

# Eventos moleculares que tributan a la resistencia a tetraciclina en *Helicobacter pylori*, su detección en aislados clínicos cubanos

**Lino E. Torres, Efraín E. Rodríguez, Mayrín Hernández, Arlenis Moreno, Yampier Roblejo, Marcia Samada,\* Juan Cansino,\* Karelia Melián,\* Jordi Alonso,\* Margot Martínez,\*\* Rafael Fando, Ludisleydis Bermúdez, Boris L Rodríguez.**

Departamento de Microbiología e Inmunología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba, Fax 537 2080497, \*boris.rodriguez@cnic.edu.cu . \*Departamento de Gastroenterología y \*\*Laboratorio de Microbiología, Hospital Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas.

Recibido: 18 de septiembre de 2007.

Aceptado: 13 de noviembre de 2007.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, resistencia, antibióticos, tetraciclina.

Key words: *Helicobacter pylori*, resistance, antibiotics, tetracycline.

**RESUMEN.** La tetraciclina es uno de los antibióticos de mayor uso en las terapias erradicadoras de la infección por *Helicobacter pylori*. Este microorganismo es el agente etiológico de múltiples afecciones del tracto gastroduodenal a nivel mundial. La resistencia a tetraciclina en *H. pylori* depende fundamentalmente de mutaciones puntuales en el gen que codifica para el ARNr16S, específicamente, en el triplete AGA<sub>926-928</sub>. Se ha postulado además que la presencia del gen HP1165, que codifica para una posible proteína de eflujo, también puede tributar a la resistencia del microorganismo a la tetraciclina. En este trabajo, se estudia la prevalencia de mutaciones en el gen ARNr16S y la presencia del gen HP1165 en un grupo de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos cubanos. La prevalencia de las mutaciones se estudió mediante la amplificación por PCR y secuenciación de un fragmento del gen ARNr16S. También se detectó por PCR la presencia del gen HP1165. De las 28 cepas secuenciadas solo tres presentaron mutaciones, siendo todas simples sustituciones en el triplete AGA<sub>926-928</sub>, para un 10,7 % de prevalencia de mutaciones. Por otra parte, todas las cepas estudiadas contienen el gen HP1165 en su genoma. Los resultados obtenidos en el análisis de las mutaciones, sugieren que la resistencia a tetraciclina en los aislados clínicos cubanos de *H. pylori* analizados no es muy elevada. Sin embargo, la presencia homogénea del gen HP1165 en las cepas cubanas pudiera incrementar su resistencia, si finalmente se demostrara la participación del producto de este gen en la resistencia a tetraciclina en *H. pylori*.

**ABSTRACT.** Tetracycline is one of most common antibiotics used in therapy for *Helicobacter pylori* eradication. This microorganism is the etiologic agent of many gastroduodenal diseases all over the world. Tetracycline resistance in *H. pylori* is mainly caused by mutations in the ARNr16S coding gene, specifically in the AGA<sub>926-928</sub> triplet. Also, the presence of HP1165 gene, which code to a putative efflux protein, could induce tetracycline resistance in this microorganism. The aims of this study were to detect the prevalence of mutations in 16SrRNA gene and the presence of HP1165 gene in Cuban *H. pylori* isolates. Mutations in 16SrRNA gene were detected by PCR amplification and sequence analysis of amplified product. The presence of HP1165 gene was also detected by PCR. From 28 sequenced strains, only three have mutations, and all were simple substitutions at AGA<sub>926-928</sub> site, giving a 10,7 % mutations incidence. On the other hand, all studied strains carry the HP1165 gene in its genome. Sequence analysis of amplified 16SrRNA gene fragments suggests that tetracycline resistance among analyzed *H. pylori* Cuban isolates is not very high. However, homogeneous presence of HP1165 gene in Cuban strains could increase their resistance, if the participation of its gene product in *H. pylori* tetracycline resistance is finally demonstrated.

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* fue aislado e identificado en 1983 por los investigadores Marshall y Warren a partir de biopsias gástricas de pacientes con desórdenes gástricos.<sup>1</sup> Esta bacteria es un bacilo Gram negativo, helicoidal con extremos redondeados y multiflagelado.<sup>2,3</sup> Se cultiva en condiciones de microaerofilia y tiene la capacidad de producir ureasa, oxidasa y catalasa.<sup>4</sup> Se estima que aproximadamente el 50 % de la población mundial está infectada con *H. pylori*, pero existen diferencias en la

prevalencia de la infección entre los países desarrollados (20 a 40 %) y los países en vías de desarrollo (80 a 90 %).<sup>5-7</sup> Su presencia en el estómago se ha relacionado con la aparición de gastritis crónica no autoinmune, úlceras gástricas y duodenales, así como cáncer gástrico y carcinoma del tejido linfoide asociado a mucosa.<sup>8,9</sup> El tratamiento erradicador de *H. pylori* consiste de una triple terapia que contiene dos antibióticos (combinaciones de claritromicina, amoxicilina, tetraciclina y metronidazol) y un inhibidor de la bomba de protones (omeprazol, lansoprazol) o una cuádruple terapia consistente de dos

