



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS FENOTÍPICAS Y
GENOTÍPICAS ASOCIADAS A EVALUACIÓN DE LA
RESISTENCIA ANTIBIÓTICA A PARTIR DE CEPAS DE
HELICOBACTER PYLORI AISLADAS DESDE
PACIENTES DE LA REGIÓN DEL BIOBÍO.**

POR LUCIANO ANDRÉS ARELLANO ARRIAGADA

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía: Apolinaria del Rosario García Cancino
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía
Cristian Andrés Parra Sepúlveda

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Noviembre, 2021
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

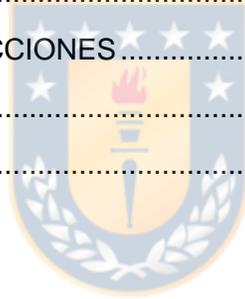




El trabajo está dedicado a mi madre biológica, sin sus mitocondrias y microbiota este viaje no hubiera empezado

1.TABLA DE CONTENIDOS

1.TABLA DE CONTENIDOS.....	4
2. INDICE DE TABLAS.....	5
3.INDICE DE ILUSTRACIONES.....	6
4. RESUMEN.....	7
5. INTRODUCCIÓN.....	8
6. MATERIALES Y METODOS.....	13
7. RESULTADOS.....	16
8. DISCUSIÓN.....	21
9. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.....	30
10. BIBLIOGRAFÍA.....	32
11. ANEXOS.....	39



2. INDICE DE TABLAS

5.1 Tabla 1. Tratamiento de la infección por <i>H. pylori</i> según las guías del MINSAL	9
6.1 Tabla 2. Partidores y enzimas de restricción utilizados para evaluar la presencia de mutaciones asociadas a resistencia	15
7.1 Tabla 3. Porcentajes de resistencia y coeficientes kappa asociados a los resultados obtenidos mediante el análisis de susceptibilidad frente a claritromicina. *26 cepas evaluadas.....	16
7.2 Tabla 4. Porcentajes de resistencia y coeficientes kappa asociados a los resultados obtenidos mediante el análisis de susceptibilidad frente a Metronidazol.	19
7.3 Tabla 5. Porcentajes de resistencia y coeficientes kappa asociados a los resultados obtenidos mediante el análisis de susceptibilidad frente a Levofloxacina.	20
7.4 Tabla 6. Porcentajes de resistencia y coeficientes kappa asociados a los resultados obtenidos mediante el análisis de susceptibilidad frente a Tetraciclina.....	20

3.INDICE DE ILUSTRACIONES

7.1 Ilustración 1.Resultados PCR-RFLP utilizando la enzima MbolI. Las bandas corresponden a cepas consideradas susceptibles mediante esta técnica presentando solamente una banda a 1400pb.....	17
7.2 Ilustración 2.Resultados PCR-RFLP utilizando la enzima BsaI. Las cepas susceptibles presentan una banda a 1000pb y 400pb, en el caso de resistentes presentaran bandas a 300pb, 400pb y 700 pb	17
7.3 Ilustración 3.Resultados PCR rdxA. El producto PCR esperado es de 850 pb, en el caso de presentar una mutación se obtendrá una banda a 650 pb. ..	19



4. RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria con alta prevalencia a nivel mundial que coloniza el estómago humano, desarrollando distintas patologías gastroduodenales. El tratamiento de primera línea para este patógeno es una terapia triple, pero en el caso de que la resistencia frente a Claritromicina sea superior al 20%, se recomienda el uso de una terapia cuádruple. Existen distintas metodologías que permiten evaluar la susceptibilidad antibiótica de las cepas de interés, dentro de las cuales podemos destacar dilución en agar, técnica considerada el Gold standard, pero es operador dependiente y requiere una inversión elevada de material y tiempo. Por ello, nace como propuesta el uso de técnicas moleculares para evaluar las mutaciones asociadas a resistencia, de esta forma, se disminuirían posibles errores asociados al operador. Este proyecto se centró en la comparación de 3 técnicas fenotípicas y PCR-RFLP para evaluar la susceptibilidad de cepas provenientes de biopsias gástricas de pacientes de la región del Biobío. Se obtuvieron resultados similares entre las técnicas fenotípicas y el Gold Standard ($k > 0,61$), excepto al evaluar los antibióticos Metronidazol y Levofloxacina. A pesar de lo anterior, la única técnica genotípica que presentó una concordancia adecuada con el Gold Standard fue el PCR-RFLP utilizando la enzima BsaI, por lo que sólo esta metodología sería adecuada para la evaluación de susceptibilidad de *H. pylori*.

5. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa, microaerófila que al momento de efectuar los ensayos de ureasa, catalasa y oxidasa da resultados positivos para estas tres enzimas (Wroblewski, L. *et al*, 2010).

Este microorganismo coloniza el epitelio gastrointestinal, lugar donde es asociado a una serie de patologías gástricas, de las cuales podemos destacar gastritis crónica, linfoma MALT, úlcera gástrica, úlcera duodenal y además de presentar relación directa con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico (García, A. *et al*, 2014). La prevalencia de esta bacteria está directamente relacionada con la situación económica de cada país, en donde los países en vías de desarrollo presentan una mayor prevalencia (50.8%) que los países ya considerados desarrollados (34,7%) (Zamani, M. *et al*, 2018), particularmente en Chile, se observa una prevalencia en adultos de un 73% (Arenas, A. *et al*, 2019).

