

Mutaciones que confieren resistencia a metronidazol y tetraciclina en *Helicobacter pylori*, su detección en aislados cubanos

Orlando Reyes-Zamora, Mayrín Hernández-Power, Lino E. Torres-Domínguez, Ludisleydis Bermúdez-Díaz y Boris L. Rodríguez-González.

Departamento de Microbiología e Inmunología, Avenida 25 y 158 No.15202, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: orlando.reyes@cnic.edu.cu

Recibido: 29 de octubre de 2009.

Aceptado: 7 de mayo de 2010.

Palabras clave: *H. pylori*, resistencia, tetraciclina, metronidazol, terapia.
Key words: *H. pylori*, resistance, tetracycline, metronidazole, therapy.

RESUMEN. La bacteria *Helicobacter pylori* es el agente causal de múltiples patologías gastroduodenales en los humanos. La infección con este microorganismo es tratada eficazmente con una combinación de dos antibióticos y un antiácido, sin embargo, la aparición de cepas resistentes a los principales antibióticos de las terapias, resulta el factor fundamental de las fallas terapéuticas. En el presente estudio se utilizó la técnica de PCR para amplificar y luego secuenciar el gen *rdxA* completo y un fragmento del gen *ARNr16S*, con el objetivo de detectar en ellos las mutaciones que tributan a la resistencia a metronidazol y tetraciclina, respectivamente. Se analizaron 37 cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas de pacientes dispépticos cubanos procedentes del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas. Al secuenciar el gen *rdxA* se encontraron 10 cepas (27 %) con mutaciones que confieren resistencia al metronidazol, otras cuatro cepas (10,8 %) con mutaciones que se han asociado a esta resistencia, una cepa (2,7 %) en la cual no se logró amplificar el gen *rdxA* por PCR y siete cepas más (18,9 %) con codones de parada no reportados anteriormente, pero que deben afectar también la función de la proteína RDXA y por tanto, tributan a la resistencia de *H. pylori* frente a este antibiótico. Consecuentemente, el valor estimado de resistencia al metronidazol en este estudio es de 45,9 % (17/37) y podría alcanzar un 62,2 % (23/37) si se sumaran las cepas con mutaciones asociadas a la resistencia y la cepa con el gen *rdxA* no amplificado por PCR. En la secuenciación del fragmento del gen *ARNr16S* solo se detectaron cinco cepas que tuvieron simples mutaciones en el codón AGA, para un 13,5 % de resistencia a la tetraciclina. Teniendo en cuenta, la resistencia potencialmente elevada al metronidazol y el relativamente pequeño número de cepas de *H. pylori* con capacidad potencial de resistir la tetraciclina en este estudio, se deberá evaluar la sustitución del metronidazol por la tetraciclina en la terapia erradicadora de *H. pylori* en Cuba.

ABSTRACT. The bacterium *Helicobacter pylori* is the main agent causing gastroduodenal pathologies in humans. The infection with this microorganism is efficaciously treated with a combination of two antibiotics and one anti-acid, although, the appearance of strains resisting the antibiotics used in therapies, is the principal factor conducting to therapeutic failures. In this study, PCR amplifications and sequence analysis of the entire *rdxA* gene and a fragment of the *ARNr16S* gene were done to detect mutations involved in metronidazol and tetracycline resistance, respectively. *H. pylori* strains isolated from gastric biopsies of thirty seven Cuban dyspeptic patients belonging to Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas hospital were analyzed. The *rdxA* sequencing analysis rendered 12 strains (32.4 %) with mutations that confer metronidazol resistance, another four strains (10.8 %) with mutations that have been associated to this resistance and seven more (18.9 %) with stop codons, not reported before, that should also affect the RDXA protein activity, tributing to the *H. pylori* resistance to this antibiotic. Consequently, the estimated metronidazol resistance value in this study is 48.6 % (18/37) and could be increased up to 65 % (24/37) if all isolates with mutations will be added. Analysis of *ARNr16S* gene fragment sequences showed only five strains with simple mutations in the AGA codon, caused by the substitution of one of its bases, to a 13.5 % of tetracycline resistance. Taking into account, the potential high level of metronidazol resistance and the relative small number of *H. pylori* strains with the potential capacity to resist tetracycline of this study, a substitution of metronidazol by tetracycline in the *H. pylori* eradicating therapy used in our country should be evaluated.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria espirilada, Gram negativa y microaerofílica que coloniza la mucosa gástrica.¹ Se estima que más del 50 % de la población mundial está infectada con este patógeno, particularmente, en países en vías de desarrollo la tasa de infección sobrepasa el 80 % de la población.² Su presencia en el estómago se ha vinculado a la aparición de diferentes patologías como

