, y otros, 2003).

Las combinaciones de genotipos se pueden dar por dos de razones. La primera es que al ser una muestra proveniente de heces fecales puede existir la denominada “mezcla de poblaciones”, en donde se encuentran poblaciones tanto resistentes como WT o como en algunos estudios en donde se ha detectado dos o más cepas resistentes (Lottpeich, y otros (2007); Versalovic, y otros (1996) y Taylor, y otros (1997). Las bacterias pueden estar en el intestino como agregaciones celulares o biofilms, lo que daría una idea de que en las muestras se podría encontrar dos o más cepas y, teniendo en cuenta que la vía de infección es oral-fecal con reservorio en humano, es muy probable que se obtenga dos o más genotipos diferentes (Alvarez, y otros, 2009). La segunda razón por el cual se puede dar estas combinaciones es que los genotipos sean proveniente de una misma cepa que tenga diferentes alelos en el ADN 23S ribosomal como lo mostrado Lee, y otros (2013), pero discrepando con (Oleastro, y otros, 2003) debido a que en ese estudio se procesaron muestras de biopsias.

6.3 Prevalencia de la resistencia

El porcentaje de resistencia total del estudio fue de 43% (19 en un total de 44 muestras positivas para *H. pylori*) en donde se tomó en cuenta los genotipos combinados de resistencia como un paciente con resistencia al igual que las mutaciones combinadas y todo eso se dividió para todos los pacientes que tuvieron positivo en el test de CerTest. Este resultado se relaciona con lo reportado a lo largo de Sur América que varía entre 0 al 60%, siendo el continente en promedio con mayor resistencia a la claritromicina (Camargo, y otros, 2014). Por estudios con porcentajes de resistencia como: 60% en Colombia (Yepes, Rodriguez, Ruiz, & Ariza, 2008), 50% Perú (Fochesatto, Guayán, Moran, & Vizacino, 2004), 18-22% Brasil (William, y otros, 2004), 2.2% Paraguay (Fariña, y otros, 2007) y 20% Chile (Vallejos, y otros, 2007).

Nuestro resultado en supremacía a lo reportado en el 2003 en un estudio realizado en Guayaquil, determinó que la resistencia de claritromicina de un 9,5% utilizando E-test (Debets-Ossenkopp, y otros, 2003). El E-test se ha comparado varias veces con las mutaciones que confieren resistencia detectadas por PCR Real Time y se ha encontrado una correlación del 96,4% (Oleastro, y otros, 2003). La ventaja del PCR Real time sobre este método es que es más sensible debido a que es capaz de detectar las mezclas de poblaciones previamente mencionadas. Ya que se obtuvieron casos en donde existía la mutación en PCR Real time mientras que en la tirilla no mostraba ninguna reacción por E-test (Mégraud, Bessède, & Lehours, 2014). También la gran diferencia de porcentaje la podemos acreditar al hecho del tiempo, de esta única publicación hecha en el país, en ese tiempo la resistencia pudo crecer debido a que no hay proyectos de restricción de consumo de antibióticos en el Ecuador, como lo hecho en Taiwan por ejemplo que bajo en una 7.9% (Liou, y otros, 2015). En primera instancia el medicamento que se recetaba primordialmente era el metrodinazol, mientras que la claritromicina se la utilizaba en menor proporción (Debets-Ossenkopp, y otros, 2003). Ahora se utiliza una combinación triple constituida por: un inhibidor de la bomba de protones como

el metrodinazol, un macrólido como la claritromicina y un beta-lactámico como amoxicilina (Fariña, y otros, 2007) El tratamiento ha sido demostrado ser el más eficaz contra el *Helicobacter pylori* a pesar de las mutaciones además de demostrar la importancia de la claritromicina por encima de metrodinazol que aun así exista resistencia logra servir, mientras que en el macrólido no sigue el mismo patrón (Fischbach & Evans, 2007). Por la creciente subida de claritromicina es que se ha evaluado estas mutaciones y por lo que hemos encontrado mayor resistencia a claritromicina de lo reportado anteriormente por (Debets-Ossenkopp, y otros, 2003). Además de todo esto tenemos que tener en cuenta que la claritromicina se comercializó y utilizó desde los años 90 como antibiótico para tratar enfermedades del tracto superior respiratorio (Alvarez, y otros, 2009).

6.4 Mutaciones en el gen 23S rRNA

A pesar de que se han tratado de asociar mutaciones que confieren resistencia a claritromicina, en diferentes subunidades de los ribosomas bacterianos como 16S, 5S y de más (Taylor, Zhongming, Purych, Lo, & Hiratsuka, 1997). El 23S es el que más ha tenido aceptación en la comunidad científica debido a que es el más asociado con resistencia a claritromicina (Makrithis, y otros, 2007; Oleastro, y otros, 2003; Versalovic, y otros, 1996; y Taylor, y otros, 1997). Mientras que el 16S más se encuentra asociado a tetraciclina (Versalovic, y otros, 1996) y el 5S con eritromicina (Taylor, y otros, 1997). Es determinante explicar porque utilizamos esta región si es que existen muchas subunidades ribosomales potenciales.

La razón por la cual utilizamos primers y sondas para la región 23S rRNA del *Helicobacter pylori*, es debido a que las mutaciones A2142/3G y A2142C están específicamente colocadas en la región de la activación de la peptidiltransferasa, en el dominio V (como se puede observar en el Anexo 7) (Versalovic, y otros, 1996). Dichas mutaciones provocan un cambio conformacional del ribosoma a nivel externo. Este cambio reduce la afinidad entre la

14-hidroxiclaritromicina de la claritromicina y la subunidad 50S del ribosoma bacteriano de *H. pylori*, que en vez de cumplir su actividad microbicida inhibiendo las cadenas nascentes de polipéptidos, bloqueando la peptidiltransferasa, por medio de la liberación del ARNt del sitio A del ribosoma, lo cual deberían acabar con la bacteria. No lo logra, debido a que la claritromicina no llega a unirse al ribosoma, dejando que actúe de manera normal y que las cadenas polipeptídicas se ensamblan sin problemas (Goldman, y otros, 1994).

