



REVISTA DE GASTROENTEROLOGÍA DE MÉXICO

www.elsevier.es/rgmx



ARTÍCULO ORIGINAL

Mutaciones puntuales en el dominio transglicosilasa del gen *pbp1a* en aislados de *Helicobacter pylori* resistentes a amoxicilina



A.J. Matta^a, D.C. Zambrano^a, Y.C. Martínez^b y F.F. Fernández^{c,*}

^a Facultad de Ciencias de la Educación y el Deporte, Escuela Nacional del Deporte, Cali, Colombia

^b Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Corporación Universitaria Rafael Núñez, Cartagena de Indias, Colombia

^c Facultad de Ciencias, Universidad San Buenaventura, Cali, Colombia

Recibido el 9 de agosto de 2020; aceptado el 14 de mayo de 2021

Disponible en Internet el 15 de febrero de 2022

PALABRAS CLAVE

pbp1a;
Peptidoglucano;
Helicobacter pylori;
Amoxicilina;
Transpeptidasa

Resumen

Introducción: El tratamiento para la erradicación de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) incluye un inhibidor de la bomba de protones y 2 antibióticos: amoxicilina y claritromicina; este tratamiento tiene como objetivo erradicar la infección en al menos el 90% de los pacientes. El fracaso del tratamiento de erradicación de la infección puede tener múltiples causas, entre ellas la presencia de mutaciones puntuales en los genes diana de los antimicrobianos.

Objetivo: Caracterizar las mutaciones presentes en el gen *pbp1a* y su posible asociación con la resistencia a la amoxicilina *in vitro*.

Metodología: Se evaluó la susceptibilidad a amoxicilina en 147 aislados de *H. pylori* de Túquerres, se amplificó por PCR y secuenció los dominios transglicosilasa del gen *pbp1a* en aislados de Túquerres, y se evaluó la asociación entre las mutaciones y la resistencia.

Resultados: Se observó que el 5.4% (8/147) de aislados de Túquerres fueron resistentes a amoxicilina *in vitro*. La amplificación por PCR de los dominios transglicosilasa del gen *pbp1a* se realizó en el 87.5% de los aislados resistentes *in vitro* a amoxicilina, y en el análisis de la secuenciación del ADN se observó un total de 2 cambios de aminoácidos a partir de 3 mutaciones en el ADN que codifica para la proteína PBP1A-1.

Conclusión: Esta investigación constituye el primer reporte sobre las mutaciones en el gen *pbp1a* en aislados de *H. pylori* provenientes de las poblaciones de Túquerres; se encontraron mutaciones no reportadas en investigaciones previas.

© 2022 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia. Universidad San Buenaventura, Carrera 122 # 6-65, 760043 Cali, Colombia. Teléfono: +57-2-3108350841, +57-2-3174931774

Correo electrónico: fabian.fernandez.daza@gmail.com (F.F. Fernández).

<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2021.05.008>

0375-0906/© 2022 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

pbp1a;
Peptidoglycan;
Helicobacter pylori;
Amoxicillin;
Transpeptidase

Point mutations in the glycosyltransferase domain of the *pbp1a* gene in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* isolates

Abstract

Introduction: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eradication treatment includes a proton pump inhibitor and two antibiotics: amoxicillin and clarithromycin. The goal of that treatment is to eradicate the infection in at least 90% of the patients. Failure to eradicate the infection can have multiple causes, among which is the presence of point mutations in the antimicrobial target genes.

Objective: To characterize the mutations present in the *pbp1a* gene and their possible association with resistance to amoxicillin *in vitro*.

Methodology: Susceptibility to amoxicillin was evaluated in 147 isolates of *H. pylori* from the Colombian municipality of Túquerres. PCR amplification and sequencing of the glycosyltransferase domain of the *pbp1a* gene were carried out on Túquerres isolates, and the association between mutations and resistance was evaluated.

Results: A total of 5.4% (8/147) Túquerres isolates were resistant to amoxicillin *in vitro*. PCR amplification of the glycosyltransferase domain of the *pbp1A* gene was performed on 87.5% of the amoxicillin-resistant isolates *in vitro*, and in the DNA sequencing analysis, a total of 2 changes of amino acids from 3 DNA mutations that encoded the PBP1A-1 protein were observed.

Conclusion: The present study is the first report on *pbp1a* gene mutations in *H. pylori* isolates coming from a population in Túquerres. Mutations that have not been reported in previous studies were found.