gastritis, úlceras gástricas y duodenales, cáncer gástrico y linfoma del tejido asociado a mucosa, conocido como linfoma tipo MALT.³ Los tratamientos comunes consisten en una triple terapia que incluye un inhibidor de la bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol u otro antiácido similar) y dos antibióticos, siendo los más usados, la amoxicilina, claritromicina, metronidazol o tetraciclina y una cuádruple terapia consistente en una sal de bismuto, un

inhibidor de la bomba de protones y dos de los antibióticos antes mencionados.⁴ Pero, el hecho de que los antibióticos empleados en el tratamiento de esta infección sean también empleados en otras enfermedades infecciosas, su uso indiscriminado y la automedicación, entre otras causas, han incrementado rápidamente la presencia de cepas de *H. pylori* resistentes a la mayoría de ellos.³ Por lo anterior, el estudio de la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos usados en las terapias ha devenido en un aspecto fundamental para lograr aumentar la eficacia de los tratamientos contra este patógeno humano.

Los principales antibióticos usados en la terapia contra *H. pylori* en Cuba son la amoxicilina, el metronidazol y la tetraciclina. Sin embargo, en el caso estudiado, la aparición de resistencia solo debería ser evaluada para el metronidazol y la tetraciclina, ya que este microorganismo tiene muy poca capacidad de generar resistencia contra la amoxicilina.³ Se conoce que los mecanismos de resistencia a antibióticos de *H. pylori* no están mediados por plasmidios, sino que se deben fundamentalmente a mutaciones en genes cromosomales.⁵ Existen dos tipos de técnicas fundamentales para evaluar la susceptibilidad de *H. pylori* a los antibióticos, que son las técnicas fenotípicas o de cultivo y las genotípicas o moleculares. Las primeras son consideradas las "estándar de oro", pero tienen como desventajas que consumen mucho tiempo, fracasan en un 10 % de los casos por contaminaciones o porque las bacterias no crecen y requieren condiciones especiales dadas por la microaerofilia del microorganismo.⁶ De ahí, que las técnicas moleculares se han convertido en una opción para evaluar la resistencia, ya que son rápidas, no requieren la viabilidad de las bacterias y sus resultados son reproducibles. Sin embargo, estas últimas en ocasiones requieren la secuenciación de genes o fragmentos de ellos, lo que imposibilita su uso en la práctica clínica, pero siguen siendo una poderosa herramienta en las investigaciones sobre la resistencia de este microorganismo.

En el estudio de la resistencia a metronidazol se ha determinado que los genes más importantes son *rdxA* y *frxA*. El gen *rdxA* codifica para una nitrorreductasa que le garantiza a la bacteria un poder reductor, el cual es capaz de reducir el metronidazol y activarlo, pues el antibiótico en su forma oxidada es inactivo y por tanto, no puede ejercer su efecto bactericida. Por su parte, el gen *frxA* codifica para una flavinoxidorreductasa que presenta un mecanismo de interacción con el antibiótico muy similar al de la nitrorreductasa RDXA, pero, trabajos previos han demostrado que las mutaciones en *frxA* tiene un menor efecto sobre la resistencia del microorganismo al metronidazol.^{6,7}

Existen diferentes tipos de mutaciones que afectan la actividad de los genes *rdxA* y *frxA* y son: las que conducen a codones de parada, pues se incorporan bases erróneas que determinan el fin de la síntesis de la proteína y por tanto, se produce una proteína más corta y no funcional; también se producen mutaciones puntuales que cambian la estructura tridimensional de ambas reductasas y dificultan o imposibilitan la unión del metronidazol al sitio activo de dichas enzimas.⁶ Las mutaciones que en ocasiones promueven la aparición de codones de parada, pueden ser sustituciones, inserciones o deleciones de nucleótidos. Adicionalmente, un particular interés se le ha prestado a las secuencias repetidas de adenina y timina (poli A y poli T) en el gen *rdxA* vinculadas con la aparición de resistencia, pues son regiones propensas a inserciones o deleciones de adenina o timina, respectivamente. Este último tipo de mutaciones traen como resultado final una nitrorreductasa no funcional que es incapaz de activar el

metronidazol y por tanto, no ocurre la destrucción de la bacteria por la acción del antibiótico.^{8,9}