Las mutaciones en las posiciones 2142 y 2143 de *H. pylori* han demostrado que son mutaciones equivalentes a las 2058 y 2059 en el genoma de 23S rRNA de *Escherichacoli* que confieren resistencia a macrólidos (Versalovic, y otros, 1996). Además de equivalentes entre sí, estas especies pueden asociarse con los mayores MICs presentados en varias cepas aisladas, como por ejemplo, la cepa UA802 de *H. pylori* (Taylor, y otros, 1997). Por un lado la mutación 2058 se ha encontrado en genes mutados de rRNA 23S en plásmidos a manera de multicopia, es decir en grandes cantidades como parte de la transferencia de genes entre bacterias, que confiere resistencia a eritromicina (un macrólido parecido a la claritromicina) (Vester & Garrett, 1987). Mientras que la 2059 no se había reportado para bacterias, pero estaba asociada a resistencia hacia algunos herbicidas en cloroplastos de plantas, agentes bioquímicos al igual que los macrólidos (Cseplo, Etzold, Talbi, Megraud, & Lamouliatte, 1988), hasta que luego se lo detectó en *E. coli* (Taylor, y otros, 1997). Estas dos mutaciones se pueden encontrar por la acción de dos copias del operon 23S rRNA encontrados en el genoma de *H. pylori* que le entrega la posibilidad de ser heterocigoto en contraste con *Mycobacterium avium* que solo posee una copia de su gen en cada ribosoma y no lo puede ser (Bukanov & Berg, 1994). A pesar de esto se ha encontrado por ejemplo que *Bacillus subtilis* tiene que tener una sola copia mutada para generar resistencia, mientras que se sugiere que *H. pylori* necesita de sus dos copias mutadas para generar mayor resistencia (Doi, 1991)

6.5 Ventajas de PCR Real-Time vs otras metodologías

En cuanto a las ventajas del PCR Real time, contra otros métodos de diagnóstico podemos observar que en primera instancia tiene una buena correlación con el E-test que se presenta en algunos caso como la prueba gold estándar (E-test) con un 98% (Monno, y otros, 2012) y con el método de ureA muy utilizado en 96% (Xiong, Tong, Wang, & Mao, 2012). A pesar de que algunos artículos atribuyen una baja de sensibilidad cuando se utilizan muestras de heces debido a dos principales aspectos, el primero por la mezcla de microbiota y el segundo por una infección mixta de las cepas resistentes con las sensibles en casos en el que el WT se encuentra 10:1 en donde predominaba la presencia de WT (Schabereiter-Gurtner, y otros, 2004; Lottpeich, y otros, 2007). Esto no ocurrió en nuestro estudio debido a que nosotros si obtuvimos algunas muestras en combinación WT + Resistencia, además de corroborar con secuenciación una cepa WT en comparación a algunas combinadas. La secuenciación de Sanger (Versalovic , y otros, 1996) como se ha podido valorar en muchas pruebas se considera como el mejor acercamiento para la detección de mutaciones a lo largo de los genes 23S rRNA los cuales confieren resistencia a la claritromicina(Occhialini, y otros, 1997), al utilizar este componente en la metodología nos ayudó a confirmar los meltings y la técnica de PCR Real-time que son métodos menos complejos, menos largos y rápidos en términos de tiempo para detectar las mutaciones como lo hecho por (Noguchi, y otros, 2007). La técnica utilizada ha sido probada y medida con una sensibilidad de 98,4% y especificidad 94,1% por (Oleastro, y otros, 2003).

La técnica proporciona una gran ayuda en el aspecto clínico, como en Austria un hospital de niños ha introducido el PCR Real time en las prácticas como un método novel no invasivo para la infección y resistencia a claritromicina, además de que el hospital confirmo el uso clínico de dicho método en pediatría con una 96% de erradicación en un estudio de soporte (Vécese, y otros, 2010). En cuanto a la comparación con otros métodos por ejemplo moleculares como el PCR-RFLP tenemos que se ha demostrado por (Fontana , y otros, 2003) que no sirve para muestras de heces, además de tener un bajo rendimiento, ser incómodo al

momento de analizar por los patrones de restricción, la complejidad de detectar alelos y los falsos negativos que presenta (Lins, Lima, & Magalhaes , 2010). Para otras pruebas como la urea posee bajísima sensibilidad y especificidad (Xiong, Tong, Wang, & Mao, 2012); el E-test tiene la desventaja de durar 7-8 días para emitir un resultado además de los problemas que presente el cultivo previo antes de colocar la tirilla (Monno, y otros, 2012); y por último el HPSA ELISA (del inglés *Helicobacter pylori StoolAntigenEnzyme-LinkedImmunosorbentAssay*) solo sirve para la detección de *Helicobacter pylori* presenta una mayor sensibilidad pero no presenta la resistencia a claritromicina(Booka, y otros, 2005).

7. CONCLUSIONES

La detección molecular de las resistencias a la claritromicina fue exitosa debido a que pudimos encontrar todas las mutaciones reportadas anteriormente. La mutación A2143G fue la mutación más prevalente entre las estudiadas y el porcentaje de resistencia se encuentra dentro de los rangos reportados en latino américa con 43%. En cuanto a la metodología, no se encontró ningún problema con las muestras de heces y el protocolo mostró buena eficiencia en cuanto a la concentración y calidad del ADN. Además las muestras tuvieron picos bien definidos en sus curvas demelting, teniendo como resultado la mutación A2143G en 53⁰C, la A2142G en 52-52,7⁰C y la A2142C alrededor de 57⁰C. La puesta a punto del PCR Real time no mostró ningún problema y se utilizó controles negativos los cuales no amplificaron. En cuanto a la corroboración de la técnica por medio de la secuenciación de Sanger, se obtuvo una concordancia total de lo obtenido por la curva de melting y la alineación de las cepas mutadas con la secuencia base del 23S rRNA en el software SeqScapeSoftware 3.0. La detección de estas mutaciones por PCR Real time en heces posee la ventaja principal de no ser un método invasivo de detección y tener una alta sensibilidad y especificidad; además de poder dar un tiempo respuesta de 2 horas máximo para generar un resultado. Este proyecto permite dar una pauta a muchas alternativas, que se pueden dar en el país como por ejemplo: estudios a nivel molecular de la mutación más prevalente, estudios a nivel nacional del porcentaje de persistencia, programas de control de la ingestión de claritromicina sin receta, a pesar de esto no podría ser utilizado como prueba gold estándar en el país debido a su costo. Y por último dar un adecuado diagnóstico para que los pacientes reciban un tratamiento efectivo y la persistencia del *Helicobacter pylori* no desarrolle en un cáncer gástrico o una ulcera.

