



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Evaluación de mutaciones relacionadas con la resistencia a antibióticos en
cepas de *Helicobacter pylori*”**

T E S I S

Que presenta

QBP Dulce Alheli Guzmán González

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de tesis:

Dra. Abigail Betanzos Fernández

Ciudad de México

Julio, 2024

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU 676977 en el laboratorio 4 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección de la Dra. Abigail Betanzos Fernández y la asesoría de los Drs. Rosa María del Ángel Núñez y Luis Esaú López Jácome

Agradecimientos

A la **Dra. Abigail Betanzos** por aceptarme en su laboratorio para realizar este proyecto. Por todas sus enseñanzas desde las clases que me impartió, hasta las que me proporcionó en cada revisión seminario. Por todo el apoyo y amabilidad en este año, asesoramiento, la paciencia, resolver mis inquietudes y guiarme hasta el final.

A la **Dra. Rosa María del Ángel** por el asesoramiento y guía a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Al **Dr Luis Esaú López** por todo el conocimiento proporcionado, las facilidades de trabajar, mucha paciencia en disipar mis dudas y todo el tiempo y cariño que brindo en la realización de este proyecto.

A mi amigo de la maestría **Mizel** que ha estado conmigo desde el día uno hasta la culminación de esta meta, por todos los momentos compartidos y estar en los instantes de estrés.

A mi amiga y compañera de Laboratorio **Melissa Chacón** por la guía y compartir sus conocimientos con amabilidad y paciencia, por estar con los buenos y malos momentos y por contar con su valiosa amistad siempre.

A la **M. en C. Angelica Silva** por toda la ayuda brindada en el laboratorio.

A todos los alumnos de servicio social **Manuel, Genesis, Ivon y Karla** por la ayuda en la elaboración de este trabajo.

Dedicatoria

A **mi madre Esthela**, quien me dio la vida, y a pesar de la situación que pasemos, siendo madre soltera, puso sacarnos adelante a mi hermana y a mi. Por ser la incondicional siempre y darlo todo por sus hijas. Tu madre mía que me ha apoyado en cada decisión que he tomado, siendo mi mejor amiga de toda la vida, mi confidente, quien me ha dado ánimos cuando una situación me sobrepasa, y ser la más orgullosa cuando cumplo alguna meta, así como esta. Apoyándome en este camino de la maestría desde el día que decidí postularme, siempre presente en todo el proceso, y aun sabiendo que esto implicaría irme a vivir a otro estado de país y quedarse un tiempo con mi hijo, lo cual lo agradezco infinitamente y espero encontrar la forma de pagarte por tanto que has hecho por mí. Gracias por ser mi más grande ejemplo de jamás rendirse ante ninguna circunstancia, de ser una mujer empoderada y dedicada a triunfar.

A **mi hijo Brayan** quien, a pesar de la distancia siempre estuvo presente, apoyándome en cada paso, en cada materia, creyendo en mí. Enseñándome que existe el amor incondicional madre e hijo y, que, siendo aun un niño, puede darme varias enseñanzas. Por ti hago esto, hijo mío, para ser un ejemplo para seguir y sientas orgullo por tu madre. Tú, que has llenado de felicidad mi vida y me has hecho crecer como persona y como madre. Siendo mi motor para seguir adelante cada día.

Índice

1.	LISTA DE ABREVIATURAS	1
2.	RESUMEN	2
3.	ABSTRACT.....	3
4.	INTRODUCCIÓN	4
4.1.	<i>Helicobacter pylori</i>	4
4.1.1	Generalidades.....	4
4.1.2	Epidemiología	5
4.1.3	Factores de virulencia.....	6
4.2	Colonización de <i>H. pylori</i>	8
4.2.1	Gástrica	9
4.2.2	Pancreática	9
4.3	Afecciones relacionadas con <i>H. pylori</i>	10
4.3.1	Afecciones gástricas.....	11
4.3.2	Afecciones extragástricas	11
4.4	Tratamiento contra <i>H. pylori</i>	12
4.4.1	Tipos	12
4.4.2	Mecanismo de acción.....	14
4.3.	Tratamiento en México.....	16
5.	Resistencia a antimicrobianos de <i>Helicobacter pylori</i>	17
5.1.	Resistencia a claritromicina	18
5.2.	Resistencia a amoxicilina	19
5.3.	Resistencia a metronidazol	19
5.4.	Resistencia a levofloxacino/ciprofloxacino	21
5.5.	Resistencia antimicrobiana de <i>Helicobacter pylori</i> en México	21
5.6	Métodos para la detección de RAM en <i>H. pylori</i>	22
5.	JUSTIFICACIÓN.....	24
6.	HIPÓTESIS.....	25
7.	OBJETIVOS.....	25
7.1	OBJETIVO GENERAL	25
7.2	OBJETIVOS PARTICULARES	25
8.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26

9. MATERIALES Y MÉTODOS	27
9.1 Cepas de <i>H. pylori</i>	27
9.2 Extracción de ADN	27
9.3 Amplificación de genes por PCR	28
9.4 Secuenciación de genes.....	29
9.5 Ensayo de susceptibilidad a antibióticos	29
9.6 Inducción de RAM in vitro en cepas de <i>H. pylori</i>	31
10. RESULTADOS	33
10.1 Caracterización de las cepas de <i>H. pylori</i>	33
10.2 Amplificación de genes relacionados con RAM en <i>H. pylori</i> antes de la inducción a RAM ..	36
10.3 Secuenciación de genes relacionados con RAM en cepas de <i>H. pylori</i> antes de la inducción a RAM	37
10.4 Determinación de MIC en cepas de <i>H. pylori</i>	43
10.5 Inducción de resistencia a antibióticos in vitro para <i>H. pylori</i>	45
10.6 Secuenciación de genes relacionados con RAM en cepas de <i>H. pylori</i> después de la inducción a RAM.....	50
11. DISCUSIÓN	56
12. CONCLUSIONES	61
13. PERSPECTIVAS.....	63
14. BIBLIOGRAFIA	64

1. LISTA DE ABREVIATURAS

μL: microlitros

μm: micrometros

AGS: Adenocarcinome Gastric Stomach

AMH: agar Müeller Hilton

ATCC: American Type Culture Collection

cag PAI: isla de patogenicidad *cag*

CagA: citotoxina asociada al gen A

CIIC: Centro Internacional de Investigaciones sobre Cáncer

CO₂: dióxido de carbono

DM: Diabetes *mellitus*

DNA: ácido desoxirribonucleico

ERK: quinasa reguladora de señal extracelular

FAK: quinasa de adhesión focal

g: gramo

h: hora

HtrA: proteasa A de requerimiento de alta temperatura 2

IBP: inhibidor de la bomba de protones

IL: interleucina

MALT: tejido linfoide asociado a mucosas

mg: miligramos

min: minutos

mL: mililitros

mM: milimol

Mpb: mega de pares bases

NH₄: amoniaco

OipA: proteína inflamatoria externa A

OMPs: proteínas de membrana externa

pb: pares de bases

PBP: proteínas de unión a penicilinas

PBS: buffer fosfato salino

pH: potencial de Hidrógeno

RET: resistencia eléctrica transepitelial

RNAr: Ácido ribonucleico ribosomal

rpm: revoluciones por minuto

seg: segundos

T4SS: sistema de secreción tipo 4

TIN: tinidazol

UEs: uniones estrechas

VacA: citocina vacuolizante A

Wnt-β: sitio de integración relacionado con Wingless beta

2. RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa caracterizada por infectar el estómago y causar gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico; además de estar relacionada con el desarrollo de enfermedades extragástricas. En los últimos años, *H. pylori* ha sido considerado por la OMS como un patógeno de relevancia mundial, debido a su elevada prevalencia (50% en la población adulta) y a su alto índice de resistencia a antimicrobianos (RAM). En consecuencia, esto podría incrementar la virulencia de *H. pylori*, así como la incidencia de las afecciones relacionadas con la infección. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es inducir resistencia en diferentes cepas de *H. pylori* contra antibióticos usados en el tratamiento de primera línea y de rescate. Los antibióticos empleados en este trabajo fueron claritromicina (CLR), amoxicilina (AMX) y levofloxacino (LVX), a diferentes sub-concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), en 4 cepas de *H. pylori* (26695, PMSS1, 51932 y 43504). La RAM se evaluó por medio del método de dilución en agar, encontrando que las MIC's fueron 15-31, 6-62 y 15-125 ng/mL para CLR, AMX y LVX, respectivamente. Adicionalmente, se identificaron los genes *23s*, *pbp1a*, *gyrA* y *gyrB* relacionados con la RAM. A través de ensayos de PCR y de secuenciación empleando el método de Sanger, se determinó que solo los genes *pbp1a* y *gyrB* presentaron mutaciones, lo que explicaría la resistencia a AMX y LVX, respectivamente. El siguiente paso será evaluar la virulencia de estas cepas bacterianas resistentes sobre diferentes tipos epiteliales, así como su participación durante el desarrollo de enfermedades gástricas y extragástricas.

3. ABSTRACT

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium that colonises the stomach, causing chronic gastritis, peptic ulceration and gastric cancer. Furthermore, it is associated with the development of extra-gastric diseases. In recent years, the World Health Organization (WHO) has classified *H. pylori* as a global pathogen due to its high prevalence (50% in the adult population) and high resistance to antimicrobial agents (RAM). This classification could potentially increase the virulence of *H. pylori* and the incidence of related infections. The objective of this study is to induce resistance in different strains of *H. pylori* against antibiotics used in first-line and rescue treatments. The antibiotics employed in this study were clarithromycin (CLR), amoxicillin (AMX) and levofloxacin (LVX), at different sub-inhibitory minimum inhibitory concentrations (MIC) in four *H. pylori* strains (26695, PMSS1, 51932 and 43504). The resistance to antibiotics (RAM) was evaluated using the agar dilution method, with the minimum inhibitory concentrations (MICs) found to be 15-31, 6-62 and 15-125 ng/mL for claritromycin (CLR), amoxicillin (AMX) and levofloxacin (LVX), respectively. Additionally, the genes *23S*, *pbp1a*, *gyrA* and *gyrB* associated with RAM were identified. Through polymerase chain reaction (PCR) and sequencing using the Sanger method, it was determined that only the *pbp1a* and *gyrB* genes exhibited mutations, which would explain the resistance to AMX and LVX, respectively. The subsequent step will be to assess the virulence of these resistant bacterial strains on different epithelial types, as well as their involvement in the development of gastric and extra-gastric diseases.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. *Helicobacter pylori*

4.1.1 Generalidades

Helicobacter pylori es una bacteria perteneciente al filo Proteobacteria, clase Epsilonproteobacteria, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae* respectivamente. Esta bacteria Gram negativa, mide aproximadamente 2 a 4 μm de largo, cuenta con 4 a 8 flagelos unipolares, es microaerofílica y puede presentarse en forma bacilar o cocoide, dependiendo las condiciones de crecimiento (Figura 1) (Sgouras et al., 2015). Tiene un genoma de 1.7 Mpb aproximadamente, que difiere dependiendo de la cepa, ya que varían en la expresión de ciertas proteínas, como las de membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés) (Xu et al., 2020). *H. pylori* coloniza principalmente el epitelio del antro y cuerpo del estómago y está relacionada con el desarrollo de afecciones gástricas, de las que destacan gastritis crónica, úlcera péptica, úlcera duodenal, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico (Warren JB, Marshall B, 1983) (De Brito et al., 2019).

La transmisión de esta bacteria se lleva a cabo por vía fecal-oral, oral-oral o por el consumo de alimentos o agua contaminada, aunque algunas de estas vías aún se encuentran en debate (Burucoa & Axon, 2017). *H. pylori* puede adquirirse desde la niñez, y existe una controversia entre considerarla como parte de la microbiota gastrointestinal o como un agente patógeno en ciertas circunstancias, como la disbiosis o consumo de dieta alta en grasas y azúcares (Kübeck et al., 2016). Por otro lado, se ha sugerido que esta bacteria es un mejor indicador de migración y cambios evolutivos, que el DNA mitocondrial (Breurec, S et al., 2011). En el 2017, *H. pylori* fue considerada como un patógeno de alta prioridad a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), y en el IV Consenso Mexicano sobre *H. pylori* del 2018 se clasificó como carcinógeno clase I por el Centro Internacional de Investigaciones sobre Cáncer (CIIC) (Bosques-Padilla et al., 2018). Además, esta bacteria tiene una amplia distribución, alta prevalencia, se relaciona con el desarrollo de diversas enfermedades gástricas y extragástricas y, por si fuera poco, en el año 2018 la WHO reportó que los aislados clínicos de *H. pylori* muestran una alta resistencia a

claritromicina, antibiótico utilizado como tratamiento de primera línea para su erradicación (WHO, 2018).

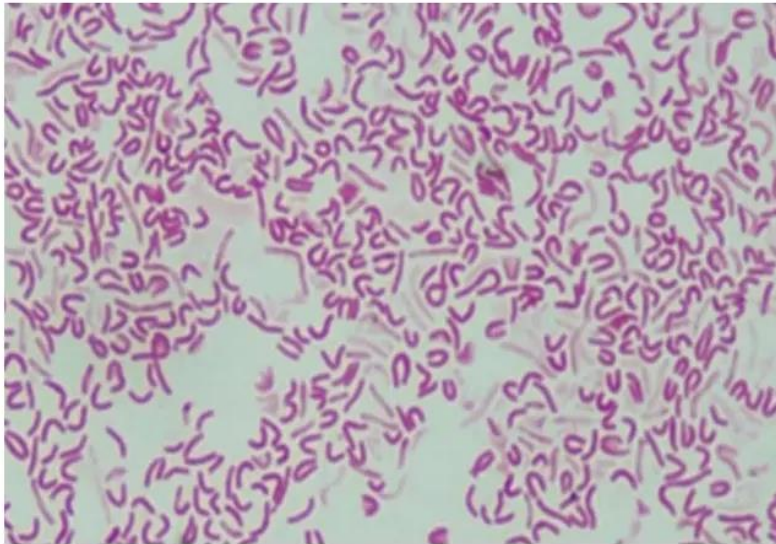


Figura 1. *H. pylori* vista al microscopio. Frotis teñido con Gram observado en microscopio óptico a 100x. Se logra apreciar la morfología típica de bacilo Gram negativo curvo de esta bacteria (Reshetnyak, 2017).

4.1.2 Epidemiología

H. pylori se encuentra ampliamente distribuida por el mundo. Datos publicados por Organización Mundial Gastroenterología (WGO por sus siglas en inglés), mencionan que aproximadamente el 50 % de la población adulta está infectada con *H. pylori* a nivel mundial, pero en los países en desarrollo la prevalencia llega a incrementar de 63% al 94%, de los cuales México está incluido con más del 70% de infección en la población adulta (Hooi et al., 2017). La diferencia en la prevalencia alrededor del mundo puede deberse a diversos factores; entre los más importantes está el nivel socioeconómico, el desarrollo del país y las condiciones sanitaria de la población (Sgouras et al., 2015). Además de estos, otro factor importante a incluir es la edad, ya que se ha observado que la mayoría de los infectados por *H. pylori* la adquirieron entre el nacimiento y la infancia, dependiendo claro, de las condiciones socioeconómicas de cada individuo (Yuan C. et al., 2022).

4.1.3 Factores de virulencia

H. pylori cuenta con diversos factores de virulencia que le ayudan a invadir la mucosa gástrica y contribuyen con su supervivencia en este nicho. Estos factores están implicados en los procesos de adaptación, colonización e invasión de la mucosa gástrica (Ansari & Yamaoka, 2019) (Fig. 2).

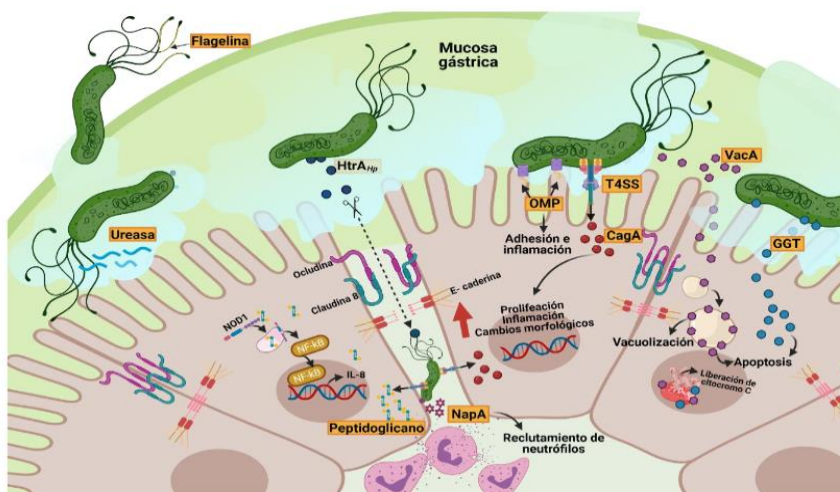


Figura 2. Factores de virulencia de *H. pylori*. Esta bacteria secreta varios factores de virulencia que le ayudan a sobrevivir en el ambiente ácido del estómago y también contribuyen en el daño a la barrera epitelial gástrica (Mendoza MJ., 2022, tesis de Maestría).

Durante el proceso de adaptación al medio, la bacteria produce una enzima llamada ureasa, cuya actividad es hidrolizar la urea presente en el medio ácido del estómago, en NH_4 , y CO_2 . Con esto, se incrementa el pH del medio alrededor de ella, hasta neutralizarlo. Este cambio puede alterar las propiedades de la mucosa del epitelio gástrico (Rutherford J. 2014). Además, debido a la presencia de flagelos unipolares, la bacteria puede moverse fácilmente entre la mucosa gástrica, que va degradando, hasta llegar a las células epiteliales.

En el caso de la adhesión celular, *H. pylori* cuenta con diversas OMPs; entre ellas se incluyen lipoproteínas, porinas, proteínas de bombas de eflujo y adhesinas (Xu et al., 2020). Dentro de las adhesinas de mayor relevancia y más estudiadas se encuentran BabA que se une al antígeno sanguíneo de Lewis^b (Le^b), SabA que se une a los antígenos Le^x y Le^y , SabB y OipA, cuyo receptor aún no ha sido descubierto, pero en los últimos años se ha destacado su relación con el desarrollo de cáncer gástrico y úlceras duodenales (Xu et al., 2020). SabA o proteína de unión a ácido siálico, se ha encontrado en algunas cepas de *H. pylori* y puede

estar en un estado encendido o apagado dependiendo del pH gástrico, lo que confiere a la bacteria una mejor adaptación al medio (Benktander et al., 2018). OipA se ha descrito en cepas que expresan la citotoxina CagA, modulando positivamente la infección, aunque no se ha relacionado con otros factores de virulencia bacterianos. OipA es llamada proteína de inflamación externa, ya que induce la secreción de IL-8 (interleucina 8), provocando una mayor infiltración de neutrófilos en la zona colonizada, aumentando la inflamación y generando mejores condiciones para el establecimiento permanente de la bacteria (Horridge et al., 2017). Estudios *in vitro* mostraron que OipA puede inducir apoptosis en células gástricas AGS, con un incremento en el desarrollo de cáncer gástrico; mientras que cepas negativas a OipA se describen como menos virulentas (Al-Maleki et al., 2017). En otro estudio se observó que esta proteína es importante en el rearrreglo del citoesqueleto celular, por medio de la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK), quien a su vez está relacionada con la aparición de neoplasias (Tabassam et al., 2008).

En el genoma de *H. pylori* se encuentra una isla de patogenicidad, conocida como *cag PAI*, de aproximadamente 40kb, conformada por 32 genes relacionados con la patogenia de esta bacteria (Ansari & Yamaoka, 2019). Entre los genes más importante se encuentra CagA y el sistema de secreción tipo 4 (T4SS, por sus siglas en inglés) encargado de translocar a esta proteína al interior de las células. Para la formación correcta del T4SS intacto y funcional, se requiere de la expresión en simultáneo de 17 genes; además, varios de sus componentes están relacionados con el aumento de la secreción de IL-8 por parte del hospedero (Sánchez-Zauco et al., 2013).

La proteína CagA está relacionada con cepas más virulentas. Tiene un peso molecular de 125 kDa a 145 kDa y es conocida como una proteína inmunodominante. CagA tiene integrado una secuencia de aminoácidos en su extremo C-terminal conocidos como motivos EPIYA (ácido glutámico, prolina, isoleucina, tirosina y alanina, respectivamente), los cuales determinan su actividad proteica. Esta secuencia sufre de fosforilación en residuos de tirosina (Y) por diferentes cinasas que posee la célula gástrica. CagA fosforilada puede interactuar con Grb2 o SHP2, lo cual se ha relacionado con una disminución en la adhesión y proliferación celular, en la activación de vías como Wnt- β o Ras-ERK, induciendo cambios

en la morfología de las células gástricas, descritos como fenotipo colibrí. Estas vías de señalización también están vinculadas con el desarrollo de tumorigénesis en el estómago (Da Costa et al., 2015).

La proteína VacA o citotoxina vacuolizante A, secretada también por la bacteria, tiene como función primordial formar poros en las membranas de las células que infecta, además de inducir la liberación de citocromo de las mitocondrias, desencadenando apoptosis y generando una respuesta proinflamatoria (Sgouras et al., 2015). En diversos aislados y cepas de *H. pylori*, se han encontrado diferentes variables en los segmentos que conforman a VacA: señal (s), media (m) e intermedia (i), cuyos cambios modifican su actividad vacuolizante o de adhesión celular. Por ejemplo, en cepas como la 26695 y PMSS1 que tienen la variable *s1m1*, se observa una mayor actividad vacuolizante, en comparación con la cepa 51932 que expresa la variable *s2m2* (Ansari & Yamaoka, 2019). Un estudio *in vitro* usando células AGS, mostró que VacA podría estar induciendo estrés en el retículo endoplásmico, activando así la autofagia y aumentando la muerte celular (Zhu et al., 2017). La proteína HtrA de *H. pylori* tiene la función de neutralizar los efectos del estrés oxidativo y térmico que se generan al momento de la colonización del antro y cuerpo del estómago, ya que, al oligomerizarse o sufrir cambios conformacionales, HtrA puede tener actividad de serin-proteasa. Esta proteína llega a soportar altas temperaturas y variaciones de pH, lo que le ayuda a la bacteria a incrementar su porcentaje de supervivencia en el microambiente extenuante del estómago (Wessler et al., 2017).