© 2022 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción y objetivo

El *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gramnegativa, microaerófila en forma de espiral, con flagelos que le permiten su movilización y adherencia al epitelio gástrico¹. Esta bacteria está asociada a la gastritis y a la enfermedad ulcerosa péptica, además se considera factor de riesgo en el cáncer gástrico¹.

El *H. pylori* tiene factores de virulencia que le permiten colonizar la mucosa gástrica y desarrollar la enfermedad, que induce a una mayor incidencia y prevalencia de su patogenicidad. Los factores de virulencia más importantes son: la ureasa, el flagelo, el gen *cagA*, la citotoxina *vacA* y la proteína *babA*².

El *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica de más del 50% de la población del mundo, generalmente se adquiere durante la infancia y persiste durante toda la vida. Cabe resaltar que el resultado clínico de la infección está influenciado por factores ambientales, la diversidad genética de la cepa y la diversidad genética del hospedero³.

En cuanto al tratamiento el esquema de primera línea para la erradicación del *H. pylori* es la terapia triple, que incluye un inhibidor de la bomba de protones y 2 antibióticos como la amoxicilina y la claritromicina. Este tratamiento tiene como objetivo erradicar la infección en al menos el 90% de los pacientes⁴; el fracaso del tratamiento de erradicación puede darse por dosis inadecuadas, falta de adherencia al tratamiento, presencia de bombas de eflujo y mutaciones en los genes diana de los antimicrobianos.

La resistencia antimicrobiana es un fenómeno natural que se acelera ante la presión selectiva que genera para

los microorganismos la exposición a antibióticos. Lo anterior lleva a que los tratamientos antibióticos convencionales se vuelvan ineficaces, a que las infecciones persistan y a que se incremente el riesgo de su propagación⁵.

Uno de los antibióticos más ampliamente empleados en la terapia de erradicación es la amoxicilina; este derivado semisintético de la ampicilina inhibe la biosíntesis de la pared celular, uniéndose a las proteínas de unión a la penicilina (*penicillin-binding proteins* [PBP])⁶, en la membrana plasmática; PBP1A tiene actividad transglucosilasa/transpeptidasa y su función consiste en el alargamiento de las hebras de peptidoglicano y la formación del entrecruzamiento entre los péptidos de peptidoglucano, por lo que su inhibición interfiere con la síntesis de peptidoglucano y crecimiento celular⁷.

La prevalencia de la resistencia de *H. pylori* a la amoxicilina presenta variación geográfica, con valores de 2.2%, 65.6%, 11.6% y de 0.5% para América, África, Asia y Europa, respectivamente^{8,9}. Si bien la información sobre la prevalencia de la resistencia en Colombia es limitada presenta valores del 7% en Bogotá¹⁰, del 3.8% en el eje cafetero¹¹ y del 20.5% en Tumaco¹²; en ninguno de estos estudios se evaluaron mutaciones en el gen *pbp1a* y su asociación con la resistencia a la amoxicilina. Se desconocen las mutaciones en el gen *pbp1a* y su asociación con la resistencia a la amoxicilina en aislados de *H. pylori* provenientes de la población de Túquerres, ubicada en los Andes de Colombia, con prevalencia de *H. pylori* (> 80%) y alto riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico¹³, al igual que la posible asociación entre las mutaciones en este gen y el fracaso en la erradicación de *H. pylori*. Esta información es útil para el desarrollo e

implementación de metodologías de detección rápida de la resistencia y aplicación de esquemas de erradicación, por lo que el objetivo de esta investigación fue caracterizar las mutaciones presentes en el gen *pbp1a* y su posible asociación con la resistencia a la amoxicilina *in vitro*.

Materiales y métodos

Estudio observacional en el que se incluyeron 149 muestras de mucosa gástrica provenientes de pacientes con síntomas de dispepsia de Túquerres-Nariño, con el propósito de evaluar la resistencia antimicrobiana a amoxicilina *in vitro* mediante el método de dilución en agar. Para cumplir los objetivos propuestos, primeramente se tomó biopsia de la mucosa gástrica, seguido a ello se realizó cultivo y pruebas bioquímicas para la identificación de colonias puras de *H. pylori*, lo cual se confirmó mediante la identificación molecular por PCR del gen estructural *ureA*, seguido a esto se procedió a evaluar la susceptibilidad antimicrobiana a amoxicilina *in vitro* mediante el método de dilución en agar y, finalmente, a las cepas resistentes se les realizó la amplificación de los dominios transglicosilasa del gen *pbp1a* y se secuenció para la identificación de mutaciones puntuales. A continuación se detallan los métodos utilizados en este estudio.