antibióticos, un inhibidor de la bomba de protones y sales de bismuto. Los cuatro antibióticos de mayor uso en la erradicación del *H. pylori* son: el metronidazol, la amoxicilina, la claritromicina y la tetraciclina.<sup>10,11</sup> El hecho de que los antibióticos empleados en el tratamiento contra *H. pylori* sean también empleados en otras enfermedades infecciosas, ha incrementado rápidamente la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes a la mayoría de ellos.<sup>12,13</sup> El porcentaje de resistencia a tetraciclina varía según el consumo entre los diferentes países.

En estudios realizados en Europa con aislados clínicos de *H. pylori* se determinó que el intervalo de resistencia a este antibiótico estaba entre 0 y un 0,7%.<sup>14-16</sup> En Norteamérica los estudios realizados han mostrado bajos índices de resistencia a tetraciclina, y en la mayoría, no se ha llegado a encontrar cepas resistentes.<sup>17,18</sup> Los niveles más altos de cepas de *H. pylori* resistentes a tetraciclina se han reportado en países asiáticos, llegando a ser de un 59% en un estudio realizado en China.<sup>19,20</sup>

La resistencia a tetraciclina en *H. pylori* se debe principalmente a la presencia de mutaciones en el triplete AGA de las posiciones 926-928 del ácido ribonucleico ribosomal de la subunidad 16S (ARNr16S).<sup>21</sup> El nivel de resistencia varía en dependencia de la cantidad de bases mutadas en el triplete, existiendo tres niveles: alto para triples mutaciones, medio para dobles mutaciones y bajo para simples mutaciones.<sup>22</sup> Adicionalmente, la delección de la guanina 903 en el gen que codifica para el ARNr16S (gen ARNr16S) fue reportado por Trieber y cols. como una mutación que incrementa el nivel de resistencia a tetraciclina, aunque dicha mutación ocurrió *in vitro*, cuando las cepas de *H. pylori* fueron sometidas a sucesivos pases de cultivo con tetraciclina, por lo que constituye una mutación inducida por el fármaco, y cuya ocurrencia natural no ha sido reportada aún.<sup>21</sup>

Otro posible mecanismo de resistencia de *H. pylori* a la tetraciclina es la presencia de la proteína de eflujo TetA, que está involucrada en la resistencia inducida por el fármaco.<sup>23</sup> Varios estudios se han realizado para evaluar la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos empleados en las terapias contra este patógeno humano, sin embargo en nuestro país no se han publicado estudios sobre este importante tema de la infección por *H. pylori*. Por todo lo anterior, los objetivos de este trabajo consistieron en analizar la presencia de las mutaciones en el gen ARNr16S que tributan a la resistencia a tetraciclina en aislados clínicos de *H. pylori* colectados entre diciembre 2006 y mayo 2007 en el Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ) en Ciudad de La Habana y estudiar la presencia del gen HP1165 en todos estos aislados.

## MATERIALES Y METODOS

### Cultivo microbiológico

Se empleó como referencia la cepa de *H. pylori* J99. Tanto la cepa control como las aisladas en el laboratorio se cultivaron en placas de agar Columbia con 7% de sangre humana y se incubaron durante tres días a 37 °C en atmósfera de microaerofilia. Los 28 aislados clínicos de este estudio se obtuvieron a partir de biopsias gástricas tomadas de pacientes cubanos con trastornos gastroduodenales que acudieron a la consulta de Gastroenterología en el CIMEQ, Ciudad de La Habana, y que fueron sometidos a endoscopia en el período comprendido entre diciembre de 2006 y mayo de 2007.

### Purificación de ADN

Todas las colonias presentes en una placa de cultivo de la cepa de referencia de *H. pylori* J99 y de cada una de las 28 cepas cubanas de *H. pylori*, fueron colectadas en 1 mL de disolución estabilizadora de fosfato salino estéril y se procedió a la purificación del ADN genómico mediante el método del CTAB-fenol-cloroformo.<sup>24</sup> La calidad y cantidad del ADN purificado se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% con bromuro de etidio a 0,6 µg/mL. Se tomó como criterio de buena calidad de los ADN, valores de la relación 260/280 mayores que 1,6. La concentración de ADN se determinó mediante la expresión:

$$C_{ADN} = DO_{260} \cdot 50/\text{Dil.} \quad (\mu\text{g/mL})$$

donde:

DO<sub>260</sub> densidad óptica de la suspensión de ADN a 260 nm.

