



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN
BACTERIOLOGÍA



MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Expresión de *HP0605* y *HP0971* de bombas de eflujo en cepas de
Helicobacter pylori resistentes a claritromicina aisladas de
pacientes con patología gástrica**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q.B.P. Maria Magdalena Del Carmen Vergara

DIRECTOR:

Dr. Adolfo Román Román

CODIRECTORA:

Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo

Chilpancingo, Guerrero, Enero de 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 11 días del mes de julio de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Expresión de HP0605 y HP0971 de bombas de eflujo en cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a claritromicina aisladas de pacientes con patología gástrica", presentada por la alumna María Magdalena Del Carmen Vergara, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dr. Adolfo Román Román
Dirección de tesis

Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo
Codirección de tesis

Dra. Isela Parra Rojas

Dra. Verónica Iranzú Martínez Santos

M en C. Carlos Alberto Castañón Sánchez

Vo. Bo

Dr. Daniel Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021

Vo. Bo

Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de investigación en Bacteriología y Laboratorio de investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo, Guerrero; y en el Instituto Estatal de Cancerología de Guerrero Dr. Arturo Beltrán Ortega, en Acapulco, Guerrero.

Bajo la dirección de:
Dr. Adolfo Román Román

La co-dirección de:
Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo

La asesoría externa de:
M. en C. Carlos Alberto Castañón Sánchez

La asesoría interna de:
Dra. Verónica Irazú Martínez Santos
Dra. Isela Parra Rojas

La investigación se realizó con el financiamiento del FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT, CONVOCATORIA 2012, Clave 2012-01-182778.

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la Q.B.P. Maria Magdalena Del Carmen Vergara recibió beca por parte del CONACYT.



Agradecimientos

A mi director de tesis...

Dr. Adolfo, sin su apoyo, comprensión e infinita paciencia no habría logrado culminar este proyecto. Gracias por animarme a seguir cuando estaba a punto de abandonar esto. Es una excelente persona, maestro y amigo, no pude haber elegido un mejor director.

A mi Codirectora...

Dra. Dinorah, por el tiempo dedicado a mejorar este trabajo, por las observaciones y consejos dados. Por guiarme cuando me perdía, apoyarme y darme la confianza que necesité en el transcurso de este viaje.

A la Dra. Verónica...

Por tomarse el tiempo de revisar y corregir este trabajo, sus valiosas observaciones y sugerencias siempre fueron de gran utilidad.

Al Dr. Carlos...

Por el interés mostrado y por hacernos el honor de acompañarnos en cada sesión para mejorar este trabajo. Sus aportaciones siempre fueron muy valiosas.

A la Dra. Isela...

Por el tiempo dedicado a este proyecto y las observaciones realizadas.

Al Dr. Salomón y la Enf. Lalis...

Por el apoyo y disposición mostrados en la captación de pacientes, por todas las atenciones mostradas y hacerme sentir como en casa. Sin ustedes nada de esto sería posible.

Al laboratorio de Investigación Clínica...

En especial a las químicas **Sarita**, **Dianita** y a la **maestra Jose**, por apoyarme e instruirme en el trabajo de Laboratorio.

A **Fernanda, Migue y Adrián** por su apoyo al comienzo del proyecto en el muestreo realizado para este trabajo.

A las señoras bebés...

Saris, Gaby, Juju, Deivid y Sandris, sin su apoyo, consejos y regaños no hubiera terminado esta etapa, por creer en mi cuando ni yo lo hacía. Se convirtieron en grandes amigos, de verdad los quiero mucho y espero me sigan otorgando el tremendo honor de brindarme su amistad. Porque a pesar de los títulos y grados que tienen son tan humildes. Por siempre estar en la mejor disposición de ayudar a cualquier pobre estudiante perdida (en este caso yo). Los quiero mucho bebés, les deseo todo el éxito del mundo, son las personas más dedicadas e inteligentes que he conocido, nunca cambien y sigan haciendo lo que les gusta, los quiero ver ganando, como siempre.

A Luis...

Por ser mi compañero estos dos años, hemos comenzado y terminado algunas etapas de nuestra vida juntos y me alegro ver que los dos estamos creciendo y logrando metas poco a poco, ojalá lo sigamos haciendo. Por levantarme el ánimo cuando lo necesitaba y alegrar mis días. Por ser una personita especial en mi vida y a pesar de la distancia, el tiempo y las dificultades presentadas, caminar a mi lado.

A Chemis, Sayu, Fercho y Aivons...

Por brindarme su amistad y compartir las penas y alegrías en estos más de dos años, por animarme a seguir y siempre darle humor a nuestras tragedias. Me alegro mucho de haberlos conocido, son excelentes personas y les deseo lo mejor del mundo amikos.

Dedicatorias

A Dios... todas las bendiciones y mi más grande tesoro, mi familia. Por darme a los mejores padres del mundo y unas hermanas maravillosas. Por cada día de vida, por todo...

A mis padres, **Jesús** y **Yannet**, sin su apoyo no sería quién soy ahora, gracias por comprenderme y respaldarme en todo momento. En los momentos difíciles siempre pienso en ustedes y son mi mayor inspiración para seguir adelante, para no rendirme. Espero que se sientan orgullosos de mí y que sepan que todos y cada uno de sus sacrificios han valido la pena. Los amo infinitamente.

A mis hermanas y sobrino, **Wabis**, **Chais**, **Molichi**, **Pachomi** y **Lichi**, por todas sus ocurrencias. Cuando estamos todos juntos me recargan de energía y me hacen olvidar todos los problemas. Los quiero como no tienen idea y de alguna u otra forma han contribuido para que yo llegara a este punto, este logro también es de ustedes.

**Expresión de *HP0605* y *HP0971* de bombas de eflujo en cepas de
Helicobacter pylori resistentes a claritromicina aisladas de
pacientes con patología gástrica**

Índice

I.	Resumen	3
II.	Abstract.....	4
III.	Introducción	5
IV.	Material y métodos	9
V.	Resultados.....	13
VI.	Discusión	21
VII.	Anexos.....	26
VIII.	Referencias.....	32

I. Resumen

En los últimos años se ha observado un aumento en la prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en diferentes regiones, asociado principalmente al aumento de cepas resistentes a diferentes antibióticos. El fármaco de mayor importancia en la terapia de erradicación es la claritromicina y el mecanismo de resistencia más estudiado es la presencia de mutaciones puntuales en el gen 23S *rRNA*, sin embargo, recientemente ha surgido la posible participación de las bombas de eflujo en la extrusión de claritromicina como un mecanismo de resistencia. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el nivel de expresión de los genes *HP0605* y *HP0971* de bombas de eflujo en cepas de *H. pylori* sensibles y resistentes a claritromicina. Un total de 49 pacientes fueron incluidos en el estudio, de los cuales se aislaron 14 cepas de *H. pylori*. Mediante el método de Kirby Bauer se evaluó la resistencia a claritromicina. El nivel de expresión de *HP0605* y *HP0971* se determinó mediante qRT-PCR. Del total de aislamientos, sólo dos cepas fueron resistentes a claritromicina (IEC-177 y UEGE-902), lo que significa una prevalencia de resistencia de 16.6%. Al evaluar la presencia de las mutaciones, la cepa UEGE-902 presentó la mutación A2142G. En la cepa IEC-177, ambos genes tuvieron un mayor nivel de expresión en comparación con los aislamientos sensibles, mientras que la cepa UEGE-902 presentó un nivel de expresión similar a varios aislamientos sensibles e, interesantemente, algunos aislamientos sensibles tuvieron un mayor nivel de expresión que ésta. No se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión de ambos genes entre las cepas con genotipos *cagA+*, *cagA-*, *vacA s1m1* y *vacA s2m2*. El nivel de expresión de ambos genes no presentó las diferencias esperadas entre los aislamientos sensibles y los resistentes.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, bombas de eflujo, *HP0605*, *HP0971*, claritromicina, resistencia.

II. Abstract

In recent years there has been an increase in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different regions, mainly associated with the increase in strains resistant to different antibiotics. The most important drug in eradication therapy is clarithromycin and the most studied resistance mechanism is the presence of point mutations in the 23S *rRNA* gene, however, the possible involvement of efflux pumps in the extrusion of effusion has recently emerged. Clarithromycin as a mechanism of resistance. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the level of expression of the *HP0605* and *HP0971* genes of efflux pumps in strains of *H. pylori* sensitive and resistant to clarithromycin. A total of 49 patients were included in the study, of which 14 strains of *H. pylori* were isolated. The resistance to clarithromycin is evaluated by Kirby Bauer's method. The expression level of *HP0605* and *HP0971* was determined by qRT-PCR. Of the total isolates, only two strains were resistant to clarithromycin (IEC-177 and UEGE-902), which means a prevalence of resistance of 16.6%. When evaluating the presence of mutations, strain UEGE-902 presented the A2142G mutation. In strain IEC-177, both genes had a higher level of expression compared to sensitive isolates, while strain UEGE-902 had a level of expression similar to several sensitive isolates and, interestingly, some sensitive isolates had a higher level. of expression that is. No differences were observed in the level of expression of both genes between strains with genotypes *cagA* +, *cagA*-, *vacA s1m1* and *vacA s2m2*. The expression level of both genes did not show the expected differences between sensitive and resistant isolates.

KEYWORDS: *Helicobacter pylori*, efflux pump, *HP0605*, *HP0971*, clarithromycin, resistance.