8. RECOMENDACIONES

La detección de las mutaciones que confieren resistencia a la claritromicina por medio de PCR Realtime constituye una técnica muy fácil de realizar. Para mejorar la eficiencia de dicha técnica es importante tener en cuenta varias recomendaciones. Primero en lo que viene el tema de las muestras de heces, es preferible realizar la extracción en las 24 horas desde que llegue al laboratorio y la corrida por PCR Realtime máximo en 48-72 horas. Esta metodología también está validada para muestras de biopsia que se las puede realizar sin problema. Es importante mantener refrigerada la muestra a una temperatura de 2-8 °C en el frasco de recolección de heces y el ADN en congelación. Al momento de la extracción previamente se debe diluir con PBS o cualquier solución tampón similar para mejorar la eficacia de la extracción. Para ahorrar el trabajo y tiempo de una extracción manual, se puede utilizar el QiagenStool Mini Kit u otros kits de extracción de heces. En cuanto al PCR Real time definir en el análisis de las curvas de melting los picos correspondientes a las mutaciones A2142/3G y si no es posible hacerlo reportar como cepa mutante. Sería de gran ayuda para mejorar la validación de la técnica un control externo, el cual tenga las cepas mutadas como una WT. En cuanto a los controles internos se puede utilizar un máximo de 3 veces debido a la degradación del ADN, ya que se observó que en muestras de heces tiende a degradarse por el cambio de temperatura al usar en cada corrida como control. La primera amplificación para secuenciación se puede no solo realizar en el mismo Light Cycler sino también en cualquier Termociclador de punto final. Para la purificación del amplicón de PCR se puede utilizar kits para la purificación de la banda y cuantificar para verificar que la banda este en una concentración deseada. Mientras que, después de la correcta validación del método, la secuenciación solo es necesaria hacerla si se desea aclarar una duda en las curvas de melting.

9. REFERENCIAS

- Agudo, S., Pérez-Pérez, G., Alarcón, T., & Lopez-Brea, M. (2010). High prevalence of clarithromycin- resistente *Helicobacter pylori* strains and risk factors associates with resistance in Madrin. *J Clin Microbiol*, 3703-7.
- Alarcón, T., Domingo, D., & López-Brea, M. (1999). Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori* . *International Journal of Antimicrobial Agents* , 19-26.
- Alvarez, A., Moncayo, J., Santacruz, J., Corredor, L., Reinoso, E., Martinez, J., & Beltrán, L. (2009). Resistencia a memtrodinazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispéptidos en Colombia . *Revista médica de Chile*, 1309-1314.
- Amieva , M., & El-Omar, E. (2008). Host bacterial interactions infection . *Gastroenterology* , 306-323.
- Andrews, J., Marsden, B., Brown, D., Wong, V., Wood, E., & Kesley, M. (2001). Comparison of three stool antigen tests for *Helicobacter pylori* detection. *J Clin Pathol* , 769-771.
- Batts, K., Ketover, S., Kakar, S., Krasinskas, A., Mitchell, K., & Wilcox, R. (2013). Appropriate use of special stains for identifying *Helicobacter pylori*: recommendations from the Rodger C Haggitt Gastrtointestinal Pathology Society . *Am J Surg Pathol* , 12-22.
- Bauerfiend, P., Garner, R., Dunn, B., & Mobley, H. (1997). Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*, 25-30.
- Belak, S., Thorén, P., LeBlanc, N., & Viljoen, G. (2009). Advance in viral disease diagnostic and molecular epidemiological techniques. *Molecular Diagnostic Expert Rev* , 367-381.
- Booka, M., Okuda, M., Shin, K., Miyashiro , E., Hayashi, H., Yamauchi, K., . . . Yoshikawa, N. (2005). Polymerase chain reaction restriction fragment lenght polymorphism analysis of clarithromycin-resistant *Helicobacter pyloti* infection in children using stool sample. *Helicobacter*, 205-213.
- Bukanov, N., & Berg, E. (1994). Ordered cosmid library and high resolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC1638. *Molecular Microbiology*, 509-523.
- Camargo, C., García, A., Riquelme, A., Otero, W., Camargo, C., Hernandez-Garcia, T., . . . Rabkin, C. (2014). The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: A systematic review in Latin America. *Am J Gastroenterol*, 485-495.
- Chiarini, A., Calá , C., Bonura, C., Gullo, A., Giuliana, G., Peralta , S., . . . Giammarco, A. (2009). Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from Western Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 437-446.
- Correa y otros. (2000). Unsuccessful treatment results in survival of less virulent genotypes of *Helicobacter pylori* in Colombian patients. . *Am J Gastroenterol*, 546-6.
- Cseplo, A., Etzold, T., Talbi, F., Megraud, F., & Lamouliatte , H. (1988). Point mutations in the 23rRNA genes of four lincomycin resistan *Nicotiana plumbaginifolia* mutants could