Dil. dilución del ADN empleada en la determinación de la densidad óptica

### Detección de las mutaciones que tributan a la resistencia a tetraciclina

Las mutaciones en el gen que codifica para el ARNr16S fueron detectadas por secuenciación de un fragmento de ADN de 574 pares de bases (pb), amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y que contenía los nucleótidos implicados en el mecanismo de resistencia (tripleto AGA<sub>926-928</sub> y G<sub>903</sub>). Con este objetivo, se diseñaron cebadores que flanquearan esta zona del gen (Tabla 1), los que se verificaron además que fueran óptimos cebadores para la amplificación por la técnica de PCR.

Para amplificar el fragmento de 574 pb se partió de una fracción de 50 ng del ADN purificado de cada cepa y se empleó el equipo de ciclos térmicos Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 µL que contenían: 10 µL de disolución estabilizadora de reacción, 10 µL de la suspensión de nucleótidos (2 mol/L), 10 µL de cloruro de magnesio (2,5 mmol/L), 1 µL de cebador directo 5' 16S-D1 (0,5 µmol/L) y 1 µL de cebador reverso 3' 16S-I1 (0,5 mmol/L), 1 µL de la enzima Taq polimerasa (5 UI, Centro de Ingeniería Genética, Ciudad de La Habana), 5 µL (50 ng/reacción) de ADN y 62 µL de agua. Las reacciones se llevaron a cabo de la manera siguiente: una primera etapa de desnaturalización a 94 °C durante 1 min seguida de 40 ciclos que constan de otra etapa de desnaturalización a la misma temperatura durante 1 min, 1 min de alineamiento a 53 °C y una etapa de extensión a 72 °C durante 1 min. Luego, una segunda etapa de alineamiento a 53 °C durante 3 min y una etapa final de extensión a 72 °C durante 5 min. Por último, se tomaron 5 µL del producto de la amplificación y se chequeó la presencia de la banda de 574 pb por electroforesis en gel de agarosa al 1,6% con bromuro de etidio. Se utilizó un patrón de peso molecular de 250 a 10 000 pb (Promega, EUA.). El resto del producto de PCR (95 µL) se purificó con el uso del juego comercial de purificación de ADN GFX™ (Amersham Pharmacia Biotech, Alemania). Después, se tomaron 5 µL de cada uno de los ADN purificados y se rechequearon empleando el procedimiento de electroforesis en agarosa 1,6% antes descrito.

Para la secuenciación del ADN purificado de cada cepa se contrataron los servicios de la compañía MacroGen (Korea del Sur) y en el proceso se emplearon los oligonucleótidos anidados: directo 16S-Dn2 y reverso 16S-In2 (Tabla 1). Las secuencias obtenidas se analizaron empleando la base de datos del sitio EBI y se

**Tabla 1.** Oligonucleótidos empleados en las PCR.

Oligo	Secuencia	Talla del fragmento
16S-D1	5' GAACATTACTGACGCTGATT 3'	574 pb
16S-I1	5' ACAATCCGAACTGAGGGTG 3'	574 pb
16S-Dn2	5' GGGGAGCAAACAGGATTAGATA 3'	491 pb
16S-In2	5' CTTCCTTTTGTGCACCCCAT 3'	491 pb
Tet-D	5' TCTAGCGGCACGATTGAAGC 3'	415 pb
Tet-I	5' ATTGCTCTTTAACGCCTTGT 3'	415 pb

emplearon los programas Blast-n para el alineamiento por similitud y ClustalW para el alineamiento múltiple de secuencias.<sup>25</sup>

### Detección del gen Hp1165

Para detectar este gen se empleó la PCR con las mismas muestras de ADN del estudio de las mutaciones en el gen ARNr16S, y prácticamente las mismas condiciones de reacción; así como los mismos volúmenes de los reactivos. La electroforesis de ADN y la toma de imágenes se llevaron a cabo según lo descrito con anterioridad. Las diferencias estuvieron dadas en los volúmenes de cloruro de magnesio, 2  $\mu$ L (2 mmol/L), la cantidad de Taq polimerasa, 0,25  $\mu$ L (1,25 UI) y el volumen de agua, 16,25  $\mu$ L. Los cebadores en este caso fueron: directo 5' Tet-D y reverso 3' Tet-I (Tabla 1). El ciclo de reacciones se ejecutó de la misma forma que el de las PCR anteriores, con la particularidad de que el alineamiento fue a 57 °C. La banda amplificada en esta reacción fue de 415 pb.

## RESULTADOS

### Cultivo microbiológico

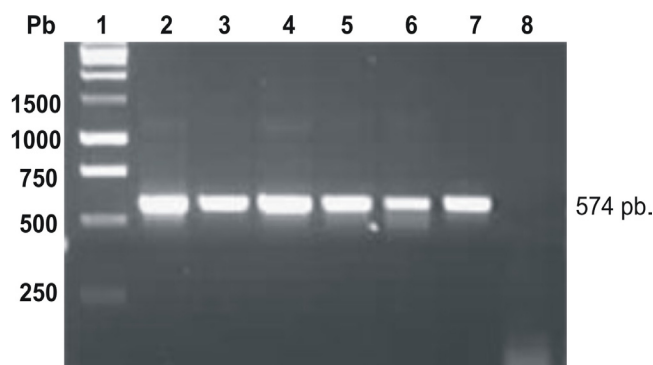
La reacción positiva de las colonias en las pruebas de ureasa, catalasa y oxidasa, así como la presencia de bacilos Gram negativos ligeramente espiralados y curvos fueron las evidencias de la presencia de *H. pylori* en los cultivos realizados a las 28 aislados clínicos, así como para la cepa de referencia J99.