4.2 Colonización de *H. pylori*

H. pylori puede establecerse en diferentes regiones del estómago, principalmente en el antro y el cuerpo, donde utiliza diferentes factores de virulencia para colonizar, generando una infección permanente asintomática o sintomática que conlleva al cambio morfológico celular de los epitelios, ya mencionado.

4.2.1 Gástrica

Una vez que *H. pylori* llega al epitelio gástrico, empieza una serie de eventos propiciados por la bacteria, las células epiteliales del huésped y la respuesta inmune del mismo. La bacteria, ya establecida en el epitelio gástrico, requiere la constante secreción de ureasa para mantener neutralizado el pH del estómago (Sgouras et al., 2015). Se ha encontrado que esta enzima también puede romper las uniones estrechas (UEs), aumentando la permeabilidad paracelular y afectando la integridad del epitelio gástrico. Con la alteración de las UEs, sus componentes también sufren cambios. Por ejemplo, claudina y ZO-1 se modifican, de una localización periférica en la membrana a una localización citoplasmática, así como aumentando su expresión durante la infección por *H. pylori* (Caron et al., 2015). Estos abruptos generan el paso desmedido de componentes a la matriz celular y la barrera epitelial pierde su característica selectiva, aumentando la resistencia eléctrica transepitelial (RET) (Wroblewski et al., 2010). *H. pylori* viaja por los espacios intercelulares que va creando y llega hasta la base de las células, mientras que otras se quedan en la parte apical, formando pedestales en las zonas de las microvellosidades, disminuyendo su cantidad y promoviendo cambios morfológicos, como el redondeamiento de éstas (Caron et al., 2015). La infección de *H. pylori* en células gástricas, además de aumentar la permeabilidad paracelular y la RET, también aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, IFN- γ y TNF- α , lo que conduce a un ambiente inflamatorio, que, dependiendo del tiempo de la infección, genera algunas de las afecciones mencionadas (Fiorentino et al., 2013). La infección también propicia infiltrado de neutrófilos, quienes, para atacar a la bacteria y detener la infección, secretan citocinas que aumentan aún más el estado inflamatorio, incrementando el riesgo de desarrollo de úlcera péptica y/o duodenal, gastritis crónica y cáncer gástrico (Sánchez-Zauco et al., 2013).

4.2.2 Pancreática

Uno de los órganos que puede llegar a infectar *H. pylori*, fuera del tracto gastrointestinal, es el páncreas. Al igual que en el estómago, el daño puede ser provocado por la constante inflamación causada por la propia infección, o debido a la expresión de citocinas

proinflamatorias y a la infiltración de neutrófilos en la región infectada, desarrollándose afecciones pancreáticas, como DM, pancreatitis y cáncer pancreático. Los factores de virulencia, principalmente CagA, que es conocida como una proteína carcinogénica, tienen la capacidad de reprogramar la proliferación celular e inducir una transición epitelio-mesénquima (MET), la cual, se relaciona con el desarrollo de cáncer, en este caso pancreático (Elizabeth MA et al., 2015).

Además, existe la hipótesis de que la bacteria o las vesículas de membrana externa (OMVs, por sus siglas en inglés) producidas por *H. pylori* que contienen VacA, CagA y OipA, pueden viajar a través de la circulación y llegar a colonizar o dañar otros tejidos, debido a su capacidad de romper las UEs y activar en las células vías de señalización que desregulen la proliferación y secreción de insulina (Elizabeth MA et al., 2015).

Por otra parte, se ha relacionado la infección por *H. pylori* con pancreatitis aguda. Esta infección es una respuesta inflamatoria no regulada del páncreas, que puede ser causada por diversos factores, y uno de ellos podría ser la infección por esta bacteria (Chen et al., 2022).

Otra afección con la que se ha relacionado la infección de *H. pylori* es con el cáncer pancreático. Se teoriza que el incremento de gastrina y somatostatina provocado por la infección de esta bacteria también aumenta la liberación de secretina en el páncreas, lo que induce la síntesis de DNA e inflamación, conduciendo a un proceso de carcinogénesis, por activación de la vía NF- κ B y el aumento en la secreción de IL-8 (Kunovsky et al., 2021).

4.3 Afecciones relacionadas con *H. pylori*

H. pylori entra al cuerpo por la boca, y una vez establecida en el estómago, por un tiempo determinado, provoca el desarrollo de ciertas complicaciones en esta región, causando principalmente inflamación crónica, incrementada por la respuesta inmune del hospedero, hasta el desarrollo de afecciones como gastritis crónica, úlcera péptica, hasta algunas más graves como cáncer gástrico (Ansari & Yamaoka, 2017).

4.3.1 Afecciones gástricas

Como ya se mencionó, las afecciones gástricas provocadas por *H. pylori*, pueden ser de diferente gravedad. Esto lo determinan diferentes factores como: genéticos, ambientales, la respuesta inmune del hospedero, la cepa de la bacteria que esté infectando y la duración de la infección (FitzGerald & Smith 2021).

La gastritis es la más común, de la cual, el 100% de los infectados por *H. pylori* llegarán a desarrollarla. De ahí sigue la gastritis crónica, presentada aproximadamente en el 15 a 20% de las personas infectadas. Ésta se caracteriza por el aumento en la acidez del estómago, y es generada en respuesta a diversos factores de virulencia de la bacteria (Amieva & Peek, 2016). Se estima que alrededor del 70% al 80% de las úlceras gástricas péptidas y duodenales reportadas a nivel mundial, son causadas por *H. pylori*, pero la aparición de éstas puede llevar años. El riesgo aumenta en infecciones recurrentes y con tratamientos fallidos, pero disminuye con el diagnóstico oportuno y erradicación exitosa (Amieva & Peek, 2016).

H. pylori es el factor más importante para la aparición de cáncer gástrico a nivel mundial, pues se estima que es causante del 75% de este tipo de cáncer. Esto se debe principalmente a la proteína CagA, codificada en la isla de patogenicidad *cag* PAI, que tiene la capacidad de reprogramar células epiteliales, glandulares y células madre de estos sitios de infección, aumentando así su proliferación (Da Costa et al., 2015).

4.3.2 Afecciones extragástricas

En los últimos años de investigación sobre la infección provocada por esta bacteria, se le ha relacionado con diversos padecimientos fuera del tracto gastrointestinal. Entre estos se pueden mencionar afecciones neuronales (como esclerosis múltiple, Parkinson y Alzheimer), cardiovasculares (como hipertensión, aterosclerosis e infarto al miocardio), dermatológicas (p. ej. rosácea o psoriasis), hepáticas (como cirrosis, carcinoma hepatocelular y encefalopatía hepática) y pancreáticas (como diabetes *mellitus* y cáncer pancreático) (Elizabeth MA et al., 2015; Kunovsky et al., 2021). En la Figura 3 se encuentran enlistadas las afecciones extragástricas divididas por sistemas del cuerpo humano.

4.4 Tratamiento contra *H. pylori*

Desde que *H. pylori* fue descubierta ha sido un gran reto el encontrar un tratamiento óptimo para su erradicación, por lo cual, existe una amplia diversidad de métodos para su eliminación (Hu et al., 2020).

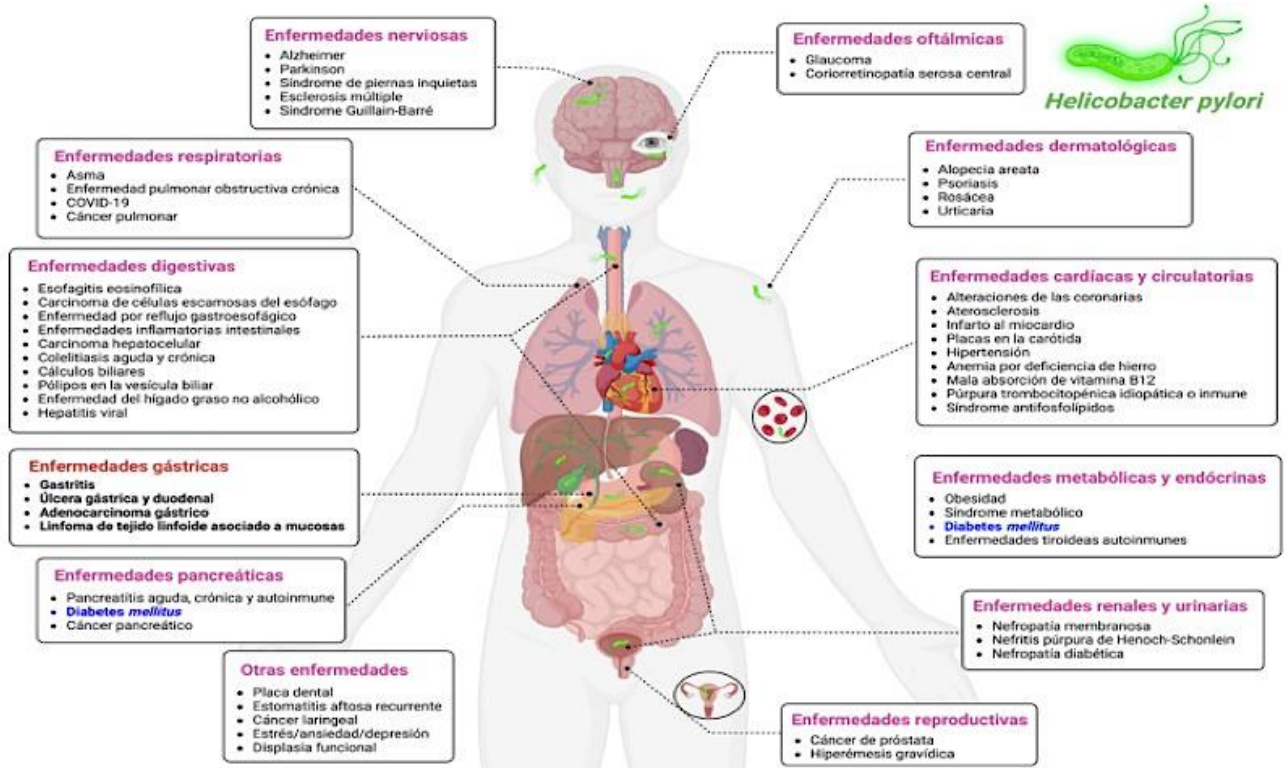


Figura 3. Afecciones extragástricas relacionadas con la infección de *H. pylori* (He, J. et al. 2022) (Modificada).

4.4.1 Tipos

Los tipos de tratamiento pueden clasificarse de primer o segunda línea. La primera hace referencia a aquel primer tratamiento que se le prescribe a un paciente al ser diagnosticado con infección por *H. pylori*. Después del primer tratamiento fallido, confirmado mediante pruebas de laboratorio, se prescribe un siguiente tratamiento, el cual se llama de segunda línea (Gisbert, 2020).

El principal tratamiento es el conocido como terapia triple, el cual incluye 2 antibióticos que son en primera instancia claritromicina (CLR) y amoxicilina (AMX), o metronidazol (MTZ) y un inhibidor de la bomba de protones (IBP) como el omeprazol. El tratamiento se administra por 10 días y es considerado como el estándar de oro para la erradicación de *H. pylori*. Esta terapia se considera empírica y puede modificarse dependiendo de la región y el porcentaje de resistencia a antibióticos reportado >15% (Hu et al., 2020). Cuando el tratamiento con CLR como primera opción falla, se opta por cambiarlo a levofloxacino (LVX), el cual es una quinolona de amplio espectro (Suzuki et al., 2019).

Debido al alto fracaso en el tratamiento para la erradicación de *H. pylori* con los tratamientos convencionales, se propuso la formulación de tratamientos alternativos, como la terapia secuencial, la cuádruple, la concomitante y la híbrida (Kasahun et al., 2020a). La terapia secuencial consiste en administrar el tratamiento durante 10 días, dividido en 2 fases. En la primera fase de 5 días se administra MTZ 20 mg y AMX 1 g, ambos cada 12 h. En la segunda fase, por los otros 5 días, igualmente MTZ 20 g, pero el cambio reside en el antibiótico, aumentando a dos dosis: CLR 500 mg y tinidazol (TIN) 500 mg, ambos cada 12 h. Esta estrategia ha tenido un buen porcentaje de erradicación desde un 74% hasta 93%, dependiendo de la región y la resistencia a CLR reportada (Zullo et al., 2007).

La terapia cuádruple es similar a la terapia triple, pero se le ha añadido otro antibiótico, quedando de la siguiente manera: IBP de la preferencia del médico, AMX 1 g, CLR 500 mg y MTZ o TIN 500 mg (Liu et al., 2023). Pero la alta tasa de fallo en este esquema ha derivado en una modificación, basada igualmente en la terapia estándar, pues se le añade subsalicilato de bismuto para aumentar la eficacia del tratamiento. El bismuto tiene actividad bactericida directa contra *H. pylori* y se ha observado que puede proteger a la mucosa gástrica del ácido estomacal. La desventaja de esta terapia es su alto costo y la aparición de efectos secundarios mayores a los esperados con la terapia estándar: como náuseas, diarrea, dolor estomacal y abdominal, vómito, dolor de cabeza, alergia, coloración amarillenta en la piel, aparición de moretones y en casos extremos brotes psicóticos reversibles. (Poonyam et al., 2019).

La terapia concomitante es parecida a la terapia cuádruple. En ésta se administran 3 antibióticos y un IBP. Se aplica cuando el paciente ya muestra resistencia a CLR o no hay disponibilidad de bismuto en la zona. Inicialmente esta terapia se administraba por 5 días, pero estudios comparativos encontraron que el mayor porcentaje de erradicación se ve a los 10-14 días (Wang et al., 2018). Los antibióticos para este tipo de tratamiento son lansoprazol 30 mg como IBP, AMX 1 g, MTZ 500 mg y CLR 500 mg; los 4 medicamentos se administran cada 12 h. Su desventaja es la aparición de más efectos secundarios (similares a los del tratamiento con bismuto), en comparación con la terapia secuencial (Kim et al., 2014).

La terapia híbrida consiste en la combinación de la terapia dual que incluye CLR 500 mg y AMX 1 g por 7 días, incorporando la terapia cuádruple sin subsalicilato de bismuto por los siguientes 7 días. Todos los medicamentos se ingieren 2 veces al día. Se han realizado algunas modificaciones en este esquema, en las que se incluyen el aumento en la dosis del IBP al doble del estándar, e incrementando la frecuencia en la administración del metronidazol tres veces al día. También se ha disminuido la duración de este tratamiento a 10 días, quedando la combinación dividida en 5 días; evitando así, la aparición de efectos secundarios. Estudios publicados en los que se ha evaluado la eficacia de este tipo de terapia, han reportado una tasa de erradicación del 85% al 91% (Song et al., 2016).

Otro de los retos que se han presentado es que los pacientes pueden exhibir alergia a la penicilina, siendo la amoxicilina perteneciente a este grupo de antibióticos. Para ellos, la terapia de primera línea quedaría igual, solo quitando la amoxicilina, y en caso de que ya se presente resistencia a claritromicina, se sustituye por LVX. Desafortunadamente estas dos alternativas no han tenido muy buenos resultados, obteniendo un 55% de erradicación para el tratamiento que incluye CLR y un 73% en el que se cambia a LVX (Gisbert et al., 2009).

4.4.2 Mecanismo de acción

La CLR es un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos y es derivado de la eritromicina. Se ha empleado como base en el tratamiento de primera línea para *H. pylori* debido a su fácil difusión en la mucosa gástrica y por tener una concentración mínima

inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) baja. El blanco en la bacteria de este antibiótico es la subunidad ribosomal 50S por lo que su actividad bactericida reside en la inhibición de la síntesis de proteínas (Lee et al., 2022). Su mecanismo de acción radica en unirse al bucle peptidil transferasa del dominio V del RNAr 23s, el cual forma parte de la subunidad mayor del ribosoma bacteriano. Esta unión provoca cambios en su estructura y por consiguiente la separación del complejo peptidil transferasa-RNAt, complicando el alargamiento de la cadena peptídica saliente. La CLR es sensible a los ácidos del estómago, lo que produce su rápida degradación. Para solucionar este problema, se receta de manera dual, junto con un IBP, para conseguir concentraciones luminales gástricas óptimas y producir su efecto bactericida (Marques et al., 2020).

El IBP más recetado es el omeprazol, el cual puede incrementar el pH gástrico a 6.0 por aproximadamente 156 minutos, tiempo suficiente para que la CLR no se degrade y alcance la mucosa gástrica, se difunda en las células del epitelio gástrico y llegue a las bacterias (Serebrova et al., 2022). Los IBP suelen activarse y generar una protonación secuencial de los anillos de pirimidinas y benzimidazol a diferentes pH. Pero a un pH muy ácido como en las condiciones del estómago, éste llega a degradarse y no alcanza las canículas de las células parietales. Por lo que, al momento de su fabricación, se le incorpora una cubierta entérica (Seshadri et al., 2013).

El LVX pertenece al grupo de las quinolonas de amplio espectro y es efectivo contra bacterias Gram positivas y negativas. Su blanco en las bacterias es la ADN girasa (subunidad GyrA y GyrB) y la topoisomerasa IV, las cuales se encargan del superenrollamiento y relajación del DNA. Su mecanismo de acción se basa en la unión a estas proteínas y resulta en la inhibición de la replicación del DNA (Rimbara et al., 2012). *H. pylori* solo posee DNA girasa pero no topoisomerasa IV, ya que no posee los genes que codifican para esta proteína (*parC* y *parE*) (Tomb et al., 1997).

La AMX es uno de los antibióticos principales en la terapia estándar de primera línea contra *H. pylori*. Es un antibiótico β -lactámico, el cual se une en las bacterias, a las proteínas de unión a penicilinas (PBP, por sus siglas en inglés) que están involucradas en la síntesis de peptidoglicano. *H. pylori* posee 7 PBP's, pero la AMX se une a PBP1A, la cual tiene actividad

de peptidiltransferasa (Tran et al., 2022). Su mecanismo de acción es el bloqueo en la síntesis de peptidoglicanos e induce la autólisis bacteriana. Las bacterias Gram negativas, como *H. pylori*, presentan una membrana externa de proteínas y lípidos así como una capa fina de peptidoglicanos, separadas ambas por un espacio periplásmico (Suárez & Gudíol, 2009). Los peptidoglicanos están formados por repetidos de N-acetilmurámico y N-acetil-glucosamina, los cuales son sintetizados en el citoplasma y llegan hasta el espacio periplásmico, donde la transpeptidasa los convierte de pentapéptidos a tetrapéptidos y los une en cadenas para formar así la pared bacteriana (Taylor et al., 2021). Los betalactámicos están formados por un anillo betalactámico, cuya estructura es similar a la de la transpeptidasa, por lo que, al unirse la AMX a la transpeptidasa, no permite el último paso de la síntesis del peptidoglicano (Pichichero & Reed, 2011.). Por esta similitud estructural, a la transpeptidasa se le llama también PBP. Es importante que la bacteria se encuentre en fase de crecimiento, pues en este momento está activa la síntesis de la pared bacteriana. Esta desregulación en la síntesis de peptidoglicanos activa a la enzima autolisina, lo que induce la lisis bacteriana (Dubée et al., 2011).

El metronidazol es un nitroimidazol que es recetado para enfermedades inflamatorias gastrointestinales, como la infección por *H. pylori*. Este fármaco requiere la reducción del grupo nitro para su activación, llevada a cabo por la enzima NADH nitrorreductasa, por lo que es llamado un profármaco. Esta reducción produce compuestos citotóxicos que van a causar daño en el DNA, como ruptura de la cadena, desestabilización de la doble hélice y finalmente producen la muerte celular (Dingsdag & Hunter, 2018).

4.3. Tratamiento en México

Como lo mencionan las diversas guías para el diagnóstico y tratamiento para la infección por *H. pylori*, el esquema de tratamiento para esta bacteria cambia dependiendo de la región. Esto se debe a que el uso de antibióticos para cada país está regulado de manera diferente, además, la resistencia hacia los antibióticos varía en cada localidad (Zhang, 2015). Todo esto modifica el tratamiento empírico contra la infección de *H. pylori*. En México, el tratamiento de primera línea es el tratamiento triple estándar, basado en un IBP, usualmente omeprazol,

CLR 500 mg y AMX 1 g. En nuestro país, el MTZ dentro del esquema del tratamiento contra esta bacteria ha sido eliminado a causa de la alta resistencia a éste, reportando hasta un 60% de resistencia, siendo una de las más alta a nivel mundial (Bosques-Padilla et al., 2018). Aunque no existen muchos reportes sobre la resistencia a los demás medicamentos, si se han publicado cifras de resistencia a CLR que oscilan entre el 4% y el 25% en algunas zonas del país, lo cual ya es alarmante, por lo que se ha optado por tratamientos alternativos (Alarcón-Millán et al., 2016). Dentro de estas alternativas está el tratamiento con LVX, azitromicina y un IBP. Se ha reportado que el LVX administrado durante 10 días, muestra porcentajes de erradicación de un 80% a 90% (Gisbert et al., 2009).

5. Resistencia a antimicrobianos de *Helicobacter pylori*

La resistencia a los antimicrobianos (RAM, por sus siglas en inglés) se describe como la capacidad que adquiere un microorganismo para crecer y sobrevivir a los mecanismos de acción de los RAM. Por su parte *H. pylori*, ha desarrollado estrategias para evadir mecanismos bactericidas de los antibióticos administrados para su eliminación (Savoldi et al., 2018).

La RAM puede clasificarse como natural y adquirida. La RAM natural o intrínseca surge de forma natural e independiente a la exposición de los antimicrobianos y se comparte universalmente entre especies. Esta puede producirse por la presencia de proteínas en la membrana que evitan la entrada del antimicrobiano al microorganismo, o promueven la expulsión de este, disminuyendo su concentración citoplasmática, por ejemplo, bombas de eflujo (Kasahun et al., 2020; Tan et al., 2022). En el caso particular de *H. pylori*, se ha estudiado la presencia de bombas de eflujo como las pertenecientes a la familia RND (Zhang, 2015). También puede deberse a la presencia de proteínas que hidrolizan o inactivan el antibiótico, como es el caso de las betalactamasas que degradan a las penicilinas.

