

DETECCIÓN POR ASP-PCR DE MUTACIONES RESPONSABLES DE RESISTENCIA A CLARITROMICINA EN *HELICOBACTER PYLORI*

Ángela Boretto

Becaria de Iniciación a la Investigación, Cientibeca, Edición 2023.
Laboratorio de Práctica Profesional de Bioquímica, Hospital José María Cullen.
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Director: Dr. Fabián A. Tedeschi.
Co-Director: Dr. Fabián E. Zalazar.

Área: Ciencias de la Salud

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, Resistencia a Claritromicina, ASP-PCR

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un bacilo gram-negativo, curvado y microaerófilo que puede encontrarse en la mucosa gástrica del estómago humano por su capacidad de sintetizar y secretar la enzima ureasa que modifica el pH gástrico, generando condiciones permisivas para la colonización. Se considera que podría ser el patógeno gástrico de más amplia distribución mundial, aceptado como agente causal de gastritis crónica, enfermedad ulcero péptica y como un factor etiológico en la secuencia que conduce al carcinoma gástrico. A pesar de la alta prevalencia de la infección, (que en algunas regiones alcanza al 90 % de la población) sólo una minoría de los individuos infectados evoluciona hacia una enfermedad maligna. Esto podría deberse a la presencia de factores de virulencia específicos de la bacteria (por ejemplo los productos de los genes *cagA*, *vacA*, *CagA* y *OipA*), a la diversidad genética de diferentes cepas y a factores inherentes al huésped. (Bucci P. 2023) En relación al tratamiento la claritromicina (o levofloxacina), amoxicilina y un inhibidor de la bomba de protones son las drogas más recomendadas como terapia de primera línea, aunque la eficacia de estos regímenes terapéuticos ha ido disminuyendo, principalmente por la creciente resistencia a antibióticos. La erradicación es variable según la región debido al aumento de la resistencia a claritromicina, como consecuencia de mutaciones puntuales en el dominio V del gen *23S ARNr* siendo las más prevalentes en todo el mundo las A2142G y A2143G. En 2017 la Organización Mundial de la Salud incluyó a *H. pylori* en su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos. Además, según las recomendaciones del Consenso de Maastricht VI, el uso de las terapias de erradicación de la infección debe estar respaldado por estudios de prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos en cada región. El mismo consenso internacional, propone a las pruebas moleculares como alternativa diagnóstica para determinar la resistencia de *H. pylori* en biopsias gástricas. Sobre esta base, el monitoreo de la prevalencia de la resistencia a antibióticos adquiere una significativa relevancia para la práctica clínica. Si bien hay estudios que abordan la prevalencia de resistencia a antibióticos tanto en Latinoamérica, como en nuestro país, todavía son escasos los reportes publicados, a nivel molecular, sobre la evaluación de mecanismos de resistencia de *H. pylori* a distintos antibióticos. (Baroni, MR 2018)

Título del proyecto: Infección por *Helicobacter pylori*: estudio de factores asociados a la bacteria y al huésped con impacto en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

Instrumento: CAI+D (50520190100198L)

Año convocatoria: 2020 / Organismo financiador: Secretaría de Ciencia y Técnica, UNL.

Director: Dr. Fabián E. Zalazar

Co-director: Dr. Fabián A. Tedeschi



OBJETIVOS

Objetivo General:

- Abordar aspectos moleculares de la patogénesis y mecanismos de resistencia a los antibióticos en la infección por *H. pylori* a fin de consolidar en nuestra región una línea de trabajo sobre el tema.

Objetivos Específicos:

- Detectar molecularmente la presencia de la bacteria *H. pylori* en muestras de biopsias gástricas.
- Realizar una genotipificación en función de genes de factores de virulencia.
- Analizar la presencia de las mutaciones A2142G y A2143G en el dominio V del gen 23S ARNr de *H. pylori*.

METODOLOGÍA

Pacientes y muestras:

Para la selección de pacientes aptos para la presente investigación, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- Criterio de inclusión: pacientes a los que se les haya indicado estudio endoscópico digestivo alto, por síntomas como: ardor, pirosis, dolor abdominal recurrente, pérdida de peso o intolerancia selectiva a ciertas ingestas.
- Criterio de exclusión: Pacientes que hubieran recibido en los últimos 15 días terapia con antibióticos, antagonistas de receptores H2 e Inhibidores de la bomba de protones.

Se procesaron 81 muestras de mucosa gástrica de pacientes sintomáticos atendidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital “Dr. J.M. Cullen” (Santa Fe), con indicación de fibroendoscopia digestiva alta, que hayan dado su consentimiento informado para el estudio. Se cuenta con un Formulario de Consentimiento Informado y una Ficha Epidemiológica para cada paciente. Los profesionales médicos encargados de las endoscopias, tomaron 6 muestras de la región antral y cuerpo del estómago de cada paciente: 2 para el test de ureasa rápida, 2 para el examen histológico y 2 para el análisis molecular. Se registró: género, edad, diagnóstico anatomopatológico y endoscópico de cada paciente. Para el test de la ureasa rápida se colocaron las dos primeras muestras de biopsia en caldo de urea de Christensen al 2% con el agregado de rojo fenol. El análisis histológico (llevado a cabo por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital “Dr. José María Cullen”) incluyó coloración con Giemsa para detectar *H. pylori*, así como una evaluación de las lesiones en la mucosa gástrica.