- provide new selectable markers for chloroplast transformation. *Molecular Genetics* , 295-99.
- Debets-Ossenkopp, Y., Reyes , G., Mulder, J., aan de Stegge , B., Peters, J., Savelkoul, P., . . . Vanderbroucke-Grauls, C. (2003). Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 141-145.
- Di Lorenzo. (2005). Subcommittee on chronic abdominal pain. *Pediatrics*, 370-381.
- Doi, R. H. (1991). Regulation of gene expression . *Modern microbial genetics* , 15-39.
- El-Zimaity, H., Serra, S., Szentgyorgyi , E., Vajpeyi, R., & Samani, A. (2013). Gastric biopsies: the gap between evidence-based medicine and daily practice in the management of gastric *Helicobacter pylori* infection. *Can J Gastroenterol* , 25-30.
- Falsafi, T., Walizadh, N., Sepehr, S., & Najafi, M. (2005). Application of a stool antigen test to evaluate the incidence of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents . *Clin Diagn Lab Immunol*, 1094-1097.
- Fariña, N., Kasamatsu, E., Samudio, M., Morán, M., Sanabria, R., & Laspina, F. (2007). Suceptibilidad a antibióticos de cepas paraguayas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con enfermedad gastro-duodenal. *Rev Médica de Chile* , 1009.1014.
- Fischbach, L., & Evans, E. (2007). Meta-analysis the effect of antibiotic resistances status on the efficacy of triple and queadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*, 343-57.
- Fochesatto, N., Guayán, V., Moran, E., & Vizacino, A. (2004). *Helicobacter pylori* y enfermedad gastroduodenal: Bases para el diagnóstico y tratamiento . *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*, 11-17.
- Fontana , C., Favaro, M., Pietroiusti, A., Pistoia, E., Galante , A., & Favalli, C. (2003). Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples . *J Clin Microbiol*, 3636-40.
- Formichella, L., Romberg, L., Bolz, C., Vieth, M., Geppert, M., & Gottner, G. (2013). A novel line inmunnoassays based on recombinant virulence factors enables highly specific sensitive serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection . *Clin Vaccine Immunol*, 1703-10.
- Garcia, G. (2010). High prevalence of claritromycin resistance and *cagA*, *vacA*, *iceA2* and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian children. *J Clin Microbiol*, 4266-8.
- Goldman, R., Zakula, D., Flamm, J., & Capobianco , J. (1994). Tight binding of chlaritromicyn its 14-R-hidroxy metabolite and erithromicyn to *Helicobacter pylori* ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother* , 1496-1500.
- Gomez, N., Alvarez, L., Zapatier, J., & Vargas, P. (2005). Efficacy of stool antigen and serologic tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* in Ecuadorian population. *Rev Gastroenterol* , 146-150.
- Goodwin, C., Armstrong, J., Chilvers, T., Peters, M., Collins , M., Sly, L., . . . Harper, W. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* genera. *Ins Syst Bacteriol*, 397.

- Korkmaz, H., Kesli, R., Karabagli, P., & Terzi, Y. (2013). Comparison of the diagnostic accuracy of five different stool antigen tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 116-23.
- Lee y otros. (2013). Eradication of *Helicobacter pylori* according to 23S ribosomal RNA point mutations associated with clarithromycin resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, 1123-1130.
- Lins, A., Lima, R., & Magalhaes, M. (2010). Claritromycin-Resistant *Helicobacter pylori* in Recife, in Brazil, directly identified from gastric biopsies by polymerase chain reaction. *Arq Gastroenterol*, 379-82.
- Lins, A., Lima, R., & Magalhaes, M. (2010). Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in Recife Brazil, directly identified from gastric biopsies by polymerase chain reaction. *Arq Gastroenterol*, 379-82.
- Liou, J., Chang, C., Chen, C., Chen, M. J., Fang, Y., & Lee, J. (2015). The primary resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan after the National Policy to restrict antibiotic consumption and its relation to virulence factor. *Plos ONE*, 1-11.
- Lipkin, W. (2010). Microbe hunting. *Microbiol Molecular Biology*, 363-377.
- Liu y otros. (2011). Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from Beijing children. *Helicobacter*, 356-3622.
- Long, M., Luo, J., Li, Y., Zeng, F., & Li, M. (2009). Detection and evaluation of antibodies against neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2381-8.
- López-Brea, M., & Alarcón, T. (2006). Novel Real Time PCR for detection of Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Helicobacter*, 400.
- Lottpeich, C., Schwarzer, A., Panthel, K., Koletzko, S., & Rüssmann, H. (2007). Evaluation of the Novel *Helicobacter pylori* ClariRes Real-Time PCR assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of *H. pylori* in stool specimens from symptomatic children. *Journal of Clinical Microbiology*, 1718-1722.
- Makristathis, A., Hirschl, A., Russmann, H., & Koletzko, S. (2007). Detection and clarithromycin susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in stool specimens by real-time PCR: how to get accurate test results. *J Clin Microbiol*, 2756-7.
- Malfertheiner y otros. (2012). Current concepts in the Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*, 646-64.
- Mansourk, B., Burucoa, C., & Zribi, M. (2010). Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of *Helicobacter pylori* isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: a prospective multicentre study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 332-5.
- Marais, A., Monteiro, L., Occhialini, A., Pina, M., Lamouliatte, H., & Mégraud, F. (1999). Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. *Gutt*, 463-467.
- Marshall, B. (2002). *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin Med JRCPL*, 147-152.