La RAM adquirida o extrínseca se produce una vez que el microorganismo ya ha tenido contacto con el antibiótico. Este tipo de RAM puede generarse por el uso prolongado de antibióticos o mal uso de éstos. Cuando se da una dosis poco efectiva para la erradicación de una bacteria, ésta va generando tolerancia hacia el mismo, por lo que, en poco tiempo

provocara RAM en la bacteria. Por otro lado, la exposición repetida a los antibióticos, pueden propiciar el desarrollo de mutaciones en los genes blanco de las bacterias, como mecanismo de defensa y supervivencia (Iglér et al., 2021). Otra forma de desarrollar RAM adquirida es por la transferencia horizontal de genes, en la cual el contacto de bacterias de igual o diferente especie puede transferirle genes o plásmidos con la información para producir la RAM. *H. pylori* al ser una bacteria que coloniza la mucosa gástrica, está en mutuo contacto con bacterias de la microbiota gastrointestinal, las cuales pueden transferirle genes de resistencia a antibióticos por este medio de mecanismos como transformación, conjugación y transducción (McInnes et al., 2020).

Estudios donde se evaluó la resistencia natural en pacientes infectados con *H. pylori*, revelaron que este tipo de resistencia pudo originarse al contraer una cepa proveniente de una persona infectada, que haya recibido tratamiento previo y desarrollado RAM (Chen et al., 2022).

En *H. pylori*, la RAM es causada en gran medida por la aparición de mutaciones en los diferentes blancos de los antibióticos usados para su erradicación, disminuyendo su afinidad a ellos (Kuo et al., 2017). En menor medida, la bacteria activa bombas de eflujo que expulsan el antibiótico del citoplasma, y con esto no se alcanza su MIC, disminuyendo su eficacia. Un último mecanismo, que se ha estudiado muy poco es la generación de biopelícula por parte de *H. pylori*, la cual le confiere protección contra los antibióticos y contra las acciones del sistema inmune del huésped (Yonezawa et al., 2015a). La tasa de resistencia primaria al tratamiento de primera línea a nivel mundial se encuentra de la siguiente manera: CLR 17.2%, AMX 16.2%, MTZ 11.2% y LVX 5.9% (De Francesco et al., 2010) (Fig. 4).

5.1. Resistencia a claritromicina

La resistencia a CLR por parte de *H. pylori*, se genera por mutaciones puntuales en el gen *23s*, siendo las principales A2143G, A2142G, C2195T y T2182C, y algunas mutaciones consideradas nuevas son C2288T, A2146G y A2147G. De estas mutaciones, las que han mostrado un MIC más alto, mediante la prueba fenotípica de susceptibilidad, han sido en la posición 2142 y 2143, representando alrededor del 80% de resistencia contra este

antibiótico (Mitui et al., 2014). Se han encontrado otras mutaciones en diferentes posiciones en este gen, pero no se han relacionado con la resistencia fenotípica a la CLR.

La resistencia a CLR es la principal causa del fracaso en el tratamiento contra *H. pylori*. En 2009 reportes de Europa, China, América del Norte y América de Sur indicaron que la resistencia a este antibiótico fue de 11.1%, 27.6%, 29.3% y 17.2% respectivamente, y estas cifras aumentaron en años recientes (Zhang, 2015). La sensibilidad de *H. pylori* a CLR también se ve afectada por las proteínas de la membrana externa, como HopT (BabB), HofC y OMP31, las cuales están ausentes en las cepas sensibles a la CLR y solo se identificaron en cepas resistentes (Xu et al., 2020).

5.2. Resistencia a amoxicilina

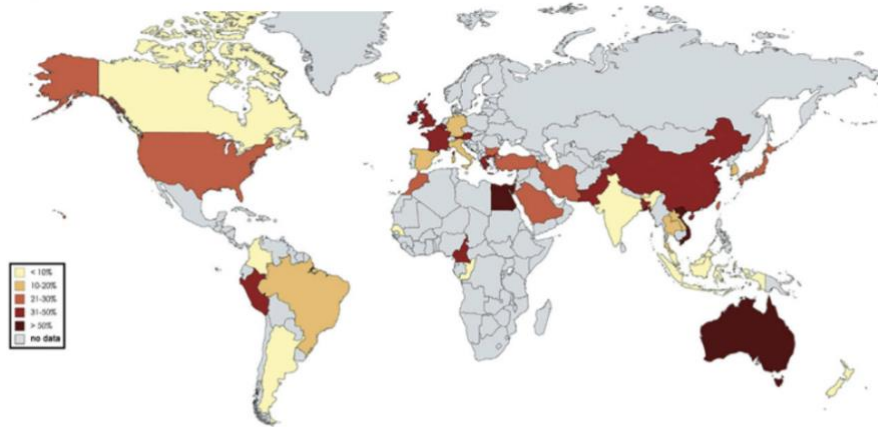
En *H. pylori*, la RAM asociada con este antibiótico se presenta por mutaciones en los genes que codifican para las PBP, siendo el de mayor importancia *pbp1A*. Las mutaciones más importantes son: S402G, E406A, S414R, S417T, F473L, K555S, N561Y y T593A/G/K (Ansari & Yamaoka, 2022). Estas mutaciones disminuyen la afinidad de la AMX con la PBP1A, bloqueando su mecanismo de acción al no inhibir la síntesis de peptidoglicanos, lo que evita su acción bactericida (Tuan et al., 2019). La tasa de resistencia a AMX ha sido relativamente baja, a pesar de que cambia a nivel regional (Zhang, 2015).

5.3. Resistencia a metronidazol

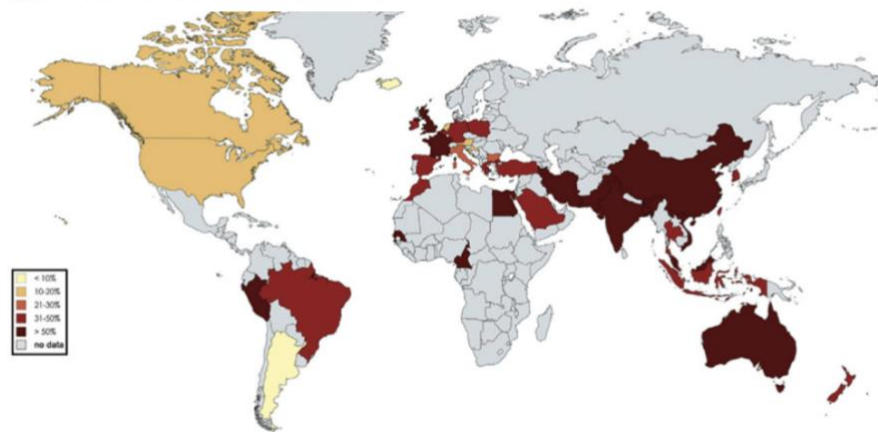
En el caso del MTZ, la resistencia se da por mutaciones en un gen, pero en este caso no es en el de la diana del antibiótico. El metronidazol viene en una forma inactiva, y para activarlo, debe reducirse. Esta acción la realiza la enzima NADH nitrorreductasa. En *H. pylori*, los genes que codifican para esta enzima son *rdxA* (nitrorreductasa insensible al oxígeno) y *frxA* (flavin oxidasa reductasa). Las mutaciones en el gen *rdxA* pueden generar cambio del marco de lectura o producir una proteína trunca (Lee et al., 2018).

El MTZ fue el primer medicamento recetado contra la infección por *H. pylori*. En diversos países, el uso de este antibiótico es regulado, como en Japón, por lo que su tasa de resistencia es menor. Pero en países de Latinoamérica, en los que no existe esta regulación, la tasa de resistencia si es elevada (Chisholm & Owen, 2003).

A Resistencia a Claritromicina



B Resistencia a Metronidazol



C Resistencia a Levofloxacino

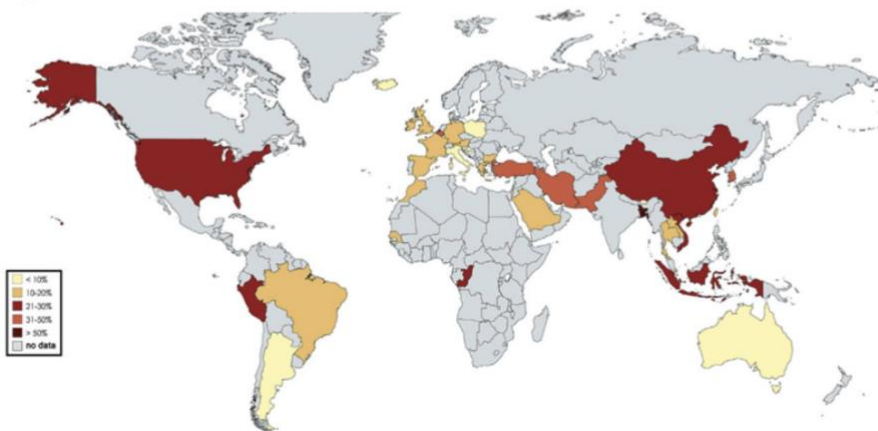


Figura 4. Porcentaje de resistencia de *H. pylori* a CLR, MTZ y LVX en el mundo durante el 2006 y 2016 (Savoldi, A. et al. 2018) (Modificada).

Para analizar la resistencia a MTZ se ha usado la detección de mutaciones en los genes ya mencionados, pero éstas no predicen completamente la resistencia en la bacteria. Además, el mecanismo de acción del MTZ y de la resistencia en *H. pylori* no se ha estudiado a fondo, por lo que requiere más investigación al respecto (Zhang, 2015).

5.4. Resistencia a levofloxacino/ciprofloxacino

La resistencia a esta quinolona se basa en la presencia de mutaciones en los genes que codifican para la DNA girasa, y *H. pylori* posee dos: *gyrA* y *gyrB*. En el gen *gyrA*, las mutaciones relacionadas con la resistencia están en la posición 87, el cambio de N (asparagina) por L (leucina), I (isoleucina), A (alanina) o K (lisina); y en la posición 91, el cambio de D (Ac. aspártico) por Y (tirosina), N (asparagina) o G (glicina). En el *gyrB* las mutaciones se dan en la posición 463, el cambio E (Ac. glutámico) por K o G; en la posición 479, el cambio de S (serina) por G; y algunos polimorfismos se presentan en las posiciones 438 F (fenilalanina) por S, 481 D por E o N y 484 R por K (Lee et al., 2011). Aunque no hay muchos reportes sobre la resistencia a este antibiótico, algunas publicaciones han mostrado altos porcentajes de resistencia. Por ejemplo, Japón mostró un aumento en la resistencia a LVX de 42% en 2015 a 43% en 2017, y datos similares se obtuvieron en China (Hu et al., 2017).

5.5. Resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* en México

En el caso de nuestro país, varios reportes epidemiológicos han mostrado que la RAM de *H. pylori* a los diferentes antibióticos es elevada. En América, los análisis revelaron que hay un 77% de erradicación para el tratamiento de primera línea con CLR y un 80% para el tratamiento de segunda línea basado en LVX, cuando el tratamiento se sigue al pie de la letra; pero estas cifras disminuyen cuando éste no es completado (Savoldi et al., 2018). En un estudio realizado en México, donde se compararon dos terapias de primera línea, una basada en azitromicina y otra en CLR, se encontró una tasa de resistencia a CLR del 28.2% (L. Ladrón-de-Guevara et al., 2019). Según las guías clínicas para el diagnóstico y tratamiento para *H. pylori*, no es recomendable administrar CLR en regiones con resistencia mayor al

15% (Suzuki et al., 2019). Esta resistencia elevada puede deberse al uso excesivo de macrólidos en la población mexicana. Usualmente se había recetado como tratamiento de primera línea CLR, AMX y MTZ, pero debido a la elevada resistencia a este último, de 60% en adultos mexicanos, se ha suspendido su uso en el tratamiento para la infección de *H. pylori* (Torres et al., 2001). La resistencia a LVX en nuestro país aún no ha alcanzado cifras alarmantes, por lo que se puede usar como tratamiento efectivo para erradicar la infección de esta bacteria, siempre y cuando, los resultados de las pruebas de susceptibilidad no muestren lo contrario (Sierra et al., 2014).

5.6 Métodos para la detección de RAM en *H. pylori*

Existen diferentes métodos para la determinación de la resistencia en los microorganismos, tanto fenotípicos como moleculares. Los más usados han sido los métodos fenotípicos, como dilución en agar, difusión en disco, microdilución seriada y prueba de E combinada. Estos se basan en el crecimiento de una bacteria expuesta al antibiótico en diluciones crecientes. Las bacterias son sembradas en medio líquido o sólido y los antibióticos dispuestos en discos o en diversas diluciones incluidos en el medio (Medakina et al., 2023). Los métodos genotípicos se basan en la amplificación y secuenciación de genes y en la búsqueda de mutaciones que se relacionen con la resistencia a antimicrobianos (Miftahussurur et al., 2020).

En el caso de *H. pylori*, el método considerado como estándar de oro para la detección de RAM es el método de dilución en agar. Esto se debe a que la bacteria es de crecimiento lento, por lo que el uso de sensidiscos con antibiótico no es un método factible. El método de dilución en agar se realiza preparando agar Müller Hilton (AMH), suplementado con sangre de carnero desfibrilada al 5-7% con diferentes concentraciones del antibiótico a analizar. La inhibición del crecimiento bacteriano dará el resultado de la MIC de esta cepa en particular. Existe puntos de corte en base a la MIC expresada para cepas y aislados clínicos los cuales se usan para determinar si una cepa es susceptible o resistente contra la mayoría de los antibióticos utilizados en el tratamiento de erradicación, como los que se muestran en la tabla 1 (EUCAST, 2023).

En cuanto a los métodos moleculares, para esta bacteria, se hace la búsqueda de las mutaciones ya mencionadas para los diferentes antibióticos que engloban el esquema de tratamiento. Estos métodos incluyen PCR, hibridación con sondas, secuenciación en Sanger o NGS (secuenciación de nueva generación por sus siglas en inglés) y análisis de polimorfismos. La presencia de mutaciones en los genes blanco de los antibióticos puede generar la resistencia a los mismos, pero debe ser confirmada mediante alguna prueba fenotípica (Medakina et al., 2023).

En general, cualquiera de los métodos descritos anteriormente debe implementarse antes de iniciar un tratamiento contra *H. pylori*, para evitar el fracaso al tratamiento, aunque esto conlleve un gasto mayor para el paciente y para el sector salud. De igual manera, se deben realizar cuando el tratamiento de primera línea no ha erradicado a la bacteria, proponiendo así un mejor tratamiento.

Tabla 1. MIC de diferentes antibióticos probados en *H. pylori* (puntos de corte publicados por la EUCAST en el 2023).

Antibiótico	MIC en µg/mL	
	Susceptible ≤	Resistente >
Claritromicina	0.25	0.50
Amoxicilina	0.12	0.25
Metronidazol	8.00	8.00
Levofloxacino	1.00	1.00
Tetraciclina	1.00	1.00
Rifampicina	1.00	1.00

5. JUSTIFICACIÓN

H. pylori es una bacteria con alta prevalencia mundial (~50%) en la población adulta e infecta principalmente el estómago, relacionándose con enfermedades gastrointestinales, aunque recientemente se ha asociado con padecimientos extragástricos. Debido a la alta tasa de resistencia antimicrobiana que han presentado las diferentes cepas de esta bacteria a nivel mundial, el tratamiento para su erradicación se ha vuelto un problema, por lo que la incidencia de las enfermedades relacionadas con la infección persistente está en aumento. Por todo esto, la OMS en el 2017, consideró a *H. pylori* como un patógeno de alta prioridad a nivel de salud mundial. Así, en este trabajo se pretende analizar la aparición de la RAM de *H. pylori* ante los diferentes tratamientos y evaluar la presencia de mutaciones relacionadas con esta resistencia.

6. HIPÓTESIS

La interacción continua y a concentraciones crecientes de los antibióticos usados en los tratamientos contra *H. pylori*, induce la aparición de mutaciones en algunos genes relacionados con la resistencia a claritromicina, amoxicilina y levofloxacino.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Inducir resistencia a ciertos antibióticos (claritromicina, amoxicilina y levofloxacino) en diferentes cepas (26695, PMSS1, 51932 y 43504) de *H. pylori*.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar si las diferentes cepas de *H. pylori* sin tratamiento presentan mutaciones en genes relacionados con la resistencia a CLR, AMX y LVX.
2. Determinar la MIC de cada antibiótico en las cepas de *H. pylori*.
3. Desarrollar resistencia a antibióticos por medio de la inducción *in vitro* de cada cepa de *H. pylori*.
4. Identificar si las cepas que adquirieron resistencia presentan mutaciones en genes relacionados con la resistencia a CLR, AMX y LVX.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

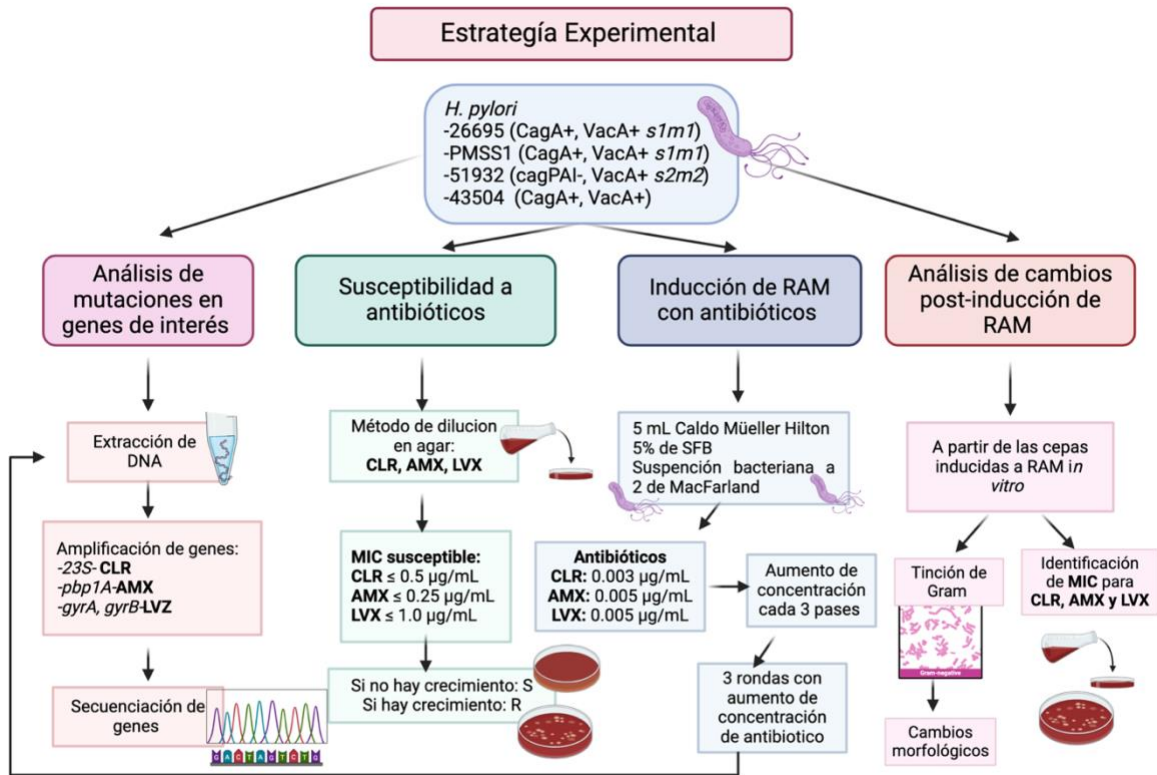


Figura 5. Diagrama de flujo de la estrategia experimental seguida en el presente proyecto.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Cepas de *H. pylori*

Las cepas de *H. pylori* que se usaron en este trabajo son: 1) 26696 de la ATCC, la cual contiene a todos los factores de virulencia, incluidos CagA+, VacA+; 2) PMSS1, cepa hipergénica con todos los factores de virulencia y usualmente usada para infectar ratones, CagA+ y VacA+; 3) 51392, cepa carente de la isla de patogenicidad *cagPAI-*, por lo que es CagA- y con la proteína VacA variedad *s2m2*, la cual le confiere una actividad vacuolizante disminuida; y 4) 43504 de la ATCC incluida en el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) como cepa susceptible a claritromicina, CagA+ y VacA+. Las bacterias se descongelaron y se sembraron en medio Casman suplementado con 5% sangre de carnero desfibrilada y estéril, incubándose a 37°C con 5% de CO₂ por 48 a 72 h. Después, se resembraron igualmente en agar Casman para que las bacterias se vayan adaptando al medio por otras 48 h con las mismas condiciones de incubación.

9.2 Extracción de ADN

De las bacterias crecidas anteriormente, se tomó un inóculo de aproximadamente 2x10⁹ bacterias, las cuales se suspendieron en 500 µL de PBS estéril (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM y KH₂PO₄ 2 mM), se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 min y se desechó el sobrenadante, utilizando solo el botón formado. Se realizó la extracción de DNA total usando el kit ONE-4-ALL Genomic DNA Mini-Preps (Bio Basic Canadá Inc.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Al botón se le agregaron 180 µL de ACL (que es esto) y 20 µL de proteinasa K. La mezcla se agitó en un vórtex por 15 seg y se incubó a 56°C por 1 h. Después se le agregó al mismo tubo 200 µL de buffer CL, se pasó por el vórtex por 15 seg, se agregó 200 µL de etanol al 96% y se mezcló nuevamente. La mezcla total se transfirió a una columna sostenida por un tubo de colecta de 2 mL y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min, para posteriormente desechar el sobrenadante. Después se agregó 500 µL de solución CW1, se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante. A continuación, se agregaron 500 µL de solución CW1, para volver a centrifugar en las mismas condiciones y se desechó igualmente el sobrenadante.