Por otra parte, la resistencia a tetraciclina en *H. pylori* se asocia a la presencia de mutaciones en el triplete AGA de las posiciones 926-928 del gen que codifica para el ácido ribonucleico ribosomal de la subunidad 16S (*ARNr16S*).¹⁰ El nivel de resistencia depende de la cantidad de bases mutadas en el triplete. Existen tres niveles: alto, para triples mutaciones, medio para dobles mutaciones y bajo para simples mutaciones.¹¹ La tetraciclina actúa bloqueando la síntesis de proteínas y por tanto, la multiplicación bacteriana.^{12,13} En Cuba sólo se ha reportado un estudio a nivel molecular de resistencia a tetraciclina en un grupo de 28 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos.¹⁴

Por todo lo anterior, fue objetivo de este estudio, analizar la prevalencia de las mutaciones que tributan a la resistencia a metronidazol y tetraciclina en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes dispépticos cubanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo microbiológico

La cepa de referencia de *H. pylori* J99 fue utilizada como control en los experimentos. Los 37 aislados clínicos de *H. pylori* analizados en este estudio se obtuvieron a partir de biopsias gástricas tomadas de pacientes cubanos con trastornos gastroduodenales que fueron sometidos a endoscopia gástrica en el período comprendido entre diciembre del 2006 y mayo del 2007 en el Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ), La Habana. Todas las cepas del estudio fueron crecidas a partir de un banco de conservación a -70 °C en placas petri con Agar Columbia más Sangre Humana al 7 % e incubadas en atmósfera con 5,5 % de CO₂ y 37 °C por 72 h .

Purificación de ADN

Para la purificación de ADN, todo el crecimiento de una placa de cultivo de cada cepa fue colectado en 1 mL de tampón fosfato salino estéril y se procedió a la purificación del ADN genómico mediante el método del CTAB-fenol-cloroformo.¹⁵ La calidad y cantidad del ADN purificado se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % con bromuro de etidio a 0,6 µg/mL y medición espectrofotométrica a 260/280 nm .

Detección de las mutaciones que tributan a la resistencia

Las mutaciones en los genes que codifican para la nitrorreductasa RDXA y el *ARNr16S* fueron detectadas por secuenciación de segmentos de ADN de 618 y 574 pares de bases (pb), respectivamente, ambos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar los segmentos de los dos genes se partió de 50 ng del ADN total purificado de cada cepa de *H. pylori* y se empleó el equipo de ciclos térmicos Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL que contenían: 5 µL de tampón de reacción, 4 µL de la suspensión de nucleótidos (2,5 mmol/L), 4 µL de cloruro de magnesio (2 mmol/L), 1 µL de cebador directo (0,6 mmol/L) y 1 µL de cebador reverso 3' (0,6 mmol/L), 0,5 µL de la enzima Taq polimerasa (5 U, CIGB, Cuba) y 29,5 µL de agua. Las reacciones se realizaron de la siguiente manera: una primera etapa de desnaturalización a 94 °C durante 1 min seguida de 40 ciclos que constan de otra etapa de 1 min de desnaturalización a la misma temperatura, 1 min de alineamiento a 53 °C y una etapa de extensión a 72 °C durante 1 min y una etapa final de extensión a 72 °C por 5 min . Por último, se tomó 5 µL del producto

de la amplificación y se chequeó la presencia de la banda esperada para cada fragmento amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 1,6 % con bromuro de etidio. Se utilizó un patrón de peso molecular con un rango de 250 a 10 000 pb (Promega, EUA). Todos los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba (Tabla 1).

Para la secuenciación de los productos de PCR se contrataron los servicios de la compañía MacroGen Inc. (Korea del Sur). Las secuencias obtenidas se analizaron empleando las bases de datos del sitio web Europeo: EBI (www.ebi.ac.uk) y del sitio web de Estados Unidos: NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTADOS

Cultivo microbiológico

Las 37 cepas empleadas fueron confirmadas como *H. pylori* por la reacción positiva de las colonias en las pruebas de la ureasa, catalasa y oxidasa, así como por la presencia de bacilos Gram negativos ligeramente espirilados y curvos.