Considerando el ultimo consenso de Maastricht, en el cual se establece que independiente de la sintomatología del paciente, si es confirmada la presencia de *H. pylori*, éste deberá recibir el tratamiento adecuado para erradicarla, con el fin de disminuir la incidencia de pacientes con cáncer gástrico (Malfertheiner, P. *et al*, 2017). En Chile, según las guías clínicas facilitadas por el Ministerio de salud (MINSAL. 2013), el tratamiento de primera línea para la erradicación de

H. pylori, es una terapia triple, basada en un inhibidor de la bomba de protones (IBP), Claritromicina y amoxicilina. Este tratamiento ha presentado una disminución en su eficacia mediante el transcurso del tiempo, debido a la aparición de mecanismos de resistencia antibiótica (Hernández, P. *et al*, 2018), en el caso de fallar o que la resistencia a claritromicina en la región sea superior a un 20%, se recomienda el uso de una terapia cuádruple, basada en un IBP, Bismuto, Metronidazol y tetraciclina. A pesar de que la terapia cuádruple sea una terapia mas agresiva y se ha demostrado su eficacia como tratamiento de primera línea como alternativa a la terapia triple, existen otras opciones para el tratamiento de *H. pylori* como es la terapia doble (IBP + amoxicilina) o el uso de Vonoprazan (O'Connor, A. *et al*, 2020).

Tabla 1. Tratamiento de la infección por *H. pylori* según las guías del MINSAL

COMBINACIÓN FÁRMACOS	CONDICIONES
IBP+Claritromicina+amoxicilina o metronidazol (en alérgicos a penicilina)	Si la prevalencia de la resistencia de claritromicina es < 20%.
IBP+Claritromicina+ metronidazol	Preferible si hay una prevalencia de resistencia de metronidazol < 40 %.
Terapias cuádruples: (IBP+ Bismuto + Metronidazol+ Tetraciclina) o basadas en Furazolidona	Si se dispone de Subcitrato de bismuto
Terapias cuádruples basadas en bismuto	Mejor terapia de 2 ^{da} línea (si se dispone de bismuto)
IBP+ (amoxicilina o tetraciclina)+ metronidazol	Mejor terapia de 2 ^{da} línea (si no se dispone de bismuto)

Es importante destacar que los patrones de resistencia antibiótica presentados por *H. pylori* son bastante heterogéneos a lo largo del mundo (Savoldi, A. *et al*,

2018). Por esto, el tratamiento de *H. pylori* debe ser orientado por región, además de tener conocimiento y registro de los porcentajes de resistencia frente a los distintos antibióticos usados en los tratamientos.

La metodología usada para evaluar la resistencia de *H. pylori* son variadas, pero el Gold standard según la CLSI es la dilución en agar (CLSI, 2015), que es un método que además de consumir mucho material y tiempo, al momento de ser efectuado en una situación donde se evalúe la susceptibilidad de una baja cantidad de cepas simultáneamente, los resultados serán escasos en comparación al tiempo y material invertido. A raíz de esto, es importante buscar alternativas a este método, y evaluar su concordancia con otras metodologías fenotípicas, como por ejemplo, difusión por disco o el E-test, que si bien ambas poseen sus desventajas, no requieren tanto tiempo y material como el Gold standard.

El E-test es una técnica fenotípica la cual consiste en la incubación de la cepa a evaluar en conjunto con una tira reactiva que posee un gradiente de concentración conocida de antibiótico, posterior a un tiempo de incubación adecuado, se genera una elipse que permitirá dar a conocer la lectura de la concentración mínima inhibitoria. El problema de esta técnica es que a pesar de tener un bajo porcentaje de error y ser sencilla de utilizar, la tira reactiva tiene un costo bastante elevado (ahussurur, M. *et al*, 2020). Por otra parte, otra técnica fenotípica utilizada para evaluar susceptibilidad es la difusión por disco,

técnica que posee una metodología similar al E-test, pero en vez de utilizar una tira reactiva, utiliza discos con una concentración conocida de antibióticos, si bien esta técnica es igual de sencilla de utilizar y al mismo tiempo, más económica, los límites para discernir si las cepas son susceptibles o resistentes no están definidos (Oporto, M., *et al*, 2019).

A raíz de lo anterior, han surgido como propuestas para evaluar posibles resistencias a los antibióticos utilizados en el tratamiento de *H. pylori* el uso de técnicas moleculares, donde se detecta la presencia de mutaciones asociadas a resistencia (Guzmán, J. *et al*, 2019). Algunos ejemplos de las técnicas moleculares utilizadas son distintas variantes de PCR, como PCR-RFLP, qPCR y Mismatch PCR, en donde el concepto principal es la amplificación consecutiva de una secuencia específica de ADN para la posterior lectura de resultados (Xuan, S.-H, *et al*, 2016). PCR-RFLP, es una técnica molecular, que además de la amplificación de la secuencia específica de ADN, se incluyen una serie de enzimas de restricción, cuya función es detectar pequeñas secuencias nucleotídicas específicas y generar cortes, estos cortes, a su vez, generarán patrones específicos que podrán ser leídos mediante electroforesis.

En consecuencia, es importante destacar que al comparar la expresión de la resistencia de manera fenotípica en conjunto a la genotípica permite tener un panorama más amplio y robusto de como dirigir el tratamiento, para que de esta forma sea el más efectivo para erradicar al patógeno del organismo.

Objetivo General

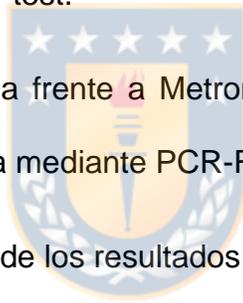
Comparar la concordancia de los métodos PCR-RFLP, difusión por disco y E-test, respecto a dilución en agar.

Objetivos específicos

1: Determinar la susceptibilidad de cepas de *H. pylori* frente a Metronidazol, Amoxicilina, Levofloxacina, Tetraciclina y Claritromicina, mediante dilución en agar, difusión por disco e E-test.

2: Determinar la resistencia frente a Metronidazol, Amoxicilina, Levofloxacina, Tetraciclina y Claritromicina mediante PCR-RFLP.

3: Evaluar la concordancia de los resultados mediante análisis estadísticos.



6. MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de las cepas de la *H. pylori*:

A partir de biopsias gástricas obtenidas de pacientes de la región del Biobío, se procedió a generar un macerado el cual fue cultivado en placas de agar Columbia suplementado con sangre de equino al 5% además de Dent, lo cual corresponde a el conjunto de Vancomicina, Trimetoprima, Cefsulodina y Anfotericina B. Una vez cultivado, se incubó a 37°C bajo condiciones de microaerobiosis durante 7-10 días. A partir de las condiciones mencionadas previamente, se procedió a identificar colonias con la morfología asociada a *H. pylori*, a las cuales se les efectuó test de Ureasa y tinción de Gram para confirmar su identidad. Las cepas que arrojaron resultados positivos se les hizo dos traspasos para aclimatarlas previo a su almacenamiento en caldo BHI suplementado con glicerol al 20%.

Ensayos de susceptibilidad antibiótica:

Dilución en agar: La susceptibilidad antibiótica de *H. pylori* se midió mediante la preparación de microplacas de 24 pocillos a los cuales se les agregó medio semisólido de agar Müller-Hinton, suplementado con 5% sangre de equino y concentraciones decrecientes del antibiótico a evaluar. Una vez preparado el medio, se llevaron tubos con suero fisiológico en conjunto con la cepa a evaluar

a concentraciones de McFarland 2. Finalmente se inoculó 2 uL de solución previamente mencionada en las microplacas y luego, a partir de esto se incubó a 37°C en condiciones de microaerobiosis durante 48-72 horas. La CMI fue medida a través del pocillo asociado a una concentración de antibiótico donde ya no se vea crecimiento.

E-test: A partir de un cultivo de la cepa a evaluar, se procedió a preparar una solución McFarland 2, de la cual se tomaron 2 uL y se sembraron en forma de tapiz sobre placas de agar Müller-Hinton suplementado con 5% de sangre de caballo. A partir de esto, se procedió a agregar la tira reactiva con concentración decreciente del antibiótico a evaluar y se incubó durante 48-72 horas a 37°C en condiciones de microaerobiosis.

Difusión por disco: A partir de un cultivo de la cepa a evaluar, se procedió a preparar una solución McFarland 2, de la cual se tomaron 2 uL y se sembrarán en forma de tapiz sobre placas de agar Müller-Hinton suplementado con 5% de sangre de caballo. A partir de lo anterior, se procedió a agregar los discos con concentración de antibiótico conocida y se incubaron durante 48-72 horas a 37°C en condiciones de microaerobiosis.

PCR-RFLP: A partir de un cultivo de la cepa a evaluar, se procedió a hacer la extracción de ADN y posterior PCR correspondiente. Una vez amplificada la secuencia a evaluar se efectuó el ensayo con enzimas de restricción, ya sea BsaI o MboII cuyos resultados serán evaluados mediante una electroforesis. En

el caso de Levofloxacin, Tetraciclina y Amoxicilina los resultados serán basados y comparados con bibliografía.

Tabla 2. Partidores y enzimas de restricción utilizados para evaluar la presencia de mutaciones asociadas a resistencia

Antibiótico	Partidores	Enzima	Productos
Claritromicina	Hp23-F 5'-CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3' Hp23-R 5'-CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3'	Bsal MbolI	R:700pb, 400pb y 300pb S: 1400 pb
Metronidazol	RdxA-F: 5''-AATTTGAGCATGGGGCAGA-3'' RdxA-R: 5''-GAAACGCTTGAAAACACCCCT-3''	-	R: 650 pb S: 850 pb
Levofloxacin	gvrA-F 5'-CCGTCGCATTCTTTACG-3' gvrA-R 5'-AGTTGCTCCATTAACCA-3'	AluI	R :180 pb, 140 pb y 60 pb S: 200pb y 180pb
Tetraciclina	Hp16S-F3 5'CTGACGCTGATTGCGCGAAA 3' Hp16S-R2 5' TGGCTCCACTTCGCAGTATT -3'	Hinfi	R : 281 bp, 214 bp, and 40 bp S: 281 bp and 254 bp
Amoxicilina	glmMF(5'-TGGGACTGATGGCGTGAGGG-3) ispAR (5'-ATCATGCATCAGCGAAGTTAAAAATGG-3')		-

Análisis estadísticos:

Se realizó análisis univariado y se aplicó la prueba Kappa para evaluar la concordancia de los métodos utilizados, mediante el programa IBM SPSS. Los distintos resultados obtenidos mediante la técnica a utilizar fueron comparados con el Gold standard, de esta forma se obtendrá el coeficiente Kappa de Cohen el cual permitirá interpretar la concordancia de las técnicas utilizadas con el Gold standard.

7. RESULTADOS

Claritromicina: A través los análisis fenotípicos se evaluó la susceptibilidad de 23 cepas, donde se obtuvo un porcentaje de resistencia de 43,4%, 39,1% y 43,4% mediante Dilución en agar, E-test y difusión por disco respectivamente. Por otra parte, se obtuvo un porcentaje de resistencia de 47,8% realizando PCR-RFLP en conjunto con la enzima de restricción Bsal a 23 cepas. Finalmente, se evaluó la susceptibilidad frente a Claritromicina realizando PCR-RFLP en conjunto con la enzima MbolI a 26 cepas obteniendo una resistencia de un 34,4%. (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes de resistencia y coeficientes kappa asociados a los resultados obtenidos mediante el análisis de susceptibilidad frente a claritromicina. *26 cepas evaluadas

Técnica	% Resistencia n=23	Coefficiente kappa
Dilución en Agar	43,4/50*	-
E-test	39,1	0,911 (Casi perfecto)
Difusión por disco	43,4	0,823 (Casi perfecto)
PCR-RFLP(Bsal)	47,8	0,738 (substantial)
PCR-RFLP(MbolI)	34,4*	0,231 (aceptable)

Además de lo anterior, al momento de evaluar la concordancia de las distintas técnicas con respecto al Gold standard, se obtuvo un coeficiente kappa de 0,911 mediante E-test, 0,823 difusión por disco, 0,738 PCR-RFLP Bsal y 0,231 PCR-RFLP MbolI, respectivamente.

Ilustración 1. Resultados PCR-RFLP utilizando la enzima MboII. Las bandas corresponden a cepas consideradas susceptibles mediante esta técnica presentando solamente una banda a 1400pb.