Posterior a esto, se secó la membrana centrifugándose a 13,000 rpm por 2 min y se desechó el sobrenadante. La columna se pasó a un tubo nuevo de colecta de 2 mL y se dejó incubando a temperatura ambiente (TA) por 2 min, con la tapa abierta para que el etanol se evaporara completamente. Se agregó de 50 a 100 µL de buffer CE, tratando de que cayera en el centro de la membrana, después se incubó a TA por 2 min y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 2 min para eluir el DNA. La muestra se dividió en volúmenes pequeños con agua libre de RNAsas, para almacenarse a -20°C, hasta su posterior análisis. La cuantificación del DNA se realizó por espectrometría a una longitud de onda de 260 nm.

9.3 Amplificación de genes por PCR

A partir del DNA extraído de cada cepa, se llevó a cabo la amplificación de los genes relacionados con la RAM en *H. pylori* por medio de PCR de punto final. Los genes de interés fueron: *23S* para CLR, *pbp1A* para AMX y *gyrA* y *gyrB* para LVX. Los oligonucleótidos que se utilizaron se enlistan en la tabla 2. La PCR se realizó en un termociclador y las condiciones de amplificación para cada gen se muestran en la tabla 3. Para cada reacción se agregó 400 ng de DNA templado y los oligos se usaron a 10 µM. Se utilizó la mezcla para PCR OnePCR® Ultra de la marca GeneDireX, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Tabla 2. Lista de iniciadores utilizados para la amplificación de cada uno de los genes relacionados con la RAM de *H. pylori*.

Genes	Oligonucleótidos
23S	Sentido: 5'-ATGAAGCGTTGAATTGAAGC-3' Antisentido: 5'-CAACTCTCTTACACTCAGTAAGGC-3'
<i>pbp1A</i>	Sentido: 5' - CGATAGATTTGGATTACCAACGC-3' Antisentido: 5' - ACGATTTCTTTACGCAAGCC-3'
<i>gyrA</i>	Sentido: 5'CCGAGTTCCACCCATTAG-3' Antisentido: 5'ATTTCACTCATCGCGTCTC-3
<i>gyrB</i>	Sentido: 5'CCGAGTTCCACCCATTAG-3' Antisentido: 5'ATTTCACTCATCGCGTCTC-3

Tabla 3. Protocolo de amplificación por PCR para los genes de *H. pylori*.

	23S	<i>pbp1a</i>	<i>GyrA, GyrB</i>	16S
Incubación inicial	95°C x 5m	95°C x 5m	94°C x 5m	95°C x 2m
Ciclos	40 ciclos	40 ciclos	35 ciclos	29-30 ciclos
Desnaturalización	95°C x 20s	95°C x 30s	94°C x 1m	95°C x30s
Alineación	55°C x 30s	60°C x 30s	57°C x 1m	60°C x 30s
Extensión	72°C x 30s	72°C x 1m	72°C x 1m	72°C x 1m
Extensión final	72°C x 5m	72°C x 8m	72°C x 6m	72°C x 5m
Producto final	294 pb	1035 pb	426 pb y 444pb	120 pb

9.4 Secuenciación de genes

Los productos amplificados se purificaron con ayuda del kit GeneElute™ PCR Clean-up (Sigma-Aldrich) y se mandaron a secuenciar en el laboratorio de Microbiología Clínica, División de Infectología del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). Las secuencias proporcionadas se analizaron en búsqueda de mutaciones ya publicadas que estuvieran relacionadas con RAM en *H. pylori* (Tabla 4). Las secuencias se convirtieron en formato FASTA para su posterior análisis, utilizando como referencia la secuencia de la cepa 26695 de *H. pylori* (acceso en GenBank CP003904.1). Para el caso de los genes *pbp1a*, *gyrA* y *gyrB*, de la secuencia de nucleótidos, se realizó la traducción utilizando Blastx y con esta secuencia de aminoácidos se hizo el alineamiento con Blastp, tomando como referencia las secuencias ya publicadas de cada cepa. Todo esto se realizó en la plataforma del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

9.5 Ensayo de susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad contra los 3 antibióticos de interés para este estudio se realizó mediante el método de dilución en agar, para el cual se usó AMH suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrilada estéril, adicionando los antibióticos por separado (CLR, AMX y LVX) en diluciones dobles.

Tabla 4. Mecanismo de acción de cada antibiótico y las mutaciones en los genes relacionados.

Antibiótico	Mecanismo de acción del antibiótico	Mutaciones génicas
Claritromicina	Bloquea la síntesis de proteínas Diana: 23s ARNr	23s: A2143G, A2142G, C2195T, T2182C, C2288T, A2146G, A2147G
Amoxicilina	Bloquea la pared bacteriana Diana: PBP (proteína de unión a penicilina)	pbp1A: P473L, E406K, T593A/G/K
Levofloxacino	Bloquea la replicación bacteriana Diana: ADN girasa	gyrA: 87 (N por L/I/A/K) 91 (D por G/N/A/Y), N87K y D91Y/N/G gyrB: 463 (E por K/G), polimorfismos 438 (F por S), 481 (D por E/N), 484 (R por K)

Se usaron los puntos de corte para establecer como susceptibles a las cepas de *H. pylori*, de acuerdo con el Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST, por sus siglas en inglés) (tabla 5). Las placas se inocularon con 10 µL de una suspensión bacteriana en solución salina estéril, ajustando la concentración a 2 en la escala de McFarland. Las bacterias se mantuvieron en incubación por 48-72 h a 37°C en condiciones microaerofílicas.

Después se observó el crecimiento en las placas y se establecieron las cepas como susceptibles o resistentes de acuerdo con la MIC de cada cepa para cada antibiótico evaluado. La MIC se consideró como la concentración más alta del antibiótico en la cual hubo inhibición del crecimiento bacteriano. Las cepas que resultaron resistentes se volvieron a analizar por el mismo método, pero usando el doble de la MIC para los antibióticos a los que mostró resistencia.

Tabla 5. MIC usada para considerar la sensibilidad a los antibióticos por *H. pylori*, de acuerdo con la EUCAST.

Antibiótico	MIC en $\mu\text{g/mL}$	
	Susceptible \leq	Resistente $>$
Claritromicina	0.25	0.50
Amoxicilina	0.12	0.25
Levofloxacino	1.00	1.00

9.6 Inducción de RAM *in vitro* en cepas de *H. pylori*

Las bacterias se dejaron crecer hasta su fase logarítmica para ser resembradas. Se utilizó caldo Müeller Hilton (CMH) para hacer las diluciones correspondientes de cada antibiótico utilizado (CLR, LVX y AMX). Para la primer interacción se usaron concentraciones subMIC: para CLR fue de 0.003 $\mu\text{g/mL}$ y para AMX y LVX de 0.005 $\mu\text{g/mL}$. La interacción se hizo en 5 mL de CMH con la dilución de antibiótico correspondiente y se inocularon con bacterias a 2.0 en la escala de McFarland de cada una de las cepas. Se mantuvieron en tubos de 15 mL con tapa a 37°C en condiciones de microaerófilas. Se dejó un tubo por cepa inoculado solamente en CMH como control de crecimiento y otro solo con CMH como control negativo. Cada tubo fue suplementado con 5% de SFB para mejorar el crecimiento bacteriano. Se cambió el medio cada 48 h para que las bacterias no se quedaran sin nutrientes y se mantuvieron así por 6 pases (cada cambio de medio se consideró un pase). Los tubos se mantuvieron en 2 condiciones: en agitación y sin agitación para monitorear en cual se conseguía un crecimiento óptimo.

Pasados los 3 pases se centrifugaron los tubos, se decantó el medio y se conservó el botón bacteriano, el cual se sembró en agar Casman suplementado con 5% de sangre desfibrilada de carnero y 200 μL de SBF. Las placas se dejaron incubando por 72 h a 37°C en condiciones de microaerofilia. Se resembraron en agar Casman suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrilada, añadiendo 200 μL de SBF a cada caja para tener un mayor crecimiento bacteriano, dejándose incubar por 48 h a 37°C en condiciones de microaerofilia.

Después de obtener una buena cantidad de biomasa, se repitió la interacción con antibióticos, aumentando la concentración al doble, quedando CLR en 0.006 $\mu\text{g/mL}$ y AMX

y LVX en 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se mantuvieron igualmente por 3 pases, con cambio de medio cada 48 h. Se prosiguió con el mismo protocolo de cultivo para posteriormente interactuarlas con la siguiente concentración de antibióticos, quedando CLR a 0.012 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y AMX y LVX a 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Terminado esto, las bacterias que sobrevivieron se sembraron en agar Casman con 5% de sangre de carnero desfibrilada por 72hrs y posteriormente se resembraron e incubaron por 48 h. Nuevamente se determinó de MIC con la misma metodología, para compararla con las MIC's iniciales, en caso de haber diferencias con estas. De estas bacterias se realizó extracción de DNA total para proseguir con la amplificación y secuenciación de los genes de interés, usando la metodología ya descrita.

10.RESULTADOS

10.1 Caracterización de las cepas de *H. pylori*

Las cepas utilizadas en este trabajo (26696, PMSS1, 51932 y 43504) fueron caracterizadas a través de pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares, para asegurarse de que cumplieran con las características de *H. pylori*.

La caracterización morfológica se llevó a cabo mediante tinción de Gram. Las 4 cepas crecieron como bacilos alargados y de forma helicoidal de 2 a 4 μm de largo, como se observa en la Figura 6.

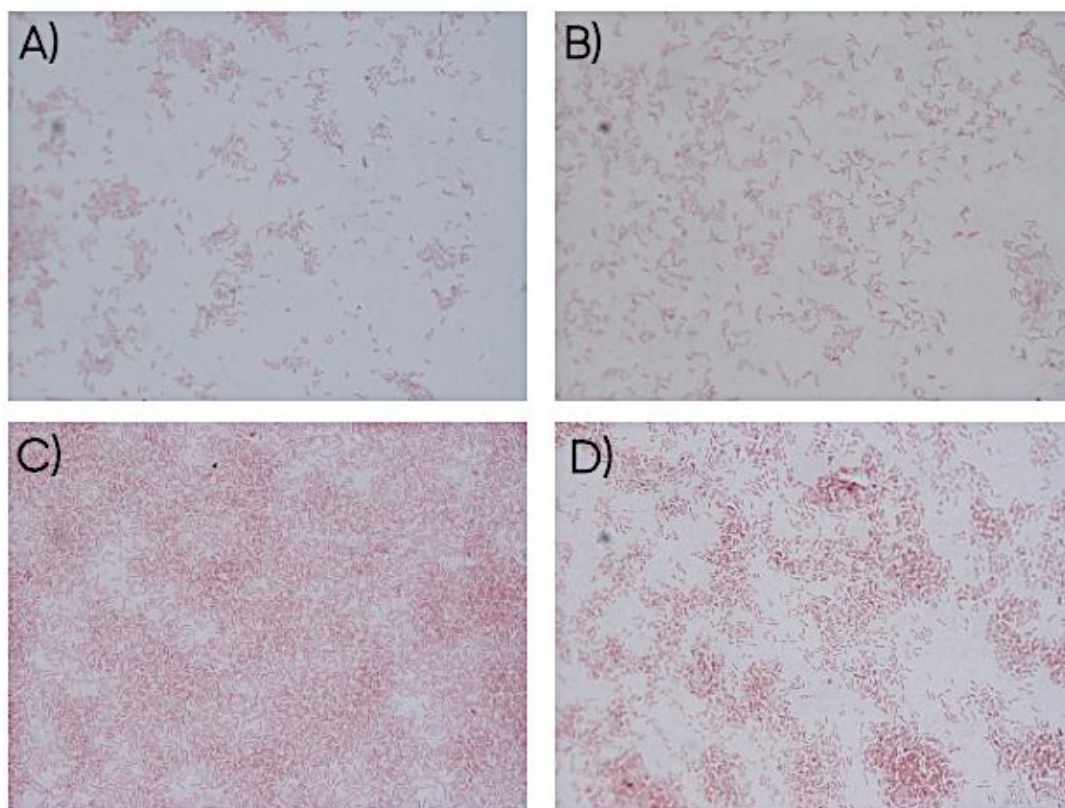


Figura 5. Tinción de Gram de las cepas de *H. pylori* analizadas. A) Cepa 26695. B) Cepa PMSS1. C) Cepa 51932. D) Cepa 43504.

Las pruebas bioquímicas que se realizaron fueron: prueba de ureasa, catalasa y oxidasa y los resultados se aprecian en la Figura 7. En el caso de la prueba de ureasa, se utilizó medio con urea y rojo de fenol como indicador de pH, mostrando un viraje en la coloración a rosa, lo

que demostró la presencia de la enzima ureasa la cual hidrolizó la urea presente y aumentó el pH del medio. Los resultados para las 4 cepas fueron positivos para la presencia de ureasa. En el caso de la prueba de oxidasa se utilizaron tiras reactivas, observándose un cambio de coloración a un tono azul. Las 4 cepas analizadas exhibieron resultados positivos para la enzima oxidasa.

En cuanto a la prueba de catalasa, se utilizó peróxido de hidrogeno al 3%, tomando una gota y agregando una muestra de bacterias de cada cepa. En cada caso, se observó la formación de burbujas por la presencia de la enzima catalasa que hidroliza el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno, teniendo resultados positivos para las 4 cepas.

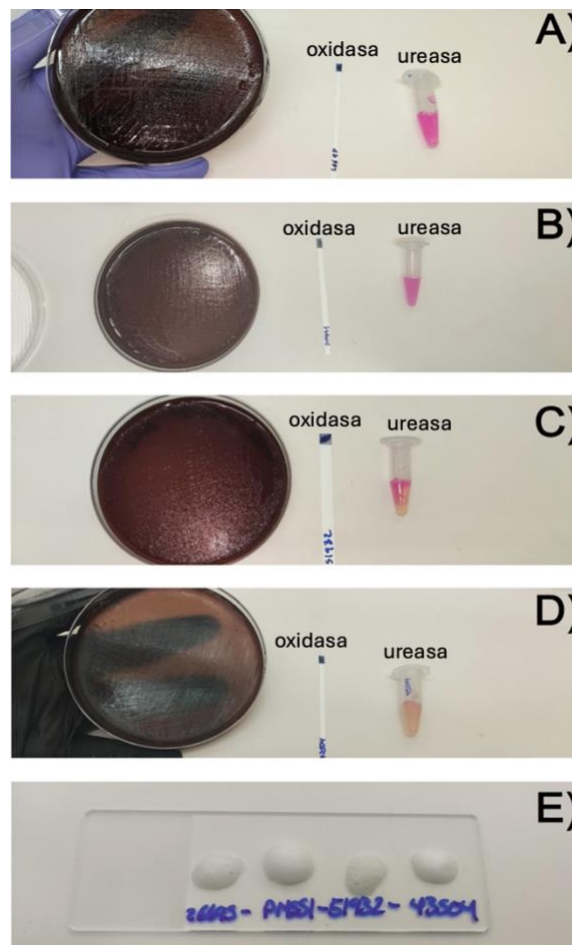


Figura 7. Pruebas bioquímicas para la caracterización de *H. pylori*. A) Cepa 26695 catalasa (+) y ureasa (+). B) Cepa PMSS1 catalasa (+) y ureasa (+). C) Cepa 51932 catalasa (+) y ureasa (+). D) Cepa 43504 catalasa (+) y ureasa (+). E) Prueba de catalasa (+) para las 4 cepas. El crecimiento colonial se puede apreciar en la caja Petri de cada cepa (A, B, C, D)

La caracterización molecular se realizó amplificando 3 genes específicos de *H. pylori*: *16S*, *glmM* y *cagA*. Los genes constitutivos fueron *16S* y *glmM*, mientras que *cagA* se presenta principalmente en cepas consideradas más virulentas (Ansari & Yamaoka, 2020). El gen *16S* codifican para una parte de la subunidad 16S del ribosoma bacteriano; *glmM* codifica para una fosfoglucoamina mutasa que participa en la biosíntesis de la pared bacteriana; y el gen *cagA* codifica para una citotoxina inyectada en la célula hospedera. En todas las cepas se amplificó un fragmento de los genes constitutivos *16s* y *glmM* (Figura 8).

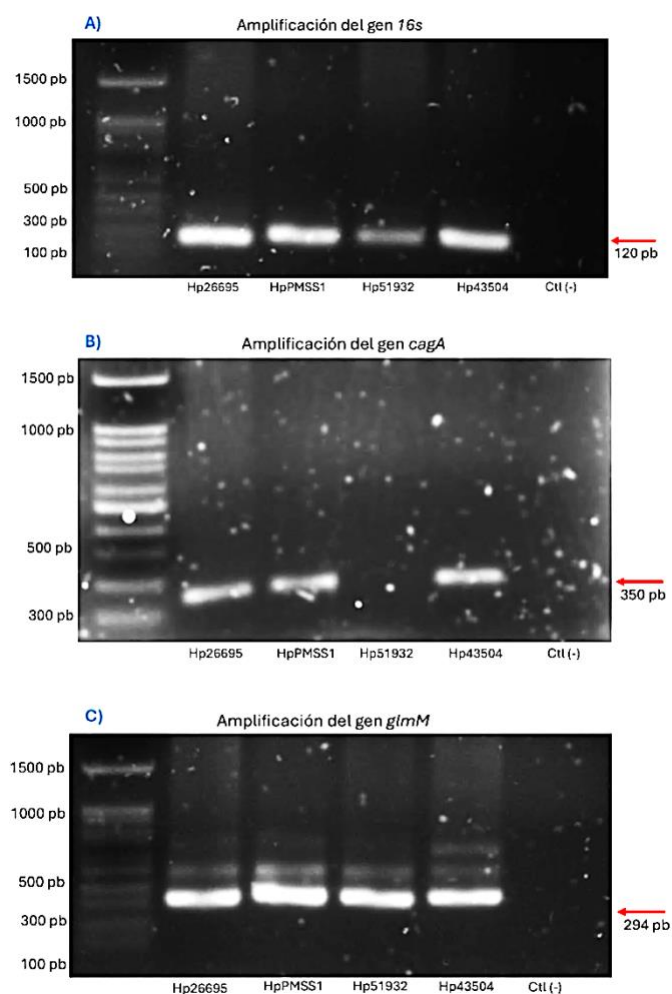


Figura 8. Amplificación de genes para la caracterización molecular de las cepas de *H. pylori* (26696, PMSS1, 51932 y 43504). El DNA bacteriano se obtuvo y se procesó para ensayos de PCR. **A)** Amplificación del gen *16s* (120 pb). **B)** Amplificación del gen *cagA* (350 pb). **C)** Amplificación del gen *glmM* (294 pb). Primer carril: estándar de tamaño molecular. Ctl (-): control de la PCR sin molde.

En tanto que el gen *cagA* solo se amplificó en las cepas 26695, PMSS1 y 43504, ya que como era de esperarse en la cepa 51932 carente de la isla de patogenicidad CagPAI no se amplificó

el gen *cagA* +. Con estos resultados se puede afirmar que las 4 cepas que se utilizaron en este estudio, corresponden a *H. pylori* ya que conservaron sus características morfológicas, bioquímicas y moleculares.

10.2 Amplificación de genes relacionados con RAM en *H. pylori* antes de la inducción a RAM

Una vez caracterizadas las cepas de *H. pylori*, se determinó si presentaban de manera natural mutaciones en los genes *23S*, *pbp1a*, *gyrA* y *gyrB* relacionados con la resistencia a CLR, AMX y LVX. Para ello, se aisló DNA a partir de cada cepa y empleando oligonucleótidos específicos para cada gen (tabla 2), se llevaron a cabo ensayos de PCR (tabla 3). En general, en las 4 cepas se amplificaron cada uno de los genes mencionados (Figura 9).

En el caso del gen *23S*, cuyos oligos amplifican la facción del gen desde la posición 2,007 a la 2,301 pb, el tamaño del amplicón fue de 294 pb. Los oligos del gen *pbp1a* produjeron un amplicón de 1,035 pb. En cuanto los genes *gyrA* y *gyrB*, los amplicones tuvieron una longitud de 426 pb y 444 pb, respectivamente (Figura 7).

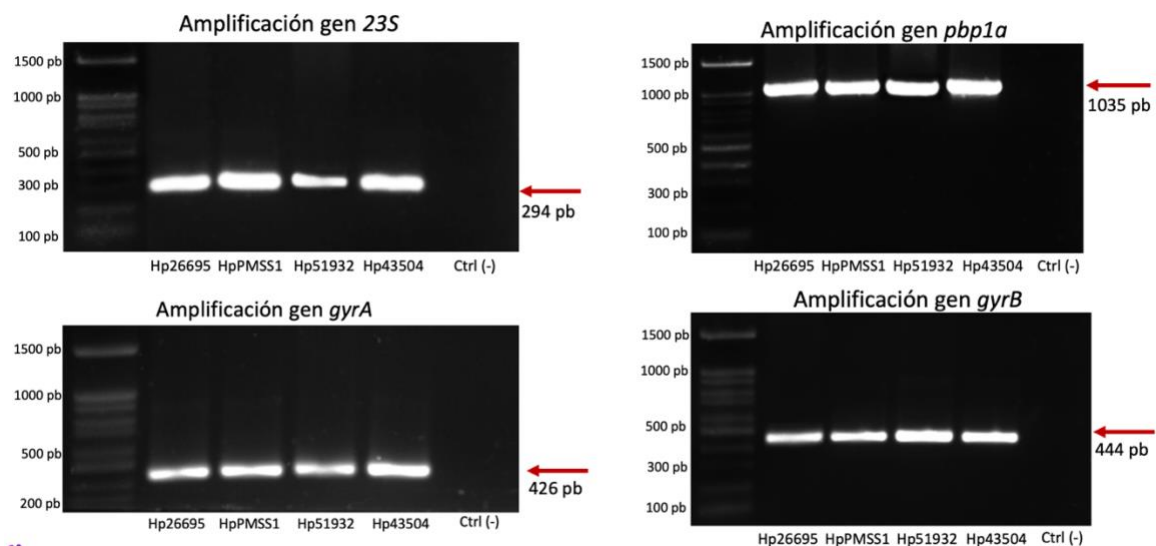


Figura 9. Amplificación de genes relacionados con la resistencia a CLR, AMX y LVX en cepas de *H. pylori*. A) Amplificación del gen *23S*. **B)** Amplificación del gen *pbp1a*. **C)** Amplificación del gen *gyrA*. **D)** Amplificación del gen *gyrB*. Cepas analizadas: 26695, PMSS1, 51932 y 43504.