III. Introducción

Helicobacter pylori es un bacilo espirilar, Gram negativo, con una longitud de 2-4 µm y 0.5-1 µm de ancho, posee de 4 a 6 flagelos con un bulbo distintivo final que incrementa su movilidad en el mucus del cuerpo gástrico (Li, 2015; Kamboj *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2018). *H. pylori* es un microorganismo microaerófilo, que se desarrolla adecuadamente a una temperatura de 34-40°C, requiere de 5-8% de O₂ y 5-10% de CO₂ en un ambiente de alta humedad (Li, 2015).

La infección por *H. pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial, las tasas de infección reportadas varían entre diferentes regiones, con una mayor prevalencia en países en desarrollo (Zamani *et al.*, 2018; Gravina *et al.*, 2018). Un metaanálisis realizado por Hooi *et al.*, en 2017 reporta que las regiones con mayor prevalencia son África (79.1%), América Latina y el Caribe (63.4%) y Asia (54.7%). En México, un estudio realizado por Alarid-Escudero *et al.*, en 2017 reportó una prevalencia nacional de 86.1%.

H. pylori coloniza el mucus del epitelio gástrico, en donde puede provocar inflamación crónica progresiva y una variedad de enfermedades gastroduodenales que incluyen: gastritis crónica atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico, en 1 a 10% de los individuos colonizados (Savoldi *et al.*, 2018; Debraekeleer y Remaut, 2018; Rizvanov *et al.*, 2019). El resultado final de la infección por *H. pylori* está determinado por una interacción compleja entre factores bacterianos, del hospedero y ambientales (Jemilohun y Otegbayo, 2016; Šterbenc *et al.*, 2019).

El cáncer gástrico es la quinta neoplasia maligna más común y la tercera causa principal de morbilidad relacionada con el cáncer en todo el mundo (Díaz *et al.*, 2018; Ierardi *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la erradicación de la infección por *H. pylori* reduce la incidencia de cáncer gástrico, sin embargo, la eficacia del tratamiento de erradicación ha disminuido drásticamente en los últimos años, debido al aumento de la resistencia a antibióticos (Savoldi *et al.*, 2018; Nishisawa *et al.*, 2014).

Inicialmente, la terapia triple estándar desarrollada en 1990 se recomendó como la primera línea de tratamiento en pacientes positivos para *H. pylori*, debido a la

elevada tasa de erradicación inicialmente obtenida (White *et al.*, 2015; Jemilohun y Otegbayo, 2016). Esta terapia consiste en la administración de los antibióticos claritromicina (Clr) y amoxicilina (Amx), y un inhibidor de bombas de protones (IBP) durante una semana (Burkitt *et al.*, 2017; White *et al.*, 2015; Jemilohun y Otegbayo, 2016).

Gracias a su efecto bactericida sobre *H. pylori*, la claritromicina es reconocida como el antibiótico más importante dentro del tratamiento de primera línea (Talebi, 2014). La claritromicina es un macrólido bacteriostático estable al ácido que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas mediante su unión a la región V de la subunidad ribosomal 23S (23S *rRNA*) (Flores-Treviño *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2016). El incremento de la resistencia a claritromicina disminuye drásticamente la tasa de erradicación de *H. pylori* (Nishizawa y Suzuki, 2014; Serrano *et al.*, 2017). La presencia de mutaciones puntuales en la región peptidiltransferasa codificada en el dominio V del gen 23S *rRNA* confiere a *H. pylori* resistencia a los macrólidos (Vianna *et al.*, 2016; Rizwan *et al.*, 2014). Estas mutaciones inhiben la unión de la claritromicina a su sitio blanco, evitando así, ejercer su efecto sobre la bacteria. Las principales mutaciones del gen 23S *rRNA* incluyen una transición de adenina a guanina en las posiciones 2142 (11.7%) y 2143 (69.8%), y una transversión de adenina a citosina en la posición 2142 (2.6%) (Matta *et al.*, 2018).

La prevalencia de la resistencia a claritromicina ha aumentado en diferentes regiones. Se ha demostrado que en países con tasas bajas de seropositividad para *H. pylori*, la prevalencia de resistencia a los antibióticos no parece cambiar considerablemente con el tiempo (Thung *et al.*, 2015). En contraste, los países con tasas más altas de seropositividad para *H. pylori* se asocian con tasas cada vez mayores de resistencia a la claritromicina (Thung *et al.*, 2015). En el Estado de Guerrero, México, Alarcón-Millán *et al.*, reportaron una prevalencia de resistencia a claritromicina del 17.8%, superior a lo establecido por los criterios de Maastricht, que recomiendan evitar la terapia triple estándar basada en claritromicina si la tasa de resistencia local la claritromicina supera el 15%.

Las bombas de eflujo son complejos de proteínas capaces de transportar moléculas desde el interior de la célula bacteriana hasta el espacio extracelular (Du *et al.*, 2018; Blanco *et al.*, 2016; Rahman *et al.*, 2017). Específicamente, las bombas RND se describieron por primera vez como un grupo de proteínas de transporte de membrana involucradas en la resistencia a metales pesados (*Ralstonia metallidurans*), nodulación (*Mesorhizobium loti*) y división celular (*Escherichia coli*) (Puzari y Chetia, 2017; Blair y Pidock, 2016). Están ubicadas en la membrana interna (MI), pero deben interactuar con una proteína adaptadora periplásmica (también llamada proteína de fusión de membrana) y el canal de membrana externa (ME), produciendo así un complejo de tres proteínas que abarca la MI, el periplasma y la ME (Puzari y Chetia, 2017; Geng *et al.*, 2017).

Los genes que codifican para bombas de eflujo se encuentran organizados en operones, su expresión está mediada por reguladores globales y locales que controlan y optimizan la expresión génica en respuesta a señales específicas (Puzari y Chetia, 2017; Geng *et al.*, 2017). La resistencia a antibióticos mediada por bombas de eflujo RND se describió por primera vez en *E. coli* mediante la sobreexpresión de proteínas Tet y su participación en la resistencia a tetraciclinas. También se ha demostrado la participación de estos transportadores en la resistencia a fluoroquinolonas y se sabe que el tratamiento con dichos antibióticos contribuye a la sobreexpresión de las bombas de eflujo (Spengler *et al.*, 2017; Gong y Yuan, 2018).

En *H. pylori* se han identificado cuatro sistemas de eflujo RND, codificados por los genes *HP0605–HP0607*, *HP0971–HP0969*, *HP1327–HP1329* y *HP1489–HP1487*. Los genes *HP0605* y *HP0971* son homólogos del gen *tolC* de *E. coli*, que codifica para la proteína de membrana externa TolC, mientras que los genes *HP0606* y *HP0970* (homólogos del gen *acrA*) codifican para la proteína de fusión, y finalmente, *HP0607* y *HP0969* (homólogos del gen *acrB*) codifican para la proteína de membrana interna (Hirata *et al.*, 2010; Geng *et al.*, 2017; Nishizawa y Susuki, 2014).

En el 2000, Bina *et al* identificaron tres sistemas de eflujo RND en *H. pylori*, denominados *hefABC*, *hefDEF* y *hefGHI*. En dicho estudio, *HP0605* (También denominada *hefA*) y *HP0971* (también denominado *hefD*) se expresaron tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, no se pudo establecer el papel de estos sistemas de eflujo en la resistencia a tetraciclina, cloranfenicol y claritromicina.

Van Amsterdam *et al.*, en el 2005 demostraron que al inactivar los genes *HP0605* y *HP0971* aumentaba la sensibilidad a novobiocina y metronidazol. Por otro lado, Hirata *et al.*, en 2010 demostraron que 15 cepas resistentes a claritromicina expresaban los genes *HP0605* y *HP0971* y, al añadir un inhibidor de bombas de eflujo la concentración mínima inhibitoria del fármaco (CMI) disminuyó en todas las cepas. Agudo *et al.*, en 2010, encontraron que el 19% (8/42) de las cepas resistentes a claritromicina carecían de mutaciones puntuales en el gen *23S rRNA* y proponen la participación de las bombas de eflujo RND en la resistencia a claritromicina.

Alarcón-Millán *et al.*, en 2016 observaron que de ocho cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina aisladas de pacientes dispépticos, sólo una presentaba mutaciones en el gen *23S rRNA*. Resultados similares fueron encontrados por Queck *et al.*, en 2016, quienes aislaron 165 cepas resistentes a claritromicina de pacientes en Vietnam y observaron que sólo ocho de las 165 cepas presentaban mutaciones en el gen *23S rRNA*, y sugieren la participación de otros mecanismos en la resistencia a antibióticos, como la presencia de bombas de eflujo. Por lo anterior, en el presente trabajo nos planteamos evaluar el nivel de expresión de los genes *HP0605* y *HP0971* de bombas de eflujo RND en aislamientos sensibles y resistentes con y sin mutaciones en el gen *23S rRNA* y establecer su posible papel en la resistencia al fármaco.

IV. Material y métodos

Pacientes

Se incluyeron 49 pacientes del Instituto Estatal de Cancerología “Arturo Beltrán Ortega” en Acapulco, Gro. y de la Unidad Especializada de Gastroenterología Endoscopia, en Chilpancingo, Gro., México que acudieron a realizarse una endoscopia por padecimientos gástricos. Los participantes del estudio firmaron una carta de consentimiento informado y contestaron una encuesta para registrar sus datos generales e historial clínico.