Detección de las mutaciones que tributan a la resistencia a metronidazol

En el análisis de resistencia a metronidazol en los 37 aislados clínicos de *H. pylori* de pacientes del CIMEQ prevalecieron las variaciones en las secuencias del gen *rdxA* y por tanto, en los aminoácidos que conforman la nitrorreductasa RDXA. En la mayoría de las cepas, se detectaron variaciones y se dividieron en diferentes grupos teniendo en cuenta la contribución de estas mutaciones a la resistencia a metronidazol en estudios anteriores.^{6,7,9}

En el primer grupo, están las mutaciones en el gen *rdxA* que tributan directamente a la resistencia, las cuales con su sola presencia definen la resistencia del microorganismo al metronidazol (Tabla 2). En este mismo grupo, se ubican las inserciones o deleciones de adenina o timina que afectan las secuencias poli A y poli T de este gen, que muestran un 13,5 % (5/37) y 18,9 % (7/37), respectivamente. Sin embargo, dentro de este tipo de mutaciones se destacaron, por su aporte directo a la resistencia, la inserción de timina en la secuencia repetida de T desde el par de bases 213 hasta el 216 observada en cuatro cepas y la inserción de adenina en la secuencia repetida de A desde el par de bases 186 hasta el 192 presente en una cepa; no se observó afectación de las secuencias poli A y poli T de forma simultánea en una misma cepa. En el segundo grupo están las mutaciones asociadas a la resis-

tencia, que agrupa una serie de mutaciones puntuales que se han observado en cepas resistentes, aunque ellas por sí solas no tributan a la resistencia a este antibiótico, es decir siempre están asociadas con algunas otras mutaciones en el gen *rdxA* (Tabla 2). En el tercer grupo, se encuentran diferentes mutaciones en el gen *rdxA* de las cepas cubanas, que no han sido descritas en la literatura consultada, en el que se destaca la aparición de cambios que conducen a codones de parada que resultan en una proteína truncada (Tabla 2).

Solo en una de las 37 cepas analizadas no se obtuvo la banda esperada en la electroforesis en gel de agarosa, aún cuando la amplificación por PCR de gen *glmM*, especie específico de *H. pylori*,¹⁶ corroboró el correcto funcionamiento del ADN de esta cepa.

Detección de las mutaciones que tributan a la resistencia a tetraciclina

El producto de PCR de 574 pb se obtuvo en todas las cepas incluidas en el estudio y la especificidad de la reacción fue elevada, pues no se visualizaron bandas de amplificación inespecífica (Fig. 1). Los productos de los PCR de todas las cepas fueron purificados y secuenciados y las secuencias resultantes fueron analizadas por el alineamiento con la secuencia reportada en base de datos de la cepa J99, la cual es sensible a la tetraciclina.

Al analizar las secuencias de los fragmentos del gen que codifica para el ARNr16S de las cepas analizadas, se determinó que cinco poseían una simple sustitución de bases en el triplete AGA₉₂₆₋₉₂₈, para un 13,5 % de aparición de este tipo de mutaciones que tributan a la resistencia a tetraciclina. De manera particular, la cepa Hp13 tuvo una sustitución de la adenina de la posición 926 por una guanina, AGA₉₂₆₋₉₂₈ → GGA, las cepas Hp80 y C30 presentan una sustitución de la adenina de la posición 928 por una timina, AGA₉₂₆₋₉₂₈ → AGT y las cepas C44 y C70 presentan una sustitución de la adenina de la posición 926 por una timina AGA₉₂₆₋₉₂₈ → TGA. Las mutaciones encontradas se indican en negrita y subrayadas (Fig. 2).

DISCUSIÓN

En este estudio, se caracterizaron las mutaciones que tributan a la resistencia a metronidazol y tetraciclina en 37 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes cubanos aquejados de diferentes patologías gástricas. Para ello, en todas las cepas se secuenció el gen *rdxA* completo (618 pb) y un fragmento de 574 pb del gen que codifica para el ARNr16S.

Tabla. 1. Cebadores empleados en las reacciones de PCR y secuenciación.