10.3 Secuenciación de genes relacionados con RAM en cepas de *H. pylori* antes de la inducción a RAM

Una vez amplificados los fragmentos de los genes *23S*, *pbp1a*, *gyrA* y *gyrB* que contienen los sitios donde se han reportado mutaciones relacionadas con la resistencia a CLR, AMX y LVX (Mitui et al., 2014; Zhang, 2015; Hu et al., 2017), las bandas de los geles de agarosa se purificaron y se mandaron a secuenciar en el laboratorio de Microbiología de la Clínica del en la División de Infectología del INR. El análisis de los datos secuenciación realizada antes de iniciar con la inducción a RAM con los 3 antibióticos mostraron los siguientes resultados: la secuencia del gen *23S* de la cepa 26695 mostró 98% de identidad en el alineamiento con el genoma de referencia (Figuras 10). De igual manera, las secuencias de este mismo gen en las 3 cepas restantes (PMSS1, 51932, 43504) mostraron 100% de identidad en los 290 pb con la secuencia de la cepa 26695, lo que sugiere que este gen se encuentra conservado entre cepas y sin mutaciones. Para la búsqueda de mutaciones relacionadas con RAM contra CLR, se utilizó el sistema de posicionamiento de nucleótidos propuesto por Taylor et al, en el año 1997. Los sitios de interés fueron 2142, 2143, 2182, 2195 y 2288, en los cuales no se encontraron mutaciones, como se muestra en las Figura 10 y 11.

U27270.1 Genes de ARN ribos##mico 23S y 5S de *Helicobacter pylori*, secuencia completa

Sequence ID: Query_2324689 Length: 3870 Number of Matches: 1

Range 1: 2375 to 2668 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
501 bits(271)	1e-145	288/295(98%)	6/295(2%)	Plus/Plus
Query 2	CGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTG-TCGGTTAAATACCGACCTGCAT			60
Sbjct 2375	CGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTTTCGGTTAAATACCGACCTGCAT			2434
Query 61	GAATGGCGTAACGAGAT-GGGAGCTGTCTCAACCAGAGATTCAGTGAAATTGTAGTGGAG			119
Sbjct 2435	GAATGGCGTAACGAGATGGGGAGCTGTCTCAACCAGAGATTCAGTGAAATTGTAGTGGAG-			2493
Query 120	GTGAAAATTCCTCCTACCC-GCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGGACCTTT-ACTACAAC			177
Sbjct 2494	GTGAAAATTCCTCCTACCCGGCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGGACCTTTAACTACAAC			2553
Query 178	TTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGCGCAGGATAGGTGGGA-GGCTTTGAAGTAAGGGC			236
Sbjct 2554	TTAGCACTGCTAATGGGAATATCATGCGCAGGATAGGTGGGAGGGCTTTGAAGTAAGGGC			2613
Query 237	TTTGGCTCTTATGGAGCCATCCTTGAGATACCACCTTGATGTTTCTGTACCTA			291
Sbjct 2614	TTTGGCTCTTATGGAGTCATCCTTGAGATACCACCTTGATGTTTCTGTACCTA			2668

Figura 10. Alineamiento de la secuencia del gen 23S de la cepa 26695 con el genoma completo publicado en GenBank U27270.1.



Figura 11. Alineamiento de las secuencias del gen 23S en las 4 cepas de *H. pylori*.

Para el gen *pbp1a*, el producto de amplificación fue de 1035, pero al momento de hacer la secuenciación, al ser una secuencia larga, la secuenciación no fue completa. Para la cepa 26695 se secuenciaron 896 pb; para la cepa PMSS1 fueron 921 pb; en la cepa 51932 se obtuvieron 881 pb; y en la cepa 43504 se secuenciaron 816 pb. A partir de estas secuencias se realizó la traducción de nucleótidos a aminoácidos, tomando en cuenta los marcos de lecturas de esta proteína (PBP1A) y su función biológica. A diferencia del gen 23S que no se traduce ya que es parte de la subunidad mayor del ribosoma y cuya función se da estando en secuencia de nucleótidos, la PBP1A tiene su actividad en forma de proteína y la búsqueda de mutaciones se da en la secuencia de aminoácidos. En la cepa 26695 se obtuvo 97% de identidad, para la cepa PMSS1 96%, para la cepa 51932 98% y para la cepa 43504 100% de identidad (Figura 12-15).

En cuanto a la búsqueda de mutaciones en PBP1A de la cepa 26696, observamos que en las posiciones 402, 414, 417, 473, 555 y 561 no se encontraron mutaciones, mientras que en la posición 406 hay una sustitución de ácido glutámico por alanina (E406A) y en la posición 593 una sustitución de treonina por alanina (T593A). Estas mutaciones se encuentran en cepas consideradas resistentes, aunque haciendo la revisión de todas las cepas, algunas difieren en ciertos aminoácidos en las posiciones de interés, como el anteriormente dado.

PBP1A en la cepa 26695

lcl|CP003904.1_prot_AFV41818.1_597 [locus_tag=C694_03085] [protein=penicillin-binding protein 1A (PBP-1A)] [protein_id=AFV41818.1] [location=complement(630852..632831)] [gbkey=CDS]

Sequence ID: Query_4173036 Length: 659 Number of Matches: 1

Range 1: 307 to 604 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
592 bits(1527)	0.0	Compositional matrix adjust.	289/298(97%)	293/298(98%)	0/298(0%)
Query 1	I LEKIAKEKPKTNASNEDEDNLNASMIVTDTSTGKILALVGGIDYKKSFAFNRAQAKRQF				60
Sbjct 307D.....				366
Query 61	GSAIKPFVLYQIAFDNGYSTTSKIPDTARNFENDNYSKNSAQNHWHPFSNYSRKFLGLVTL		402 406 414 417		120
Sbjct 367V.....G.....E.....S.....				426
Query 121	QEALSHSLNLATINLSDQLGFEEKYQSLSDMGFKNLPKDL SIVLGSFAISPIDAAEKYSL		473		180
Sbjct 427D.....S.....				486
Query 181	FSNYGMLKPM LIESITNQNDVKTFPTIETKITSKEQAF LTL S VLMNAVENGTGRLAR				240
Sbjct 487M.....D.....S.....				546
Query 241	IKGLEIAKKTGTSNNIDAWFIGFTPTLQSVIWFGRDNTPI SKGATGGVVSAPVYSY	555 561		593	298
Sbjct 547T.....G.....V.....				604

Motivos catalíticos:
SAIK 368-371
KTG 555-557
SNN 559-561

Figura 12. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PBP1A de la cepa 26695 (Query) con la secuencia publicada de la misma cepa (Sbjct).

PBP1A en la cepa PMSS1

AQM72281.1 Penicillin-binding protein 1A [Helicobacter pylori PMSS1]

Sequence ID: Query_7612356 Length: 659 Number of Matches: 1

Range 1: 307 to 612 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
604 bits(1557)	0.0	Compositional matrix adjust.	293/306(96%)	299/306(97%)	0/306(0%)
Query 1	I FRKIAKEKPKTNASNENEDNLNASMIVTDTSTGKILALVGGIDYKKSFAFNRAQAKRQF				60
Sbjct 307LE.....D.....				366
Query 61	GSAIKPFVYQIAFDNGYSTTSKIPDTARNFENGNYSKNSVQNHAWHPFSNYSRKFLGLVTL		402 406 414 417		120
Sbjct 367L.....D.....A.....S.....				426
Query 121	QEALSHSLNLATINLSDQLGFEEKYQSLSDMGFKNLPKDL SIVLGSFAISPIDAAEKYSL		473		180
Sbjct 427D.....S.....				486
Query 181	FSNYGMLKPM LIESITNQNDVKTFTPMETKITSKEQAF LTL S VLMNAVENGTGRLAR				240
Sbjct 487I.....				546
Query 241	IKGLEIAKKTGTSNNIDAWFIGFTPTLQSVIWFGRDNTPI SKGATGGVVSAPVYSYFM	555 561		593	300
Sbjct 547A.....S.....I.....A.....				606
Query 301	RNILSM				306
Sbjct 607AI				612

Motivos catalíticos:
SAIK 368-371
KTG 555-557
SNN 559-561

Figura 13. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PBP1A de la cepa PMSS1 (Query) con la secuencia publicada de la misma cepa (Sbjct).

PBP1A en la cepa 51932

Helicobacter_pylori_ATCC_51932.fasta_00793 Penicillin-binding protein 1A

Sequence ID: **Query_8120489** Length: **659** Number of Matches: **1**

Range 1: **312 to 604** [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
591 bits(1523)	0.0	Compositional matrix adjust.	288/293(98%)	290/293(98%)	0/293(0%)
Query 1	AKEKPKTNASNEDEDNLNASMIVTDTSTGKILALVGGIDYKKSFAFNRTQAKRQFGSAIK	60			
Sbjct 312N.....	371			
Query 61	PFVYQIAFDNGYSTTSKIPDTARNFENGNYSKNSEQNHWHPNSYSRKFLGLVTLQEALS	120	402 406 414 417		
Sbjct 372M.....	431			
Query 121	HSLNLATINLSDQLGFEEKIYQSLSDMGFKNLPKDLISIVLGSFAISPIDAAEKYSLFSNYG	180	473		
Sbjct 432	491			
Query 181	TMLKPLIESITNQNDVKTFTPMETKKITSKEQAFLLSVLMDAVENGTGSLARIKGLE	240			
Sbjct 492N.....R.....	551			
Query 241	IACKTGTSMNVIDAWFIGFTPTLQSVIWFGRDDNTPISKGATGGVVSAPVYSY	293	555 561 593		
Sbjct 552T.....	604			

Motivos catalíticos:
SAIK 368-371
KTG 555-557
SNN 559-561

Figura 14. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PBP1A de la cepa 51932 (Query) con la secuencia publicada de la misma cepa (Sbjct).

PBP1A en la cepa 43504

BBI22728.1 penicillin-binding protein 1F [Helicobacter pylori]

Sequence ID: **Query_8143914** Length: **659** Number of Matches: **1**

Range 1: **326 to 596** [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
556 bits(1433)	0.0	Compositional matrix adjust.	271/271(100%)	271/271(100%)	0/271(0%)
Query 1	DNLNASMIVTDTSTGKILALVGGIDYKKSFAFNRTQAKRQFGSAIKPFVYQIAFDNGYST	60			
Sbjct 326	385			
Query 61	TSKIPDTARNFENGNYSKNSEQNHWHPNSYSRKFLGLVTLQEALSHSLNLATINLSDQL	120	402 406 414 417		
Sbjct 386	445			
Query 121	GFEKIYQSLSDMGFKNLPKDLISIVLGSFAISPIDAAEKYSLFSNYGTMKPLIESITNQ	180	473		
Sbjct 446	505			
Query 181	QNDVKTFTPMETKKITSKEQAFLLSVLINAVENGTGRLARTKGLEIACKTGTSMNVIDA	240	555 561		
Sbjct 506	565			
Query 241	WFIGFTPTLQSVIWFGRDDNTPISKGATGGV	271	593		
Sbjct 566	596			

Motivos catalíticos:
SAIK 368-371
KTG 555-557
SNN 559-561

Figura 15. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PBP1A de la cepa 43504(Query) con la secuencia publicada de la misma cepa (Sbjct).

Por lo que, estas mutaciones deben analizarse dependiendo de la cepa. Para la cepa PMSS1 no se encontraron mutaciones en las posiciones 402, 414, 417, 473, 555 y 561; mientras que en la posición 406 hay una sustitución de alanina por valina (A406V), lo cual ya se considera como una mutación relacionada con la resistencia a AMX. De igual manera, en la posición 593 se encontró una sustitución de alanina por treonina (A593T), tomando en cuenta que

tener A en dicha posición está relacionada a la misma resistencia. Para la cepa 51932 no se encontraron mutaciones en las posiciones 402, 414, 417, 473, 555, 561 y 593. En la posición 406 hay una sustitución valina por ácido aspártico (V406E), aunque esta sustitución no está relacionada con resistencia a AMX. Para la cepa 43504 no hay mutaciones en ninguno de los 8 sitios de en la PBP1A relacionados con resistencia a AMX.

Finalmente se realizaron los alineamientos para los genes *gyrA* y *gyrB*, encontrando que la secuencia de la cepa 26695 tuvo un 98% de identidad y la de las cepas PMSS1, 51932 y 43504 presentaron un 100% de identidad. No se encontraron mutaciones en las posiciones 87 y 91 de GyrA en ninguna de las 4 cepas analizadas (Figura 16), los cuales son sitios donde se han encontrado mutaciones relacionadas con resistencia a LVX en *H. pylori*.

Para GyrB, la comparación de las secuencias de aminoácidos quedó de la siguiente manera: para la cepa 26695 se obtuvo un 99% de identidad, para la PMSS1 un 100% y para la 51932 99%. Debido a que la secuencia de GyrB es específica para la cepa 43504, se realizó el alineamiento usando la secuencia de esta proteína con el código de acceso WP_209612216.1 publicado en el GenBank. En cuanto a la búsqueda de mutaciones relacionadas con la resistencia a LVX, no se encontraron mutaciones de GyrB en los sitios 438, 463, 479, 481 y 484 de las cepas 26695 y 51932; pero en la cepa 43504, en la posición 481 hay una sustitución de un ácido aspártico por un ácido glutámico (D481E) y en la posición 484 de una arginina por una lisina (R484K) (Figura 17).

A) GyrA en la cepa 26695

Icl|CP003904.1_prot_AFV41918.1_697 [locus_tag=C694_03615] [protein=DNA gyrase subunit A] [location=752524..755007] [gbkey=CDS]

Sequence ID: Query_2618790 Length: 827 Number of Matches: 1

Range 1: 26 to 165 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
286 bits(733)	9e-95	Compositional matrix adjust.	137/140(98%)	138/140(98%)	0/140(0%)
Query 1	FSLSMSV	IIGRALPDARDGLKPVHRRILYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHHPHG			60
Sbjct 26	LAY			85
Query 61	DNAVYD	ALVRMAQDFSMRLELVGGQGNFGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKD			120
Sbjct 86			145
Query 121	TIDFVPNYDDTLKEPDILPS		140		
Sbjct 146		165		

B) GyrA en la cepa PMSS1

AQM72381.1 DNA gyrase subunit A [Helicobacter pylori PMSS1]

Sequence ID: Query_3621438 Length: 827 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 166 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
288 bits(738)	1e-95	Compositional matrix adjust.	138/138(100%)	138/138(100%)	0/138(0%)
Query 3	SMSV	IIGRALPDARDGLKPVHRRILYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHHPHG			62
Sbjct 29			88
Query 63	VYD	ALVRMAQDFSMRLELVGGQGNFGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKID			122
Sbjct 89			148
Query 123	FVPNYDDTLKEPDILPSR		140		
Sbjct 149		166		

C) GyrA en la cepa 51932

Helicobacter_pylori_ATCC_51932.fasta_00894 DNA gyrase subunit A

Sequence ID: Query_3816670 Length: 831 Number of Matches: 1

Range 1: 31 to 170 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
291 bits(746)	1e-96	Compositional matrix adjust.	140/140(100%)	140/140(100%)	0/140(0%)
Query 1	LAYSMSV	IIGRALPDARDGLKPVHRRILYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHHPHG			60
Sbjct 31			90
Query 61	DNAVYD	ALVRMAQDFSMRLELVGGQGNFGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKD			120
Sbjct 91			150
Query 121	TIDFVPNYDDTLKEPDILPS		140		
Sbjct 151		170		

D) GyrA en la cepa 43503

BB122835.1 DNA gyrase subunit A [Helicobacter pylori]

Sequence ID: Query_4130349 Length: 828 Number of Matches: 1

Range 1: 26 to 165 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
292 bits(747)	8e-97	Compositional matrix adjust.	140/140(100%)	140/140(100%)	0/140(0%)
Query 1	LAYSMSV	IIGRALPDARDGLKPVHRRILYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHHPHG			60
Sbjct 26			85
Query 61	DNAVYD	ALVRMAQDFSMRLELVGGQGNFGSIDGDNAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKD			120
Sbjct 86			145
Query 121	TIDFVPNYDDTLKEPDILPS		140		
Sbjct 146		165		

Figura 16. Alineamientos de la secuencia de GyrA en las 4 cepas de *H. pylori*. A) Cepa 26695. B) Cepa PMSS1. C) Cepa 51932. D) Cepa 43504.

A) GyrB en la cepa 26695

lcl|CP003904.1_prot_AFV41720.1_499 [gene=gyrB] [locus_tag=C694_02575] [protein=DNA gyrase :
[location=527696..530017] [gbkey=CDS]

Sequence ID: Query_5381976 Length: 773 Number of Matches: 1

Range 1: 378 to 522 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
297 bits(760)	3e-99	Compositional matrix adjust.	144/145(99%)	145/145(100%)	0/145(0%)
Query 1		KAREASKKARELTRKKDNLVSGTLPGLKADQCQSKDPLESEIFLVEGDSAGGSAKQGRDRV			60
Sbjct 378	438.....463.....479 481 484.....			437
Query 61		VFQAILPLKGGKILNVEKSHLSKILKSEIKNMIFAGCGIQESFDIERLRYHKIIMTDA			120
Sbjct 438	463.....479 481 484.....			497
Query 121		VDGSHIQTLMTFFRYLRPLIEQG	145		
Sbjct 498	Q.....522			

B) GyrB en la cepa PMSS1

AQM72175.1 DNA gyrase subunit B [Helicobacter pylori PMSS1]

Sequence ID: Query_5237318 Length: 773 Number of Matches: 1

Range 1: 377 to 522 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
301 bits(771)	8e-101	Compositional matrix adjust.	146/146(100%)	146/146(100%)	0/146(0%)
Query 1		AKAREASKKARELTRKKDNLVSGTLPGLKADQCQSKDPLESEIFLVEGDSAGGSAKQGRDR			60
Sbjct 377	438.....463.....479 481 484.....			436
Query 61		VFQAILPLKGGKILNVEKSHLSKILKSEIKNMIFAGCGIQESFDIERLRYHKIIMTDA			120
Sbjct 437	463.....479 481 484.....			496
Query 121		DVDGSHIQTLMTFFRYLRPLIEQG	146		
Sbjct 497	522			

C) GyrB en la cepa 51932

Helicobacter_pylori_ATCC_51932.fasta_00728 Type 2 topoisomerase subunit B

Sequence ID: Query_5751046 Length: 773 Number of Matches: 1

Range 1: 395 to 524 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
268 bits(686)	2e-88	Compositional matrix adjust.	129/130(99%)	129/130(99%)	0/130(0%)
Query 1		NLSVGTLPGLKADQCQSKDPLESEIFLVEGDSAGGSAKQGRDRVVFQAILPLKGGKILNVEKS			60
Sbjct 395	463.....479 481 484.....			454
Query 61		HLSKILKSEIKNMIFAGCGIQESFDIERLRYHKIIMTADVDGSHIQTLMTFFRYR			120
Sbjct 455	463.....479 481 484.....			514
Query 121		LRPLIEQWHV	130		
Sbjct 515	G.....524			

D) GyrB en la cepa 43504

VIRT-74124:5'3' Frame 3, start_pos=0

Sequence ID: Query_5009201 Length: 147 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 146 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
298 bits(763)	2e-102	Compositional matrix adjust.	144/146(99%)	146/146(100%)	0/146(0%)
Query 377		AKAREASKKARELTRKKDNLVSGTLPGLKADQCQSKDPLESEIFLVEGDSAGGSAKQGRDR			436
Sbjct 1	438.....463.....479 481 484.....			60
Query 437		VFQAILPLKGGKILNVEKSHLSKILKSEIKNMIFAGCGIQESFDIERLRYHKIIMTDA			496
Sbjct 61	463.....479 481 484.....			120
Query 497		DVDGSHIQTLMTFFRYLRPLIEQG	522		
Sbjct 121	146			

Figura 17. Alineamientos de la secuencia de GyrB en las 4 cepas de *H. pylori*. A) Cepa 26695. B) Cepa PMSS1. C) Cepa 51932. D) Cepa 43504.

10.4 Determinación de MIC en cepas de *H. pylori*

Los antibióticos utilizados fueron CLR, AMX y LVX, proporcionados por el laboratorio de Microbiología Clínica de la División de Infectología del INR. Antes de utilizarlos para este estudio, se evaluó su efectividad mediante la técnica de microdilución en placa.

De los tres antibióticos se hicieron diluciones dobles, las cuales se agregaron a cada pocillo (100 µg/mL), y se inocularon con 10 µL de suspensión bacteriana de cepas determinadas por la CLSI, a 0.5 en la escala de McFarland.

En el caso de CLR se usó la cepa de *Staphylococcus aureus* 29213 de la ATCC, y para AMX y LVX se empleó la cepa de *E. coli* 25922 de la ATCC. La concentración de los antibióticos empleados correspondió a la MIC. Como control de crecimiento, en algunos pocillos solo se pusieron CMH y bacterias. En el control de medio, a los pocillos solo se les agregó CMH. Después de leer la placa a las 24 h, no se observó crecimiento bacteriano cuando se añadieron los diferentes antibióticos, solo en el control de crecimiento. De manera que, con estos resultados satisfactorios, se emplearon los tres antibióticos en los experimentos subsecuentes.

Estos antibióticos se emplearon para el cultivo de las diferentes cepas de *H. pylori* a diferentes concentraciones, con lo que se pudo obtener la MIC para cada uno. En general, las MIC para CLR rondan entre 0.015 µg/mL a 0.031 µg/mL; para AMX van de 0.006 µg/mL a 0.062 µg/mL; y para LVX se encuentran en un rango de 0.015 µg/mL a 0.125 µg/mL (tabla 6).