Extracción y purificación de ADN:

Para la extracción y purificación de ADN de las muestras, se llevó a cabo un protocolo basado en el tratamiento de las mismas con Proteinasa K y posterior extracción por solventes. Las muestras de ADN se conservaron a -20°C hasta su uso en las distintas reacciones de amplificación.

Identificación molecular de *H. pylori* por amplificación del gen hsp60:

Para la detección de *H. pylori*, las muestras de ADN obtenidas de biopsias gástricas fueron sometidas a amplificación por una PCR, utilizando oligonucleótidos específicos de secuenciación para el gen *hsp60* y reactivos comerciales.

Amplificación por PCR de punto final de secuencias correspondientes a los genes de factores de virulencia de *H. pylori*:

En aquellas muestras positivas para *H. pylori*, se procedió a evaluar el perfil de factores de virulencia correspondiente. Para esto, se realizó una PCR múltiple de punto final para analizar los genes *cagA* y *vacA*, y una PCR de punto final individual para la detección de los genes *babA2* y *OipA*.

Detección de mecanismos de resistencia a claritromicina:

En las muestras positivas para *H. pylori* se evaluó la presencia de mutaciones responsables de resistencia a claritromicina. Éstas fueron analizadas por amplificación, por una variante de la PCR conocida como Allele-Specific Primer-PCR, utilizando un juego de primers que -en un solo tubo de reacción- (Multiplex PCR) puede detectar y distinguir la presencia de las mutaciones A2142G y A2143G, generando un solo fragmento de 576 pb en ausencia de mutaciones y 2 fragmentos en presencia de mutaciones (439 pb + 576 pb, para el caso de la mutación A2142G y de 171 pb + 576 pb en el caso de la mutación A2143G).

Análisis de los productos de amplificación en las PCR de punto final:

En todos los casos, los productos formados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con un colorante fluorescente apropiado, en presencia de 2 marcadores de tamaño molecular.

RESULTADOS

Para la detección de *H. pylori* en muestras de mucosa gástrica se utilizó una PCR que constó con dos rondas de amplificación de secuencias del gen *hsp60* (Nested-PCR). Las muestras positivas, generaron un fragmento de 590 pb en la primera ronda de amplificación y uno de 501 pb en la segunda, con el uso de un par de oligonucleótidos de apareamiento interno de la primera secuencia seleccionada. (Figura 1).

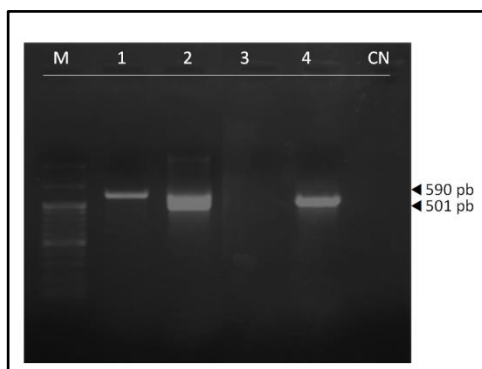


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación del gen *hsp60* de *H. pylori*

Calles: 1-3 Primera ronda de PCR,
Cálles 2-4 Nested PCR,
M: Marcador 50 bp (InbioHighway),
CN: Control Negativo

La especificidad de la reacción fue evaluada previamente utilizando muestras de ADN de microorganismos no relacionados (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*) y de ADN humano. Los resultados de la Nested-PCR fueron tenidos en cuenta en conjunto con los resultados del test rápido de ureasa y del análisis histológico. En base a éste análisis, se consideraron como muestras *H. pylori* (+) a aquellas muestras de pacientes con resultados positivos en al menos 2/3 de las pruebas ensayadas. Este criterio permitió seleccionar 44 muestras de pacientes, quienes tuvieron un diagnóstico de Gastritis (con distintos grados de severidad, de acuerdo al análisis histológico realizado por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital "Dr. J.M. Cullen"). Histológicamente se pudieron observar 2 grupos de pacientes: a) Pacientes con Gastritis Crónica Leve (GCL) (n=14) y

b) Pacientes con Gastritis Crónica Moderadas (GCM) (n=30). En cuanto al género, el 71% (31) y el 29% (13) fueron mujeres y hombres, respectivamente. Al analizar los genotipos presentes en las muestras *H. pylori* (+), se detectó el gen *cagA* en un 48% del total de los pacientes con gastritis crónica. Además, la totalidad de los pacientes presentaron el gen *vacA*, en distintas variantes y combinaciones: el 66% correspondió a la variante *vacAs1m1*, *vacAs1m2* a un 23% seguida por *vacAs2m2* en un 11%. No se encontraron variantes

vacAs2m1. En cuanto a la detección del gen *Oip* se obtuvo un 75% de positividad, mientras que el gen *babA2* estuvo presente en el 48% (21) de las muestras analizadas. La Figura 2A es representativa de los resultados de la PCR Múltiple para los genes *cagA* y *VacA* encontrados en distintos pacientes.