Obtención de biopsias

Después de un ayuno de 8 horas, el estudio endoscópico se realizó con un procesador de video y un gastroscopio de video (Fujinon, Wayne, NJ, EE. UU.). Durante el procedimiento se tomaron dos biopsias de cada paciente. La primera biopsia se depositó en caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Becton Dickinson, Carolina del Norte, EE. UU.) con 10% de glicerol para cultivo bacteriológico. La segunda biopsia se colocó en una solución tamponada (Tris 10 mM pH 8, EDTA 10 mM, SDS 0.5%) para la extracción de DNA.

Cultivo e identificación de *H. pylori*

La biopsia destinada al cultivo se maceró usando un aplicador de madera estéril y se colocaron 50 µl del homogenizado en una placa de agar Columbia (Becton Dickinson, North Caroline, EE. UU.), suplementado con 10% de sangre humana, 20% de plasma, Isovitalex (Becton Dickinson, North Caroline, EE. UU.) y suplemento selectivo antibiótico Dent (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a un pH de 6.8 - 7.0 y se distribuyó en la placa de cultivo. Las placas inoculadas se incubaron en condiciones microaerófilas con niveles de 10% de CO₂ a 37°C de 3 a 6 días. Los cultivos positivos para *H. pylori* se identificaron por morfología colonial (colonias pequeñas, transparentes de 1 mm de diámetro), tinción de Gram y pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa positiva). Los aislados se almacenaron a -70°C en 1 ml de caldo BHI (Becton Dickinson, North Caroline, EE. UU.) con 30% de glicerol.

Prueba de susceptibilidad a claritromicina

La susceptibilidad a claritromicina se determinó mediante el método de difusión en disco (Kirby Bauer) (Grignon *et al.*, 2002). A partir de subcultivos de 72 h identificados como *H. pylori* se diluyeron en caldo BHI estéril y se ajustaron a un estándar de 3.0 McFarland ($\geq 10^8$ UFC/ml de células viables) (Boyanova *et al.*, 2000). La suspensión bacteriana se extendió sobre placas de Petri con agar Columbia suplementado con 10% de sangre y plasma humano e Isovitalex a pH 6.8 a 7.0. El inóculo se dispersó con un hisopo estéril para cubrir completamente la superficie del medio. Se colocaron discos con 15 μ g de claritromicina (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) sobre la superficie de la placa. Las placas se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas (5% de O₂, 10% de CO₂) durante 72 h.

Extracción de DNA

De los aislamientos identificados como *H. pylori*, se realizaron subcultivos incubando bajo las condiciones anteriormente descritas. El DNA total se extrajo mediante la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrook y Russel, 2001). Una vez obtenido el DNA se rehidrató en agua desionizada estéril (Anexo 3). La concentración total de DNA se determinó en el NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). El DNA de las cepas aisladas se almacenó a -20°C hasta su uso.

Genotipificación de *vacA* y *cagA* de *H. pylori*

La genotipificación de *vacA* y *cagA* se realizó mediante PCR punto final con oligonucleótidos específicos para cada región (Tabla 1). En todos los casos la amplificación se llevó a cabo utilizando 50 ng de DNA en un volumen de mezcla de reacción de 20 μ l. La determinación de *cagA* se realizó utilizando 1.7 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs y 1 U de Taq DNA polimerasa. Para *vacA* la mezcla de reacción consistió en 2 mM de MgCl₂, 0.18 mM de dNTPs y 1 U de Taq DNA polimerasa.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en este estudio

Oligonucleótidos	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del producto amplificado (pb)	Referencia	Condiciones
cagA F1	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	349	Park <i>et al.</i> (2001)	30 ciclos a 94°C por 40 s, 55.5°C por
cagA B1	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA			
cagA2F	GGAACCCTAGTCGGTAATG	500/850	Rudi <i>et al.</i> (1998)	30 s y 72°C por 50 s
cagA2R	ATCTTTGAGCTTGTCTATCG			
VA1 F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259/286	Atherton <i>et al.</i> (1995)	30 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C
VA1 R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC			
VacA_s	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	570/645	Atherton <i>et al.</i> (1999)	por 1 min y 72°C por 1 min
VacA_{AS}	GCGTCTAAATAATTCCAAGG			

Extracción de RNA y retrotranscripción

De los aislamientos identificados como *H. pylori*, se realizaron subcultivos incubados bajo las condiciones anteriormente descritas. Se disolvió un conjunto de colonias de cada cultivo en 1000 µl de PBS 1x y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min, se realizaron tres lavados más. Posteriormente se realizó la extracción de RNA total con el reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se rehidrató en H₂O DEPC. Para la síntesis de cDNA, se realizaron diluciones del RNA con H₂O DEPC. Posteriormente, 50 µl de las muestras se agregaron a una mezcla de reacción de 20 µl que contiene 1 µl de random primers, 1 µl de M-MLV (40 U/µl) (Invitrogen Life Technologies), 4 µl de dNTPs (2.5 mmol/l), 4 µl de buffer 5x First Strand, 2 µl de DTT (0.1 M) y 1 µl de RNase OUT Recombinant Ribonuclease

Inhibitor (40 U/ μ l). La síntesis de cDNA se realizó a 25°C por 10 minutos, seguido de 50 minutos a 37°C. Finalmente, la reacción se inactivó a 70°C durante 15 min.

q-PCR

Los niveles de mRNA de *HP0605* y *HP0971* se determinaron mediante PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan. Se realizaron curvas estándar utilizando diluciones seriadas de cDNA. Se prepararon mezclas de reacción de 10 μ l, usando 50 ng de cDNA, 5 μ l Taqman UNIVERSAL MASTER y 0.5 μ l de sondas Taqman. La PCR se llevó a cabo a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 60 s según las instrucciones del fabricante.

V. Resultados

5.1. Características de la población e infección por *H. pylori*.

Se analizaron 49 biopsias de pacientes con patología gástrica que acudieron a realizarse un estudio endoscópico al Instituto Estatal de Cancerología. Los participantes de entre 40-59 años presentaron un porcentaje mayor de positividad al cultivo de *H. pylori* (18.37%). Los hombres tuvieron una mayor participación en el estudio que las mujeres, sin embargo, el porcentaje de positividad al cultivo de *H. pylori* fue el mismo 14.29% (7/49) en ambos casos. El 81.6% (40/49) de los participantes tuvieron un diagnóstico preliminar de gastritis crónica activa, en el 28.57% (14/38) de los casos se aisló *H. pylori* (Tabla 2).

Tabla 2. Características generales de los participantes en el estudio y frecuencia de la infección por *H. pylori*.

	Hp Positivo n (%) N=14	Hp Negativo n (%) N=35
Edad		
20-39	0 (0)	7 (14.29)
40-59	9 (18.37)	15 (30.61)
> 60 años	5 (10.20)	13 (26.53)
Género		
Femenino	7 (14.29)	15 (30.6)
Masculino	7 (14.29)	20 (40.82)
Diagnóstico endoscópico		
Gastritis crónica	14 (28.57)	26 (53.06)
Cáncer gástrico	0 (0)	9 (18.37)

Posteriormente se realizó el diagnóstico molecular por PCR del gen *16S rRNA* de *H. pylori* y por cultivo en las biopsias de pacientes con patología gástrica. Los resultados obtenidos mostraron que el diagnóstico positivo por PCR fue mayor (38.78%), con respecto al cultivo (28.57%). Todos los aislamientos identificados como *H. pylori* por cultivo (14/14) se confirmaron mediante PCR del gen *16S rRNA* (Tabla 3).

Tabla 3. Detección de *H. pylori* por cultivo y PCR

Resultado	Cultivo n (%) n=49	PCR 16S n (%) n=49
Positivo	14 (28.57)	19 (38.78)
Negativo	35 (71.43)	30 (61.22)

5.2. Genotipificación de *cagA* y *vacA* de aislamientos de *H. pylori*

Los aislamientos identificados como *H. pylori* se genotipificaron para *cagA* y *vacA* mediante PCR punto final. Las variantes alélicas del gen *vacA* se determinaron en el 100% de las cepas. El genotipo *s1m1* se encontró en el 78.57% (11/14) de las cepas, mientras que el genotipo *s2m2* se detectó en el 21.43% de los aislados (3/14). El gen *cagA* se encontró en el 85.71% (12/14) de los aislamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de los genotipos *vacA* y *cagA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con patología gástrica

Genotipo		n (%) n=14
<i>cagA</i>	Positivo	12 (85.71)
	Negativo	2 (14.29)
<i>vacA</i>	<i>s1m1</i>	11 (78.57)
	<i>s2m2</i>	3 (21.43)
<i>vacA/cagA</i>	<i>vacA s1m1/cagA+</i>	10 (71.43)
	<i>vacA s1m1/cagA-</i>	1 (7.14)
	<i>vacA s2m2/cagA+</i>	2 (14.29)
	<i>vacA s2m2/cagA-</i>	1 (7.14)

5.3. Susceptibilidad a claritromicina.

Se analizó la resistencia a claritromicina mediante el método de Kirby-Bauer de los 14 aislamientos obtenidos. El 16.66% (2/14) de las cepas aisladas presentó resistencia a claritromicina (Figura 1).