### Detección de las mutaciones que tributan a la resistencia a tetraciclina

A partir de los 28 aislados clínicos cubanos de *H. pylori*, se purificó ADN, según el método descrito en el acápite anterior y de estas muestras, se amplificó por PCR un fragmento de 574 pb del gen ARNr16S, el cual se obtuvo en todas las cepas con la talla esperada (Fig. 1). Como control positivo de la PCR se tomó el ADN proveniente de la cepa de referencia J99. El producto de PCR se obtuvo en todas las cepas incluidas en el estudio, la especificidad de la reacción fue elevada, pues no se visualizaron bandas de amplificación inespecífica, así como el rendimiento, pues la banda era intensa. El fragmento de ADN amplificado se purificó para su posterior secuenciación, ya que incluyó la región del gen donde se localiza el triplete AGA<sub>926-928</sub>.

### Secuenciación

El fragmento de 574 pb del gen que codifica para el ARNr16S y que incluye la región del triplete AGA<sub>926-928</sub> fue enviado a secuenciar a la empresa Macrogen, Inc.



**Fig. 1.** Foto de electroforesis en gel de agarosa 1,6 % de los productos amplificados por PCR de un fragmento de 574 pb del gen que codifica para el ARNr16S. Carril 1: patrón de peso molecular. Carril 2: control positivo (ADN de la cepa J99), Carriles del 3 al 7, ADN de cinco cepas cubanas aisladas. Carril 8: control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

de Korea. Al analizar la secuencia del fragmento de ADN de las 28 cepas cubanas, se determinó que tres poseían una simple sustitución de bases en el triplete AGA<sub>926-928</sub> para un 10,7 % de aparición de este tipo de mutaciones que tributan a la resistencia a tetraciclina en la muestra analizada. Al efectuar el alineamiento de las secuencias de nucleótidos obtenidas en los análisis realizados a los productos de la PCR del gen ARNr16S, se pudo observar en las áreas sombreadas las posiciones donde ocurren las mutaciones (Fig. 2.). La cepa Hp-13 tuvo una sustitución de la adenina de la posición 926 por una guanina, AGA<sub>926-928</sub> → **GGA**, la cepa Hp-11 una sustitución de la misma base por una timina, AGA<sub>926-928</sub> → **TGA** y la cepa Hp-80 una sustitución de la adenina de la posición 928 por una timina, AGA<sub>926-928</sub> → **AGT**, las mutaciones se indican en negrita y subrayadas (Fig. 2). En el alineamiento se incluyeron las secuencias reportadas en la base de datos del sitio EBI, de tres cepas de referencia (HPAG1, J99 y 26695) de *H. pylori* cuyo genoma ha sido secuenciado completamente (las tres son cepas sensibles a tetraciclina).<sup>26,27</sup>

No se encontró la delección de la G<sub>903</sub> en ninguna de las cepas cubanas evaluadas. El porcentaje de similitud entre la secuencia obtenida en este trabajo, del fragmento del gen ARNr16S de la cepa J99 y la reportada en las bases de datos fue de un 88 %, mientras que entre las cepas de referencia y las cepas cubanas fue mayor de un 94 %. Los datos de similitud corresponden a la comparación de las secuencias obtenidas para las

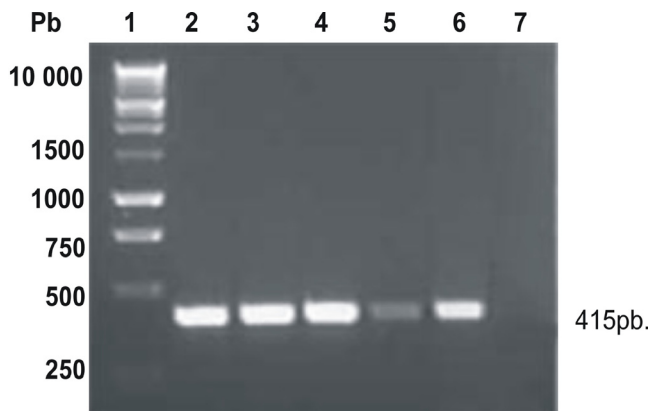
Hp32	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
Hp14	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
Hp43	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
Hp58	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
Hp3	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
Hp60	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
Hp80	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
Hp83	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
Hp13	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
26695	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
HPAG1	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
J99	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
Hp11	AGCTAACGCATTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAA	880
	*****	
Hp32	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
Hp14	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
Hp43	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
Hp58	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
Hp3	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
Hp60	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
Hp80	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG <b>T</b> TACACGAAGAAC	940
Hp83	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
Hp13	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
26695	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
HPAG1	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
J99	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
Hp11	TAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATAACACGAAGAAC	940
	*****	
Hp32	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
Hp14	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
Hp43	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
Hp58	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
Hp3	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
Hp60	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
Hp80	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
Hp83	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
Hp13	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
26695	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
HPAG1	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
J99	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
Hp11	CTTACCTAGGCTTGACATTGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGGAGTGTCTAGCTTGCTAG	1000
	*****	