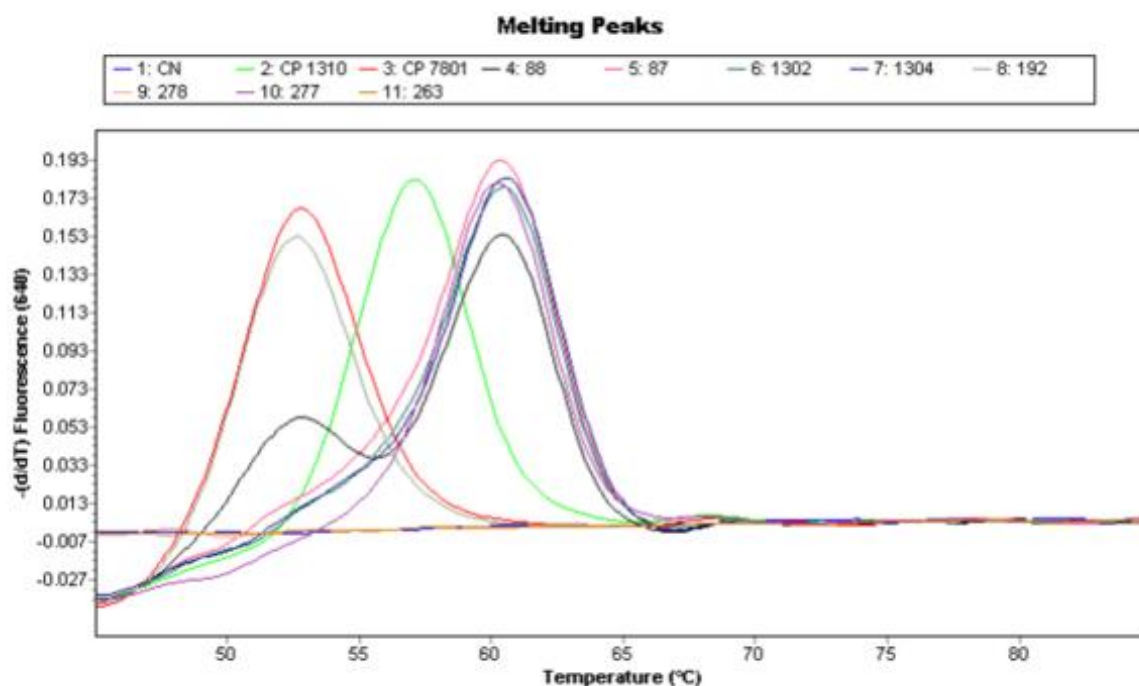
- Marshall, B., & Goodwin, C. (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Inf J Syst Bacteriol*, 68.
- Megraud y otros. (2013). Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *GUT*, 34-42.
- Megraud, F. (1998). Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in Helicobacter pylori . *Gastroenterology*, 1278-82.
- Mégraud, F., Bessède, E., & Lehours, P. (2014). Diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* , 6-10.
- Ménard, A., Oleastro, M., Santos, A., & Mégraud, F. (2002). PCR-RFLP can also detect the point mutation A2142C of the 23S rRNA gene associated with resistance of Helicobacter pylori to clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 1156-1157.
- Mladenova, I., Durazzo, M., & Pellicano, R. (2006). Transmission of Helicobacter pylori: are there evidences for a fecal-oral route? *Minerva Med*, 15-18.
- Monno, R., Giorgio , F., Carmine, P., Soleo, L., Cinquepalmi, V., & Ierardi, E. (2012). Helicobacter pylori clarithromycin resistance detected by Etest and TaqMan real-time polymerase chain reaction: a comparative study. *APMIS*, 712-7.
- Monteiro, L. (1997). Complex Polysaccharides as PCR inhibitors in Feces: Helicobacter pylori Model. *Journal of Clinical Microbiology* , 995-998.
- Newcombe, R. (1998). Two-Sided Confidence Intervals for the Single Proportion: Comparison of seven methods. *Statistics in Medicine*, 857-872.
- Noguchi, N., Rimbara , E., Kato, A., Tanaka, A., Tokunaga , K., & Kawai, T. (2007). Detection of mixed clarithromycin-resistan and suceptible Helicobacter pylori using nested PCR and direct sequencing of DNA extracted from feces. *J Med Microboil*, 1174-80.
- Nvström, J., & Svennerholm, A. (2007). Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against H. pylori that is reflected by specific mucosal immune responses . *Vaccine* , 2591-8.
- Occhialini, A., Urdaci, M., Doucet-Populaire , F., Bébéar, C., Lamouliatte, H., & Mégraud, F. (1997). Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding ribosomes. *Antimicrob Agents Chemothe*, 2724-8.
- Oleastro, M., Ménard, A., Santos, A., Lamouliatte, H., Monteiro, L., Barthélemy, P., & Mégraud, F. (2003). Real-Time PCR Assay for Rapid Acurrate Detection of Point Mutations Confering Resistante to Claritromycin in Helicobacter pylori. *Journal of Clinical Microbiology*, 397-402.
- Olfat, F., Zheng, Q., & Oleastro, M. (2005). Correlation of the Helicobacter pylori adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries . *FEMS Immunol Med Microbiol*, 151-156.
- Parsonnet, J., Friedman, G., Vandersteen, D., Chang, Y., Vogelman, H., & Orentreich, N. (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New England Journal of Medicine* : 1127-31.

- Pathak, C., Kaur, B., Bhasin, D., Mittal, B., Sharma, S., & Khanduja, K. (2014). Comparison of encapsulated versus nonencapsulated C-urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori* infection: a scintigraphy study. *Helicobacter* , 116-23.
- Ramirez , A., Mendoza , D., Leey, J., & Guerra, J. (2002). Estudio del *Helicobacter pylori* en Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Publica* , 209-214.
- Robles-Jara, C., Robles-Medranda, C., Moncayo, M., Landivar, B., & Parrales, J. (2008). Is a 7 day *Helicobacter pylori* treatment enough for eradication and inactivation of gastric inflammatory activity. *World J Gastroenterol*, 2838-2843.
- Rudnicka, A., & Chimela, M. (2004). Inflammation and host immune response in *Helicobacter pylori* infections . *Curr Trends Immunol*, 1-19.
- Scaletsky y otros. (2011). Application of Real-Time PCR Stool Assay for *Helicobacter pylori* detection and Clarithromycin Susceptibility testing in Brazilian Children. *Helicobacter*, 311-315.
- Schabereiter-Gurtner y otros. (2004). Novel Real Time PCR Assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous claritromycin susceptibility testing of Biopsy and Stool Specimens . *Journal of Clinical Microbiology* , 4512-4518.
- Sherris, Ryan, K., & Ray, C. (2004). *Medical Microbiology*. Boston: McGraw Hill.
- Skirrow, M. (1977). *Campylobacter enteritis "a new disease"*. *British Medical Journal* , 9-11.
- Taylor, D., Zhongming, G., Purych, D., Lo, T., & Hiratsuka, K. (1997). Cloning and sequence analysis of two copies of 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of Clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2621-2628.
- Theel, E. (2013). *Helicobacter pylori* infection: Test utilization Strategies for Diagnostic . *Mayo Medical Laboratories Comunico* , 1-8.
- Toshiro, F., Okazaki, K., & Tamaki, H. (2004). Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. *Laboratory Investigation* , 485-492.
- Trajkow, D., Stardelova, K., Dimitrova, M., Misheuxsi, J., & Serafimoski, V. (2007). *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. *Prizoli*, 25-38.
- Vallejos, C., Garrido, O., Cáceres , D., Madrid, A., Defilippi, C., & Toledo, C. (2007). Prevalence of metranidazole, claritromycin and tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* isolated from Chilean patients. *Rev. Médica de Chile*, 287-293.
- van Doorn et al. (2001). Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay detection of mutations in the 23S rRNA gene multicenter validation study. *Antimicrob* , 1500-1504.
- van Doorn, L., Glupczynski, Y., Kusters, G., Megraud, F., Midolo, P., Maggi-Solca, D., . . . Quint, G. (1999). Rapid detection by PCR and reverse hybridization of mutations in the *Helicobacter pylori* 23s rRNA gene associated with macrolide resistance. *Antimicrob*, 1779-1782.