Toma de biopsias de mucosa gástrica

La muestra fue seleccionada de adultos de ambos sexos remitidos al servicio médico para evaluación clínica, donde se solicitó una gastroduodenoscopia como parte de su evaluación diagnóstica debido a los síntomas referidos por los pacientes en la consulta clínica, que fueron: dolor abdominal, reflujo gastroesofágico, vómitos, síntomas respiratorios, dispepsia y diarrea. En la [tabla 1](#) se detalla el protocolo de toma de biopsias.

Las muestras se almacenaron y transportaron según las pautas del Ministerio de Salud de Colombia al Laboratorio de Patología de la Universidad del Valle, donde se realizaron los análisis correspondientes.

Cultivo a partir de biopsia gástrica

El cultivo inicial a partir de cual se aisló *H. pylori* de biopsias gástricas se realizó mediante la introducción de la biopsia en 200 μ l de NaCl 0.89% estéril, y macerado con macerador estéril; del macerado resultante se tomó con asa de argolla desechable (Fisherbrand® calibrada a 10 μ l/gota) y se sembró por estría, en agar Columbia (Oxoid®) con sangre desfibrinada de cordero, más 10% suplemento Dent (Oxoid®), el cual contiene vancomicina, cefsulodin, lactato de trimetoprima y anfotericina B. Luego de la siembra se preservó el macerado de mucosa gástrica en una solución de tioglicolato (Merck®) con glicerol (Promega®) 20% y se almacenó a -70°C .

La incubación de las cajas de Petri se hizo en una incubadora de CO₂ (Shel Lab®) a 37 °C con atmósfera de CO₂ al 10% y 90% de humedad. El crecimiento se evaluó a las 72 horas y luego periódicamente de 7 a 10 días, en busca de colonias traslúcidas, pequeñas y en forma de gotas de rocío,

compatibles con la morfología del *H. pylori*. Se evaluó la calidad del crecimiento y la contaminación por hongos o bacterias, tanto en el aislamiento primario como en el antibiograma.

Siembra del preservado

Para evaluar la susceptibilidad a amoxicilina en los 147 preservados viables de *H. pylori* de la población de Túquerres se necesitó aislar nuevamente la bacteria, a partir de sus preservados. Para este fin se tomó una fracción del preservado (-70°C), con lanceta estéril, esta se depositó en agar Columbia (Oxoid®) con sangre desfibrinada de cordero al 10%, sin suplemento. Se sembró en masa e incubó a 37 °C en ambiente microaerofílico (CO₂ al 10% y 90% de humedad). El crecimiento se evaluó a las 72 horas y luego periódicamente de 7 a 10 días. El contenido restante del preservado se almacenó a -70°C .

Purificación de los aislados de *Helicobacter pylori*

Las colonias obtenidas previamente y que presentaron fenotipo compatible con *H. pylori* se sembraron por triplicado empleando el método estría con asa estéril (10 μ l), en agar Columbia (Oxoid®) más sangre desfibrinada de cordero al 10%, con suplemento Dent (Oxoid®), el cual contenía vancomicina, cefsulodina, lactato de trimetoprima, amoxicilina y anfotericina B. Las cajas se incubaron (incubadora Shel Lab®) a 37 °C en ambiente microaerofílico (CO₂ al 10% y 90% de humedad). El crecimiento se evaluó inicialmente a las 48 a 72 h, seguidos de evaluaciones periódicas cada 24 h en un periodo de tiempo de 7 a 10 días; a las colonias resultantes se les realizó las pruebas de identificación fenotípica y amplificación del gen *ureA*.

Identificación fenotípica del *Helicobacter pylori*

Macroscópicamente se buscaron colonias pequeñas, puntiformes y traslúcidas, con bordes definidos, a las que se les realizaron las siguientes pruebas de identificación: la prueba de oxidasa, catalasa, test de urea (*Host Test*) y tinción de Gram. Finalmente, para su correcta identificación se compararon con los resultados expuestos en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* para la identificación de *H. pylori*. Adicionalmente la identificación molecular se realizó mediante amplificación por PCR del gen estructural *ureA* de *H. pylori*.

Evaluación de la susceptibilidad de los aislados de *H. pylori* a amoxicilina mediante el método de dilución en agar

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó empleando la metodología de dilución en agar aplicada a los aislados de *H. pylori* provenientes de los pacientes y donde el punto de corte para considerar una cepa resistente a amoxicilina se definió con una capacidad inhibitoria mínima (CIM) mayor o igual a 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (Figuroa et al., 2012).