**Fig. 2.** Alineamiento múltiple de las secuencias del fragmento amplificado por PCR del gen ARNr 16S de 10 de las cepas estudiadas y las secuencias reportadas en base de datos de tres cepas de referencia (HPAG1, J99 y CCUG 26695) de *H. pylori*. Las cepas Hp 11, Hp 13 y Hp 80 tienen una mutación en una de las bases del triplete AGA<sub>926-928</sub>, el cual se encuentra sombreado, mientras que las mutaciones por sustitución de bases en las cepas analizadas se indican en negrita y subrayadas. Se muestra además, la presencia de la guanina de la posición 903 (sombreada) en todas las cepas cubanas estudiadas.

28 cepas cubanas con las secuencias reportadas en las bases de datos de las tres cepas de referencia (HPAG1, J99 y 26695).

### Detección del gen que codifica para la supuesta proteína de eflujo TetA(P)

En las 28 cepas cubanas incluidas en el estudio se amplificó por PCR el fragmento del gen HP1165, y en todos los casos, presentó la talla esperada (Fig.3). La reacción de amplificación mostró una elevada especificidad, pues no se detectaron bandas de amplificación inespecífica (Fig.3). Como control positivo de las reacciones de amplificación se tomó al ADN de la cepa de referencia J99. En el carril 1 se ubicó el patrón de peso molecular ya indicado con anterioridad.



**Fig. 3.** Foto de electroforesis en gel de azarosa 1,6 % de los productos amplificados por PCR de un fragmento de 415 pb del gen Hp1165 de *H. pylori*. Carril 1: patrón de peso molecular; Carril 2: control positivo (ADN de la cepa J99), Carriles del 3 al 6, ADN de cinco de las cepas cubanas aisladas. Carril 7: control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

## DISCUSIÓN

### Detección de las mutaciones que tributan a la resistencia a tetraciclina

En este estudio se caracterizaron las mutaciones que tributan a la resistencia a tetraciclina en *H. pylori*, mediante la secuenciación de un fragmento del gen ARNr16S, en 28 aislados clínicos cubanos de este microorganismo. Solo tres cepas, de las 28 analizadas, presentaron cambios en las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen ARNr16S amplificado, al compararlas con las secuencias depositadas en las bases de datos de las cepas de referencia 26695, J99 y HPAG1 (Fig. 2). Con esta misma comparación de secuencias, se pudo constatar que las 25 cepas sin mutaciones en el gen ARNr16S mostraron elevados niveles de similitud (mayores de 90 %) con las secuencias reportadas de este gen para las cepas de referencia.

Un resultado no esperado, fue la baja similitud (88 %) encontrada entre la secuencia obtenida, en este estudio, del fragmento del gen ARNr16S de la cepa de referencia J99 y la depositada en la base de datos. Un aspecto que pudo influir en este resultado, fue que la cepa J99 solo se secuenció una de las cadenas de ADN amplificadas del gen de interés y en el resto de las muestras las dos. Otra posible explicación sería que en general, las cepas que reciben sucesivos pases en los laboratorios van acumulando mutaciones en sus genes, que luego de muchos

pases pudieran tributar a estas diferencias. De hecho, este fenómeno ya fue observado en un trabajo previo al emplear la cepa de referencia 26695.<sup>23</sup>

Las cepas con mutaciones fueron la Hp-11, Hp-13 y Hp-80 y en todos los casos sólo tuvieron mutaciones simples en el triplete de nucleótidos que más tributa a la resistencia a tetraciclina en *H. pylori*. Teniendo en cuenta este resultado, cabe esperar que las tres cepas tengan el nivel de resistencia a tetraciclina más bajo entre las cepas que son resistentes, con una concentración mínima inhibitoria (MIC) igual o ligeramente mayor que 2 µg/mL, que es el punto de corte de resistencia para este antibiótico. Lo anterior se sustenta en los trabajos de Dailidene y Gerrits,<sup>12,22</sup> quienes encontraron que la triple mutación de las bases AGA<sub>926-928</sub>→TTC induce el MIC más elevado con valores de hasta 64 µg/mL, mientras que las dobles sustituciones muestran valores de hasta 8 µg/mL y las simples sustituciones valores menores o iguales a 4 µg/mL.<sup>12,22</sup> Sin embargo, más recientemente se acepta que el punto de corte para las simples mutaciones es igual o ligeramente mayor que 2 µg/mL.<sup>13,28</sup>