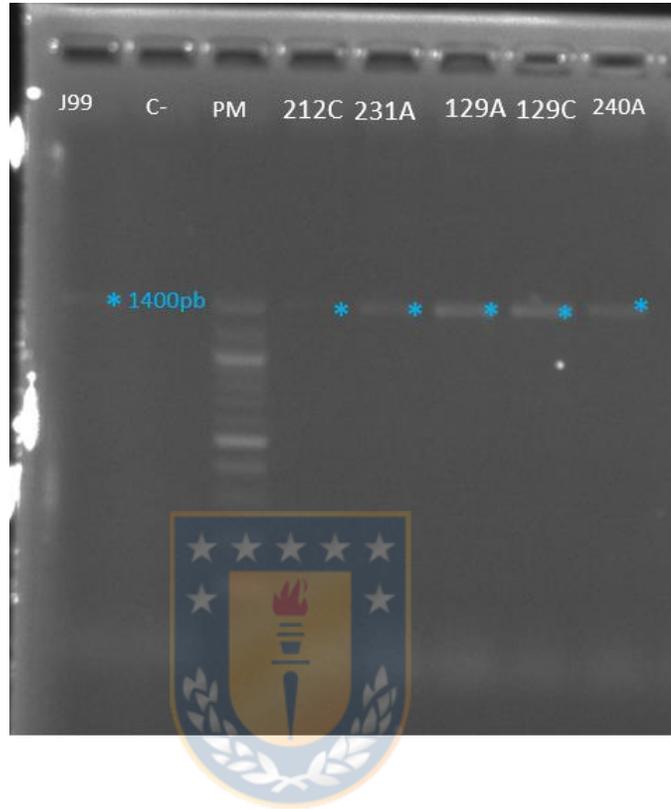
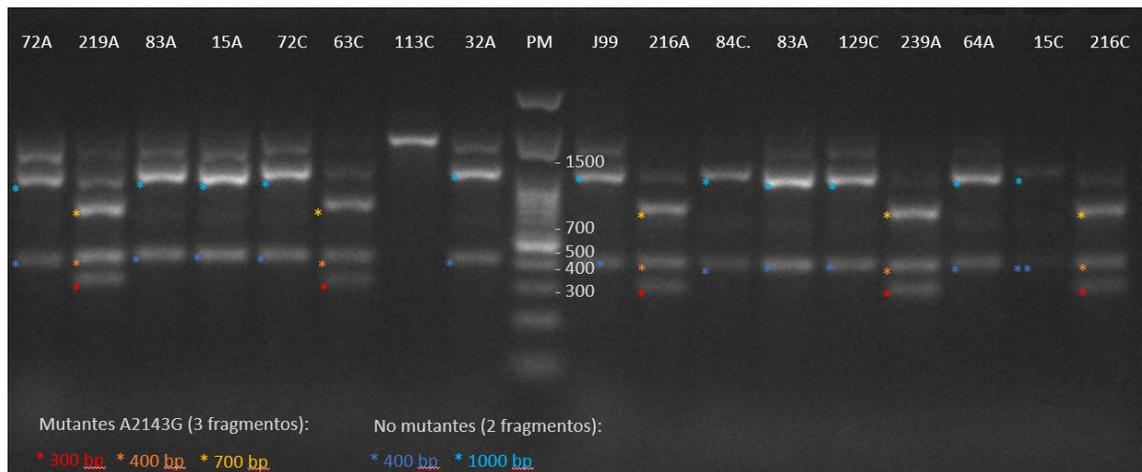


Ilustración 2. Resultados PCR-RFLP utilizando la enzima BsaI. Las cepas susceptibles presentan una banda a 1000pb y 400pb, en el caso de resistentes presentarían bandas a 300pb, 400pb y 700 pb



Metronidazol: Mediante los análisis fenotípicos realizados a 26 cepas, se obtuvo un 42,3%, 42,3% y un 53,8% mediante dilución en agar, E-test y difusión por disco, respectivamente. Además de lo anterior, el análisis genotípico asociado a RdxA, presentó un 3,8% de resistencia. Finalmente, la concordancia descrita por el coeficiente kappa de las distintas técnicas con respecto al Gold standard, fue de 0,527 mediante E-test, 0,012 mediante difusión por disco y 0,103 PCR respectivamente.



Tabla 4. Porcentajes de resistencia y coeficientes kappa asociados a los resultados obtenidos mediante el análisis de susceptibilidad frente a Metronidazol.

Técnica	% Resistencia	Coefficiente kappa
Dilución en Agar	42,3	-
E-test	42,3	0,527
Difusión por disco	53,8	0,012
PCR	3,8	0,103

Ilustración 3. Resultados PCR rdxA. El producto PCR esperado es de 850 pb, en el caso de presentar una mutación se obtendrá una banda a 650 pb.



Levofloxacina: Utilizando las técnicas dilución en agar, E-test y difusión por disco, se obtuvieron valores de resistencia de 51,7%, 58,6% y 41,3% respectivamente. La concordancia obtenida entre las técnicas fenotípicas y el Gold standard fue de un 0,861 para E-test y 0,520 para difusión por disco.

Tabla 5. Porcentajes de resistencia y coeficientes kappa asociados a los resultados obtenidos mediante el análisis de susceptibilidad frente a Levofloxacin.

Técnica	% Resistencia	Coficiente kappa
Dilución en Agar	51,7	-
E-test	58,6	0,861
Difusión por disco	41,3	0,520

Tetraciclina: Los porcentajes de resistencia obtenidos a través de las técnicas fenotípicas fueron 3,3, 6,6 y 0 mediante dilución en agar, E-test y difusión por disco respectivamente. Mediante la técnica genotípica no se obtuvo ninguna cepa resistente. Finalmente, la concordancia entre el E-test y dilución en Agar fue de un 0,651.