Tabla 6. MIC de cepas de *H. pylori* contra CLR, AMC y LVX.

Cepas de *H. pylori*

Antibióticos	26695	PMSS1	51932	43504
CLR	0.031 µg/mL	0.015 µg/mL	0.031 µg/mL	0.015 µg/mL
AMX	0.008 µg/mL	0.006 µg/mL	0.031 µg/mL	0.062 µg/mL
LVX	0.125 µg/mL	0.125 µg/mL	0.062 µg/mL	0.015 µg/mL

Estos resultados se compararon con los puntos de corte publicados por la EUCAST para estos tres antibióticos (Tabla 5), con lo que se puede clasificar a nuestras 4 cepas como susceptibles para CLR, AMX y LVX.

10.5 Inducción de resistencia a antibióticos *in vitro* para *H. pylori*

De manera inicial se había planeado usar 500 μ L de cultivo bacteriano y la subMIC $\frac{1}{2}$ para los 3 antibióticos con las 4 cepas de *H. pylori*, durante 5 pases (cada cambio de medio a las 48 h se consideró como un pase). Pero al término de la primera ronda (cada interacción con una concentración diferente de antibióticos se le denominó ronda), observamos que ninguna de las cepas sobrevivió a la inducción con CLR, AMX y LVX, excepto la cepa 43504 que sobrevivió a LVX. Haciendo el análisis del control de crecimiento nos percatamos que las bacterias solo sobrevivían a 3 pases con el medio CMH. En cuanto a la concentración de cada antibiótico utilizada, se piensa que podría ser la concentración mínima bactericida (CMB), lo que explicaría por qué ninguna cepa sobrevivió.

Con estos resultados optamos por hacer una modificación en nuestra estrategia de inducción a RAM. Para esto aumentamos la cantidad de CMH a 5 mL, debido a que una mayor cantidad de medio nos proporcionaría un mayor crecimiento bacteriano. La concentración se disminuyó para los 3 antibióticos y se optó por mantener las 4 cepas a una misma concentración, quedando para la primera ronda: CLR 0.003 μ g/mL y para AMX y LVX 0.005 μ g/mL, como se muestra en la metodología descrita en este trabajo. Las concentraciones aumentaron al doble para la 2ª ronda y al triple para la 3ª ronda. Se agregó una variable en esta estrategia, la cual fue tener una ronda de tubos en agitación y otras sin agitación durante la incubación para determinar en donde se obtenía un crecimiento óptimo.

Utilizando estas nuevas concentraciones de antibióticos, ninguna cepa sobrevivió cuando se empleó CLR, a pesar de que la dosis fue muy baja. Esto puede deberse a que el antibiótico utilizado es de grado farmacéutico y no de uso para investigación, a diferencia de la AMX y el LVX, cuya presentación viene en forma de sales.

De las 4 cepas inducidas a RAM, lograron sobrevivir las cepas 26695, PMSS1, 43504 y en muy baja cantidad la cepa 51932 con AMX. Cuando se usó LVX, las 4 cepas tuvieron buen crecimiento. En el caso de la agitación se observó variaciones de crecimiento en las diferentes cepas que se mantuvieron solamente con CMH. En el caso de la cepa PMSS1 y 51932, el crecimiento colonial entre las bacterias que estuvieron incubadas en agitación en comparación con la que no se mantuvieron en agitación, no se observó diferencias en el crecimiento. Caso contrario se observa con las cepas 26695 y 43504, en las cuales, el crecimiento colonial fue mayor en aquellas que se mantuvieron sin agitación durante la incubación, en comparación con las que sí estuvieron en agitación (Figura 18).

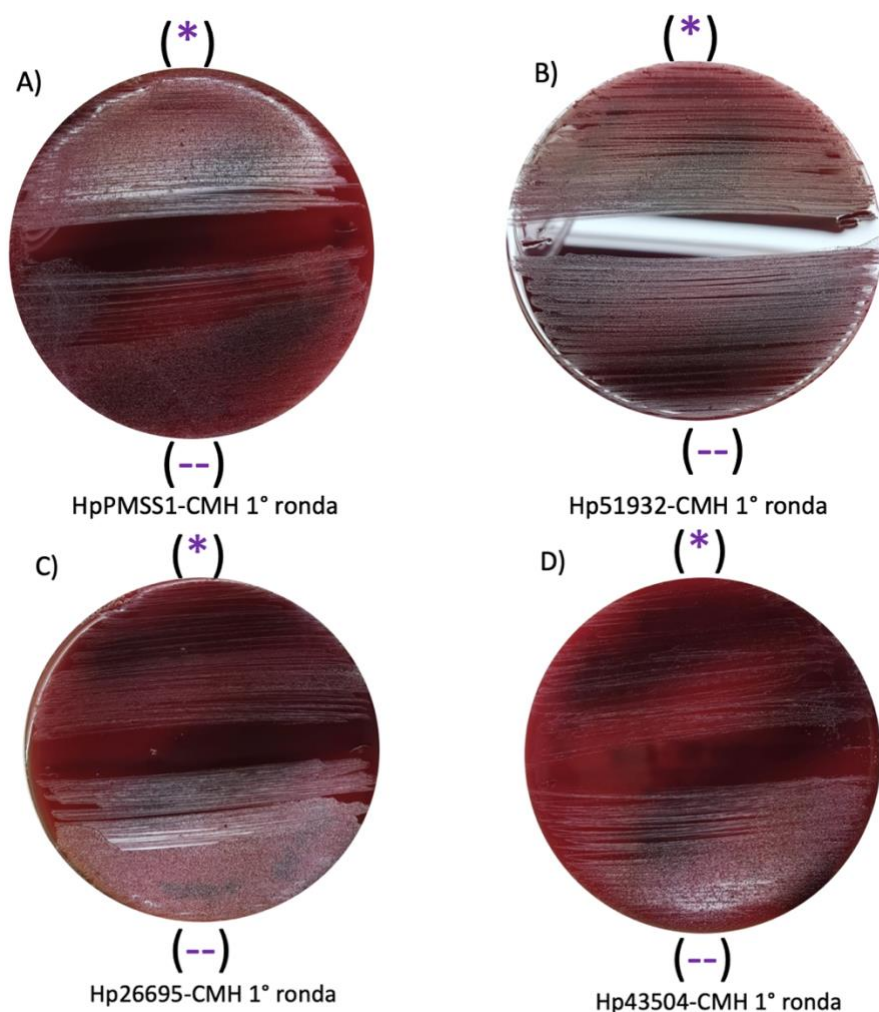


Figura 18. Diferencias en el crecimiento bacteriano después de la 1ª ronda. Cepas 26695, PMSS1, 51932 y 43505 de *H. pylori* crecidas en CMH. (*) en agitación; (--) sin agitación.

Debido a las ligeras diferencias presentadas en el crecimiento entre las bacterias incubadas en agitación y sin agitación después de la primer ronda de inducción a RAM, se decidió quitar la variable de agitación en las siguientes rondas.

Para la 2ª ronda de inducción a RAM solamente se utilizaron AMX y LVX incrementándose al doble la concentración de los antibióticos y descartándose CLR. Al finalizar la 2ª ronda de inducción a RAM en las 4 cepas de *H. pylori*, observamos que el diámetro de las colonias crecidas en agar Casman era menor que las colonias antes de iniciar con la inducción con los antibióticos. Esto se observó en mayor medida en aquellas bacterias que se mantuvieron con AMX. También se pudo notar que el crecimiento bacteriano era menor, por lo que, en la siguiente resiembra, la biomasa obtenida fue baja (Figura 19).

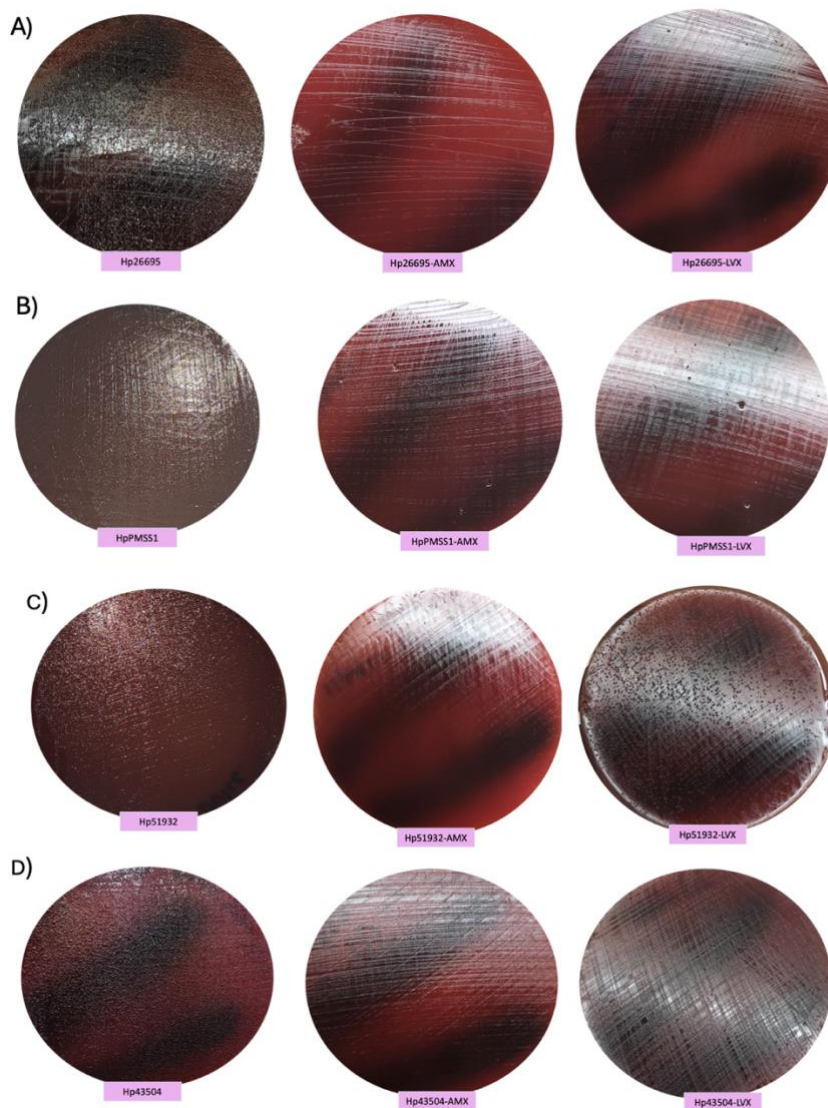


Figura 19. Crecimiento colonial de las cepas de *H. pylori* después de la 2ª ronda de inducción a RAM con AMX y LVX. A) Cepa 26695. B) Cepa PMSS1. C) Cepa 52932. D) Cepa 43504.

Tomando en cuenta el poco crecimiento obtenido después de resembrar aquellas bacterias que sobrevivieron a la 2ª inducción de RAM con AMX y LVX, se decidió no proseguir con la 3ª de inducción. Con las bacterias obtenidas hasta este paso, se realizó una tinción de Gram para observar su morfología. El tratamiento con los antibióticos cambió la morfología de las bacterias, de una forma bacilar-helicoidal, a una de bacilos cortos y formas cocoides. Esta transición se observó principalmente en aquellas bacterias que estuvieron con AMX, para las 4 cepas. En cuanto a las bacterias que se mantuvieron con LVX, en la cepa 26695 y PMSS1 se observaron principalmente bacilos cortos, en la cepa 51932 el acortamiento de los bacilos no fue tan evidente, y en cuanto a la cepa 43504, se observaron principalmente formas cocoides (Figura 20).

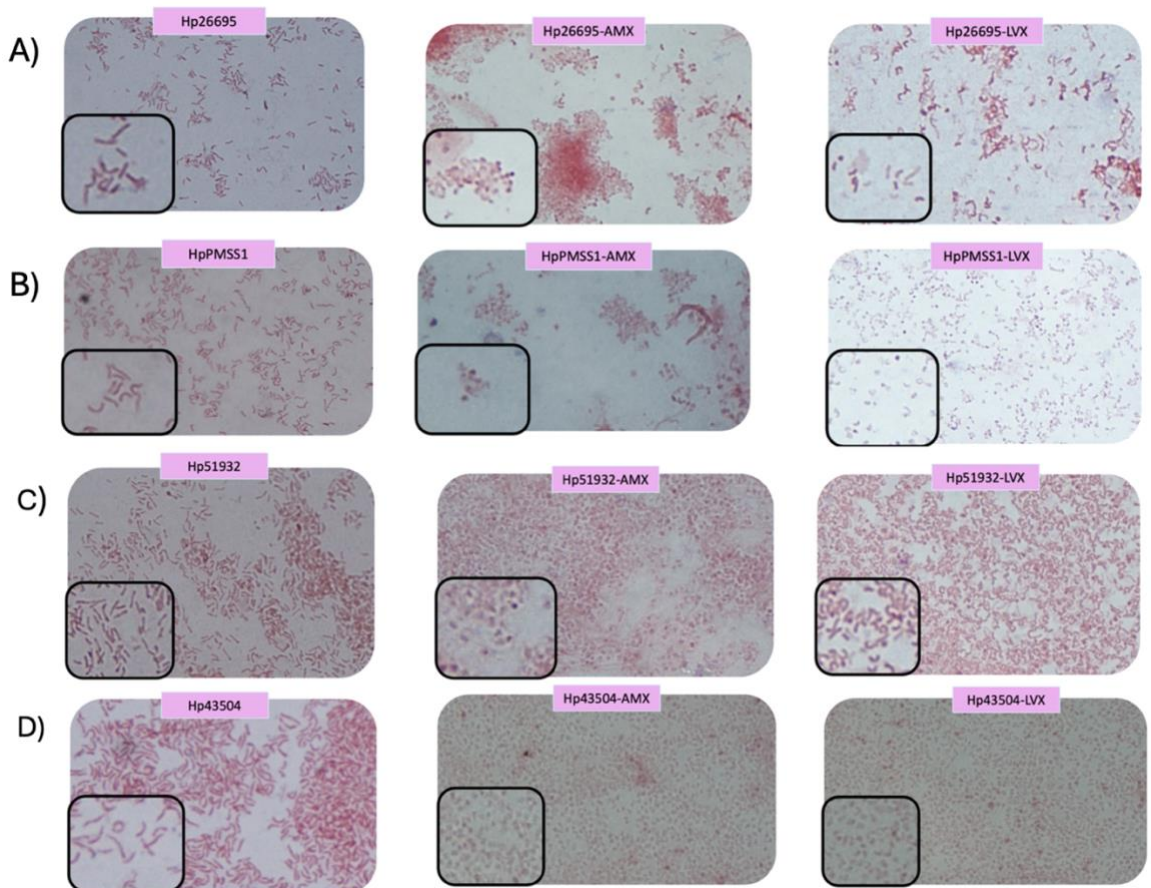


Figura 20. Cambio morfológico de las cepas *H. pylori* después de la 2ª ronda de inducción a RAM con AMX y LVX. A) Cepa 26695. B) Cepa PMSS1. C) Cepa 52932. D) Cepa 43504. Tinción de Gram.

Las bacterias sobrevivientes a la 2ª ronda se resembraron en agar Casman durante 48 h, para tener un mayor crecimiento bacteriano. A estas bacterias se les determinó nuevamente la MIC para AMX y LVX, con la finalidad de evaluar si la inducción a RAM había incrementado la MIC (tabla 7).

Tabla 7. MIC de las cepas de *H. pylori* después de la inducción a RAM con AMX y LVX.

Cepas de <i>H. pylori</i>				
Antibióticos	26695	PMSS1	51932	43504
AMX	0.062 µg/mL	0.500 µg/mL	0.031 µg/mL	0.015 µg/mL
LVX	0.125 µg/mL	-----	0.125 µg/mL	0.031 µg/mL

Teniendo estos resultados de las MIC, las concentraciones se compararon con las MIC (tabla 6). Para entender mejor la comparación, se realizó la tabla 8, en la que se indican los cambios en las MIC's. La MIC para AMX de la cepa 26695 aumentó 7 veces, pero la MIC para LVX permaneció igual. En la cepa PMSS1, solamente se pudo hacer la determinación de MIC contra AMX y no contra LVX por la poca cantidad de biomasa con que se contaba. De manera sorprendente, la MIC de AMX incrementó 80 veces, comparada con la MIC inicial. En la cepa 51932, la MIC contra AMX se mantuvo igual, pero para LVX aumento 2 veces. Por último, en la cepa 43504, la MIC contra AMX disminuyó 4 veces y la de LVX incrementó 2 veces.

Tabla 8. Comparación de MIC antes y después de la inducción a RAM con AMX y LVX.

Aumento de MIC por cepa de *H. pylori*

ATB	26695	PMSS1	51932	43504
AMX	↑7 veces	↑80 veces	igual	↓4 veces
LVX	igual	-----	↑2 veces	↑2 veces

10.6 Secuenciación de genes relacionados con RAM en cepas de *H. pylori* después de la inducción a RAM

Después de la inducción a RAM con 2 rondas de antibióticos, se realizó nuevamente la secuenciación de los genes *23S*, *pbp1a*, *gyrA* y *gyrB*, los cuales se compararon con las secuencias realizada antes de la inducción a RAM *in vitro*.

Debido a que no hubo bacterias sobrevivientes después de la inducción a RAM contra CLR, no se llevó a cabo esta comparación.

En el caso de PBP1A, en la cepa 26695 hubo una sustitución en la posición 406 de A por E, la cual implicaría un regreso a su forma no mutada. En la posición 593 también se presentó una sustitución de A por T (Figura 21). En cuanto a la cepa PMSS1, se encontró una sustitución de V en la posición 406 por A y en la posición 593 una sustitución de T por A. Estas dos mutaciones están relacionadas a la resistencia contra AMX en *H. pylori* (Figura 19). En cuanto a la cepa 51932, solamente se encontró una sustitución de E por V, pero esta mutación no está relacionada con la RAM. Por último, en la cepa 43504, no se encontraron mutaciones relacionadas con resistencia a AMX (Figura 22).

A) Alineamiento entre secuencias de PBP1A de la cepa 26695

Sequence ID: **Query_5478211** Length: **285** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 279 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
556 bits(1432)	0.0	Compositional matrix adjust.	270/279(97%)	274/279(98%)	0/279(0%)
Query 20			326		
Sbjct 1			350		
Query 80			400 402 406		
Sbjct 61			414 417		
Query 140			450		
Sbjct 121			473		
Query 200			550 555		
Sbjct 181			561		
Query 260			593		
Sbjct 241					

Motivos catalíticos:
SAIK 368-371
KTG 555-557
SNN 559-561

B) Alineamiento entre secuencias de PBP1A de la cepa PMSS1

Sequence ID: **Query_8058293** Length: **301** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 301 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
600 bits(1548)	0.0	Compositional matrix adjust.	291/301(97%)	295/301(98%)	0/301(0%)
Query 2			308		
Sbjct 1			350		
Query 62			400 402 406		
Sbjct 61			414 417		
Query 122			450		
Sbjct 121			473		
Query 182			500		
Sbjct 181					
Query 242			550 555		
Sbjct 241			561		
Query 302	N	302	593		
Sbjct 301	.	301			

Motivos catalíticos:
SAIK 368-371
KTG 555-557
SNN 559-561

Figura 21. Alineamiento entre secuencias PBP1A antes y después de la inducción a RAM *in vitro* contra AMX en las cepas de *H. pylori*. A) Cepa 26695. B) Cepa PMSS1.

A) Alineamiento entre secuencias de PBP1A de la cepa 51932

Sequence ID: **Query_4943353** Length: **306** Number of Matches: **1**

Range 1: 5 to 297 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
590 bits(1521)	0.0	Compositional matrix adjust.	288/293(98%)	290/293(98%)	0/293(0%)
Query 1					
Sbjct 5					
Query 61					
Sbjct 65					
Query 121					
Sbjct 125					
Query 181					
Sbjct 185					
Query 241					
Sbjct 245					

Motivos catalíticos:
SAIK 368-371
KTG 555-557
SNN 559-561

B) Alineamiento entre secuencias de PBP1A de la cepa 43504

Sequence ID: **Query_462953** Length: **303** Number of Matches: **1**

Range 1: 20 to 290 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
555 bits(1429)	0.0	Compositional matrix adjust.	271/271(100%)	271/271(100%)	0/271(0%)
Query 1					
Sbjct 20					
Query 61					
Sbjct 80					
Query 121					
Sbjct 140					
Query 181					
Sbjct 200					
Query 241					
Sbjct 260					

Motivos catalíticos:
SAIK 368-371
KTG 555-557
SNN 559-561

Figura 22. Alineamiento entre secuencias PBP1A antes y después de la inducción a RAM *in vitro* contra AMX en las cepas de *H. pylori*. A) Cepa 51932. B) Cepa 43504.

Para la proteína GyrA, los aminoácidos en la posición 87 y 91 son los que están relacionados con resistencia a LVX. En las cepas 26695, 51932 y 43504 no se encontraron mutaciones después de la inducción a RAM con LVX, como se muestra en la Figura 23.

Por el contrario, en el análisis de secuencias del gen *gyrB*, después de la traducción a cadena de aminoácidos, se encontraron dos mutaciones en las cepas 26695, 51932 y 43504. Estas mutaciones están en las posiciones 481 y 484 (Figura 24), pero para el caso de la cepa 43503, estas mutaciones se presentaron desde antes de la inducción a RAM y se conservaron después de esta. Estas 2 mutaciones se encuentran en la posición 481, donde hay una

sustitución de un ácido aspártico por un ácido glutámico (D481E); y en la posición 484 existe la sustitución de una arginina por una lisina (R484K).