Específicamente, la cepa Hp-11 tuvo la sustitución A<sub>926</sub>→T la cepa Hp-13 la sustitución A<sub>926</sub>→G y la cepa Hp-80 la sustitución A<sub>928</sub>→T (Fig. 2). Al comparar estos resultados con un estudio realizado por Wu y cols. en el que emplearon cepas de *H. pylori* aisladas en Norteamérica y Asia, y que secuenciaron un fragmento similar del gen ARNr16S en cepas de *H. pylori*, se corroboró que la mayoría de las mutaciones en el triplete AGA<sub>926-928</sub> ocurren en un solo nucleótido y se evidenció además, que las sustituciones encontradas en los aislados clínicos obtenidos en este estudio habían sido reportadas por ellos anteriormente.<sup>28</sup>

Ninguna de las cepas cubanas tuvo la delección de la guanina de la posición 903 del gen ARNr16S (Fig. 2). Esta es una mutación que genera cepas de *H. pylori* con resistencia baja a tetraciclina (MIC entre 4 y 8 µg/mL) y solo se ha logrado inducir *in vitro* por la presencia persistente del antibiótico.<sup>21</sup> El nucleótido G<sub>903</sub> está localizado en uno de los sitios de unión de la tetraciclina a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y cerca de los nucleótidos que hacen contacto con los ARNt, de ahí, su posible importancia en la resistencia a este fármaco. Sin embargo, este sitio es solo ocupado parcialmente por la tetraciclina a diferencia del sitio primario, triplete AGA de la hélice 31 que es completamente bloqueado por la entrada del antibiótico.<sup>29</sup> Lo anterior puede explicar la baja resistencia encontrada en las cepas de *H. pylori* que tienen esta mutación. De cualquier forma, está por demostrar la presencia de la delección G<sub>903</sub> en aislados clínicos de este patógeno y su influencia en la susceptibilidad a la tetraciclina; lo cual es coherente con la no presencia de la mutación en ninguna de las cepas de este estudio.

De forma que en este trabajo solamente el 10,7 % de los aislados clínicos cubanos, de pacientes que acudieron al hospital CIMEQ entre diciembre de 2006 y mayo de 2007, tuvieron mutaciones que los hacen potencialmente resistentes a la tetraciclina. Las variantes de mutaciones encontradas crean resistencia, pero en los menores niveles, ya que fueron simples mutaciones en el triplete del sitio primario del ARNr16S donde se une el antibiótico (Fig. 1). Este porcentaje de cepas resistentes pudiera considerarse relativamente bajo cuando se compara con otros trabajos similares. Por ejemplo, en un estudio realizado en Shangai, China, se reportó una prevalencia de aislados resistentes a tetraciclina del 59%.<sup>20</sup> En otro estudio realizado con cepas aisladas en Japón y Korea se

encontró una prevalencia entre 5 y 7 %.<sup>30</sup> Mientras que en dos estudios diferentes de Taiwán e Irlanda no se encontraron cepas resistentes a este antibiótico.<sup>31,32</sup> El resultado obtenido aquí es la primera evidencia experimental del nivel potencial de resistencia a tetraciclina en aislados clínicos cubanos de *H. pylori* y debe ser corroborado con experimentos *in vitro* empleando la técnica de MIC.

#### Detección del gen que codifica para la supuesta proteína de eflujo TetA(P)

Si bien el aporte de las mutaciones en el ARNr 16S a la resistencia a tetraciclina en *H. pylori* están bien sustentadas, la participación del gen HP1165, que codifica para una supuesta proteína de eflujo, en la resistencia del microorganismo al fármaco aún está en discusión y solo se ha podido evidenciar su aporte a un evento transitorio de resistencia, que depende de la presencia sostenida del antibiótico.<sup>23</sup>

Todas las cepas de *H. pylori* estudiadas en este trabajo tenían en su genoma el gen HP1165, incluyendo la cepa de referencia J99, lo cual coincide con lo encontrado por el grupo de trabajo de Li y Dannelly, cuando determinaron que la mayoría de las cepas con que trabajaron tenían al menos una copia del gen HP1165 en su genoma.<sup>23</sup> En realidad, este es el único reporte que relaciona la presencia de este gen con la resistencia a tetraciclina en *H. pylori*, demostrando que el fenotipo de resistencia solo se expresa, *in vitro*, por la acción del antibiótico y se pierde en ausencia de este, es decir la resistencia solo evidencia en presencia de la tetraciclina. Un aspecto interesante del trabajo de Li y Dannelly, es que utilizando RT-PCR ellos encontraron que tanto la cepa (cepa de referencia) con resistencia inducida en el laboratorio, como la cepa parental 26695, producían niveles similares de transcritos del gen HP1165. Lo anterior indica que el gen se transcribe constitutivamente y por tanto, la única explicación para la aparición del fenotipo resistente controlado por la presencia del antibiótico sería que la regulación de la expresión de la proteína TetA (P) esté relacionada a la estabilidad del ARN mensajero, a la traducción, postraducción o a varios de estos mecanismos a la vez. Otro aspecto a destacar en el trabajo de estos mismos investigadores, es que crearon mutantes defectuosos del gen HP1165, los que perdieron por completo la resistencia inducida a tetraciclina.<sup>23</sup>