Cebador	Secuencia	Longitud de amplificación
16S-D1 ^a	5' GAACATTACTGACGCTGATT 3'	574 pb
16S-I1 ^b	5' ACAATCCGAACTGAGGGTG 3'	574 pb
16S-Dn2 ^c	5' GGGGAGCAAACAGGATTAGATA 3'	491 pb
16S-In2 ^d	5' CTTCTCTTTGTGCACCCCAT 3'	491 pb
rdxA-F ^e	5' -TGGATCACGAAAAAGAAGA -3'	618 pb
rdxA-R ^f	5' -ACCAAGTAATTGCATCAACT -3'	618 pb
RdF1 ^g	5' -CACGAAAAAGAAGACAATT -3'	594 pb
RdR2 ^h	5' -TTTTGATTTTCTTGATTTTT -3'	594 pb

a,b) Cebadores directo y reverso empleados en las reacciones de PCR del gen *rdxA*. e,f) Cebadores directo y reverso empleados en las reacciones de PCR del fragmento del gen ARNr16S. c,d) Cebadores directo y reverso empleados en la secuenciación del gen *rdxA*. g,h) Cebadores directo y reverso empleados en la secuenciación del fragmento del gen ARNr16S.

Tabla 2. Mutaciones en el gen *rdxA* y los cambios resultantes en la proteína RDXA de aislados cubanos de *H. pylori*.

Grupo	Mutaciones en <i>rdxA</i>	Cambios en aa de RDXA (cepas)	Cepas con mutaciones que tributan directamente a la resistencia (%)	
1	Codones de parada	G103T	CP 35 (C67)	27
		+T163, +C155	CP 59 (C74, C92)	
		+T207	CP 73 (Hp14)	
		+A193	CP 74 (C4)	
		G223T	CP 75 (C30)	
	Mutaciones puntuales	-T442	CP 114 (C5)	
		T395G	CP 132 (C30*)	
		+G469, +G436	CP159 (Hp14*, Hp160)	
		G47A	R16H (C61)	
		C200T	A67V (C96)	
	A437T, A438G	Q146L (C30*)		
2	Mutaciones puntuales asociadas	G364A	G122S (Hp13)	0
		G419A	C140Y (Hp198, C28)	
		G508A, A510C	G170S (Hp43)	
		G610A	V204I (Hp43*)	
3	Nuevos codones de parada	C42T	CP15 (C67*)	18,9
		+T67	CP23 (Hp183)	
		+G80	CP30 (Hp80)	
		G156A	CP52 (Hp14*)	
		+T176	CP60 (Hp159)	
		+T221, A232T	CP78 (Hp80*)	
		+C240	CP92 (C18)	
		+G320	CP115 (C44)	
		-A358	CP123 (C11)	
		C388T	CP130 (Hp214)	
C414T	CP139 (C96*)			

Grupos: 1) Mutaciones en el gen *rdxA* que tributan directamente a la resistencia. 2) Mutaciones en el gen *rdxA* asociadas a la resistencia. 3) Nuevas mutaciones encontradas en el gen *rdxA* de cepas cubanas, que deben tributar directamente a la resistencia. CP Codones de parada. + Inserciones de nucleótidos. - Delecciones de nucleótidos. * Cepas que presentan más de una de las mutaciones que tributan directamente a la resistencia a metronidazol y por tanto, cuentan solo una vez en el porcentaje total reportado.

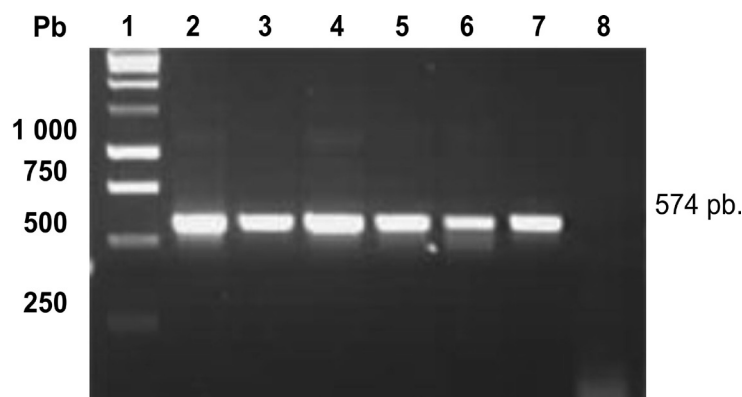


Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,6 % de los productos amplificados por PCR de un fragmento de 574 pb del gen que codifica para el ARNr16S. Carril 1) Patrón de peso molecular. Carril 2) Control positivo (ADN de la cepa J99). Carriles del 3 al 7) ADN de 5 de las cepas cubanas aisladas. Carril 8) Control negativo (mezcla de reacción sin ADN).