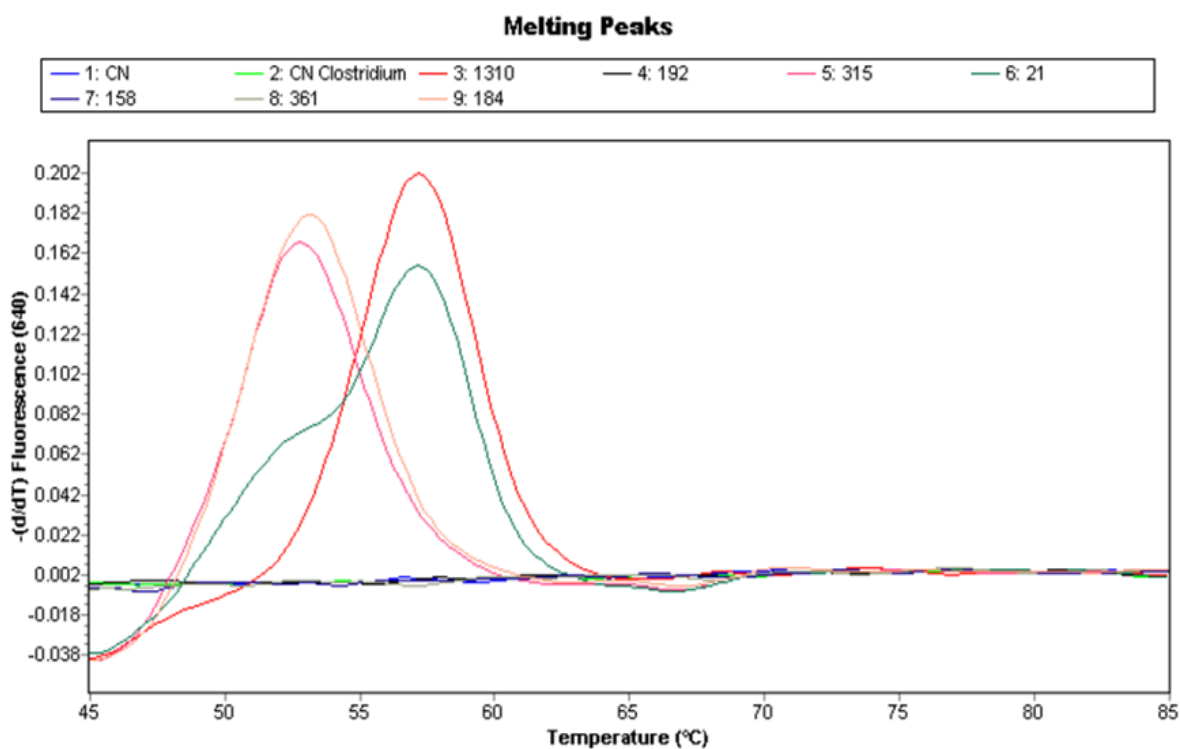
- Vécese, A., Innerhofer, A., Binder, C., Gizci, H., Hammer, K., Bruckdofer, A., . . . Makristathis, A. (2010). Stool polymerase chain reaction for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in children. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 309-12.
- Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., Griffy, M., Beyer, J., Flamm, R., . . . Go, M. (1996). Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents Chemother*, 477-480.
- Vester, B., & Garrett, A. (1987). A plasmid-coded and site-directed mutation in *Escherichia coli* 23S rRNA that confers resistance to erythromycin: implications for the mechanism of action of erythromycin. *Biochimie*, 891-900.
- Warren, J., & Marshall, B. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1273-75.
- William, D., Sobel, J., Pruckler, J., Song, Q., Swerdlow, D., Friedman, C., . . . Swaminathan, B. (2004). Antimicrobial Resistance Incidence and Risk factors among *Helicobacter pylori* infected persons United States. *Emerging Infectious Diseases*, 1088-1094.
- Wroblewski, L., Peek, R., & Wilson, K. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*, 713-739.
- Xiong, L., Tong, Y., Wang, Z., & Mao, M. (2012). Detection of Claritromycin- Resistant *Helicobacter pylori* by Stool PCR in Children: A comprehensive review literature. *Helicobacter*, 89-101.
- Yepes, C., Rodriguez, V., Ruiz, M., & Ariza, B. (2008). Resistencia antibiotica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Médica Colombiana*, 11-14.