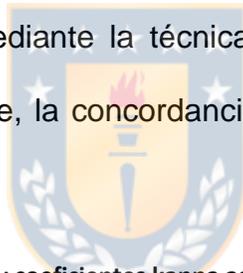


Tabla 6. Porcentajes de resistencia y coeficientes kappa asociados a los resultados obtenidos mediante el análisis de susceptibilidad frente a Tetraciclina.

Técnica	% Resistencia n=30	Coficiente kappa
Dilución en Agar	3,3	-
E-test	6,6	0,651
Difusión por disco	0	-

Amoxicilina: En el caso puntual de amoxicilina no se obtuvo ninguna cepa resistente mediante ninguna técnica, por lo que no fue necesario realizar el análisis estadístico.

8. DISCUSIÓN

Dentro de los resultados que se obtuvieron en este estudio se puede destacar los altos porcentajes de resistencia obtenidos a partir del método Gold standard. Particularmente la resistencia frente a Claritromicina, con porcentajes de resistencia superiores a 40%. Según las guías clínicas del ministerio de salud, la terapia de primera línea no se debe utilizar en regiones que presenten una resistencia superior al 20% (MINSAL. 2013), donde según estos resultados (43,4%) estaríamos incluso superando el doble de este porcentaje en la región. Por otra parte, es importante destacar la alta resistencia obtenida para Levofloxacin y Metronidazol, alcanzando valores de 51,7% y 42,3%, respectivamente. A pesar de lo anterior, hay que tener en consideración el bajo número de muestras evaluadas, ya que estos valores podrían variar considerablemente al momento de utilizar un mayor número de cepas.

Si comparamos los resultados de resistencia obtenidos con lo descrito en bibliografía, podemos encontrar algunas concordancias y otras discrepancias. En el caso de Claritromicina, al compararlos con los resultados de regiones chilenas en las cuales se han descrito porcentajes de resistencia elevados (Oporto, M., *et al*, 2019), los resultados obtenidos son bastante similares, rondando el 40%. Al compararlos con resultados de la región del Biobío, pero del periodo 2015-2017, obtuvimos más de un 10% de resistencia adicional

(Parra-Sepúlveda, C., *et al*, 2019). A raíz de lo mencionado previamente, se pudo apreciar las implicancias de un uso poco regulado de la terapia triple, dando como resultado un porcentaje elevado de resistencia superando incluso valores ya considerados altos; a pesar de lo anterior, no puede dejar de mencionarse que estos resultados deben ser considerados como preliminares, ya que se trabajó con una baja cantidad de muestras.

En el caso de Metronidazol, al momento de compararlo con lo descrito por Oporto *et al*. (Oporto, M., *et al*, 2019), nuestros resultados presentaron un porcentaje de resistencia 40% inferior en comparación con los de la región de la Araucanía. Resultados similares se obtienen al compararlo con los descritos previamente en la región, donde sólo se presentó un aumento de un 2% en comparación con años anteriores. Por otra parte, los resultados asociados a Levofloxacina superarían a los de la región de la Araucanía (Oporto, M., *et al*, 2019) y al mismo tiempo, duplicarían valores presentados previamente en la región del Biobío (Parra-Sepúlveda, C., *et al*, 2019), esto implicaría que la terapia de rescate no estaría siendo una alternativa en el caso de que la terapia cuádruple presentara bajos niveles de erradicación. Finalmente, en el caso de Tetraciclina y Amoxicilina se obtuvo un muy bajo porcentaje de resistencia, lo cual se relaciona con lo descrito previamente en la región, donde estos porcentajes no superan el 5% (Parra-Sepúlveda, C., *et al*, 2019; Oporto, M., *et al*, 2019).

En conjunto con lo mencionado previamente, otro análisis importante a realizar es con respecto a la concordancia de las distintas técnicas evaluadas y Gold standard, dilución en agar. El análisis estadístico utilizado fue el coeficiente kappa de Cohen, el cual permite analizar la fiabilidad entre evaluadores clasificándola entre distintos rangos que van desde 0,01-0,20 lo cual implicaría una concordancia nula o leve; 0,21-0,40 se considera aceptable; 0,41-0,60 moderada; 0,61-0,80 substancial y 0,81-1,00 una concordancia casi perfecta (Cerdeira, J., *et al*, 2008.). La interpretación de estos distintos rangos clasificaría resultados con un bajo valor de acuerdo como “moderado” o “substancial”, por lo que se ha propuesto en bibliografía que valores inferiores a 0,61 sean considerados como una concordancia inadecuada (Bonnyman, A. *et al*, 2012), ya que un coeficiente kappa bajo no solo implicaría que no hay acuerdo entre las técnicas, sino que también un alto grado de desacuerdo entre ellas. Utilizando el criterio descrito previamente sobre los resultados de E-test obtenidos, nuestra correlación con el Gold standard superó con creces el punto de corte de 0,61 en la mayoría de los casos, donde solamente metronidazol presentó un bajo coeficiente kappa. La alta concordancia entre el E-test y dilución en agar ha sido descrita de manera recurrente en varias publicaciones (Piccolomini, R., *et al*, 1997, Osato, M. S. *et al*, 2001, Miftahussurur, M., *et al*, 2020) por lo que los resultados obtenidos en la mayoría de los antibióticos evaluados estarían bien sustentados por bibliografía. En el caso puntual de Metronidazol, donde se obtuvo una concordancia inferior al criterio de corte, los

resultados también serían acorde con lo descrito en publicaciones previas, donde la concordancia del E-test con el Gold standard no siempre es substancial. Por el contrario, hay publicaciones donde describen una concordancia incluso inferior a la obtenida en este trabajo. La baja concordancia en el caso de Metronidazol se puede asociar a diversos factores, como la presencia de cepas hetero resistentes, largos periodos de incubación o a cantidad del inóculo utilizado (Osato, M. S. *et al*, 2001; Ogata, S. K., *et al*, 2014). A pesar de las distintas posibilidades que pueden justificar las discrepancias, no se ha dilucidado la razón de la baja concordancia entre las técnicas.