C13	CAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA T GATACA
Hp13	CAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA G GATACA
Hp153	CAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGATACA
J99	CAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGATACA
C30	CAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAG T TACA
C44	CAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA T GATACA
C92	CAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGATACA
C70	CAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA T GATACA
Hp80	CAAAGGAGGTTGCGGTGACTCGCAGACTTGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGA T GATACA

Fig. 2. Alineamiento múltiple de secuencias del fragmento amplificado por PCR del gen *ADNr 16S* de 9 de las cepas de *H. pylori* estudiadas y la secuencia reportada en la base de datos de la cepa de referencia J99, cuyo genoma ha sido secuenciado completamente (J99 es sensible a tetraciclina). Las mutaciones por sustitución de bases en las cepas analizadas se indican en negrita y subrayadas.

Metronidazol

Las cepas de *H. pylori* han desarrollado elevada resistencia a metronidazol en varias regiones del mundo.^{9,17,18} La detección microbiológica de la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos constituye un arma muy potente en la evaluación de la capacidad de resistencia de estos microorganismos, siendo el E-Test el método más confiable actualmente.¹⁹ No obstante, los métodos moleculares han ido ganando terreno en los estudios de resistencia y hoy día, se puede demostrar o inferir la resistencia a antibióticos en cepas de *H. pylori* con el solo uso de técnicas moleculares.^{9,17,18}

Numerosos estudios han demostrado que la resistencia a metronidazol en *H. pylori* está relacionada con mutaciones en los genes *rdxA* y *frxA*, lo cual se ha corroborado por experimentos de inactivación génica.⁶ Trabajos previos han descrito una amplia variedad de mutaciones puntuales en ambos genes, pero sin localización específica,^{7,20} lo que hace la caracterización de la resistencia a metronidazol un proceso tedioso desde la óptica molecular. Sin embargo, el hecho de saber que algunos tipos de mutaciones en *rdxA* son las principales responsables de la resistencia de *H. pylori* a este antibiótico, ha facilitado la detección molecular de las cepas resistentes al metronidazol.⁶

El primer grupo de mutaciones en el gen *rdxA* que tributan directamente a la resistencia fueron detectadas en el 32,4 % de las cepas estudiadas (Tabla 2), un poco superior a lo descrito por Fengchan y cols.,⁷ que reportaron un 26,3 %, e inferior a lo reportado por Chisholm y Owen,⁸ que encontraron un 42,1 % en su estudio. Sin embargo, en ambos casos, el número de cepas estudiadas fue menor que las del presente trabajo, lo que influye negativamente en la comparación de los resultados. Pero, en los tres estudios se encontró el tipo de mutaciones que conducen a la formación de codones de parada en el gen *rdxA*, que dan como resultado una reductasa truncada, incapaz de activar el metronidazol para que ejerza su acción antibiótica. Coincidiendo con lo anterior, en otros trabajos se ha detectado este tipo de mutaciones en el gen *rdxA* de cepas resistentes a metronidazol.^{9,17,18,21} También en este grupo de resistencia, se observaron mutaciones puntuales (Tabla 2), por sustituciones de bases, que por sí solas determinan la resistencia a metronidazol y que han sido descritas como marcadores moleculares de resistencia.^{9,17,18} En el tercer tipo de mutaciones de este primer grupo estuvieron las inserciones o deleciones de adenina o timina en las secuencias poli A y poli T de *rdxA*, respectivamente. Estos sitios del gen son propensos a que se alteren el número de adeninas o timinas en

ellos, lo que generalmente trae como consecuencia la síntesis de una nitrorreductasa disfuncional y por tanto la aparición de cepas resistentes.^{8,9}

En el segundo grupo de resistencia, los cambios encontrados en el gen *rdxA* que se asocian a la resistencia a metronidazol fueron mutaciones puntuales que condujeron a diferentes variaciones aminoacídicas (Tabla 2) y estuvieron presentes en el 10,8 % de las cepas (4/37). Estas mutaciones se han vinculado con la resistencia a metronidazol en *H. pylori*,⁹ pero no se han detectado fenotipos resistentes con la sola presencia de alguna de ellas, aunque tampoco se han encontrado en cepas susceptibles. Por lo anterior, para definir el aporte de estas mutaciones al porcentaje total de cepas resistentes en este estudio, se deberá evaluar *in vitro* la capacidad de resistir el metronidazol de estos aislados de *H. pylori*.