ANEXOS

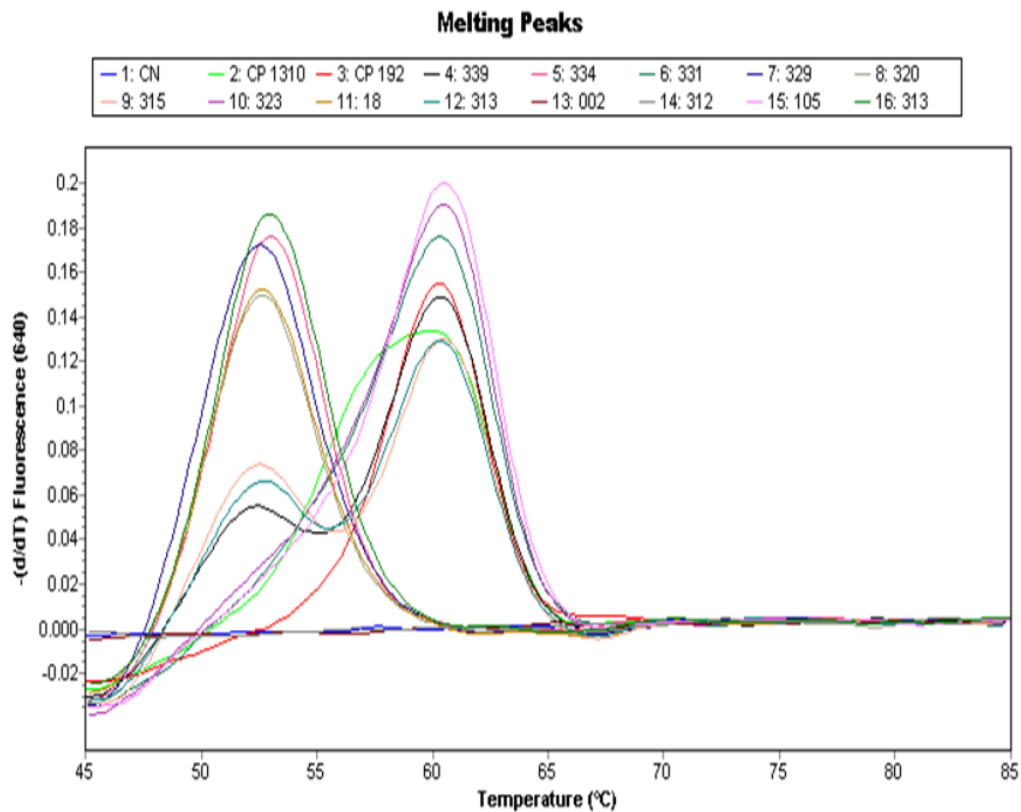
ANEXO 1: Corrida de PCR Real-time con muestras de ADN extraído de heces y controles positivo CP y negativo CN.



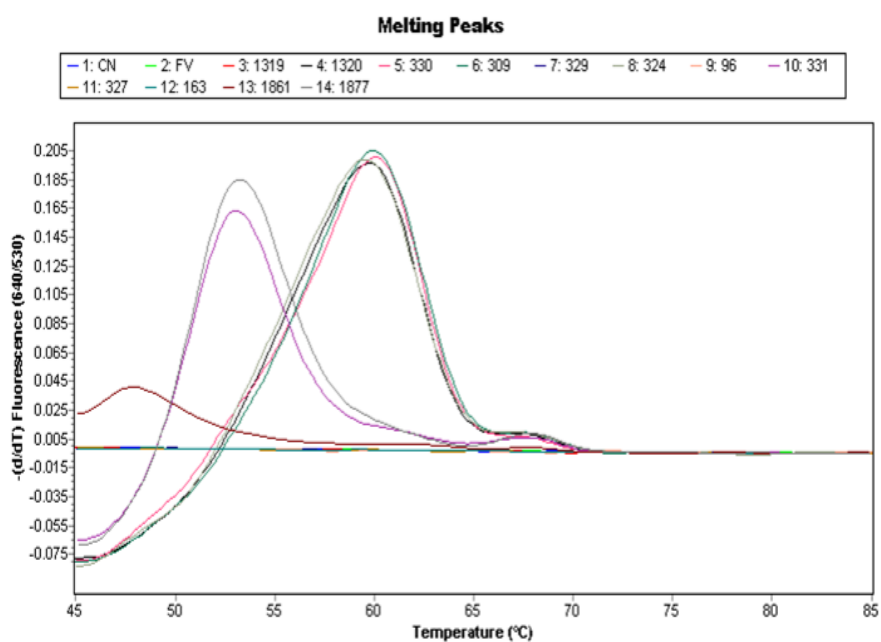
ANEXO 2: Corrida de PCR Real-time con muestras de ADN extraído de heces y controles positivo CP y negativo CN.



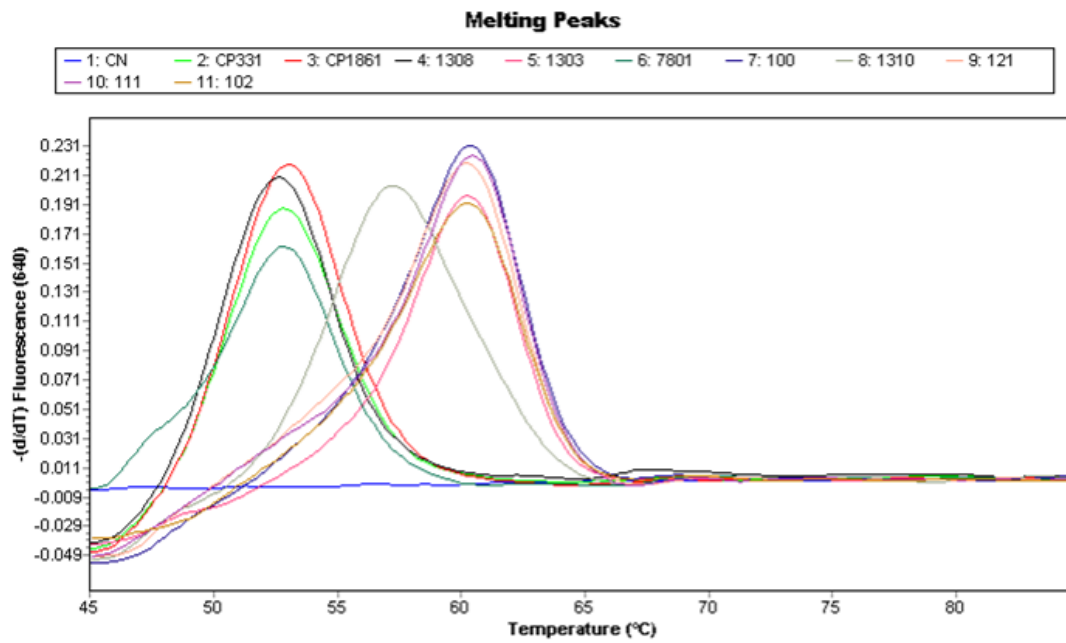
ANEXO 3: Corrida de PCR Real-time con muestras de ADN extraído de heces y controles positivo CP y negativo CN.