En el caso de difusión por disco y el análisis estadístico realizado en comparación con el Gold standard, el único antibiótico que presentó una correlación adecuada fue Claritromicina, esta correlación se ha descrito previamente en bibliografía por lo que nuevamente nuestros resultados se verían bien sustentados (Ogata, S. K., *et al*, 2014). Al mismo tiempo, Metronidazol nuevamente presentó una baja relación entre las técnicas, lo cual al igual que en el caso de E-test, se ha descrito previamente (Chaves, S., *et al*, 1999), pero en este caso asociándola principalmente a patrones irregulares en la distribución del disco en largos periodos de incubación (Chaves, S., *et al*, 1999). Finalmente, para la Levofloxacin a diferencia del E-test, presentó un coeficiente kappa de 0,520, lo cual en comparación con bibliografía encontraríamos ciertas discrepancias, ya que se ha planteado resultados muy

concordantes entre difusión por disco y el Gold standard (Miftahussurur, M., *et al*, 2020). A pesar de lo anterior, esto se puede justificar con el bajo número de muestras evaluadas, ya que al momento de aumentar el n utilizado, existe la posibilidad de presentar una mayor concordancia entre las técnicas. (Miftahussurur, M., *et al*, 2020).

En el caso de la comparación del Gold standard y la técnica genotípica para evaluar la susceptibilidad de Metronidazol, nuevamente podemos observar resultados discordantes entre ellas. El antibiótico Metronidazol es metabolizado por una NADPH nitroreductasa codificada por el gen *rdxA* lo cual deriva en la formación de especies reactivas al oxígeno provocando daño a nivel celular (Jenks, P. J., *et al*, 1999), a raíz de esto, mutaciones a nivel de *rdxA* se han asociado con resistencia frente a este a antibiótico (Jenks, P. J., *et al*, 1999), por lo que el uso de técnicas moleculares para la detección de mutaciones en esta región se ha visto como una alternativa prometedora para una identificación de cepas resistentes evitando el cultivo microbiológico. A pesar de ello, distintos estudios han desmentido la relación de mutaciones en *rdxA*, mostrando una baja relación entre la presencia de mutaciones y la presencia de cepas resistentes, adjudicando la resistencia a otros genes (Rezaei, S., *et al*, 2020; Marques, B., *et al*, 2019). Particularmente nuestros resultados se correlacionan con lo descrito previamente, en donde sólo se vió una cepa resistente mediante PCR evaluando el gen *rdxA*, por lo que nace la necesidad

de desarrollar los ensayos moleculares para la evaluación de cepas resistentes en el caso de Metronidazol.

Al momento de comparar las técnicas moleculares con el Gold standard, en el caso de Claritromicina y la mutación A2143G, presentó una alta concordancia al momento de ser comparado con el Gold standard. Esta mutación presente en el ARNr 23S se asocia a cambios conformacionales a nivel del blanco del macrólido impidiendo su unión (Pourakbari, B., *et al*, 2018). Al momento de comparar la concordancia de esta mutación con dilución en agar, podríamos pensar en distintas posibilidades que impedirían un diagnóstico de cepas resistentes de manera precisa, ya sea que la mutación no sea la causante de la resistencia o que esté presente la mutación, pero no se exprese de manera fenotípica. A pesar de lo anterior, nuestros resultados reflejan una alta concordancia entre las técnicas, superando con creces el criterio de corte planteado. En los resultados descritos en bibliografía podemos apreciar que también se ha observado una alta correlación entre la presencia de esta mutación con la resistencia descrita por el Gold Standard (Pourakbari, B., *et al*, 2018), por lo que esto es favorable para nuestro estudio debido a la reproducibilidad de los experimentos realizados. Caso contrario se ve en los resultados obtenidos mediante la enzima de restricción MbolI, donde se obtuvo un muy bajo coeficiente kappa de Cohen. Si bien se ha descrito una alta prevalencia de la mutación A2142G, la cual es detectada mediante la enzima de

restricción MbolI, en cepas resistentes a claritromicina (Pourakbari, B., *et al*, 2018). Puede que en nuestra región esta mutación no sea la principal causante de la resistencia, por lo que realizar estos ensayos con una mayor cantidad de muestras será necesario para llegar a resultados concluyentes.

La Levofloxacin es una quinolona la cual inhibe la ADN girasa impidiendo la correcta replicación del ADN bacteriano, por lo que las mutaciones en la quinolone resistance-determining region (QRDR) estarían asociadas a resistencia frente a este antibiótico. Al momento de evaluar la QRDR del gen *gyrA* mediante los partidores descritos no obtuvimos una banda representativa de este resultado, esto debido a que estos partidores estaban dirigidos al gen *gyrA* de otra especie bacteriana (González-Hormazábal, P., *et al*, 2021). Pese a esto, si secuenciáramos las cepas resistentes obtenidas se esperaría obtener resultados similares a los descritos por González-Hormazábal, P. *et al*. (González-Hormazábal, P., *et al*, 2021), ya que este último estudio fue un trabajo realizado en Chile, donde a pesar de presentar un porcentaje de resistencia inferior, se esperaría que las mutaciones presentes fueran las más prevalentes en la región. Las mutaciones más representativas en la QRDR son las ubicadas en los codones 87 y 91 (Toledo, H., & Lopez-Solis, R. 2009), particularmente las N87I, D91N, D91G y N87K.