En un tercer grupo de resistencia, se incluyeron mutaciones no reportadas hasta ahora (Tabla 2), que promovieron la formación de codones de parada. Lo anterior resulta interesante en el análisis de la resistencia, ya que las posiciones en las que se localizaron los codones de parada en las cepas cubanas son similares a otros casos previamente descritos,^{7,8} en los que las cepas portadoras de estos codones resultaron definitivamente resistentes al metronidazol. Por tanto, este tercer grupo de cepas debe tributar directamente a la resistencia al igual que lo hacen los aislados de *H. pylori* contemplados en el primer grupo de resistencia.

Solo en la cepa Hp239 no se obtuvo la amplificación por PCR del gen *rdxA*, aun cuando sí se observó un producto de PCR para el gen *glmM* con el mismo ADN de la cepa, lo cual demostró la calidad del ADN purificado. Lo anterior pudiera explicarse por una afectación del gen *rdxA* en las regiones de unión de los oligonucleótidos o por la no presencia del gen en esta cepa. Para evaluar el grado de afectación del gen *rdxA* en este aislado de *H. pylori* y su potencial tributo a la resistencia, se deberán diseñar oligonucleótidos que hibriden en las regiones flanqueantes al gen, para secuenciar el producto de esta nueva reacción de PCR y entonces realizar el análisis de las secuencias resultantes.

Finalmente, el nivel de resistencia al metronidazol estimado en este estudio fue de 48,6 % (18/37), que incluye las cepas de los grupos 1 y 3. Adicionalmente, si todos los otros aislados en los que se encontraron mutaciones (grupo 2 y cepa Hp239) fueran definitivamente resistentes al metronidazol, la resistencia en las cepas cubanas analizadas podría alcanzar un 65 % (24/37). Estos resultados sugieren que deberá evaluarse la eficacia del metronidazol en la triple terapia que se realiza en Cuba para erradicar *H. pylori*.

Tetraciclina

Solo en cinco de las cepas analizadas, se encontraron mutaciones en el fragmento del gen *ARN16S*, al compararlas con la secuencia depositada en la base de datos de la cepa de referencia J99 (Fig.2). Con la misma comparación, se pudo constatar que las cepas cubanas, que no presentaron mutaciones, tuvieron un porcentaje de similitud mayor del 94 % con respecto a las secuencia del gen de la cepa J99 depositada en la base de datos.

Dentro de las cepas potencialmente resistentes a tetraciclina, solo se detectaron simples mutaciones. Teniendo en cuenta lo planteado por Dailidiene y cols.¹¹ cabe esperar que las cinco cepas tengan el nivel de concentración mínima inhibitoria (CMI) a tetraciclina más bajo, con un valor igual o ligeramente mayor que 2 µg/mL, que es el punto de corte de resistencia para este antibiótico.¹¹ Al comparar los resultados de este estudio con los de otro realizado por Wu y cols.,²² en el que emplearon cepas de *H. pylori* de Norteamérica y Asia, y que secuenció un fragmento similar del gen *ARNr16S*, se corroboró que la mayoría de las mutaciones en el triplete AGA₉₂₆₋₉₂₈ ocurren en un solo nucleótido y se evidenció además, que las sustituciones encontradas en los aislados clínicos del presente estudio habían sido reportadas por ellos anteriormente.²²

De manera que, el 13,5 % de los aislados clínicos analizados tuvieron mutaciones que los hacen potencialmente resistentes a la tetraciclina, pero en los menores niveles, ya que las mutaciones encontradas solo fueron simples sustituciones en el triplete del sitio primario donde se une el antibiótico.²² Este bajo porcentaje de cepas con mutaciones que tributan a la resistencia a tetraciclina, sugiere un bajo nivel de resistencia en los aislados de *H. pylori* estudiados, si se compara con algunos trabajos anteriores.^{11,22,23,24} Por ejemplo, en el estudio realizado en Nigeria, se encontró que los 245 aislados analizados eran resistentes a tetraciclina con valores de CMI mayores de 16 µg/mL.²³ Sin embargo, en otro estudio realizado con cepas aisladas en Japón y Korea, se encontraron valores de prevalencia entre 5 y 7 %.²⁴ Por lo anterior, el resultado aquí obtenido corrobora los bajos niveles potenciales de resistencia obtenidos en el primer trabajo que reportó la prevalencia (10,7 %), en aislados cubanos de *H. pylori*, de las mutaciones que tributan a la resistencia a tetraciclina.¹⁴