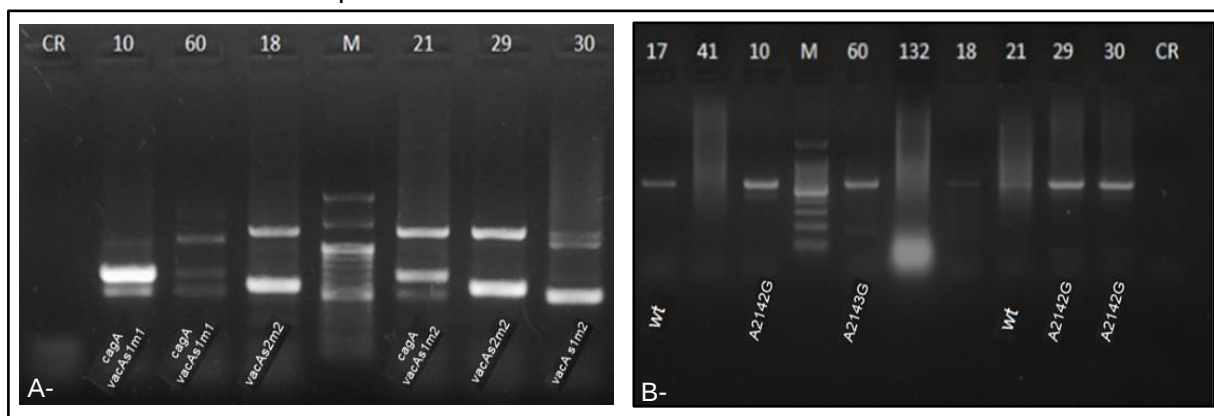


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación.

A) Múltiplex PCR para genes *cagA* y *vacA* de *H.pylori*. CR: Control de reactivos; M: Marcador 50 bp (InbioHighway);
B) ASP-PCR. WT: muestras sin mutaciones detectadas; Mut A2142G y Mut A2143G: Muestras presentando las correspondientes mutaciones; CR: Control de reactivos; M: Marcador 100 bp (InbioHighway)

Utilizando la metodología propuesta en este trabajo (Allele-Specific Primer-PCR) se detectó un 29% de mutaciones en las muestras analizadas. La Figura 2B es un ejemplo de estos resultados.

En la Tabla 1 se presenta la frecuencia de genotipos (en relación a factores de virulencia) en las muestras que presentaron mutaciones responsables de resistencia a claritromicina

El genotipo llamado “triple virulento” *cagA*(+)/*vacAs1m1*/*babA2* se encontró en un 69% mientras que cepas {*cagA*(+)/*vacAs1m1*/*babA2*/*Oip*}, “cuádruple

Virulentas” representaron un 61,5% de este grupo. Además se observó que los pacientes que portaban cepas resistentes con tres o cuatro factores de virulencia presentaban GCM.

Tabla 1: Asociación entre factores de virulencia y mutaciones puntuales en el gen 23S de ARNr en *Helicobacter pylori*

Paciente genérico	<i>cagA</i>	<i>vacA</i>		<i>babA2</i>	<i>Oip</i>	Mutaciones puntuales	
		s	m			A2142G	A2143G
1	+	1	1	+	+	+	-
2	+	1	1	+	+	+	-
3	+	1	1	-	+	+	-
4	+	1	1	+	+	+	-
5	-	1	2	-	+	+	-
6	+	1	2	-	+	+	-
7	+	1	1	+	+	+	-
8	+	1	1	+	-	+	-
9	+	1	1	-	+	+	-
10	+	1	1	+	+	-	+
11	+	1	1	+	+	+	-
12	+	1	1	+	+	+	-
13	+	1	1	+	+	+	-

CONCLUSIONES

Utilizando la metodología seleccionada, se pudieron identificar mutaciones responsables de resistencia a claritromicina. Además, en las muestras estudiadas presentando mutaciones A2142G y A2143G, se evidenciaron pacientes con genotipos altamente virulentos. Al igual que en nuestros trabajos anteriores los resultados aportarían información valiosa que combinada con los datos proporcionados por anatomía patológica resultarían en una mejor identificación de pacientes portadores de cepas virulentas y resistentes y de esta manera instaurar una terapia adecuada para prevenir la aparición de lesiones severas a nivel del epitelio gástrico.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- 1 -Baroni MR, Bucci P, Giani RN, Giusti A, Tedeschi FA, Salvatierra E, Barbaglia Y, Jimenez F, Zalazar FE. 2018. Usefulness of rapid urease test samples for molecular analysis of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Rev Argent Microbiol. 50:369-364.
- 2 -Bucci P, Barbaglia Y, Tedeschi FA, Zalazar FE. 2023. **Helicobacter pylori* infection: a balance between bacteria and host. Rev Argent Microbiol. 55:60-67