La Tetraciclina, por otro lado, presenta un bajo porcentaje de resistencia en nuestra región, lo cual también se ha visto a lo largo de nuestro país (Parra-

Sepúlveda, C., *et al*, 2019; Oporto, M., *et al*, 2019). Al momento de evaluar la resistencia mediante técnicas genotípicas, específicamente PCR-RFLP, a diferencia del caso de Claritromicina, no se esperaría ver reflejadas las mutaciones en el PCR-RFLP (Toledo, H., & Lopez-Solis, R. 2009). Diversos autores han descrito que la resistencia frente a este antibiótico está mediada por la triple mutación en el ARNr 16S AGA926–928→TTC (Gerrits MM., *et al*, 2002; Ribeiro, M. L., *et al*, 2004). A pesar de que se ha mencionado que mediante PCR-RFLP se podían diferenciar cepas resistentes por patrones específicos en el gel de electroforesis (Gerrits MM., *et al*, 2002; Ribeiro, M. L., *et al*, 2004), mediante esta metodología se han omitido mutaciones puntuales en esta región, ya que no se vería reflejado en el gel de electroforesis, por lo que existe la posibilidad de que se no se registren cepas resistentes como se ha descrito en este trabajo. Basándonos en el trabajo de Toledo H., *et al*. (Toledo, H., & Lopez-Solis, R. 2009), realizado en nuestro país, se esperaría encontrar una baja correlación entre los resultados del PCR-RFLP realizado y mutaciones asociadas a resistencia. Por lo que teóricamente se esperaría encontrar una relación 1:6:4 entre mutaciones puntuales en A928C, AG926 →927GT y AGA926→928GGC, respectivamente.

El caso particular de Amoxicilina, que es un antibiótico que a pesar de que se describen casos puntuales de resistencia en nuestro país (Parra-Sepúlveda, C., *et al*, 2019; Oporto, M., *et al*, 2019), es necesario estandarizar métodos

moleculares que permitan la identificación de cepas resistentes frente a este antibiótico. Mediante técnicas basadas en PCR no se permite identificar diferencias en cuanto al genotipo de las cepas resistentes y susceptibles, mediante secuenciación se han podido identificar ciertas mutaciones que permitirían la diferenciación entre cepas susceptibles y resistentes (Matteo, M. J., *et al*, 2008).

A raíz de todo lo ya mencionado, se puede destacar que a pesar de que se haya evaluado un bajo número de muestras, estos resultados permiten inferir que el uso de técnicas alternativas a dilución en agar, en ciertos antibióticos, pueden ser una opción viable para evaluar la susceptibilidad de *H. pylori*. Dentro de las técnicas moleculares solamente PCR-RFLP utilizando la enzima de restricción Bsal presentó resultados favorables, por lo que es necesario estandarizar nuevos protocolos para la detección de resistencia frente a los otros antibióticos usados en el tratamiento. Dentro de las alternativas moleculares para la detección de cepas resistentes frente a Claritromicina se puede citar FISH, FRET, Secuenciación, DNA Chips, entre otras (Xuan, S.-H., *et al*, 2016) estas técnicas pueden ser extrapoladas a los otros antibióticos utilizados en el tratamiento de *H. pylori*, por lo que es necesario estandarizar nuevos protocolos con el fin de obtener los perfiles de resistencia de manera rápida, que no sean operadores dependientes y que presenten una alta concordancia con el Gold standard.

9. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

En este estudio se encontró una alta resistencia de *H. pylori* frente a Claritromicina, encontrándose un porcentaje que duplica el criterio de corte recomendado para dejar de usar la terapia cuyo eje principal es este antibiótico. A raíz de lo anterior, la terapia de primera línea en nuestra región debe ser la terapia cuádruple basada o no en bismuto. En cuanto a la resistencia frente a Levofloxacin, el porcentaje también fue elevado, por lo que al momento de que se reduzca la efectividad de la terapia cuádruple, no se podrá utilizar la terapia basada en Levofloxacin en nuestra región, limitando aún más nuestras opciones. La resistencia frente a Tetraciclina y Amoxicilina si bien fue bastante baja, la evaluación de susceptibilidad debe seguir realizándose periódicamente.

En cuanto a la comparación de las metodologías utilizadas, las técnicas fenotípicas presentaron una alta concordancia con el Gold standard en la mayoría de los antibióticos evaluados. Esto implicaría que se podría utilizar estas técnicas en la evaluación de susceptibilidad antibiótica de manera rutinaria, siendo alternativas que requieren menos material y tiempo que el Gold Standard. Por otra parte, el Metronidazol no presentó ninguna técnica con alta concordancia, por lo que la evaluación de la susceptibilidad se tendrá que seguir efectuando mediante dilución en agar. El caso puntual de Levofloxacin, que presentó una baja concordancia en el caso de difusión por disco, es

necesario ensayar una mayor cantidad de muestras para poder confirmar que esta técnica presenta resultados concordantes con el Gold Standard.

Mediante las técnicas genotípicas, solamente PCR-RFLP utilizando la enzima de restricción Bsal presentó una alta concordancia con dilución en agar, por lo que esta técnica podría ser utilizada de manera rutinaria para la evaluación de susceptibilidad frente a Claritromicina. Las otras técnicas moleculares utilizadas presentaron una baja concordancia, por lo que una mayor estandarización y la búsqueda de alternativas seguirá siendo un área de interés para desarrollar.

Por último, hay que destacar que los resultados obtenidos son preliminares, ya que se evaluó un bajo número de muestras y para llegar a conclusiones más robustas será necesario evaluar un mayor número de muestras.



10. BIBLIOGRAFÍA

Ahussurur, M., Fauzia, K. A., Nusi, I. A., Setiawan, P. B., Syam, A. F., Waskito, L. A., ... Yamaoka, Y. (2020). E-test versus agar dilution for antibiotic susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: a comparison study. *BMC Research Notes*, 13(1).

Arenas, A., Serrano, C., Quiñones, L., Harris, P., Sandoval, M., Lavanderos, M., ... Riquelme, A. (2019). High prevalence of clarithromycin resistance and effect on *Helicobacter pylori* eradication in a population from Santiago, Chile: cohort study and meta-analysis. *Scientific Reports*, 9(1).

Bonnyman, A. M., Webber, C. E., Stratford, P. W., & MacIntyre, N. J. (2012). Intrarater Reliability of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry–Based Measures of Vertebral Height in Postmenopausal Women. *Journal of Clinical Densitometry*, 15(4), 405–412.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 10th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. p. M07.

Cerda, J., & Villarroel Del, L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista chilena de pediatría*, 79(1), 54-58.

Chaves, S., Gadanho, M., Tenreiro, R., & Cabrita, J. (1999). Assessment of metronidazole susceptibility in *Helicobacter pylori*: statistical validation and error rate analysis of breakpoints determined by the disk diffusion test. *Journal of clinical microbiology*, 37(5), 1628-1631.