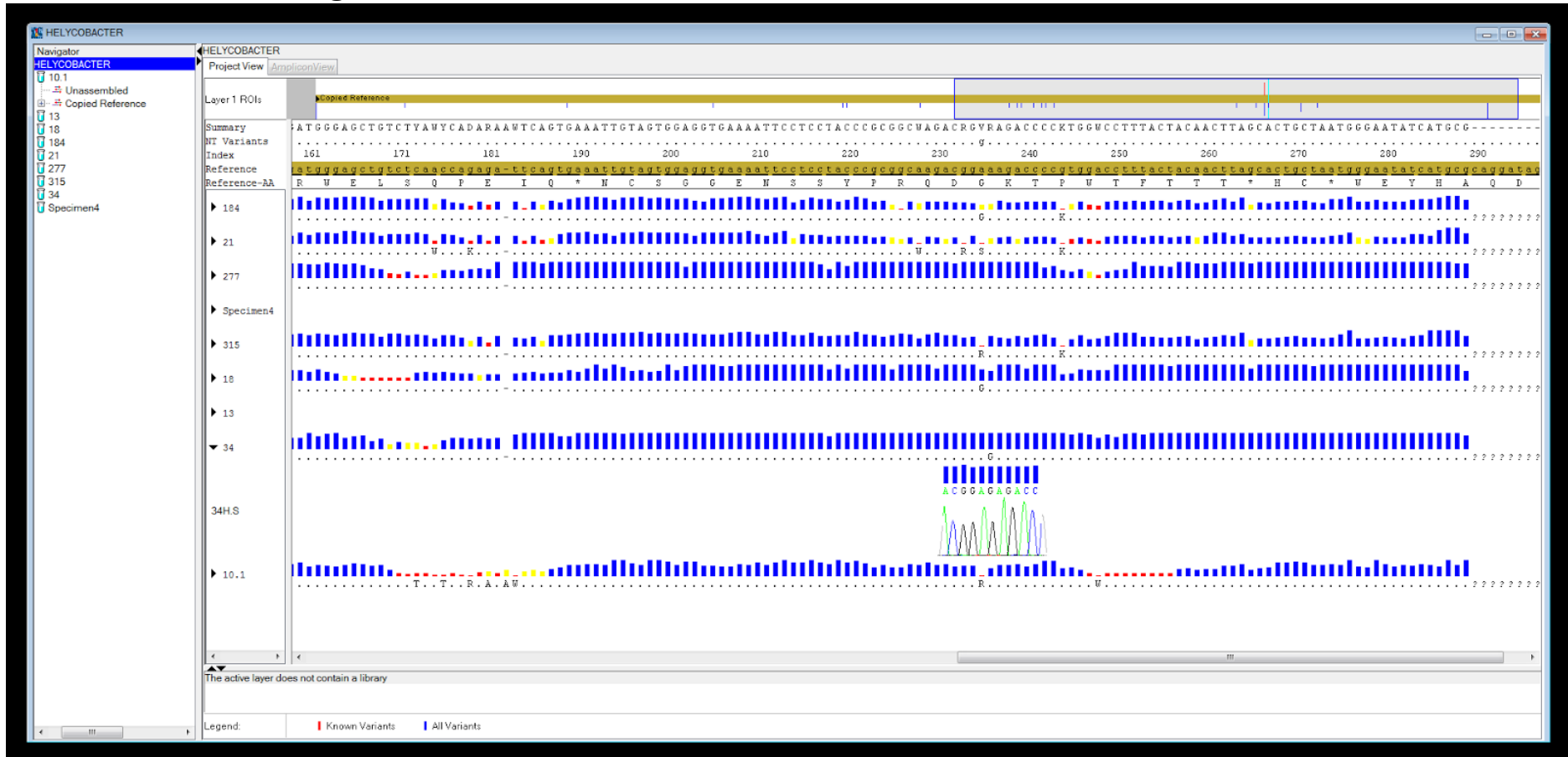
ANEXO 4: Corrida de PCR Real-time con muestras de ADN extraído de heces y controles positivo CP y negativo CN.



ANEXO 5: Corrida de PCR Real-time con muestras de ADN extraído de heces y controles positivo CP y negativo CN.



ANEXO 6: Alineación de las muestras correspondientes a diferentes mutaciones encontradas en el análisis de melting con la secuencia de referencia GB:U27270.



27	277	0,1654	0,0706	165,4	2,34
28	263	0,1184	0,043	118,4	2,75
29	339	0,1964	0,0771	196,4	2,55
30	334	0,1521	0,591	152,1	2,57
31	331	0,1707	0,0612	170,7	2,79
32	329	0,027	0,0121	27	2,23
33	320	0,0212	0,0079	21,2	2,68
34	315	0,1883	0,0719	188,3	2,62
35	323	0,1871	0,0664	187,1	2,82
36	18	0,2013	0,0718	201,3	2,8
37	313	0,0827	0,0316	82,7	2,62
38	2	0,2873	0,1156	287,3	2,49
39	312	0,1386	0,0577	138,6	2,4
40	105	0,2326	0,0929	232,6	2,5
41	313	0,1255	0,0543	125,5	2,31
42	192	0,1865	0,066	186,5	2,83
43	315	0,1542	0,054	154,2	2,86
44	21	0,1707	0,0561	170,7	3,04
45	158	0,1631	0,0582	163,1	2,8
46	361	0,1796	0,0599	169,7	3,00
47	184	0,147	0,06579	112,4	2,23
48	C. difficile 1	0,28742	0,078414	84,3	3,67
49	C. difficile 2	0,322	0,0992	113,6	3,25
50	MTB	0,178	0,0668	50,7	2,66