Esta se realizó a los 147 aislados de *H. pylori* obtenidos a partir del cultivo en agar Columbia base. Para esto

Tabla 1 Protocolo de toma de biopsias por endoscopia

Espécimen	Medio de almacenamiento	Procedimiento
Dos muestras de mucosas gástrica antral, curvatura mayor y menor	Tioglicolato con glicerol	Aislamiento de <i>H. pylori</i> y PCR de marcadores de virulencia
Cuatro muestras: 2 de antro y 2 de cuerpo gástrico	Formol al 10%	Análisis histopatológico
Dos muestras de mucosas gástrica de cuerpo, curvatura mayor y menor	Tioglicolato con glicerol	Aislamiento de <i>H. pylori</i> y PCR de marcadores de virulencia
Una muestra de mucosa gástrica de cuerpo, pared anterior media y otra de antro curvatura menor	Tioglicolato con glicerol	Preservación a -70°C

se sembró por triplicado y por agotamiento un inóculo de aproximadamente 6×10^8 UFC/ml (McFarland 2), en agar Mueller Hinton (Merck®) suplementado con 10% de sangre defibrinada de cordero, a concentraciones dobles (0.25, 0.5, 1, 2 y 4.0 µg/ml) de amoxicilina, e incubando (incubadora Shel Lab®) a 37°C en ambiente microaerofílico (CO_2 al 10% y 90% de humedad). El crecimiento bacteriano se evaluó tras 72 h, se empleó la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* como cepa de control de calidad para monitorizar la precisión de la CIM de *H. pylori* al usar el método de dilución en agar.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN bacteriano se tomó 1 ml de preservado (80% tioglicolato y 20% glicerol) de *H. pylori* a -70°C y depositó en tubo Eppendorf de 1.5 ml, que seguidamente se centrifugó (centrífuga refrigerada Forma Scientific®) a 13,000 rpm durante 2 min, se descartó el sobrenadante y se adicionó 300 µl de *buffer* de lisis (Proteinasa K 100 µg/ml, SDS 10%, EDTA 0.5 M y Tris-HCl pH 8) y se incubó a 56°C por 18 h, seguido de 10 min a 72°C . Terminada la incubación se adicionó 120 µl de NaCl 5 M y centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, seguidamente se trasvasó el sobrenadante y descartó el precipitado. Se adicionó 840 µl de etanol absoluto (Mallinckrodt®) y centrifugó a 13,000 rpm a 4°C por 20 min, se descartó el sobrenadante y adicionó 300 µl de etanol al 70%, centrifugando a 13,000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante; se dejó secar por espacio de 2 h; se resuspendió en 100 µl de Buffer TE y almacenó a -20°C . La cantidad y la pureza del ADN bacteriano se determinó por lectura de densidad óptica a 260/280 nm en espectrofotómetro (Gene Quant II® Pharmacia Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Amplificación del gen *ureA*

La identificación molecular del *H. pylori* se realizó mediante la amplificación por PCR del gen *ureA*. La reacción se realizó en un termociclador (Swift MiniProTM, Esco), adicionando los siguientes reactivos a un tubo de 0.2 ml: 1X de *buffer* de PCR (Buffer green 5X Promega®), 1 µM de MgCl_2 (Promega®), 0.25 mM de dNTPs (Promega®), 50 pmol/µl de cada cebador (sentido 3'-AAGACATCACTATCAACG-5'/anti-sentido 5'-CCCGCTCGCAATGTCTAA-3'), 0.5 unidades de GoTaq DNA polimerasa (Promega®) y 25 ng de ADN genómico de *H. pylori* en un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó por una desnaturalización inicial a $95^{\circ}\text{C}/2$ min, seguida de 35 ciclos ($95^{\circ}\text{C}/1$ min, $54^{\circ}\text{C}/1$ min

y $72^{\circ}\text{C}/1$ min) y una extensión final a $72^{\circ}\text{C}/15$ min. Los productos de amplificación fueron obtenidos por electroforesis a 80 voltios por 1 h en una cámara horizontal (Spectroline Bi-O-Vision®). Estos se visualizaron mediante fluorescencia en luz UV (260/280 nm) en un transiluminador (Spectroline Bi-O-Vision®) en geles de agarosa (Sigma®) al 2% teñida con 1 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Para determinar el tamaño de los amplificadores de todos los genes se empleó un marcador de peso de 100 pb (Fermentas®); el tamaño del amplicón correspondió aproximadamente a 167 pb (fragmento esperado mediante el análisis *in silico* y respecto a la distancia de migración del marcador de pares de bases).