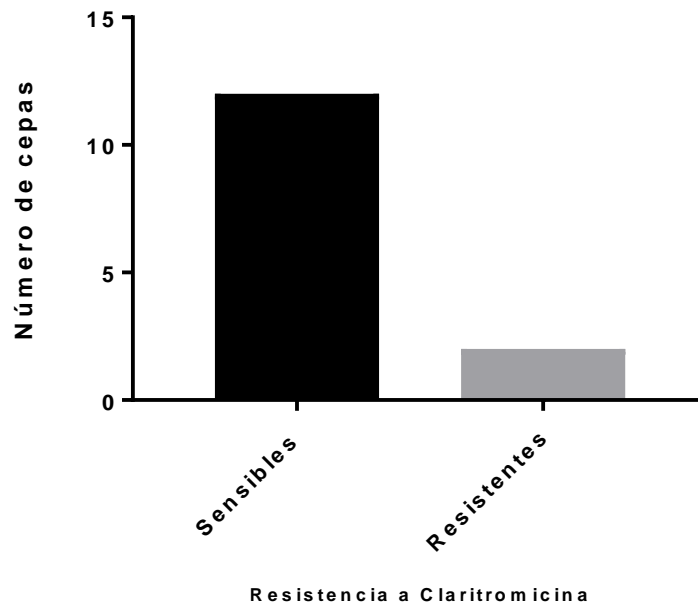


Figura 1. Resistencia a claritromicina de cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas.

5.4. Expresión relativa de *HP0605* y *HP0971* en aislamientos de *H. pylori*.

Mediante qRT-PCR se evaluó la expresión relativa de los genes de bombas de eflujo *HP0605* y *HP0971* utilizando el gen *16S rRNA* como gen endógeno para normalizar los valores obtenidos en 14 cepas de *H. pylori* resistentes y sensibles a claritromicina aisladas de pacientes con patología gástrica. La cepa IEC-177 (Clr^R) presentó una expresión significativamente mayor del gen *HP0605* en comparación con 11 aislamientos sensibles a este antibiótico (**p<0.01, ***p<0.001) (Figura 2A), mientras que para el gen *HP0971* la expresión fue mayor en comparación con los 12 aislamientos sensibles a claritromicina (Figura 2C). Por otro lado, en el aislamiento UEGE-902 (Clr^R) se observó un nivel de expresión significativamente

mayor del gen *HP0605* en comparación con 4 de los aislamientos sensibles (IEC-192, IEC-199, IEC-206 e IEC-207) (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$); interesantemente, en 3 de los aislamientos sensibles a claritromicina (IEC-179, IEC-198 e IEC-212) se observó un mayor nivel de expresión del gen *HP0605* en comparación con la cepa UEGE-902 (Figura 2A). El nivel de expresión del gen *HP0971* fue mayor en la cepa UEGE-902 que en 4 de los aislamientos sensibles a claritromicina (IEC-172, IEC-192, IEC-198, IEC-199), mientras que en las cepas sensibles IEC-174, IEC-175, IEC-179 e IEC-195 el nivel de expresión fue mayor que en la cepa UEGE-902 (Figura 2C).

Al comparar la expresión del gen *HP0605* en veces de cambio en los aislamientos en comparación con la cepa control ATCC 26695 (Clr^S) (Figura 2B), se observó que en la cepa IEC-177 (Clr^R) se expresó más de 80 veces que en la cepa control, sin embargo, en dos aislamientos sensibles (IEC-179 e IEC-198) tuvo un nivel de expresión similar a ésta. En la cepa UEGE-902 (Clr^R) el gen *HP0605* se expresó 4 veces más que en la cepa control, similar a lo observado en 3 de los aislamientos sensibles a claritromicina (IEC-172, IEC-174 e IEC-212). En 5 de los aislamientos sensibles a claritromicina, la expresión del gen *HP0605* fue menor en comparación con la cepa resistente UEGE-902. Interesantemente, en dos de los aislamientos sensibles a claritromicina (IEC-179 e IEC-198) el gen *HP0506* se expresó entre 60 a 80 veces más que en la cepa resistente UEGE-902.

Con respecto al gen *HP0971*, se observó que en la cepa IEC-177 la expresión de este gen fue de 5000 veces más en comparación con la cepa control (Figura 2D). En las cepas sensibles a claritromicina el gen *HP0971* se expresó entre 2 y 2000 veces más que en la cepa control (Figura 2D). La cepa UEGE-902 (Clr^R) expresó el gen *HP0971* 35 veces más que la cepa control, similar a lo observado en la cepa IEC-207 (Clr^S). Por otro lado, en cuatro de los aislamientos sensibles a claritromicina (IEC-174, IEC-175, IEC-179 e IEC-195) la expresión del gen *HP0971* fue mayor que en la cepa resistente (Figura 2D).

Posteriormente se procedió a evaluar el nivel de expresión entre ambos aislamientos resistentes, debido a que la cepa UEGE-902 presenta la mutación

A2142G, asociada con la resistencia a claritromicina, mientras que la cepa IEC-177 no presenta ninguna de las mutaciones asociadas con la resistencia al fármaco. Los resultados mostraron que en la cepa IEC-177 el nivel de expresión de los genes *HP0605* y *HP0971* fue significativamente mayor que en la cepa UEGE-902 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) (Figura 3).

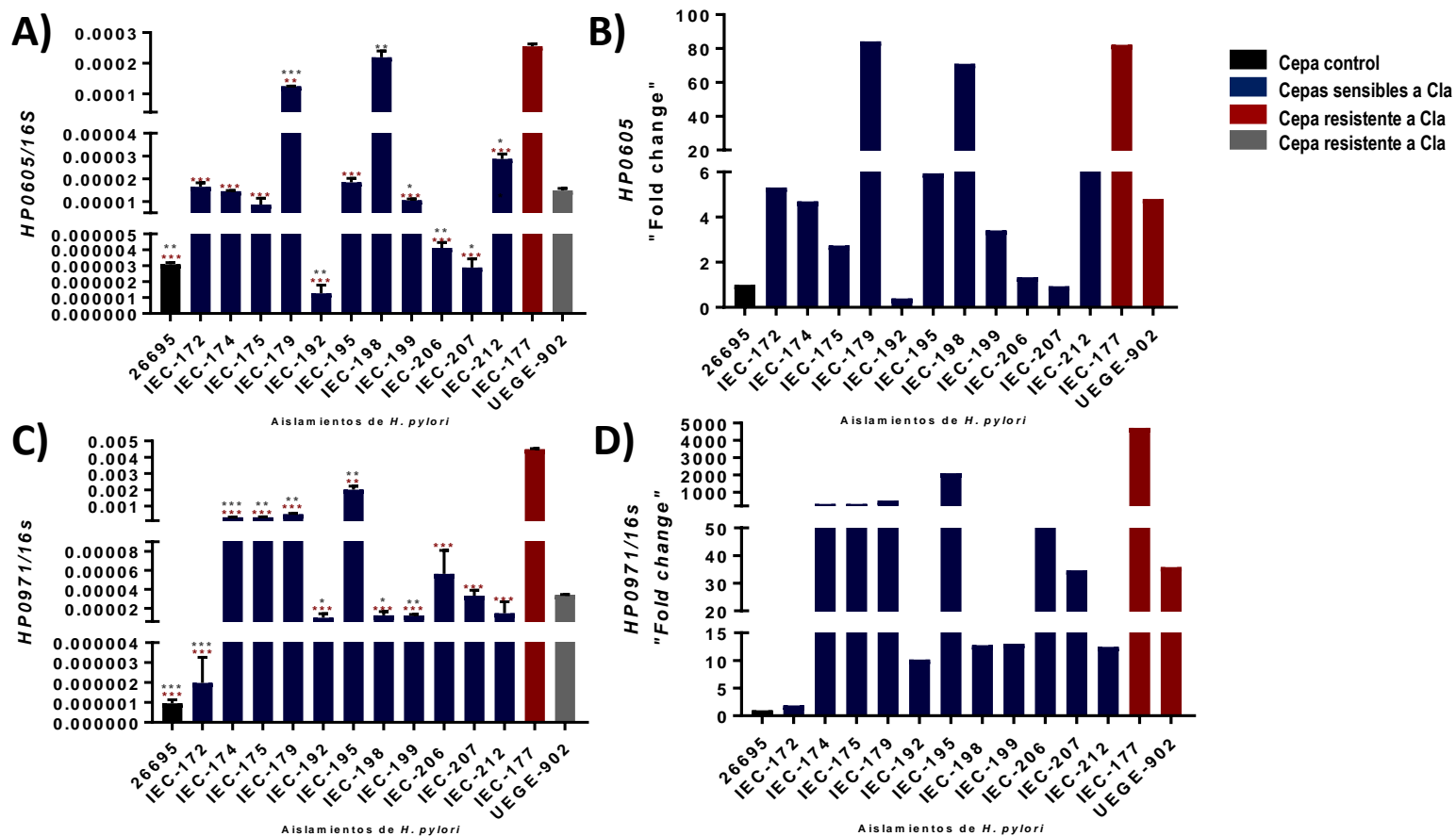


Figura 2. Nivel de expresión de *HP0605* y *HP0971* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con patología gástrica. A) y C) Expresión relativa de *HP0605* y *HP0971* Clr^R de las cepas IEC-177 y UEGE-902 en comparación con cada una de las cepas Clr^S . B) y D) "Fold change" de cepas de *H. pylori* en comparación con la cepa control sensible a claritomicina ATCC 26695. Los datos mostrados representan la media \pm DS de tres experimentos independientes, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, según la prueba t de Student.