A) Alineamiento entre secuencias de GyrA de la cepa 26695

Sequence ID: **Query_5178387** Length: **142** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 142 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
288 bits(738)	3e-107	Compositional matrix adjust.	142/142(100%)	142/142(100%)	0/142(0%)
Query 2		SLSMSV IIGRALPDARDGLKPVHRRILYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHGD			61
Sbjct 1				60
Query 62		NAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDNAAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKDT			12
Sbjct 61				12
Query 122		IDFVPNYDDLKPEPILPSPA	143		
Sbjct 121		142		

B) Alineamiento entre secuencia de GyrA de la cepa 51932

Sequence ID: **Query_921255** Length: **142** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 140 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
280 bits(715)	9e-104	Compositional matrix adjust.	137/140(98%)	138/140(98%)	0/140(0%)
Query 1		FSLMSV IIGRALPDARDGLKPVHRRILYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHG			60
Sbjct 1		LAY.....			60
Query 61		NAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDNAAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKD			120
Sbjct 61				120
Query 121		TIDFVPNYDDLKPEPILPS	140		
Sbjct 121		140		

C) Alineamiento entre secuencias de GyrA de la cepa 43504

Sequence ID: **Query_2659623** Length: **148** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 140 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
283 bits(725)	3e-105	Compositional matrix adjust.	140/140(100%)	140/140(100%)	0/140(0%)
Query 1		LAYSMSV IIGRALPDARDGLKPVHRRILYAMHELGLTSKVAYKKSARIVGDVIGKYHPHG			60
Sbjct 1				60
Query 61		NAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDNAAAMRYTEARMTKASEEILRDIDKDT			12
Sbjct 61				12
Query 121		TIDFVPNYDDLKPEPILPS	140		
Sbjct 121		140		

Figura 23. Alineamiento entre secuencias GyrA antes y después de la inducción a RAM *in vitro* contra LVX en las cepas de *H. pylori*. A) Cepa 26695. B) Cepa PMSS1. C) Cepa 51932. D) Cepa 43504.

A) Alineamiento entre secuencias de GyrB de la cepa 26695

Sequence ID: Query_6968131 Length: 148 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 146 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
291 bits(746)	2e-108	Compositional matrix adjust.	142/145(98%)	145/145(100%)	0/145(0%)
Query 1		KAREASKKARELTRKKDNLVSGTLPGLKADCQSKDPLESEIFLVEGDSAGGSAKQGRDRV			60
Sbjct 2				61
Query 61	 ⁴³⁸ FQAILPLKGGKILNVEKSHLSKILKSE ⁴⁶³ EIKNMITAFGCGIQES ^{479 481 484} FDIERLRYHKIIIMTDAD			120
Sbjct 62	 ⁴³⁸ F..... ⁴⁶³ ^{479 481 484}E.....K.....			121
Query 121		VDGSHIQTLTMTFFYRRLPLIEKG	145		
Sbjct 122	Q.	146		

B) Alineamiento entre secuencias de GyrB de la cepa 51932

Sequence ID: Query_5509513 Length: 146 Number of Matches: 1

Range 1: 19 to 146 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
256 bits(653)	2e-94	Compositional matrix adjust.	125/129(97%)	127/129(98%)	1/129(0%)
Query 1		NLSVGTLPGLKADCQSKDPLESEIFLVEGDSAGGSAKQGRDRV ⁴³⁸ FQAILPLKGGKILNVEKS			60
Sbjct 19				77
Query 61	 ⁴⁶³ HLSKILKSE ^{479 481 484} EIKNMITAFGCGIQES ^{479 481 484} FDIERLRYHKIIIMTDADVDGSHIQTLTMTFFYRY			120
Sbjct 78	 ⁴⁶³ ^{479 481 484}E.....K.....			137
Query 121		LRPLIEQWH	129		
Sbjct 138	G.	146		

C) Alineamiento entre secuencias de GyrB de la cepa 43504

Sequence ID: Query_4064761 Length: 147 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 146 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
298 bits(763)	5e-111	Compositional matrix adjust.	146/146(100%)	146/146(100%)	0/146(0%)
Query 1		AKAREASKKARELTRKKDNLVSGTLPGLKADCQSKDPLESEIFLVEGDSAGGSAKQGRDR			60
Sbjct 1				60
Query 61	 ⁴³⁸ FQAILPLKGGKILNVEKSHLSKILKSE ⁴⁶³ EIKNMITAFGCGIQES ^{479 481 484} FEIEKLRHKIIIMTDA			120
Sbjct 61	 ⁴³⁸ ⁴⁶³ ^{479 481 484}E.....E.....K.....			120
Query 121		DVDGSHIQTLTMTFFYRRLPLIEQG	146		
Sbjct 121		146		

Figura 24. Alineamiento entre secuencias GyrA antes y después de la inducción a RAM *in vitro* contra LVX en las cepas de *H. pylori*. A) Cepa 26695. B) Cepa 51932. C) Cepa 43504.

En resumen, se puede decir que la cepa PMSS1 contra AMX después de la 2ª ronda de inducción, ya se considera como cepa resistente, de acuerdo con los datos publicados por la EUCAST. En un futuro se piensa sembrar por 3 pases en placas de agar Casman suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrilada sin antibióticos para evaluar si, eliminando el factor de estrés, en este caso la AMX, las bacterias volverían a su forma

tradicional de bacilo. Además, se analizará si la transición a forma cocoide, es la que le confiere la resistencia, lo cual puede ser demostrado realizando nuevamente la determinación de MIC.

En cuanto a las cepas 26695, 51932 y 43504 se indujo la RAM contra LVX, a pesar de que sus MIC no fueron superiores para considerarse resistentes a este antibiótico. En el caso de la cepa 26695 la MIC no se modificó después de la inducción a RAM, pero si presentó 2 mutaciones relacionadas con la resistencia a este antibiótico. Por lo que también se evaluará si después de 3 pases en agar Casman suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrilada sin antibiótico, si las mutaciones persisten después de quitar el factor inductor.

11.DISCUSIÓN

H. pylori es una bacteria que infecta el antro del estómago y es causante de afecciones principalmente gástricas, como gastritis y cáncer gástrico, además de enfermedades extragástricas como pancreáticas, neuronales, hepáticas y cardiovasculares. En el año 2017 se le clasificó como un patógeno de alta prioridad, debido a su alto porcentaje de resistencia a los antibióticos incluidos en el tratamiento para su erradicación. La claritromicina es el principal antibiótico utilizado en el tratamiento de primera línea contra *H. pylori* a nivel mundial, y en México se incluye en el tratamiento estándar conocido como terapia triple, donde además se aplica amoxicilina como segundo antibiótico y omeprazol como IBP. Reportes publicados por la OMS, a nivel mundial, indican que la resistencia de *H. pylori* contra CLR es del 17.2% y para AMX es del 16.2%, las cuales son cifras alarmantes para que se considere un cambio en el tratamiento contra esta bacteria. Existen varias causas de la aparición de RAM en *H. pylori*, pero la más estudiada y por la cual ocurren más fallos en el tratamiento son por mutaciones en genes que codifican para los blancos de los antibióticos; por lo que es de suma importancia analizar la evolución de la aparición de estas mutaciones y su relevancia en el desarrollo de la RAM. De manera que, en este trabajo se utilizó un modelo de inducción a RAM contra CLR, AMX y LVX para analizar el desarrollo en la aparición de mutaciones.

El análisis de las secuencias por medio de alineamiento mostró que las 4 cepas utilizadas para este estudio (26695, PMSS1, 51932 y 43504) no presentaron mutaciones en el gen 23S relacionado con la resistencia a CLR. Esto significa que a pesar de que las cepas provienen en su mayoría de la ATCC y de que han sido sembradas por varios países, su genoma no presenta mutaciones en este gen con el paso del tiempo. En cuanto a las mutaciones encontradas en PBP1A, a lo largo de la secuencia amplificada y traducida de las cepas 26695, PMSS1 y 51932, se observaron algunas mutaciones en sitios de interés en RAM y algunas en otros sitios no relacionados, por lo que al hacer la comparación con las MIC's iniciales no se observó resistencia a AMX en dichas cepas antes de realizar la inducción a RAM, lo cual requiere de más investigaciones sobre otras mutaciones detectadas y sus repercusiones en la bacteria. En cuanto a GyrA, no se observaron mutaciones relacionadas con resistencia a

LVX, además, nos percatamos que este gen también se encuentra conservado en las 4 cepas estudiadas. Para GyrB, no se encontraron mutaciones en las cepas 26695, PMSS1 y 51932. En cuanto a la cepa 43504, si notamos dos mutaciones en los sitios 481 y 484, D481E y R484K específicamente, las cuales se han relacionado con resistencia a LVX. A pesar de esto, esta cepa no mostró dicha resistencia al inicio del estudio.

Además, las MIC's presentadas inicialmente en las 4 cepas se encuentran dentro de los puntos de corte susceptibles publicados por la EUCAST.

Antes de la inducción de RAM, las MIC mostradas contra CLR fueron de 0.015 – 0.031 µg/mL, no encontrando diferencias significativas entre cepas. Las MIC contra AMX fueron de 0.006 a 0.062 µg/mL, presentando variaciones entre cepas, siendo la más baja la de la cepa PMSS1 con 0.006 µg/mL y la más alta la de la cepa 43504 con 0.062 µg/mL. En cuanto a las MIC contra LVX estas fueron de 0.015 - 0.125 µg/mL, siendo la más baja para la cepa 43504 y la más alta para las cepas 26696 y PMSS1. Estas variaciones pueden deberse a que cada cepa absorbe el antibiótico de manera diferente, gracias a la presencia de OMP's o bombas de eflujo en su membrana, alternando la concentración bactericida de cada antibiótico (De Francesco et al., 2010). En el caso de la cepa 43504, a pesar de haber presentado 2 mutaciones en GyrB en las posiciones 481 y 484, éstas no generaron cambios en la MIC contra LVX, al grado de considerarla resistente, por lo que se considera que se requiere de mutaciones adicionales en la otra subunidad (GyrA) de esta DNA girasa, para que observar una resistencia fenotípica. Aun así, la susceptibilidad antes de iniciar el tratamiento nos da la pauta de que estas cepas no presentan mecanismos activos relacionados con RAM, los cuales pudieran intervenir con la inducción a la resistencia contra CLR, AMX y LVX. Estos datos concuerdan con las pocas mutaciones en los 4 genes analizados, por lo que los datos obtenidos se relacionan, tanto la susceptibilidad fenotípica contra CLR, AMX y LVX, como la susceptibilidad genotípica.

Durante el proceso de inducción a RAM en las cepas de *H. pylori* se tuvieron algunos inconvenientes para obtener un buen crecimiento bacteriano, por lo que se hicieron varios cambios en el protocolo para lograr una inducción a RAM satisfactoria. Con estos cambios reiteramos, que *H. pylori* es una bacteria que requiere de varios factores para su óptimo

crecimiento, como son SFB, tanto en medios líquidos como sólidos, sangre de carnero o caballo desfibrinada incluida en medios sólidos, los cuales, son el medio ideal de elección para el crecimiento de esta bacteria en tiempos menos prologados (Hortelano et al., 2020). Pero debido a que los medios sólidos requieren de mayor material y mano de obra, se optó por usar una metodología más accesible en costo y tiempo para llevar a cabo la inducción *in vitro* de la RAM, empleando finalmente medio CMH suplementado con SFB al 5%.

Como ya se mencionó, después de la 2ª ronda de inducción a RAM con AMX y LVX, hubo una transición en la morfología bacteriana, de una forma bacilar, a una forma de bacilos cortos y cocos. Esto ya ha sido publicado por varios autores, en particular Ierardi, et al., describen que esta transición puede activarse por diversas formas de estrés a la que se somete la bacteria, como son cambios bruscos de temperatura o pH, incremento en la tensión de oxígeno, disminución en la concentración de metabolitos disponibles en el ambiente, y en el caso relevante para este trabajo, la interacción con antibióticos (Ierardi et al., 2020). También mencionan que cuando se produce la forma cocoide, o como ellos la describen “estado viable pero no cultivable” (VBNC, por sus siglas en ingles), ocurre en la bacteria un apagón metabólico, en donde la expresión de ciertos genes, incluidos los factores de virulencia, está disminuida; además, esta forma de vida coloniza menos el epitelio gástrico y entra en estado latente, el cual, puede estar relacionado con la reinfección en pacientes que ya han tenido tratamiento de erradicación. Por si fuera poco, esta forma VBNC se relaciona con el fracaso en el tratamiento (Ierardi et al., 2020). Estudios anteriores a éste, ya mencionaban que la exposición prolongada a antibióticos, como CLR, AMX y MTZ, en cepas o aislados de *H. pylori* induce el cambio a formas cocoides, esto después de 68 h de exposición. Además, concluyeron que la exposición a antibióticos después de 2 h puede disminuir la expresión ATP intracelular. Todo esto después de inducir a RAM *in vitro* usando igualmente CHM (Sörberg et al., 1998). Este cambio, más la aparición de mutaciones en genes relacionados con la RAM, puede producir un incremento en la MIC inicial hasta de 200 en aislados clínicos de *H. pylori* (Rosli et al., 2023).

Al finalizar la 2ª y última ronda de inducción a RAM *in vitro*, si encontramos cambios en las MIC en algunas cepas, siendo la más relevante la exhibida por la cepa PMSS1 contra AMX,

cuya MIC aumentó 80 veces. Este resultado, la posiciona como una cepa resistente a este antibiótico. Además, en un estudio publicado en 2023, donde se trabajó con 20 aislados clínicos de *H. pylori*, se indujo RAM contra CLR y solamente el 19% de éstos adquirieron resistencia, presentando MICs que superaron los 64 µg/mL (Rosli et al., 2023). Este trabajo concuerda con nuestros resultados, en los que solamente una cepa de las 4 que indujimos adquirió RAM a un solo antibiótico. Esto puede deberse a diversos factores, como el medio en el que se mantuvieron, las MIC's iniciales, las concentraciones de antibióticos en las que se mantuvieron en estas 2 rondas, así como los mecanismos que cada cepa pudo desplegar para impedir que el antibiótico ejerciera su actividad, como puede ser la expresión diferencial de OMP's o la producción de biopelícula. Al respecto, se ha mencionado que la producción de biopelícula es considerada un mecanismo de producción de RAM (Kadkhodaei et al., 2020). *H. pylori* produce biopelícula que le ayuda a sobrevivir a factores externos del ambiente que coloniza, incluyendo antibióticos (Yonezawa et al., 2015). En estudios en los que analizan la producción de biopelículas después de la exposición a diferentes concentraciones de antibióticos, las bacterias aumentaron su producción y la MIC aumentó de 10 hasta 100 veces (Yonezawa et al., 2013).

Tomando en cuenta estos trabajos, los cambios en las MIC's después de la inducción en esta tesis, pueden deberse a varios factores. La presencia de *H. pylori* en ambientes hostiles, puede propiciar un cambio morfológico, que le permite sobrevivir y permanecer en un estado latente; como sucedió con las cepas estudiadas aquí y que al ser tratadas con AMX y LVX después de la 2ª ronda, se produjo una transición en su ciclo de vida. Este cambio y la producción de biopelícula podrían explicar la resistencia a los antibióticos, aunque no se hayan producido mutaciones en los genes relacionados con la RAM.

De acuerdo con los datos obtenidos en los alineamientos PBP1A, GyrA y GyrB, el tiempo y la concentración en las que se tuvieron las bacterias no indujeron muchas mutaciones como se esperaba. A pesar de esto, en GyrB se encontraron 2 mutaciones en las cepas 26695 y 51932 con LVX, en los sitios 481 y 484, relacionadas con la resistencia a este antibiótico. Aunque estas cepas no aumentaron sus MIC's contra LVX para clasificarse como cepas resistentes, se puede tomar en cuenta que estas posiciones son las primeras que podrían

estar mutando en *H. pylori* y eventualmente desarrollar otras mutaciones en esta subunidad o en la subunidad GyrA para que muestren un fenotipo resistente (Ziver-Sarp, T. et al., 2021). Es bien sabido que en bacterias Gram negativas es más complicado analizar la resistencia a antibióticos, a diferencia de las bacterias Gram positivas. La diferencia consiste en la conformación de sus membranas; las Gram positivas poseen solamente una membrana citoplasmática seguida de una gruesa pared de peptidoglicano, en cambio, las Gram negativas tienen una membrana interna, seguida de una delgada capa de peptidoglicano y una membrana externa que conecta al espacio extracelular (Liston & Willis, 2021).

La presencia de dos membranas y sus diferentes componentes, complica la entrada de los antibióticos para que puedan llegar hasta su blanco y producir su efecto bactericida (Li, X., & Smith, A., 2019). Uno de estos componentes es el LPS, el cual está expuesto al ambiente extracelular y relacionado con la interacción de la bacteria con células del sistema inmune del huésped y la presencia de antibióticos.

En el caso de las bacterias Gram negativas, modifican la composición del LPS para evadir al sistema inmune y producir resistencia a antibióticos. Estos dos mecanismos conducen a el establecimiento de una infección crónica (Maldonado et al., 2016).

Aunado a esto, se ha estudiado sobre la RAM en *H. pylori* y la transición a forma cocoide en ambientes hostiles, enfocados en los cambios en ácidos grasos y colesterol de su membrana. Como se ha informado en investigaciones anteriores, el LPS de *H. pylori* es diferente al de otras bacterias Gram negativas. La principal modificación está presente en el Lípido A, el cual solamente posee un grupo fosfato en el C-1, siendo lo usual que haya dos, en el C-1 y C-4. Esto se relaciona con un menor reconocimiento de esta endotoxina por células inmunes del huésped (Gaddy et al., 2015). Estos cambios se han relacionado con la forma cocoide en esta bacteria debido a que un aumento de componentes de la membrana externa, principalmente LPS, le confieren mayor rigidez, aumenta su hidrofobicidad, lo que conlleva a morfología cocoide. En consecuencia, la entrada de antibióticos al interior de la bacteria se limita, propiciando a la aparición de mutaciones en genes relacionados con RAM en *H. pylori* (Kadkhodaei et al., 2020).

Teniendo en cuenta esto y los resultados obtenidos, se requiere hacer investigaciones enfocadas en la transición de la típica forma bacilar de *H. pylori*, a la forma cocoide, los mecanismo que promueven este fenómeno y la aparición de resistencia, ya sea por la carente entrada de antibióticos, la producción aumentada de biopelícula, la disminución en la expresión de genes, la aparición de mutaciones en los genes *23S*, *pbp1A*, *gyrA* y *gyrB*, que se relacionan con resistencia a los principales antibióticos para la erradicación de esta bacteria (CLR, AMX y LVX). Y consolidar estos datos para correlacionar en la infección, fallo en el tratamiento y reinfección.

12. CONCLUSIONES

Las cepas 26695, PMSS1, 51932 y 43504 de *H. pylori* no mostraron mutaciones significativas en los genes *23S*, *pbp1a*, *gyrA* y *gyrB* relacionados con la resistencia a los antibióticos CLR, AMX y LVX.

Las MIC's contra CLR, AMX y LVX de las 4 cepas analizadas de *H. pylori*, estuvieron dentro del rango para clasificarse como susceptibles a dichos antibióticos, lo que concuerda con el análisis de mutaciones de los genes involucrados.

La inducción *in vitro* de RAM contra AMX y LVX indujo en las 4 cepas de *H. pylori* un cambio en su morfología, de la típica forma bacilar, a una reducción en la longitud de los bacilos y un cambio a su forma de vida cocoide.

El tratamiento con AMX y LVX después de 2 rondas, no incrementó la MIC en las cepas 26695, 51932 y 43504. En tanto que la MIC contra AMX aumentó hasta 80 veces en la cepa PMSS1, por lo que ya se clasifica como cepa resistente.

El análisis de mutaciones después de la inducción *in vitro* de la RAM contra AMX y LVX reveló la aparición de mutaciones en *GyrB* en las cepas 26695 y 51932, pero no se asoció con un incremento de la MIC, por lo que se sugiere profundizar en el análisis de otras mutaciones para entender el desarrollo de la resistencia contra estos antibióticos.

La generación *in vitro* de cepas de *H. pylori* resistentes a antibióticos empleados para su tratamiento y/o erradicación, permitirá entender los mecanismos moleculares utilizados

por esta bacteria para invadir y colonizar diferentes nichos en el cuerpo humano, así como su relación con las enfermedades con las que se le ha asociado.

13. PERSPECTIVAS

1. Mejorar el protocolo de inducción *in vitro* a RAM contra CLR, AMX y LVX, evitando la transformación a formas cocoides en el mayor número de rondas.
2. Estudiar otros mecanismos que puedan estar involucrados con el aumento en la MIC, como bombas de eflujo u OMP's, así como la producción de biopelícula.
3. Llevar a cabo un análisis de transcriptómica en búsqueda de genes que modifiquen su expresión con el tratamiento de los antibióticos y que contribuyan a la supervivencia de la bacteria.