Amplificación de los dominios transglicosilasa del gen *pbp1a* en el *Helicobacter pylori*

La amplificación de los dominios transglicosilasa (*pbp1a*) por PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador (Swift Mini-ProTM, Esco) y los siguientes reactivos se agregaron a un tubo de 0.2 ml: *buffer* de PCR 1X (Buffer green 5X Promega®), MgCl_2 1 mM (Promega®), DMSO al 10%, dNTPs 0.288 mM (Promega®), 50 pmol/µl de cada cebador *pbp1a-1* [R-GCCATTCTTATCGCTCAAGTT y F-TCTCGTGTGAGCACCATG], 0.5 unidades de GoTaq DNA polimerasa (Promega®) y 25 ng de ADN genómico de *H. pylori* en un volumen final de 50 µl. El ciclo térmico de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a $95^{\circ}\text{C}/2$ min, seguida de 35 ciclos ($95^{\circ}\text{C}/1$ min, $54^{\circ}\text{C}/1$ min, $53^{\circ}\text{C}/1$ min) para *pbp1a-1* (dominio transglicosilasa) y $72^{\circ}\text{C}/1$ min y una extensión final a $72^{\circ}\text{C}/5$ min.

Los productos de amplificación por PCR fueron obtenidos por electroforesis a 80 voltios por 1 h en una cámara horizontal (spectroline bio-o-visión®). Estos se visualizaron mediante fluorescencia en luz UV (260/280 nm) en un transiluminador (spectroline bio-o-visión®) en gel de agarosa (sigma®) al 2% teñida con 1 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Para determinar el tamaño de los amplificadores de todos los genes se empleó un marcador de peso de 100 pb (Fermentas®); el tamaño amplicon fue de 340 pb para *pbp1a-1* dominio transglicosilasa. Los cebadores se diseñaron empleando la secuencia para el gen *pbp1a* código GenBank: AE000511.1 en el software Primer3V 0.4.0¹⁴.

Secuenciación e identificación de mutaciones

Los amplificadores purificados del gen *pbp1a* se secuenciaron en ambos sentidos (sentido y antisentido) empleando el analizador genético (ABI 3130 Applied Biosystem®) y

Tabla 2 Agrupación de los pacientes en intervalos de edades

Edad (años)	Hombres	Mujeres
18-34	25 (16.8%)	29 (19.5%)
36-47	21 (14.1%)	32 (21.5%)
48-68	23 (15.5%)	19 (12.8%)
Total	69 (46.3%)	80 (53.7%)

la metodología Big Dye Terminator (Applied Biosystem®), conforme a las condiciones estandarizadas en el Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad de Valle. Se empleó el software BioEdit v 7.1.11® en la edición, alineamiento y traducción de las secuencias. Los cambios en las secuencias se cotejaron mediante el alineamiento local, con la secuencia referencia para el gen *pbp1a* de la cepa de *H. pylori* 26695 código GenBank AE000511.1.¹⁵

Se exportó el alineamiento en formato FASTA y se abrió en bloc de notas; la información se copió y pego en un libro de Excel donde se adicionó la fórmula lógica (DatoX=Dato Y)*1, la cual presentó valores de 0 para datos diferentes entre las secuencias alineadas y 1 para datos iguales. Para cada muestra se determinaron los cambios. Para las muestras de *pbp1a* adicionalmente se tradujo el ADN a proteína en el software BioEdit, y se realizó el mismo análisis para determinar los cambios.

Análisis estadístico

Se estimó la frecuencia y proporción de aislados resistentes de la población de Túquerres. El rendimiento de la amplificación y secuenciación de los fragmentos del gen *pbp1a* se evaluó mediante análisis descriptivos. Se estimó la frecuencia de las mutaciones en los genes; para las variables de mutaciones en gen *pbp1a* solo se realizaron análisis descriptivos por el bajo número de muestras al comparar la resistencia *in vivo* con *in vitro* (entre 0 a 3 datos).

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH) de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, regulado por la Resolución 008430 del 4/1993 de octubre, emitida por el Ministerio de Salud de Colombia.

Resultados

De los 149 participantes el 53.7% (80/149) fueron de sexo femenino y 29 de ellas tuvieron edades entre los 18-34 años, mientras que en los de sexo masculino 25 presentaron edades entre los 18-34 años (tabla 2).