Todo lo anterior lleva a pensar que el gen HP1165 y la posible proteína de eflujo para la que codifica, pudiera desempeñar un papel en la resistencia inducida por tetraciclina en *H. pylori*. Pero para que esto sea demostrado, se deben diseñar experimentos que vinculen: la expresión de la proteína TetA(P), su funcionalidad como proteína de eflujo en *H. pylori* y la falla de las terapias basadas en este antibiótico.

#### CONCLUSIONES

Solo el 10,7 % de las cepas cubanas de *H. pylori* analizadas, aisladas a partir de pacientes que acudieron al Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas entre diciembre de 2006 y mayo de 2007, poseen mutaciones en el gen ARNr16S que tributan a la resistencia a tetraciclina, lo cual sugiere que la resistencia a este antibiótico no es muy elevada. Por otra parte, todas las cepas de *H. pylori* evaluadas tienen el gen HP1165; lo cual pudiera incrementar los niveles de resistencia a este antibiótico en las cepas cubanas, si finalmente se demuestra su participación en la resistencia a tetraciclina en *H. pylori*.

#### AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos al profesor Francis Megraud del Hospital Pellegrin, Bordeaux, Francia que nos donó la cepa de referencia J99.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall B.J. and Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patient with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, 1311-1315, 1984.
2. Goodwin C.S. and Armstrong J.A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **9**, 1-13, 1990.
3. Geis G., Suerbaum S., Forsthoff B., Leyer H. and Opferkuch W. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.**, **38**, 371-377, 1993.
4. Alarcon T. [Microbiological diagnosis of *Helicobacter pylori* infection]. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, **12**, Suppl., 1, 23-27, 1994.
5. Torres J. [Epidemiologic and clinical aspects of *Helicobacter pylori* infection in children]. **Rev. Gastroenterol. Mex.**, **65**, 13-19, 2000.
6. Rothenbacher D. and Brenner H. Burden of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-related diseases in developed countries: recent developments and future implications. **Microbes. Infect.**, **5**, 693-703, 2003.
7. Perez-Perez G.I., Rothenbacher D. and Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, **9** Suppl 1, 1-6, 2004.
8. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. **J. Med. Microbiol.**, **50**, 1021-1029, 2001.
9. Ruiz B., Garay J., Correa P, Fontham E.T., Bravo J.C., Bravo L.E. *et al.* Morphometric evaluation of gastric antral atrophy: improvement after cure of *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Gastroenterol.**, **96**, 3281-3287, 2001.
10. de Boer W.A. Topics in *Helicobacter pylori* infection: focus on a 'search-and-treat' strategy for ulcer disease. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, **232**, 4-9, 2000.
11. Go M.F. Treatment and management of *Helicobacter pylori* infection. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, **4**, 471-477, 2002.
12. Gerrits M.M., van Vliet A.H., Kuipers E. and Kusters J.G. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. **Lancet**, **6**, 1-11, 2006.
13. Megraud F and Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. **Clin. Microbiol. Rev.**, **20**, 280-322, 2007.
14. Wolle K., Leodolter A., Malfetheriner P. and König W. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. **J. Med. Microbiol.**, **51**, 705-709, 2002.
15. Cuchi B.E., Forne B.M., Quintana R.S., Lite L.J. and Garau A.J. [Evolution of the sensitivity of 235 strains of *Helicobacter pylori* from 1995 to 1998 and impact of antibiotic treatment]. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, **20**, 157-160, 2002.
16. Teare L., Peters T, Saverymattu S., Owen R. and Tiwari I. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Lancet**, **353**, 242, 1999.
17. Tolia V., Brown W., El Baba M. and Lin C.H. *Helicobacter pylori* culture and antimicrobial susceptibility from pediatric patients in Michigan. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **19**, 1167-1171, 2000.
18. Bruce M.G., Bruden D.L., McMahon B.J., Hennessy T.W., Reasonover A., Morris J. *et al.* Alaska sentinel surveillance for antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolates from Alaska native persons, 1999-2003. **Helicobacter**, **11**, 581-588, 2006.
19. Kim J.J., Reddy R., Lee M., Kim J.G., El Zaatari F.A., Osato M.S. *et al.* Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. **J. Antimicrob. Chemother.**, **47**, 459-461, 2001.