14. BIBLIOGRAFIA

1. Alarcón-Millán, J., Fernández-Tilapa, G., Cortés-Malagón, E. M., Castañón-Sánchez, C. A., De Sampedro-Reyes, J., Cruz-del Carmen, I., Betancourt-Linares, R., & Román-Román, A. (2016). Clarithromycin resistance and prevalence of *Helicobacter pylori* virulent genotypes in patients from Southern México with chronic gastritis. *Infection, Genetics and Evolution*, 44, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.044>
2. Al-Maleki, A. R., Loke, M. F., Lui, S. Y., Ramli, N. S. K., Khosravi, Y., Ng, C. G., Venkatraman, G., Goh, K. L., Ho, B., & Vadivelu, J. (2017). *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein A (OipA) suppresses apoptosis of AGS gastric cells in vitro. *Cellular Microbiology*, 19(12). <https://doi.org/10.1111/cmi.12771>
3. Amieva, M., & Peek, R. M. (2016). Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. In *Gastroenterology* (Vol. 150, Issue 1, pp. 64–78). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.004>
4. Ansari, S., & Yamaoka, Y. (2017). Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. In *Helicobacter* (Vol. 22, Issue 4). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/hel.12386>
5. Ansari, S., & Yamaoka, Y. (2019). *Helicobacter pylori* virulence factors exploiting gastric colonization and its pathogenicity. In *Toxins* (Vol. 11, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins11110677>
6. Ansari, S., & Yamaoka, Y. (2020). *Helicobacter pylori* Virulence Factor Cytotoxin-Associated Gene A (CagA)-Mediated Gastric Pathogenicity. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7430. <https://doi.org/10.3390/ijms21197430>
7. Ansari, S., & Yamaoka, Y. (2022). *Helicobacter pylori* Infection, Its Laboratory Diagnosis, and Antimicrobial Resistance: a Perspective of Clinical Relevance. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 35, Issue 3). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/cmr.00258-21>
8. Benktander, J., Barone, A., Johansson, M. M., & Teneberg, S. (2018). *Helicobacter pylori* SabA binding gangliosides of human stomach. *Virulence*, 9(1), 738–751. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1440171>
9. Bosques-Padilla, F. J., Remes-Troche, J. M., González-Huezo, M. S., Pérez-Pérez, G., Torres-López, J., Abdo-Francis, J. M., Bielsa-Fernandez, M. V., Camargo, M. C., Esquivel-Ayanegui, F., Garza-González, E., Hernández-Guerrero, A. I., Herrera-Goepfert, R., Huerta-Iga, F. M., Leal-Herrera, Y., López-Colombo, A., Ortiz-Olvera, N. X., Riquelme-Pérez, A., Sampieri, C. L., Uscanga-Domínguez, L. F., & Velarde-Ruiz Velasco, J. A. (2018). The fourth Mexican consensus on *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*, 83(3), 325–341. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.05.003>
10. Breurec, S., Guillard, B., Hem, S., Brisse, S., Dieye, F. B., Huerre, M., Oung, C., Raymond, J., Tan, T. S., Thiberge, J. M., Vong, S., Monchy, D., & Linz, B. (2011). Evolutionary history of *Helicobacter pylori* sequences reflect past human migrations in Southeast Asia. *PloS one*, 6(7), e22058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022058>

11. Burucoa, C., & Axon, A. (2017). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. In *Helicobacter* (Vol. 22). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/hel.12403>
12. Caron, T. J., Scott, K. E., Fox, J. G., & Hagen, S. J. (2015). Tight junction disruption: *Helicobacter pylori* and dysregulation of the gastric mucosal barrier. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 21, Issue 40, pp. 11411–11427). WJG Press. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11411>
13. Chen, J., Li, P., Huang, Y., Guo, Y., Ding, Z., & Lu, H. (2022). Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Different Regions of China: A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Pathogens* (Vol. 11, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070786>
14. Chisholm, S. A., & Owen, R. J. (2003). Mutations in *Helicobacter pylori* rdxA gene sequences may not contribute to metronidazole resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(4), 995–999. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg192>
15. Da Costa, D. M., Dos Santos Pereira, E., & Rabenhorst, S. H. B. (2015). What exists beyond cagA and vacA? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 21, Issue 37, pp. 10563–10572). WJG Press. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10563>
16. De Brito, B. B., Da Silva, F. A. F., Soares, A. S., Pereira, V. A., Cordeiro Santos, M. L., Sampaio, M. M., Moreira Neves, P. H., & De Melo, F. F. (2019). Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 25, Issue 37, pp. 5578–5589). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i37.5578>
17. De Francesco, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., Ierardi, E., & Zullo, A. (2010). Worldwide H. pylori Antibiotic Resistance: a Systematic Review. In *J Gastrointestin Liver Dis* (Vol. 19).
18. Dingsdag, S. A., & Hunter, N. (2018). Metronidazole: An update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 265–279. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx351>
19. Dubée, V., Chau, F., Arthur, M., Garry, L., Benadda, S., Mesnage, S., Lefort, A., & Fantin, B. (2011). The in vitro contribution of autolysins to bacterial killing elicited by amoxicillin increases with inoculum size in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), 910–912. <https://doi.org/10.1128/AAC.01230-10>
20. Elizabeth MA, R. G., Roesler, B. M., & Zeitune, J. M. (2015). Extragastric manifestations of *helicobacter pylori* infection: Possible role of bacterium in liver and pancreas diseases. *World Journal of Hepatology*, 7(30), 2968–2979. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i30.2968>
21. Fiorentino, M., Ding, H., Blanchard, T. G., Czinn, S. J., Sztein, M. B., & Fasano, A. (2013). *Helicobacter pylori*-induced disruption of monolayer permeability and proinflammatory cytokine secretion in polarized human gastric epithelial cells. *Infection and Immunity*, 81(3), 876–883. <https://doi.org/10.1128/IAI.01406-12>
22. FitzGerald, R., & Smith, S. M. (2021). An Overview of *Helicobacter pylori* Infection. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2283, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1302-3_1

23. Gaddy, J. A., Radin, J. N., Cullen, T. W., Chazin, W. J., Skaar, E. P., Trent, M. S., & Algood, H. M. (2015). *Helicobacter pylori* Resists the Antimicrobial Activity of Calprotectin via Lipid A Modification and Associated Biofilm Formation. *mBio*, 6(6), e01349-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01349-15>
24. Gisbert, J. P. (2020). Empirical or susceptibility-guided treatment for *Helicobacter pylori* infection? A comprehensive review. In *Therapeutic Advances in Gastroenterology* (Vol. 13). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1756284820968736>
25. Gisbert, J. P., Pérez-Aisa, A., Castro-Fernández, M., Barrio, J., Rodrigo, L., Cosme, A., Gisbert, J. L., Marcos, S., & Moreno-Otero, R. (2009). TRATAMIENTO ERRADICADOR DE H. PYLORI INICIAL Y DE RESCATE BASADO EN LEVOFLOXACINO EN PACIENTES ALÉRGICOS A LA PENICILINA. *Gastroenterología y Hepatología*, 32(3), 252. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.01.159>
26. He, J., Liu, Y., Ouyang, Q., Li, R., Li, J., Chen, W., Hu, W., He, L., Bao, Q., Li, P., & Hu, C. (2022). *Helicobacter pylori* and unignorable extragastric diseases: Mechanism and implications. *Frontiers in microbiology*, 13, 972777. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.972777>
27. Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D. Y., Wong, V. W. S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153(2), 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
28. Hortelano, I., Moreno, Y., Vesga, F. J., & Ferrús, M. A. (2020). Evaluation of different culture media for detection and quantification of *H. pylori* in environmental and clinical samples. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 23(4), 481–487. <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00135-z>
29. Horridge, D. N., Begley, A. A., Kim, J., Aravindan, N., Fan, K., & Forsyth, M. H. (2017). Outer inflammatory protein a (OipA) of *Helicobacter pylori* is regulated by host cell contact and mediates CagA translocation and interleukin-8 response only in the presence of a functional cag pathogenicity island type IV secretion system. *Pathogens and Disease*, 75(8). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx113>
30. Hu, Y., Zhu, Y., & Lu, N. H. (2017). Novel and effective therapeutic regimens for *helicobacter pylori* in an era of increasing antibiotic resistance. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 7, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00168>
31. Hu, Y., Zhu, Y., Lu, N. H., & Shi, Q. (2020). Recent progress in *Helicobacter pylori* treatment. In *Chinese Medical Journal* (Vol. 133, Issue 3, pp. 335–343). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000618>
32. Ierardi, E., Losurdo, G., Mileti, A., Paolillo, R., Giorgio, F., Principi, M., & Di Leo, A. (2020). The Puzzle of Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*: Beyond Basic Science. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(6), 293. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060293>

33. Iglér, C., Rolff, J., & Regoes, R. (2021). Multi-step vs. single-step resistance evolution under different drugs, pharmacokinetics, and treatment regimens. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.64116>
34. Julian C. Rutherford. (2014). The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal>
35. Kadkhodaei, S., Siavoshi, F., & Akbari Noghabi, K. (2020). Mucoïd and coccoid *Helicobacter pylori* with fast growth and antibiotic resistance. *Helicobacter*, 25(2), e12678. <https://doi.org/10.1111/hel.12678>
36. Kasahun, G. G., Demoz, G. T., & Desta, D. M. (2020a). Primary resistance pattern of *Helicobacter pylori* to antibiotics in adult population: A systematic review. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 13, pp. 1567–1573). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S250200>
37. Kim, S. Y. oung, Park, D. K. yun, Kwon, K. A. n., Kim, K. O. h., Kim, Y. J. ae, & Chung, J. W. on. (2014). Ten day concomitant therapy is superior to ten day sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *The Korean Journal of Gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe Chi*, 64(5), 260–267. <https://doi.org/10.4166/kjg.2014.64.5.260>
38. Kübeck, R., Bonet-Ripoll, C., Hoffmann, C., Walker, A., Müller, V. M., Schüppel, V. L., Lagkouvardos, I., Scholz, B., Engel, K. H., Daniel, H., Schmitt-Kopplin, P., Haller, D., Clavel, T., & Klingenspor, M. (2016). Dietary fat and gut microbiota interactions determine diet-induced obesity in mice. *Molecular Metabolism*, 5(12), 1162–1174. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.10.001>
39. Kunovsky, L., Dite, P., Jabandziew, P., Dolina, J., Vaculova, J., Blaho, M., Bojkova, M., Dvorackova, J., Uvirova, M., Kala, Z., & Trna, J. (2021). *Helicobacter pylori* infection and other bacteria in pancreatic cancer and autoimmune pancreatitis. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 13(8), 835–844. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v13.i8.835>
40. Kuo, Y. T., Liou, J. M., El-Omar, E. M., Wu, J. Y., Leow, A. H. R., Goh, K. L., Das, R., Lu, H., Lin, J. T., Tu, Y. K., Yamaoka, Y., & Wu, M. S. (2017). Primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* in the Asia-Pacific region: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 2(10), 707–715. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30219-4](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30219-4)
41. L. Ladrón-de-Guevara, L. Bornstein-Quevedo, S. González-Huezo, B. Castañeda-Romero, F.G. Costa, & M. di Silvio-López. (2019). Erradicación de *Helicobacter pylori* en México con un esquema basado en levofloxacina versus la triple terapia estándar: resultados de un estudio clínico de fase iiib, abierto, aleatorizado, de no inferioridad. In *Revista de Gastroenterología de Mexico* (Vol. 84, Issue 3, pp. 274–283). Asociacion Mexicana de Gastroenterologia. <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2018.10.005>
42. Lee, J. W., Kim, N., Nam, R. H., Park, J. H., Kim, J. M., Jung, H. C., & Song, I. S. (2011). Mutations of *Helicobacter pylori* Associated with Fluoroquinolone Resistance in Korea. *Helicobacter*, 16(4), 301–310. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00840.x>

43. Lee, S. M., Kim, N., Kwon, Y. H., Nam, R. H., Kim, J. M., Park, J. Y., Lee, Y. S., & Lee, D. H. (2018). *rdxA*, *frxA*, and efflux pump in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori*: Their relation to clinical outcomes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 33(3), 681–688. <https://doi.org/10.1111/jgh.13906>
44. Lee, Y.-C., Dore, M. P., & Graham, D. Y. (2022). Diagnosis and Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Annu. Rev. Med.* 2022, 73, 183–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042220>
45. Liston, S. D., & Willis, L. M. (2021). Racing to build a wall: glycoconjugate assembly in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Current opinion in structural biology*, 68, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.11.013>
46. Liu, D. N., Wang, Q. Y., Li, P. Y., Wu, D. H., Pan, J., Chen, Z. Y., Li, Y. Q., Han, X. Y., Lan, C., Tang, J., Tan, Y., Mo, C. Y., Yang, W. Z., Han, J. L., & Huang, X. X. (2023). Comparing high-dose dual therapy with bismuth-containing quadruple therapy for the initial eradication of *Helicobacter pylori* infection on Hainan Island: A randomized, multicenter clinical trial. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 47(5), 102125. <https://doi.org/10.1016/J.CLINRE.2023.102125>
47. Li, X., & Smith, A. W. (2019). Quantifying Lipid Mobility and Peptide Binding for Gram-Negative and Gram-Positive Model Supported Lipid Bilayers. *The journal of physical chemistry. B*, 123(49), 10433–10440. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09709>
48. Maldonado, R. F., Sá-Correia, I., & Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS microbiology reviews*, 40(4), 480–493. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>
49. Marques, A. T., Vítor, J. M. B., Santos, A., Oleastro, M., & Vale, F. F. (2020). Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin: From phenotypic to genomic approaches. In *Microbial Genomics (Vol. 6, Issue 3)*. Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000344>
50. McInnes, R. S., McCallum, G. E., Lamberte, L. E., & van Schaik, W. (2020). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. In *Current Opinion in Microbiology (Vol. 53, pp. 35–43)*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.002>
51. Medakina, I., Tsapkova, L., Polyakova, V., Nikolaev, S., Yanova, T., Dekhnich, N., Khatkov, I., Bordin, D., & Bodunova, N. (2023). *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance: Molecular Basis and Diagnostic Methods. In *International Journal of Molecular Sciences (Vol. 24, Issue 11)*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24119433>
52. Miftahussurur, M., Fauzia, K. A., Nusi, I. A., Setiawan, P. B., Syam, A. F., Waskito, L. A., Doohan, D., Ratnasari, N., Khomsan, A., Adnyana, I. K., Akada, J., & Yamaoka, Y. (2020). E-test versus agar dilution for antibiotic susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: A comparison study. *BMC Research Notes*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4877-9>
53. Mitui, M., Patel, A., Leos, N. K., Doern, C. D., & Park, J. Y. (2014). Novel *Helicobacter pylori* sequencing test identifies high rate of clarithromycin resistance. *Journal of*

- Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 59(1), 6–9.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000380>
54. Pichichero, M. E., & Reed, M. D. (n.d.). Variations in Amoxicillin Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic Parameters May Explain Treatment Failures in Acute Otitis Media.
 55. Poonyam, P., Chotivitayatarakorn, P., & Vilaichone, R. K. (2019). High effective of 14-day high-dose PPI-bismuth-containing quadruple therapy with probiotics supplement for helicobacter pylori eradication: A double blinded-randomized placebo-controlled study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(9), 2859–2864. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.9.2859>
 56. Reshetnyak, V. I., & Reshetnyak, T. M. (2017). Significance of dormant forms of Helicobacter pylori in ulcerogenesis. *World journal of gastroenterology*, 23(27), 4867–4878. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i27.4867>
 57. Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T., & Sasatsu, M. (2012). Fluoroquinolone Resistance in Helicobacter pylori: Role of Mutations at Position 87 and 91 of GyrA on the Level of Resistance and Identification of a Resistance Conferring Mutation in GyrB. *Helicobacter*, 17(1), 36–42. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00912.x>
 58. Rosli, N. A., Al-Maleki, A. R., Loke, M. F., Chua, E. G., Alhoot, M. A., & Vadivelu, J. (2023). Polymorphism of virulence genes and biofilm associated with in vitro induced resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori. *Gut pathogens*, 15(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s13099-023-00579-4>
 59. Sánchez-Zauco, N. A., Torres, J., Pérez-Figueroa, G. E., Álvarez-Arellano, L., Camorlinga-Ponce, M., Gómez, A., Giono-Cerezo, S., & Maldonado-Bernal, C. (2013). Impact of cagPAI and T4SS on the Inflammatory Response of Human Neutrophils to Helicobacter pylori Infection. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064623>
 60. Savoldi, A., Carrara, E., Graham, D. Y., Conti, M., & Tacconelli, E. (2018a). Prevalence of Antibiotic Resistance in Helicobacter pylori: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. *Gastroenterology*, 155(5), 1372–1382.e17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007>
 61. Serebrova, S., Kurguzova, D., Krasnykh, L., Vasilenko, G., Drozdov, V., Lazareva, N., Shikh, E., Zhuravleva, M., Rykova, S., Eremenko, N., Kareva, E., Mirzaev, K., Sychev, D., & Prokofiev, A. (2022). Potential factors of Helicobacter pylori resistance to clarithromycin. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 37(4), 383–391. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2021-0193>
 62. Seshadri, R. K., Raghavaraju, T. V., & Chakravarthy, I. E. (2013). A single gradient stability-indicating reversed-phase LC method for the estimation of impurities in Omeprazole and Domperidone capsules. *Scientia Pharmaceutica*, 81(2), 437–458. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1209-12>
 63. Sgouras, D. N., Trang, T. T. H., & Yamaoka, Y. (2015). Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. *Helicobacter*, 20, 8–16. <https://doi.org/10.1111/hel.12251>
 64. Sierra, F., Forero, J. D., & Rey, M. (2014). Ideal treatment for Helicobacter pylori: A systematic review. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 79, Issue 1, pp.

- 28–49). Asociacion Mexicana de Gastroenterologia.
<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.03.003>
65. Song, Z. Q., Liu, J., & Zhou, L. Y. (2016). Hybrid therapy regimen for *Helicobacter pylori* eradication. In *Chinese Medical Journal* (Vol. 129, Issue 8, pp. 992–999). Chinese Medical Association. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.179803>
 66. Sörberg, M., Hanberger, H., Nilsson, M., Björkman, A., & Nilsson, L. E. (1998). Risk of development of in vitro resistance to amoxicillin, clarithromycin, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(5), 1222–1228. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.5.1222>
 67. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
 68. Suzuki, S., Esaki, M., Kusano, C., Ikehara, H., & Gotoda, T. (2019). Development of *Helicobacter pylori* treatment: How do we manage antimicrobial resistance? *World Journal of Gastroenterology*, 25(16), 1907–1912. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i16.1907>
 69. Tabassam, F. H., Graham, D. Y., & Yamaoka, Y. (2008). OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal reorganization. *Cellular Microbiology*, 10(4), 1008–1020. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01104.x>
 70. Tan, R., Jin, M., Shao, Y., Yin, J., Li, H., Chen, T., Shi, D., Zhou, S., Li, J., & Yang, D. (2022). High-sugar, high-fat, and high-protein diets promote antibiotic resistance gene spreading in the mouse intestinal microbiota. *Gut Microbes*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2022442>
 71. Taylor, D. E., Ge, Z., Purych, D., Lo, T., & Hiratsuka, K. (1997). Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(12), 2621–2628. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.12.2621>
 72. Taylor, J. A., Santiago, C. C., Gray, J., Wodzanowski, K. A., DeMeester, K. E., Biboy, J., Vollmer, W., Grimes, C. L., & Salama, N. R. (2021). Localizing Peptidoglycan Synthesis in *Helicobacter pylori* using Clickable Metabolic Probes. *Current Protocols*, 1(4). <https://doi.org/10.1002/cpz1.80>
 73. Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., ... Craig Venter, J. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. In *NATURE* (Vol. 388). www.tigr.org/tdb/mdb/hpdb/hpdb.html
 74. Torres, J., Camorlinga-Ponce, M., Pérez-Pérez, G., Madrazo-De la Garza, A., Dehesa, M., González-Valencia, G., & Muñoz, O. (2001). Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2677–2680. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2677-2680.2001>
 75. Tran, T. T., Nguyen, A. T., Quach, D. T., Pham, D. T. H., Cao, N. M., Nguyen, U. T. H., Dang, A. N. T., Tran, M. A., Quach, L. H., Tran, K. T., Le, N. Q., Ung, V. Van, Vo, M. N.

- Q., Nguyen, D. T., Ngo, K. D., Tran, T. Le, & Nguyen, V. T. (2022). Emergence of amoxicillin resistance and identification of novel mutations of the *pbp1A* gene in *Helicobacter pylori* in Vietnam. *BMC Microbiology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02463-8>
76. Tuan, V. P., Narith, D., Tshibangu-Kabamba, E., Dung, H. D. Q., Viet, P. T., Sokomoth, S., Binh, T. T., Sokhem, S., Tri, T. D., Ngov, S., Tung, P. H., Thuan, N. P. M., Truc, T. C., Phuc, B. H., Matsumoto, T., Fauzia, K. A., Akada, J., Trang, T. T. H., & Yamaoka, Y. (2019). A next-generation sequencing-based approach to identify genetic determinants of antibiotic resistance in cambodian *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Journal of Clinical Medicine*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/jcm8060858>
77. Wang, Y., Zhao, R., Wang, B., Zhao, Q., Li, Z., Zhu-ge, L., Yin, W., & Xie, Y. (2018). Sequential versus concomitant therapy for treatment of *Helicobacter pylori* infection: an updated systematic review and meta-analysis. In *European Journal of Clinical Pharmacology* (Vol. 74, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00228-017-2347-7>
78. Wessler, S., Schneider, G., & Backert, S. (2017). Bacterial serine protease HtrA as a promising new target for antimicrobial therapy? In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0162-5>
79. Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 23, Issue 4, pp. 713–739). <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-10>
80. Xu, C., Soyfoo, D. M., Wu, Y., & Xu, S. (2020). Virulence of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins: an updated review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39, 1821–1830. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03948-y>/Published
81. Yonezawa, H., Osaki, T., Hanawa, T., Kurata, S., Ochiai, K., & Kamiya, S. (2013). Impact of *Helicobacter pylori* biofilm formation on clarithromycin susceptibility and generation of resistance mutations. *PLoS one*, 8(9), e73301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073301>
82. Yonezawa, H., Osaki, T., & Kamiya, S. (2015). Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its involvement for antibiotic resistance. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/914791>
83. Zhang, M. (2015a). High antibiotic resistance rate: A difficult issue for *Helicobacter pylori* eradication treatment. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 21, Issue 48, pp. 13432–13437). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i48.13432>
84. Ziver-Sarp, T., Yuksel-Mayda, P., Saribas, S., Demiryas, S., Gareayaghi, N., Ergin, S., Tasci, I., Ozbey, D., Bal, K., Erzin, Y., Akkus, S., Bahar-Tokman, H., Demirci, M., Tufan-Kocak, B., & Kocazeybek, B. (2021). Point Mutations at *gyrA* and *gyrB* Genes of Levofloxacin Resistant *Helicobacter pylori* Strains and Dual Resistance with Clarithromycin. *Clinical laboratory*, 67(10), 10.7754/Clin.Lab.2021.210843. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2021.210843>

85. Zhu, P., Xue, J., Zhang, Z. J., Jia, Y. P., Tong, Y. N., Han, D., Li, Q., Xiang, Y., Mao, X. H., & Tang, B. (2017). *Helicobacter pylori* VacA induces autophagic cell death in gastric epithelial cells via the endoplasmic reticulum stress pathway article. *Cell Death and Disease*, 8(12). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0011-x>
86. Zullo, A., De Francesco, V., Hassan, C., Morini, S., & Vaira, D. (2007). The sequential therapy regimen for *Helicobacter pylori* eradication: A pooled-data analysis. *Gut*, 56(10), 1353–1357. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.125658>