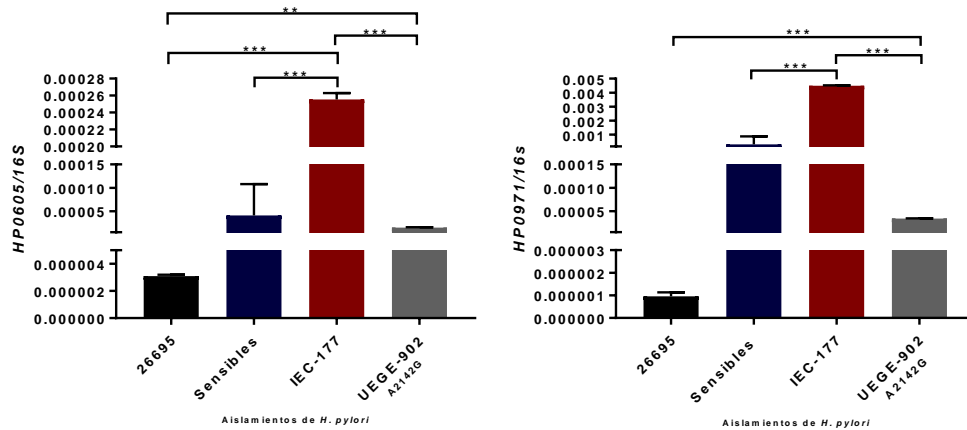


Figura 3. Nivel de expresión de *HP0605* y *HP0971* en cepas de *H. pylori* sensibles o resistentes a claritromicina. A) Expresión relativa del gen *HP0605* de aislamientos sensibles o resistentes. B) expresión relativa del gen *HP0971*. Los datos mostrados representan la media \pm DS de tres experimentos independientes, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, según la prueba t de Student.

Finalmente se comparó el nivel de expresión respecto a los genotipos *cagA* y *vacA* de los aislamientos. Los resultados obtenidos muestran que el genotipo *cagA* positivo tienen un mayor nivel de expresión de ambos genes, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 4A y B). Resultados similares fueron obtenidos para el genotipo *vacA*, donde el genotipo *s1m1* presentó un nivel de expresión mayor que el genotipo *s2m2*, pero tampoco presentó significancia estadística (Figura 4C y D).

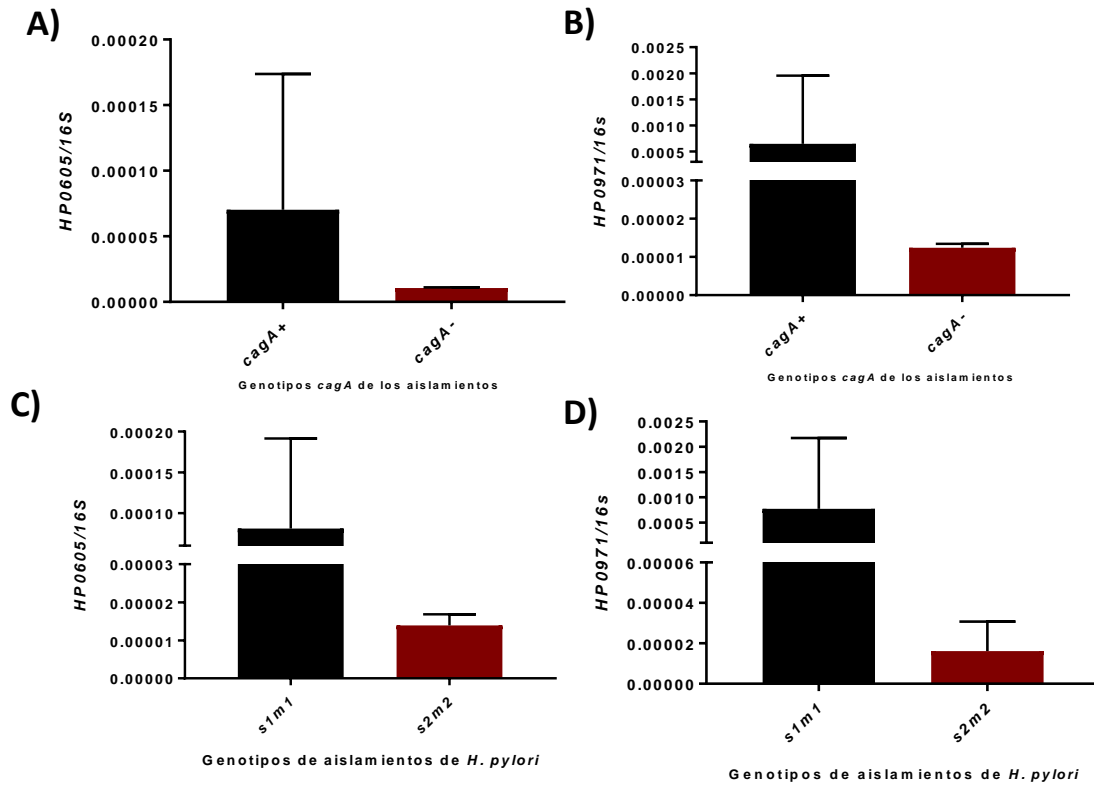


Figura 4. Expresión relativa de los genes *HP0605* y *HP0971* en aislados de *H. pylori* por genotipo. Expresión relativa del gen *HP0605* en los aislamientos de *H. pylori* de acuerdo con los genotipos de *cagA* (A) y *vacA* (C). Expresión relativa del gen *HP0971* en los aislamientos de *H. pylori* de acuerdo con los genotipos de *cagA* (B) y *vacA* (D). Los datos mostrados representan la media ± DS de tres experimentos independientes, **P < 0.01, ***P < 0.001, según la prueba t de Student.

VI. Discusión

La infección por *H. pylori* representa un problema de salud pública a nivel mundial, se estima que 4,400 millones de personas en todo el mundo son portadoras de la bacteria. La prevalencia de la infección por *H. pylori* varía según la región geográfica, afectando principalmente a países en desarrollo (Hooi *et al.*, 2017; Khoder *et al.*, 2019). En México, una encuesta nacional de seroprevalencia realizada en 1998 reportó que el 70% de la población estaba infectada; en el 2009 Paniagua *et al.*, reportaron una prevalencia de *H. pylori* del 60.1% en pacientes del Estado de México. A diferencia de lo reportado por Bosques-Padilla *et al.*, en el 2003 donde la prevalencia encontrada fue de 67.8%, en el presente estudio la prevalencia obtenida mediante cultivo fue del 28.57% (14/49) y de 38.78% (19/49) por diagnóstico mediante PCR punto final del gen *16S rRNA* similar a los resultados reportados por Alarcón-Millán *et al.*, en el estado de Guerrero en 2016. Las diferencias observadas entre ambos métodos se pueden explicar por la diferencia en la sensibilidad y especificidad de cada método (sensibilidad: 80-98% y especificidad: 100% para el cultivo; sensibilidad: 75-100% y especificidad: 84-100% para la PCR), el sitio de obtención de la biopsia procesada por cada método y la carga bacteriana presente en cada biopsia. Mientras que las diferencias en la prevalencia se pueden deber a la desigual distribución de las bacterias viables en el área afectada, las diferencias en las condiciones de cultivo utilizadas en cada estudio y la región geográfica donde se realice el estudio (Abdo *et al.*, 2007 , Patel *et al.*, 2014).

Se sabe que los genotipos *vacA s1m1* y *cagA+* están relacionados con el desarrollo de patologías gástricas de mayor gravedad. En un estudio realizado por Garza-González *et al.*, en 2004 en el noreste de México, el genotipo de *vacA s1m1* fue más frecuente en pacientes con úlcera gástrica y en gastritis crónica fue el genotipo *s2m2*. En el presente estudio, de los 14 aislamientos el genotipo *vacA s1m1* fue el más común con una prevalencia de 78.57% (11/13), seguido del genotipo *s2m2* con 21.43% (3/14), similar a lo reportado por Alarcón-Millán *et al.*, en 2016 y Román-Román *et al.*, en 2017, siendo *vacA s1m1* el genotipo más común reportado en pacientes mexicanos del Estado de Guerrero con gastritis

crónica. Con respecto al gen *cagA*, el 85.71% de los aislamientos (12/14) fueron *cagA+*, similar a lo reportado por otros estudios realizados en nuestra región (Martínez-Carrillo *et al.*, 2010; Alarcón-Millán *et al.*, 2016).

En la actualidad, la resistencia a diferentes agentes antimicrobianos se considera la principal causa del aumento en la prevalencia de la infección por *H. pylori* a nivel mundial (Quek *et al.*, 2016; Thung *et al.*, 2015). Las recomendaciones para el tratamiento de la infección incluyen el uso de la terapia triple estándar, que incluye el uso de amoxicilina o metronidazol, claritromicina y un inhibidor de bomba de protones. Dentro de este tratamiento, la claritromicina se considera el antibiótico de mayor importancia. El aumento en la resistencia a claritromicina se considera la causa principal de fallo en la terapia de erradicación de la infección (Jemilohun y Otegbayo, 2016; Burkitt *et al.*, 2017; White *et al.*, 2015). En México, en una revisión sistemática realizada por Camargo *et al.*, en 2014, se reportó una resistencia a claritromicina del 13%. En el presente estudio, de los 14 aislamientos obtenidos de pacientes con patología gástrica, el 16.7% (2/12) fueron resistentes a claritromicina, similar a lo reportado por Alarcón-Millán *et al.*, en 2016. De acuerdo con el consenso de Maastricht V/Florence, se recomienda buscar una terapia alternativa cuando la tasa de resistencia a claritromicina local supera el 15%. Debido a que la tasa de resistencia a claritromicina obtenida en el presente estudio está por encima del límite antes mencionado, es necesaria la búsqueda de una terapia alternativa para la erradicación de *H. pylori* en la población guerrerense.