20. Wu H., Shi X.D., Wang H.T. and Liu J.X. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxicillin. **J. Antimicrob. Chemother.**, **46**, 121-123, 2000.
21. Trieber C.A. and Taylor D.E. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. **J. Bacteriol.**, **184**, 2131-2140, 2002.
22. Dailidienne D., Bertoli M.T., Miculeviciene J., Mukhopadhyay A.K., Dailide G., Pascasio M.A. **et al.** Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **46**, 3940-3946, 2002.
23. Li Y. and Dannelly H.K. Inactivation of the putative tetracycline resistance gene HP1165 in *Helicobacter pylori* led to loss of inducible tetracycline resistance. **Arch. Microbiol.**, **185**, 255-262, 2006.
24. Ausubel F., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. **et al.** Short Protocols in Molecular Biology, **3ra Edition, John Wiley & Sons, Inc., USA**, 23-24, 1995.
25. European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/>
26. Alm R.A., Ling L.S., Moir D.T., King B.L., Brown E.D., Doig P.C. **et al.** Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, **397**, 176-180, 1999.
27. Oh J.D., Kling-Backhed H., Giannakis M., Xu J., Fulton R.S., Fulton L.A. **et al.** The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.**, **103**, 9999-10004, 2006.
28. Wu J.Y., Kim J.J., Reddy R., Wang W.M., Graham D.Y. and Kwon D.H. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **49**, 578-583, 2005.
29. Pioletti M., Schlunzen F., Harms J., Zarivach R., Gluhmann M. and Avila H. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. **EMBO J**, **20**, 1829-1839, 2001.
30. Kwon D.H., Kim J.J., Lee M., Yamaoka Y., Kato M., Osato M.S. **et al.** Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44**, 3203-3205, 2000.
31. Hu C.T., Wu C.C., Lin C.Y., Cheng C.C., Su S.C., Tseng Y.H. **et al.** Resistance rate to antibiotics of *Helicobacter pylori* isolates in eastern Taiwan. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, **22**, 720-723, 2007.
32. Hooton C., Dempsey C., Keohane J., O'Mahony S., Crosbie O. and Lucey B. *Helicobacter pylori*: prevalence of antimicrobial resistance in clinical isolates. **Br. J. Biomed. Sci.**, **63**, 113-116, 2006.



## CONVOCATORIA ÚNICA

**DIPLOMADO**  
**La Calidad**  
**de los Laboratorios**  
**Analíticos**



La Universidad de la Habana se complace en invitarle a participar en el Diplomado "La Calidad de los Laboratorios Analíticos". Este centro de altos estudios tiene una gran tradición en la enseñanza de postgrado. Su claustro, integrado por una elevada proporción de doctores en ciencias, organiza actividades docentes para la formación de profesionales con todas las modalidades de la educación universitaria de postgrado: adiestramientos, diplomados, maestrías y doctorados. Estos esfuerzos están dirigidos en gran medida al postgrado internacional con la participación de alumnos de Iberoamérica y otras latitudes.

El programa del Diplomado se fundamenta en la concertación de tres campos del conocimiento en el plano teórico-práctico: la teoría de la calidad de los laboratorios, los métodos quimiométricos (entre los que se destacan los estadísticos) y la Computación como herramienta.

Abarca 200 horas y consta de cinco cursos de postgrado y el desarrollo de un trabajo final, el cual estará dirigido a la solución de problemas prácticos usuales sobre calidad de los laboratorios de análisis químico.

- Curso de Postgrado "Quimiometría para la Calidad" (30 h).
- Curso de Postgrado "La Calidad de los Laboratorios Analíticos" (45 h).
- Curso de Postgrado "Muestreo y Calidad" (20 h).
- Curso de Postgrado "Computación para la Calidad" (30 h).
- Curso de Postgrado "Acreditación de los Laboratorios Analíticos" (20 h).
- Desarrollo del Trabajo Final y Evaluación (55 h).

Se incluyen horarios de consultas individuales con los profesores y de labores independientes en el laboratorio de Computación.

Versiones completas o abreviadas de esos cursos se han impartido en México, Uruguay, Argentina, Panamá, Perú, Guatemala y Cuba. Dos de ellos forman parte de programas de maestría y doctorado de la Universidad de la Habana.

### Profesores

Dr. Manuel Alvarez Prieto (Coordinador del Diplomado) [malvarez@imre.oc.uh.cu](mailto:malvarez@imre.oc.uh.cu)

Dra. Nancy Martínez Alfonso [nancy@rect.uh.cu](mailto:nancy@rect.uh.cu)

M.Sc. Juan Jiménez Chacón [jjimenez@imre.oc.uh.cu](mailto:jjimenez@imre.oc.uh.cu)

### Aseguramiento

Sra. Mariela Hurtado Camero [mhc@imre.oc.uh.cu](mailto:mhc@imre.oc.uh.cu)

### Organización

Universidad de la Habana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales, Laboratorio de Investigaciones y Servicios de Análisis Químico.

Calzada de Zapata entre Calles G y Mazón, El Vedado, Ciudad de La Habana, Código Postal 10400, Cuba.

Teléfonos: (537) 870 7666 y 870 5707. Fax: (537) 879 4651.