Coelho, L. G., & Coelho, M. C. (2014). Clinical Management of *Helicobacter pylori*: The Latin American Perspective. *Digestive Diseases*, 32(3), 302–309.

García A, Salas-Jara MJ, Herrera C, González C. (2014) Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. *World J Gastroenterol* ; 20(19): 5632-5638

Gerrits MM, de Zoete MR, Arents NL et al. (2002). 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 2996–3000

González-Hormazábal, P., Arenas, A., Serrano, C., Pizarro, M., Fuentes-López, E., Arnold, J., ... Riquelme, A. (2021). Prevalence of *Helicobacter pylori* Antimicrobial Resistance Among Chilean Patients. *Archives of Medical Research*, 52(5), 529–534.

Guzmán, Jesús, Denis Castillo, Manuel Ojeda, y Michel Sauvain. (2019). Susceptibilidad antimicrobiana y mutaciones en el gen ARNr 23s de *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 36(2): 270-74

Hernández Power, M., Reyes Zamora, O., Rodríguez González, B. (2008). La resistencia a antibióticos en *Helicobacter pylori*. Revista Cubana de Medicina, 47(4)

Jenks, P. J., Ferrero, R. L., & Labigne, A. (1999). The role of the rdxA gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43(6), 753–758.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., ... & Hunt, R. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. Gut, 66(1), 6-30.

Marques, B., Donato, M. M., Cardoso, O., Luxo, C., Martinho, A., & Almeida, N. (2019). Study of rdxA and frxA genes mutations in metronidazole resistant and susceptible *Helicobacter pylori* clinical isolates from the central region of Portugal. Journal of Global Antimicrobial Resistance.

Matteo, M. J., Granados, G., Olmos, M., Wonaga, A., & Catalano, M. (2008). *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61(3), 474–477.

Miftahussurur, M., Fauzia, K. A., Nusi, I. A., Setiawan, P. B., Syam, A. F., Waskito, L. A., ... Yamaoka, Y. (2020). E-test versus agar dilution for antibiotic

susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: a comparison study. BMC Research Notes, 13(1).

Guía Clínica AUGE. Tratamiento de erradicación de *Helicobacter pylori* en el paciente con úlcera péptica. Ministerio de Salud de Chile. https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wpcontent/uploads/2014/09/Helicobacter-Pylori-en-paciente-con-%C3%BAlcera-p%C3%A9ptica.pdf (2013).

O'Connor A, Furuta T, Gisbert JP, O'Morain C. Review – Treatment of *Helicobacter pylori* infection (2020). *Helicobacter*.;25(Suppl. 1):e12743.

Ogata, S. K., Gales, A. C., & Kawakami, E. (2014). Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1439–1448.

Oporto, M., Pavez, M., Troncoso, C., Cerda, A., Hofmann, E., Sierralta, A., ... Barrientos, L. (2019). Prevalence of Infection and Antibiotic Susceptibility of *Helicobacter pylori*: An Evaluation in Public and Private Health Systems of Southern Chile. *Pathogens*, 8(4), 226.

Osato, M. S., Reddy, R., Reddy, S. G., Penland, R. L., & Graham, D. Y. (2001). Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(1), 39–44.

Parra-Sepúlveda, C., Merino, J. S., Sáez-Carrillo, K., González, C., & García-Cancino, A. (2019). Antibiotic resistance surveillance of *Helicobacter pylori* at the Biobío region (Chile) in a decade. *Arquivos de gastroenterologia*, 56, 361-366.

Piccolomini, R., Di Bonaventura, G., Catamo, G., Carbone, F., & Neri, M. (1997). Comparative evaluation of the E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *Journal of clinical microbiology*, 35(7), 1842–1846.

Pourakbari, B., Mahmoudi, S., Parhiz, J., Sadeghi, R., Monajemzadeh, M., & Mamishi, S. (2018). High frequency of metronidazole and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. *British Journal of Biomedical Science*, 75(2), 61–65.

Rezaei, S., Talebi Bezmin Abadi, A., & Mohabatti Mobarez, A. (2020). Metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* isolates without rdxA mutations obtained from Iranian dyspeptic patients. *New Microbes and New Infections*, 34, 100636.

Ribeiro, M. L., Gerrits, M. M., Benvengo, Y. H. ., Berning, M., Godoy, A. P. ., Kuipers, E. J., ... Kusters, J. G. (2004). Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40(1), 57–61.

Savoldi, A., Carrara, E., Graham, Prof, D. Y., Conti, M., & Tacconelli, E. (2018). Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions. *Gastroenterology*.Nov;155(5):1372-1382.e17.

Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, Petit JC, Soussy CJ.(2003) Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. Dec;47(12):3942-4.

Tankovic, J., Perichon, B., Duval, J., & Courvalin, P. (1996). Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11), 2505–2510.

Toledo, H., & Lopez-Solis, R. (2009). Tetracycline resistance in Chilean clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 470–473.

Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 713–739.

Xuan, S.-H., Wu, L.-P., Zhou, Y.-G., & Xiao, M. (2016). Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in clinical specimens by molecular methods: A review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 4, 35–41.

Zamani, M., Ebrahimitabar, F., Zamani, V., Miller, W. H., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J., & Derakhshan, M. H. (2018). Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 47(7), 868–876. .

Matteo, M. J., Granados, G., Olmos, M., Wonaga, A., & Catalano, M. (2008). *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3), 474–47.



11. ANEXOS

Anexo 1 Consentimiento informado

Este estudio está bajo el alero de la Dra. Apolinaria García Cancino, directora del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción. Las biopsias gástricas, fueron solicitadas a pacientes sintomáticos de la región del Bio-bio sometidos a endoscopia digestiva alta (EDA) por indicación de un gastroenterólogo en el periodo 2018-2019. Los pacientes que accedieron a participar del estudio firmaron voluntariamente un consentimiento informado aceptado por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción. Código CEC 160527.