La resistencia a claritromicina está asociada con la presencia de mutaciones puntuales en el gen *23S rRNA*, tres de las mutaciones más frecuentes son: A2143G, A2142G y A2142C (Flores-Treviño *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2016; Rizwan *et al.*, 2014). En el presente estudio se secuenció un fragmento del gen *23S rRNA* en los dos aislamientos resistentes a claritromicina y se hizo un alineamiento con la cepa de referencia ATCC 26695 de *H. pylori*. Sólo la cepa UEGE-902 presentó la mutación A2142G asociada con la resistencia a claritromicina, además de otras no reportadas.

Las bombas de eflujo tienen la capacidad de extruir compuestos nocivos para las bacterias antes de que alcancen su sitio blanco. Recientemente, se ha demostrado que las bombas RND desempeñan un papel importante en la resistencia a fármacos en bacterias Gramnegativas, como: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Puzari y Chetia, 2017; Blair y Pidock, 2016).

En *H. pylori* se han identificado cuatro bombas de eflujo RND, dos de los sistemas de eflujo más estudiados son los homólogos de *tolC*, *HP0605* y *HP0971*, que codifican para proteínas de membrana externa. Con la finalidad de evaluar la posible participación de los genes de bombas de eflujo *HP0605* y *HP0971* en la resistencia a claritromicina, se evaluó el nivel de expresión de estos genes mediante ensayos de qRT-PCR en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con patología gástrica.

En el presente estudio, al comparar el nivel de expresión de los genes *HP0605* y *HP0971* en los aislamientos sensibles con la expresión en los aislamientos resistentes, encontramos que sólo la cepa IEC-177 (Clr^R) presentó un nivel de expresión de ambos genes mayor en comparación con los aislamientos sensibles, con diferencias estadísticamente significativas (Figura 3). Esto podría deberse a que la cepa IEC-177 carece de las mutaciones en el gen *23S rRNA* que le confieren resistencia a claritromicina, por lo que requiere una mayor expresión de las bombas de eflujo para expulsar el fármaco y evitar su efecto bactericida. Por su parte, la cepa UEGE-902 sí presenta la mutación puntual A2142G que le confiere resistencia, por lo que la expresión de las bombas de eflujo sería un mecanismo parcial o complementario de resistencia. Sin embargo, se necesita realizar más estudios para poder confirmar esta hipótesis.

Un estudio realizado por Hashemi *et al.*, en 2019, en el que evaluaron la expresión relativa de *hefA* (*HP0605*) en 15 cepas resistentes a múltiples fármacos y 7 aislamientos de *H. pylori* sensibles a metronidazol. Observaron que la expresión relativa de *hefA* en el 80% (12/15) de las cepas resistentes fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en comparación con cinco de las cepas susceptibles, a diferencia

de lo reportado en el presente estudio, donde sólo uno de los dos aislamientos resistentes a claritromicina (IEC-177) tuvo un nivel de expresión mayor de los genes *HP0605* y *HP0971* en comparación con los aislamientos sensibles con diferencias estadísticamente significativas (Figura 2A, C). Por su parte, el aislamiento UEGE-902 (Clr^R) presentó un nivel de expresión variado en comparación con los aislamientos sensibles, de los cuales, interesantemente, tres (IEC-179, IEC-198 e IEC-212) tuvieron un mayor nivel de expresión del gen *HP0605*. Por otro lado, el gen *HP0971* presentó el mismo nivel de expresión en cuatro aislamientos Clr^S (IEC-174, IEC-175, IEC-179 e IEC-195), demostrando que no todos los aislamientos resistentes presentan un nivel de expresión de los genes de bombas de eflujo superior a las cepas sensibles. El no haber encontrado las diferencias esperadas en la expresión de los genes *HP0605* y *HP0971* entre los aislamientos Clr^R y Clr^S podrían deberse a que se ha demostrado que la expresión de las bombas de eflujo está estrechamente regulada por la presencia del sustrato y, al cultivar las cepas Clr^R en ausencia del fármaco no observamos el nivel de expresión esperado de los genes de bombas de eflujo (Housseini *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2014)

En un estudio realizado por Mehrabadi *et al.*, en 2011 observaron que al cultivar cepas de *H. pylori* en concentraciones crecientes de metronidazol aumentaba también el nivel de expresión de *HP0605* y *HP0971*. Resultados similares encontraron Tsugawa *et al.*, en 2010 en cepas de *H. pylori* a las cuales se le indujo resistencia al metronidazol al realizar 10 pases cultivándolas en placas de agar que contenían la mitad, una o dos veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) de metronidazol, donde la expresión de *HP0605* incrementó de manera significativa bajo la exposición del fármaco. Confirmando que, al exponer a las cepas Clr^R al antibiótico, la expresión de las bombas de eflujo aumenta. Además, se sabe que los mecanismos subyacentes a la sobreexpresión de *hefA* en otras bacterias Gramnegativas se dividen en cuatro grupos; (i) mutaciones en el gen represor local, (ii) mutaciones en un gen regulador global, (iii) mutaciones en la región promotora, (iv) elementos de inserción río arriba del gen que codifica para la bomba de eflujo. Sin embargo, en *H. pylori* no se han estudiado ninguno de los

elementos antes mencionados, por lo cual se necesitaría identificarlos en *H. pylori* y evaluar su comportamiento en aislamientos sensibles y resistentes.

Un estudio realizado en Irlanda en 2009 sugiere que el genotipo de las cepas puede afectar el éxito de la terapia de erradicación de *H. pylori* (Taneike *et al.*, 2009). Por tal motivo, los factores de virulencia que son útiles en la colonización bacteriana, inducción de la inflamación y evasión de la respuesta inmune, pueden ser factores de predicción en la terapia de erradicación de *H. pylori*. Diversos estudios se han realizado y los resultados han sido controvertidos (Brennan *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017). Van Doorn *et al.*, señalaron que las cepas de *H. pylori vacA s1* tuvieron una mayor tasa de erradicación en comparación con las cepas *vacA s2*. Niu *et al.*, reportaron que las tasas de erradicación fueron mayores con las cepas *vacA m1*, mientras que Chaudhuri *et al.*, llegaron a la conclusión opuesta. Resultados similares se han observado para el gen *cagA*. Por esta razón, evaluamos el nivel de expresión de acuerdo con los genotipos aislados, sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los genotipos *vacA s1m1*, *vacA s2m2*, *cagA+* y *cagA-* (Figura 4).

Los resultados obtenidos confirman que los genes de bombas de eflujo RND *HP0605* y *HP0971* se expresan en todos los aislamientos, tanto sensibles como resistentes a claritromicina. Sólo en un aislamiento resistente (IEC-177) que no presenta ninguna de las mutaciones asociadas con la resistencia a claritromicina se observó un mayor nivel de expresión en comparación con todos los aislamientos sensibles, lo cual podría sugerir que la sobreexpresión de *HP0605* se relaciona con la presencia de las mutaciones asociadas con resistencia a claritromicina, sin embargo, se necesita un mayor número de cepas resistentes con y sin mutaciones para confirmarlo. Es necesario realizar más estudios para determinar la participación y regulación de las bombas de eflujo en la reducción de la susceptibilidad de *H. pylori* a claritromicina.

VII. Anexos

Anexo 1. Consentimiento informado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS
Laboratorio de Investigación Clínica
Laboratorio de Investigación en Bacteriología
Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro. Tel/Fax 01747 4
725503



No. Folio

--	--	--	--	--	--	--	--

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Diagnóstico molecular de infección por *Helicobacter pylori*

Al firmar este documento, doy mi consentimiento para que me entreviste un miembro del personal del Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, ubicada en Av. Lázaro Cárdenas S/N, Chilpancingo, Gro. Entiendo que la entrevista aportará información útil para interpretar los resultados que se obtengan en los exámenes de laboratorio que se me practicarán y también formará parte de los resultados de un proyecto de Investigación. Este estudio proporcionará datos que ayudarán a que se me indique el tratamiento adecuado.

Entiendo que seré entrevistado(a), en los horarios que se me indiquen o que así convengan, se me harán unas preguntas familiares, personales y de salud. Entendiendo que se me **tomará una muestra de sangre y biopsias gástricas suficientes** para los estudios de laboratorio. La entrevista durará entre 10 y 20 minutos, también estoy enterado (a) que el entrevistador (a) puede ponerse en contacto conmigo en el futuro, a fin de obtener más información.

Entendiendo que fui elegido (a) para participar en este proyecto debido a que cubría todas las características evaluadas. Se me ha dicho que las respuestas a mis preguntas y demás información obtenida no serán reveladas a nadie y que en ningún informe de este estudio se me identificará jamás en forma alguna.

Como compensación por cualquier esfuerzo o molestia relacionados con mi participación en este estudio me serán proporcionados los resultados de los análisis practicados, sin costo alguno.

Entiendo que en caso de que tenga alguna pregunta acerca del estudio o sobre mis derechos como participante, debo buscar a la Dra. Gloria Fernández Tilapa, al Dr. Adolfo Román Román y a la M en C. Dinorah Nashely Martínez Carrillo, en el Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la UAG, a los teléfonos 4725503, 4726977, 7476885152 o 7471184339.

Nombre y firma de participante

Nombre y firma del entrevistador (a)

Institución: Hosp. Gral. RAA SSA () UEGE () Otro _____

Anexo 2. Encuesta



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
Laboratorio de Investigación Clínica

Laboratorio de Investigación en Bacteriología

Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro.