En 147 de los 149 participantes se aisló la bacteria, y al evaluar la resistencia antimicrobiana a amoxicilina *in vitro* mediante el método de dilución en agar en los aislados de *H. pylori* se observó que 139/147 (94.6%) de los aislados fueron susceptibles y 8/147 (5.4%) presentaron resistencia *in vitro* a amoxicilina (tabla 3). La distribución por sexo fue del 50% en los aislados resistentes y fueron obtenidos a partir de

Tabla 3 Características de los aislados resistentes tras la evaluación de la susceptibilidad *in-vitro* a amoxicilina

	N = 147
Susceptible	139 (94.6%)
Resistente	8 (5.4%)
Total	147 (100.0%)

Tabla 4 Características de los pacientes con aislados resistentes

Edad (años)	N = 8
19-35	2 (20.0%)
36-47	4 (60.0%)
48-68	2 (20.0%)
Sexo	
Masculino	4 (50.0%)
Femenino	4 (50.0%)

pacientes con edades entre 19-35, 36-47 y 48-65 años (tabla 4).

La amplificación por PCR del gen *ureA* fue positiva para los 147 aislados obtenidos, y la amplificación por PCR de los dominios transglucosilasa (PBP1A) del gen *pbp1a* de *H. pylori* se realizó en el 87.5% de los aislados resistentes *in vitro* a amoxicilina, y en el análisis de la secuenciación del ADN de los 8 aislados resistentes se observaron un total de 2 cambios de aminoácidos. Los cambios en los aminoácidos se presentaron a partir de 3 mutaciones en el ADN que codifica para la proteína PBP1A-1. Los cambios se evaluaron en relación con la secuencia de la cepa de *H. pylori* 26695, susceptible a la amoxicilina. La mutación F125L se observó en 6 de los aislados, mientras que la mutación I79V se observó en 4 de los aislados (tabla 5).

Discusión y conclusiones

La amoxicilina es un antibiótico comúnmente utilizado en la terapia de erradicación del *H. pylori*. Aunque la mayoría de los aislados de *H. pylori* aún son susceptibles a la amoxicilina, la resistencia a este antibiótico está emergiendo en aislamientos clínicos, especialmente en países donde este antibiótico se distribuye ampliamente en la comunidad sin fórmula médica¹⁶. Hasta el momento el mecanismo molecular subyacente a la resistencia a la amoxicilina solo se ha identificado para unos pocos aislados de *H. pylori* resistentes a amoxicilina; en estos aislamientos la resistencia estuvo mediada por mutaciones en el gen que codifica PBP1A¹⁶.

Las proteínas de unión a la penicilina o PBP son un grupo de proteínas que se caracterizan por su afinidad y unión a la penicilina, son enzimas que participan en la síntesis y el mantenimiento de la capa de peptidoglicano de la pared celular bacteriana¹⁶, y es importante tener en cuenta que hay 2 tipos: PBP1A y PBP2A⁷. La resistencia se produce a través de modificaciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBP), lo que conduce a una disminución de la afinidad por el medicamento. Estas modificaciones incluyen mutaciones y/o mosaicos en PBP2X y PBP2B, así como en PBP1A para los aislamientos altamente resistentes¹⁴.

Tabla 5 Descripción de las mutaciones en ADN en las secuencias de *pbp1a-1* en los aislados de *H. pylori*

<i>H. pylori</i> 26695		Cambio					
Codón-i	AAi	ADN	Codón-f	AAf	Mutación	R	%
TTT	F	T373C/T375C	CTC	L	F125L	6	60
ATT	I	A235G	GTT	V	I79V	4	40
Total						10	100

AAi: aminoácido original codificado por codón-i; AAf: aminoácido codificado por el codón-f; Codón-f: secuencia del codón mutado en las cepas resistentes de *H. pylori*; Codón-i: secuencia del codón original en la cepa de *H. pylori* 26695; R: número de mutaciones observadas en la muestra.

Los estudios orientados a evaluar la susceptibilidad de *H. pylori* a amoxicilina en Colombia son escasos; estos difieren en la metodología de análisis de la susceptibilidad y en la prevalencia de la resistencia. En esta investigación la prevalencia de la resistencia a amoxicilina en los aislados de *H. pylori* provenientes de la población de Túquerres fue del 5.4% (8/147), valor muy similar a los reportados en estudios previos; en la ciudad de Bogotá fue reportada la proporción de la resistencia del 7% (6/84) mediante la técnica de difusión en disco¹⁰, y del 3.8% (3/79) mediante la técnica de E-test¹¹, y contrasta con lo reportado en aislados de *H. pylori* del eje cafetero (Armenia y Pereira), donde no se presentó resistencia a la amoxicilina¹⁵. Estos registros muestran variación geográfica de la prevalencia en la resistencia a amoxicilina en Colombia, donde los contrastes en la prevalencia de la resistencia pudieran ser explicados por una mayor exposición al antimicrobiano^{17,18}.