CONCLUSIONES

El 48,6 % de las cepas analizadas resultó potencialmente resistente a metronidazol con la posibilidad de que este valor aumente hasta un 65 %, lo cual resulta una cantidad muy elevada de cepas resistentes y constituye una alarma en el uso de este antibiótico en la terapia contra *H. pylori*. Por otra parte, solo se detectó un 13,5 % de cepas potencialmente resistentes a tetraciclina y siempre en los niveles más bajos de resistencia, por lo cual debería estudiarse la posible sustitución del metronidazol por la tetraciclina en el esquema terapéutico contra *H. pylori* que se realiza en el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (Campylobacter pylori). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990;9:1-13.
2. Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2004;9 Suppl 1:1-6.
3. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:280-322.
4. Go MF. Treatment and management of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Gastroenterol Rep.* 2002;4:471-7.

5. Rautelin H, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2003;8:13-20.
6. Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Dailidiene D, Wang Y, Velapattino B, Gilman RH, et al. Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2000;182:5082-90.
7. Fengchan H, Sookyn L, Bow H, Zhen Y, Xiaojun Y. Alterations in *rdxA* and *frxA* genes and their upstream regions in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* isolates. *Research in Microbiology.* 2007;158:38-44.
8. Chisholm SA, Owen RJ. Mutation in *Helicobacter pylori* *rdxA* gene sequences may not contribute to metronidazole resistance. *J of Antimicrob Chemother.* 2003;51:995-9.
9. Tankovic J, Lamarque D, Delchier JC, Soussy CJ, Labigne A, Jenks PJ. Frequent Association between Alteration of the *rdxA* Gene and Metronidazole Resistance in French and North African Isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000;608-13.
10. Trieber CA, Taylor DE. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol.* 2002;184:2131-40.
11. Dailidiene D, Bertoli MT, Miculeviciene J, Mukhopadhyay AK, Dailide G, Pascasio MA, et al. Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3940-6.
12. Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake and resistance mechanisms. *Arch Microb.* 1996;165:359-69.
13. Brodersen DE, Clemons WM, Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell.* 2000;103:1143-54.
14. Torres L, Rodríguez E, Hernández M, Moreno A, Roblejo Y, Samada M, et al. Eventos moleculares que tributan a la resistencia a tetraciclina en *Helicobacter pylori*, su detección en aislados clínicos cubanos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2007;39(2):121-7.
15. Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ra Edition USA: John Wiley & Sons, Inc: 1995:p.23-4.
16. Roblejo Y, Samada M, González J, Marrero A, Rodríguez BL, Fando R, et al. Comparación de métodos en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con desórdenes gastroduodenales. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2004;36(3):191-7.
17. Jenks PJ, Ferrero R L, Labigne A. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J of Antimicrob Chemother.* 1999;43:753-8.
18. Marais A, Bilardi C, Cantet F, Mendz GL, Mégraud F. Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Research in Microbiology.* 2003;154:137-44.
19. Glupczynski Y, Broutet N, Cantagrel A, Andersen LP, Alarcón T, Megraud F, et al. Comparison of the E test and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:549-52.
20. Kim SY, Joo YM, Lee HS, Chung IS, Yoo YJ, Merrell DS, et al. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss functional *rdxA*. *The Journal of Antibiotics.* 2009;62:43-50.
21. Albert TJ, Dailidiene D, Dailide G, Norton JE, Kalia A, Richmond TA, et al. Mutation discovery in bacterial genomes: metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Nature Methods.* 2005;2(12):951-3.
22. Wu JY, Kim JJ, Reddy R, Wang WM, Graham DY, Kwon DH. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:578-83.
23. Oyedeji KS, Smith SI, Coker AO y Arigbabu AO. Antibiotics susceptibility patterns in *Helicobacter pylori* strains from patients with upper gastrointestinal pathology in Western Nigeria. *British J Biom Science.* 2009;66(1):10-3.
24. Kwon DH, Kim JJ, Lee M, Yamaoka Y, Kato M, Osato MS, et al. Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:3203-5.