Tel/Fax 01747 4 725503

No.									
Folio									

ENCUESTA

Diagnóstico molecular de infección por *Helicobacter pylori*

DATOS GENERALES

Nombre del paciente	Edad
Dirección: _____ <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Calle y número Colonia </div>	
Teléfono: _____ Localidad: _____	
Años de residencia: _____	
Lugar de origen: _____	de _____
Estado civil: () Soltero () Casado () Divorciado () Unión Libre () Viudo	
Ocupación: _____	

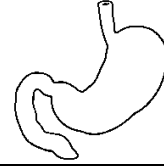
1. ¿Cuántos cuartos tiene su casa? (sin contar el baño y la cocina)	_____ cuartos
2. ¿Cuántas personas viven en su casa?	_____ personas
3. ¿Actualmente está tomando algún medicamento?	1. Si 2. No
4. ¿Cuál?	
5. ¿Cuánto tiempo ha estado en tratamiento?	
6. Sabe leer y escribir	1. Solamente leer 2. Leer y escribir 3. No

7. ¿Qué grado de escolaridad tiene?	0. Sin estudios 1. Primaria 2. Secundaria 3. Preparatoria 4. Profesional, especifique_____
8. Ha fumado alguna vez en su vida	1. Si 2. No
9. Fuma actualmente	1. Si 2. No
10. ¿A qué edad empezó a fumar?	_____ años
11. ¿Cuántos cigarros fuma al día?	_____ cigarros
12. Ha ingerido bebidas alcohólicas	1. Si 2. No
13. Ingiere bebidas alcohólicas actualmente	1. Si 2. No
14. Con que frecuencia lo hace	_____ días
15. Ingiere refrescos con gas	1. Si 2. No
16. ¿Cuántas veces al día?	_____ veces
17. Toma café	1. Si 2. No 3. Tomaba
18. ¿Cuántas veces al día?	_____ veces
19. Consume comidas picantes	1. Si 2. No
20. ¿Consume comidas grasosas?	1. Si 2. No
21. ¿Qué usa para freír sus alimentos?	1. Manteca 2. Aceite 3. No sabe
22. Come alimentos preparados en la calle	1. Si 2. No
23. ¿Cuántas veces a la semana?	_____ veces
24. Come fruta que preparan en la calle	1. Si 2. No
25. ¿Cuántas veces a la semana?	_____ veces
26. Desinfecta las frutas y verduras que consume en su casa	1. Si 2. No
27. ¿Qué usa para desinfectarlas?	
28. ¿El agua que bebe es de?	1. Garrafón 2. De la llave 3. Hervida 4. Clorada 5. Otra_____

29. Le han diagnosticado gastritis o úlcera gástrica	1. Gastritis 2. Úlcera 3. Otro, especifique_____ 4. NO
30. ¿Cuándo?	
31. Le recetaron algún medicamento	1. Si 2. No
32. ¿Cuál o cuáles fueron?	
33. Tiene algún familiar que padezca gastritis o úlcera gástrica	1. Si 2. No 3. NS
34. ¿Qué pariente?	
35. ¿Padece usted alguna otra enfermedad?	1. Si 2. No
36. ¿Cuál?	
37. ¿Hace cuánto tiempo que la padece?	
38. ¿Ha oído hablar de <i>Helicobacter pylori</i> ?	1. Si 2. No
39. ¿Sabe qué es y qué enfermedad causa?	
40. ¿Sabe cómo se transmite <i>Helicobacter pylori</i> ?	1. Si 2. No
41. ¿Le han diagnosticado infección por <i>Helicobacter pylori</i> ?	1. Si 2. No (Termina la entrevista)
42. Si es afirmativo, ¿Hace cuánto?	
43. Si es afirmativo. ¿Le recetaron tratamiento contra la bacteria?, ¿Qué antibióticos?	Dosis y periodicidad:

Dx endoscópico:	
Biopsia tomada por:	

Zona de muestreo:



Nombre y firma del entrevistado

Nombre y firma del entrevistador

Institución: Hosp. Gral. RAA SSA () IECAN-ABO () Otro ()

Anexo 3. Protocolo de extracción de DNA

1. Colectar un conjunto de colonias en 750 µl de solución de extracción (Tris 10 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5%).
2. Agregar 8 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Mezclar vigorosamente en vórtex por 20 segundos.
3. Incubar a 65°C durante 12 horas o más.
4. Añadir 250 µl de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico, mezclar con vórtex aproximadamente 40 segundos.
5. Centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C, recuperar la fase acuosa y pasarla a un tubo limpio.
6. Repetir los pasos 4 y 5 dos veces más.
7. Añadir 250 µl de cloroformo alcohol isoamílico, mezclar con vórtex por 45 segundos.
8. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C, recuperar la fase acuosa y ponerla en un tubo limpio.
9. Agregar 75 µl de LiCl 8 M (concentración final 0.2 M) mezclar con vórtex por 15 segundos.
10. Centrifugar durante 5 minutos a 14,000 rpm a 4°C, recuperar casi todo el sobrenadante y pasarlo a un tubo limpio.
11. Agregar 40 µl de NaCl 5 M, agitar por unos segundos y en seguida agregar 750 µl de isopropanol y agitar por inversión hasta que se forme la hebra de DNA.
12. Incubar por 12 horas o más a -20°C.
13. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos, desechar el sobrenadante y recuperar el pellet.
14. Lavar con 1 ml de etanol al 75% en frío y mezclar suavemente por inversión.
15. Centrifugar por 1 minuto a 14,000 rpm.
16. Repetir los pasos 14 y 15 dos veces más.
17. Escurrir el exceso de etanol en papel secante y secar el pellet.
18. Resuspender el pellet en 30 µl de agua desionizada estéril. Almacenar el DNA a -20°C hasta su uso.

VIII. Referencias

- Abdo, J., Uscanga, I., Sobrino, S., Rivera, J., Huerta, F. & Tamayo, J. (2007). MHSG III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*, 72 (2007), pp. 322-338
- Agudo, D., Pérez, G., Alarcón, T. & López, M. (2010). High prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain. *World Journal of Gastroenterology*, 48, 3703-3707.
- Ahmed, F., Ahmed, J., Ahmed, H., Ul-Hassan, S.S., Iqbal, J. & Sharif, A. (2018). Advances in Research Progress of *H. pylori*. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 21 (3).
- 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.
- Alarid-Escudero, F., Enns, E., Maclehorse, R., Torres, J., Parsonnet, J. & Kuntz, K.M. (2017). Force of Infection of *Helicobacter pylori* in Mexico: Evidence From a National Survey. *Value in Health*, 20(9), A856. doi:10.1016/j.jval.2017.08.2450.
- Atherton, J.C., Cao, P., Peek Jr., R.M., Tummuru, M.K.R., Blaser, M.J. & Cover, T.L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(30), pp. 17771-17777.
- Atherton, J.C., Cover, L.T., Twells, R.J., Morales, M.R., Hawkey, C.J., & Blaser, M.J. (1999). Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), pp. 2979-2982.
- Bina, J. E., Alm, R. A., Uria-Nickelsen, M., Thomas, S. R., Trust, T. J. & Hancock, R. E. (2000). *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 248-54.
- Blair, J.M. & Piddock, J.V. (2016). How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. *American Society for Microbiology*, 7(4).
- Bosques-Padilla, Tijerina-Menchaca, R., Pérez-Pérez, G.I., Flores-Gutiérrez, J.P., & Garza-González, E. (2003). Comparison of *Helicobacter pylori* prevalence in symptomatic patients in northeastern Mexico with the rest of the country: its association with gastrointestinal disease. *Archive of Medical Research*, 34(1) 60-3.
- Brennan, D. E., Dowd, C., O'Morain, C., McNamara, D., & Smith, S. M. (2018). Can bacterial virulence factors predict antibiotic resistant *Helicobacter pylori* infection? *World Journal of Gastroenterology*, 24(9), 971–981. doi:10.3748/wjg.v24.i9.971

- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderón, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, *et al.*, (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4(1), 14. doi:10.3390/microorganisms4010014
- Burkitt, M. D., Duckworth, C. A., Williams, J. M. & Pritchard, D. M. (2017). *Helicobacter pylori* induced gastric pathology: insights from *in vivo* and *ex vivo* models. *Disease Models & Mechanisms*, 10 (2), 89-104.
- Camargo, M.C., García, A., Riquelme, A., Otero, W., Camargo, C.A., Hernandez-García, T., *et al.*, The Problem of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A Systematic Review in Latin America. *American Journal of Gastroenterology*, 2014; 109:485-95.
- Debraekeleer, A. & Remaut, H. (2018). Future perspective for potential *Helicobacter pylori* eradication therapies. *Future Microbiology*, 13(6), 671–687. doi:10.2217/fmb-2017-0115
- Díaz, P., Valenzuela Valderrama, M., Bravo, J. & Quest, A. F. G. (2018). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. *Frontiers in Microbiology*, 9, 5.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523–539. doi:10.1038/s41579-018-0048-6.
- Flores-Treviño, S., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibaria, P., Maldonado-Garza, H.J. y Garza-González, E. (2018). *Helicobacter pylori* drug resistance: therapy changes and challenges. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 12(8), 819-827.
- Garza-González, E., Bosques-Padilla, F.J., Tijerina-Menchaca, R. y Perez-Perez, G.I. (2004). Characterization of *Helicobacter pylori* isolates from the north-eastern region of Mexico. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(1):41-5
- Geng, X., Li, W., Chen, Z., Gao, S., Hong, W. & Ge, X (2017). The Bifunctional Enzyme SpoT Is Involved in the Clarithromycin Tolerance of *Helicobacter pylori* by Upregulating the Transporters HP0939, HP1017, HP0497, and HP0471. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(5), 2011–16.
- Gong, Y. & Yuan, Y. (2018) Resistance mechanisms of *Helicobacter pylori* and its dual target precise therapy. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(3), 371-392.
- Gravina, A.G., Zagari, R.M., De Musis, C., Romano, L., Loguercio, C., & Romano, M. (2018). *Helicobacter pylori* and extragastric diseases: A review. *World Journal of Gastroenterology*, 24(29), 3204–3221. doi:10.3748/wjg.v24.i29.3204.
- Hashemi, S. J., Sheikh, A. F., Goodarzi, H., Yadyad, M. J., Seyedian, S. S., Aslani, S., & Assarzaghan, M. A. (2019). Genetic basis for metronidazole and clarithromycin

resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastroduodenal disorders. *Infection and drug resistance*, 12, 535–543. doi:10.2147/IDR.S192942