En los aislados resistentes provenientes de la población de Túquerres se encontraron variantes y cambios de aminoácidos polares sin carga F125L, I79V. Si bien la asociación de estas mutaciones pudiera estar explicada por su presencia próxima a los sitios de actividad enzimática SKN368-371, SNN433-435, KTG555-557 de la proteína PBP localizados en la región C-terminal, donde las mutaciones provocan cambios conformacionales en las PBP que disminuyen la afinidad de unión a la amoxicilina, dando lugar a fenotipos resistentes¹⁹, también pueden asociarse a la presencia de mutaciones como A296V, A494H, A541M, Q572G en gen *pbp2*, A499V y Q536L en *pbp3*, los cuales se encuentran fuera de las regiones evaluadas en este estudio^{20,21}.

A pesar de que las mutaciones en el gen *pbp1a* se asocian con resistencia a la amoxicilina en *H. pylori*, existen otros genes que pudieran ser responsables del fenotipo resistente, como la presencia de mutaciones en el gen *hopC* y la delección en el gen *hopB* de *H. pylori* codificante por porinas, que al presentarse permiten a la bacteria sobrevivir a concentraciones de 125 mg/l y 250 mg/l de amoxicilina respectivamente²². Adicionalmente, si los cambios son simultáneos a mutaciones en el gen *pbp1a* se observa crecimiento de la bacteria hasta concentraciones de 400 mg/l de amoxicilina, lo que sugiere un efecto aditivo²³. Entre las características asociadas a la resistencia se encuentra la presencia de betalactamasas, como describe una investigación en la cepa de *H. pylori* 3778, donde se encontró un producto idéntico a beta-lactamaseTEM-1 (GenBank acceso: EU726527) que permitía a esta cepa crecer en medios con concentraciones de amoxicilina mayores 256 mg/l²⁴; la resistencia a la amoxicilina es poco probable que se dé por bombas de eflujo, debido a que este antibiótico presenta

una hidrofobicidad muy baja, lo que es un requisito indispensable en fármacos que son sustratos de este tipo de estructuras²⁵.

Esta investigación constituye el primer reporte sobre las mutaciones en el gen *pbp1a* en aislados de *H. pylori* provenientes de las poblaciones de Túquerres; se encontraron mutaciones no reportadas en investigaciones previas. A pesar de estos resultados se sugiere evaluar el efecto de las mutaciones en diseños de mutación dirigida o modelación, con el fin de identificar su verdadero aporte a la resistencia a amoxicilina.

Fortalezas y limitaciones del estudio

El objetivo de este estudio fue caracterizar las mutaciones presentes en el gen *pbp1a* y su posible asociación con la resistencia a la amoxicilina *in vitro* en pacientes de la población de Túquerres, ubicada en los Andes de Colombia, con prevalencia de *H. pylori* (> 80%) y alto riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico usando técnicas de identificación microbiológicas y moleculares de *H. pylori*, que permitieron una mayor seguridad de los resultados obtenidos, aunque se requieren estudios en los cuales se evalúen aislados de las diferentes regiones de Colombia o también de diferentes regiones del mundo, con el fin de identificar mutaciones propias de las cepas circulantes en el medio y su asociación no solo a la resistencia a amoxicilina sino también a otros fármacos empleados en la erradicación para disminuir el fracaso del tratamiento.

Financiación

Este proyecto fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de la República de Colombia-COLCIENCIAS, Beca No. RC: 1902002; y por el Registro Poblacional de Cáncer de Cali, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, al Laboratorio de Histopatología del Departamento de Patología de

la Universidad del Valle que nos permitieron utilizar las instalaciones para desarrollar esta investigación.

Al hospital San José de Túquerres, que nos permitió utilizar sus instalaciones para la toma de las muestras clínicas, de las cuales se obtuvieron los aislamientos de *H. pylori* empleados en esta investigación.

Agradecimientos a Colciencias y a la Universidad del Valle el apoyo y financiación a esta investigación. Finalmente, al grupo de investigación del Registro Poblacional de Cáncer de Cali y a sus miembros.

Referencias

1. Uribe Echeverry PT, Acosta Cerquera MA, Arturo Arias BL, et al. Prevalencia genotípica de *cagA* y *vacA* en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes colombianos. *Rev Cubana Med Trop*. 2018;70:18–26. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602018000300003&lng=es&nrm=iso.
2. Martínez Leyva L, Márquez Aleaga Y, Rodríguez González BL, et al. Presence of *cagA* gene and *vacA* cytotoxin of *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients. *Rev Cuba Med Mil*. 2016;45:1–9. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572016000400009&lng=es&nrm=iso.
3. Bustamante Rengifo JA, Matta AJ, Pazos AJ, et al. Effect of treatment failure on the *CagA* EPIYA motif in *Helicobacter pylori* strains from Colombian subjects. *World J Gastroenterol*. 2017;23:1980–9, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i11.1980>.
4. Matta AJ, Zambrano DC, Pazos AJ. Punctual mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in Colombian populations. *World J Gastroenterol*. 2018;24:1531–9, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v24.i14.1531>.
5. Barrientos Sánchez S, Serna Varona FS, Díez Ortega H, et al. Resistencia a la amoxicilina de cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de individuos con antibioterapia previa y sin esta. *Univ Odontol*. 2015;34:101–6.
6. Poursina F, Fagri J, Mirzaei N, et al. Overexpression of *spoT* gene in coccoid forms of clinical *Helicobacter pylori* isolates. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63:459–65, <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-017-0557-0>.
7. Egan AJF, Cleverley RM, Peters K, et al. Regulation of bacterial cell wall growth. *FEBS J*. 2017;284:851–67, <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13959>.
8. De Francesco V, Zullo A, Hassan C, et al. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2011;2:35–41, <http://dx.doi.org/10.4291/wjgp.v2.i3.35>.
9. Wu W, Yang Y, Sun G. Recent insights into antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* eradication. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:723183, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/723183>.
10. Yopez CA, Rodríguez A, Ruiz A, et al. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Médica Colomb*. 2008;33:11–4.
11. Trespacios AA, Otero W, Mercado M. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol*. 2010;25:31–8. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572010000100009&lng=en&nrm=iso.
12. Figueroa M, Cortés A, Pazos A, et al. Sensibilidad *in vitro* a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*. 2012;32:32–42, <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v32i1.454>.
13. Matta AJ, Pazos AJ, Bustamante Rengifo JA, et al. Genomic variability of *Helicobacter pylori* isolates of gastric regions from two Colombian populations. *World J Gastroenterol*. 2017;23:800–9, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i5.800>.
14. Huang L, Wang Z-Y, Pan D-D. Penicillin-binding protein 1A mutation-positive *Helicobacter pylori* promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer via the suppression of microRNA-134. *Int J Oncol*. 2019;54:916–28, <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2018.4665>.
15. Álvarez A, Moncayo JI, Santacruz JJ, et al. Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. *Rev Méd Chile*. 2009;137:1309–14, <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009001000005>.
16. Gerrits MM, Godoy APO, Kuipers EJ, et al. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2006;1:181–7, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00398.x>.
17. Kim JY, Kim NY, Kim SJ, et al. Regional difference of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Korea. *Korean J Gastroenterol*. 2011;57:221–9, <http://dx.doi.org/10.4166/kjg.2011.57.4.221>.
18. Lee JW, Kim N, Kim JM, et al. Prevalence of primary and secondary antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 through 2012. *Helicobacter*. 2013;18:206–14, <http://dx.doi.org/10.1111/hel.12031>.
19. Qureshi NN, Morikis D, Schiller NL. Contribution of specific amino acid changes in penicillin binding protein 1 to amoxicillin resistance in clinical *Helicobacter pylori* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:101–9, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00545-10>.
20. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, et al. Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*. 2007;51:939–44, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03990.x>.
21. Tshibangu-Kabamba E, Ngoma-Kisoko PJ, Tuan VP, et al. Next-generation sequencing of the whole bacterial genome for tracking molecular insight into the broad-spectrum antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates from the Democratic Republic of Congo. *Microorganisms*. 2020;8:887, <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8060887>.
22. Eng NF, Ybazeta G, Chapman K, et al. Antimicrobial susceptibility of Canadian isolates of *Helicobacter pylori* in Northeastern Ontario. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2015;26:137–44, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/853287>.
23. Matteo MJ, Granados G, Olmos M, et al. *Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:474–7, <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm504>.
24. Tseng YS, Wu DC, Chang CY, et al. Amoxicillin resistance with beta-lactamase production in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:807–12, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02166.x>.
25. Hashemi SJ, Sheikh AF, Goodarzi H, et al. Genetic basis for metronidazole and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastroduodenal disorders. *Infect Drug Resist*. 2019;12:535–43, <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S192942>.