- Hirata, K., Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Muraoka, H., Saito, Y., Matsuzaki, J. & Hibi, T. (2010). Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology and Hepatology*, 25, S75–S79.
- Hooi, J.K., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y, Underwood, F.E., Tanyningoh, D., *et al.*, (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153 (2), 420-429.
- Housseini, B.I., Phan, G. y Broutin, I. (2019). Functional Mechanism of the Efflux Pumps Transcription Regulators from *Pseudomonas aeruginosa* Based on 3D Structures. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5(57).
- Ierardi, E., Giorgio, F., Iannone, A., Losurdo, G., Principi, M., Barone, M., *et al.*, (2017). Noninvasive molecular analysis of *Helicobacter pylori*: Is it time for tailored first-line therapy?. *World Journal of Gastroenterology*, 23(14), 2453–2458. doi:10.3748/wjg.v23.i14.2453
- Jemilohun, A.C. & Otegbayo, J.A. (2016). *Helicobacter pylori* infection: past, present and future. *The Pan African Medical Journal*. 23, 216.
- Kamboj, A.K., Thomas, MD., Cotter, T.G. & Oxentenco, A.S. (2017). *Helicobacter pylori*: The Past, Present, and Future in Management. *Concise Review for Clinicians*, 92(4), 599-604.
- Khoder, G., Muhammad, J. S., Mahmoud, I., Soliman, S., & Burucoa, C. (2019). Prevalence of *Helicobacter pylori* and Its Associated Factors among Healthy Asymptomatic Residents in the United Arab Emirates. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(2), 44. doi:10.3390/pathogens8020044
- Li, L., Li, L., Zhou, X., Xiao, S., Gu, H., & Zhang, G. (2015). *Helicobacter pylori* Infection is Associated with an Increased Risk of Hyperemesis Gravidarum: A Meta-Analysis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, 278905.
- Martínez-Carrillo, D.N., Atrisco-Morales, J., Hernández-Pando, R., Reyes-Navarrete, S., Betancourt-Linares, R., Cruz-del Carmen, I., *et al.*, (2013). *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotype diversity and interferon gamma expression in patients with chronic gastritis and patients with gastric cancer. *Revista de Gastroenterología de México*, 79(4), 220-228.
- Matta, A. J., Zambrano, D. C., & Pazos, A. J. (2018). Punctual mutations in 23S *rRNA* gene of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in Colombian populations. *World Journal of Gastroenterology*, 24(14), 1531–1539. doi:10.3748/wjg.v24.i14.1531
- Mendoza-Cantú, A., Urrutia-Baca, V.U., Urbina-Ríos, C.S., De la Garza-Ramos, M.A., García-Martínez, M.E. & Torre-Martínez, H.H. (2017). Prevalence of *Helicobacter*

pylori vacA Genotypes and *cagA* Gene in Dental Plaque of Asymptomatic Mexican Children. *BioMed Research International*,

- Mehrabadi, J.F., Sirous, M., Daryani, N.E., Eshraghi, S., Akbari, B. y Shirazi, M.H. (2011). Assessing the role of the RND efflux pump in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* by RT-PCR assay. *Journal of Infection in Developing Countries*, 5(2), 88-93.
- Nishizawa, T. & Suzuki, H. (2014). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing . *Frontiers in Molecular Biosciences* ,1, 19. <http://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00019>.
- Niu, S.L. & Yang, F. (2014). Relationship between lansoprazole triple therapy effect and alleles of vacuolating cytotoxin genotype in patients with gastric ulcer. *Chinese Journal of Practical Medicine*, 18(2), 190-195.
- Paniagua, G.L., Monroy, E., Rodríguez, R., Arroniz, S., Rodríguez, C., Cortés, J.L., Camacho, A., Negrete, E. y Vaca, S. (2009). Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 8, 14. doi:10.1186/1476-0711-8-14.
- Park, C.Y., Kwak, M., Gutierrez, O., Graham, D.Y. & Yamaoka, Y. (2001). Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), pp. 3336-3338.
- Park, J.K., Dunbar, K.B., Mitui, M., Arnold, C.A., Lam-Himlin, D.M., Valasek, M.A., et al., (2016). *Helicobacter pylori* Clarithromycin Resistance and Treatment Failure Are Common in the USA. *Digestive diseases and sciences*, 61(8), 2373-2380.
- Patel, S.K, Pratap, C.B., Jain, A.K., Gulati, A.K. y Nath, G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World Journal of Gastroenterology*, 20 (2014), pp. 12847-12859.
- Puzari, M. & Chetia, P. (2017). RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2). doi:10.1007/s11274-016-2190-5
- Quek, C., Pham, S. T., Tran, K. T., Pham, B. T., Huynh, L. V., Luu, N. B., Le, T. K., et al., (2016). Antimicrobial susceptibility and clarithromycin resistance patterns of *Helicobacter pylori* clinical isolates in Vietnam. *F1000Research*, 5, 671. doi:10.12688/f1000research.8239.1
- Rahman, T., Yarnall, B. & Doyle, D.A. (2017). Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance. *European Biophysics Journal*, 46(7), 647-653.
- Rizvanov, A.A., Haertlé, T., Bogomolnaya, L. & Talebi, A. (2019). *Helicobacter pylori* and Its Antibiotic Heteroresistance: A Neglected Issue in Published Guidelines. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01796

- Rizwan, M., Fatima, N., & Alvi, A. (2014). Epidemiology and pattern of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: scenario from Saudi Arabia. *Saudi journal of gastroenterology*, 20(4), 212–218. doi:10.4103/1319-3767.136935.
- Román-Román, A., Martínez-Carrillo, D. N., Atrisco-Morales, J., Azúcar-Heziquio, J. C., Cuevas-Caballero, A. S., Castañón-Sánchez, C. A. *et al.*, (2017). *Helicobacter pylori vacA s1m1* genotype but not *cagA* or *babA2* increase the risk of ulcer and gastric cancer in patients from Southern Mexico. *Gut pathogens*, 9, 18. doi:10.1186/s13099-017-0167-z.
- Rudi, J., Kolb, C., Maiwald, M., Kuck, D., Sieg, A., Galle, P.R. & Stremmel, W. (1998). Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), pp 944-948
- Savoldi, A., Carrara, E., Graham, 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*, 155(5):1372-1382.e17. doi: 10.1053/j.gastro.2018.07.007.
- Serrano, C.A., Leon, M.A., Palma, C., Vera, M., Hernández, C. & Harris, P.R. (2017). *Helicobacter pylori*-Clarithromycin Resistance in Symptomatic Pediatric Patients in a High Prevalence Country. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(3), 56-60.
- Spengler, G., Kincses, A., Gajdács, M. & Amaral, L. (2017). New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules*, 22(3), 468.
- Sun, J., Deng, Z. & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 254-267.
- Šterbenc, A., Jarc, E., Poljak, M., & Homan, M. (2019). *Helicobacter pylori* virulence genes. *World Journal of Gastroenterology*, 25(33), 4870–4884. doi:10.3748/wjg.v25.i33.4870
- Talebi, B.A. (2014). Therapy of *Helicobacter pylori*: present Medley and future prospective. *BioMed Research International*, 2014, 1-7.
- Taneike, I., Nami, A., O'Connor, A., Fitzgerald, N., Murphy, P., Qasim, A., O'Connor, H. y O'Morain, C. (2009). Analysis of drug resistance and virulence-factor genotype of Irish *Helicobacter pylori* strains: is there any relationship between resistance to metronidazole and *cagA* status?. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 30, 784-790.
- Thung, I., Aramin, H., Vavinskaya, V., Gupta, S., Park, J. Y., Crowe, S. E., & Valasek, M. A. (2016). Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43(4), 514–533.

- Van Amsterdam, K., Bart, A. & van der Ende, A. (2005). A *Helicobacter pylori* TolC Efflux Pump Confers Resistance to Metronidazole. *AAC*, 49(4), 1477–1482.
- Van Doorn, L.J. Schneeberger, P.M., Nouhan, N., Plaisier, A.P., Quint, W.G.V. & De Boer, W.A. *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut*, 46(3), 321-326.
- Vianna, J.S., Ramis, I.B., Ramos, D.F., VON-Groll, A. & Silva, P.E. (2017). Drug resistance in *Helicobacter pylori*. *Arquivos de Gastroenterologia*, 53(4), 215-223
- Wang, D., Li, Q., Gong, Y. & Yuan Y. (2017). The association between *vacA* or *cagA* status and eradication outcome of *Helicobacter pylori* infection: A meta-analysis. *PLoS One*, 12.
- White, J.R., Winter, J.A. & Robinson, K. (2015). Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: etiology and clinical outcomes. *Journal of Inflammation Research*, 8, 137–147.
- Zamani, M., Ebrahimitabar, F., Zamani, V., Miller W.H., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J., *et al.*, Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 47 (7), 868-876|