

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Helicobacter pylori* A PARTIR DE
BIOPSIAS GASTRICAS Y SU RESPUESTA A LA TERAPIA ANTIMICROBIANA

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

ERIKA DANIELA CAÑAS VARGAS

KEVIN FERNANDO DIAZ ORTIZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

MAYO 2020

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORAS DE AREA EN MICROBIOLOGIA

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

DOCENTE ASESOR

MSc. Mario Herbert Romero Rivera

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos a Dios porque él nos ha permitido alcanzar este logro, a nuestros familiares y amigos por su apoyo y cariño.

A nuestro docente asesor MSc. Mario Herbert Romero Rivera por habernos propuesto este reto, por su tiempo y dedicación para el desarrollo de este trabajo de graduación.

A nuestras asesoras de área, Dra. Tania Cuadra y MSc. Coralia González y Directora de Procesos de Graduación, MSc. Cecilia Gallardo por sus consejos y sugerencias.

A Dra. Yaneth Henríquez de la Facultad de Odontología de la Universidad de El Salvador, quien nos facilitó el uso del equipo para incubar nuestros cultivos y a Dr. Emerson Pocasangre de la Facultad de Medicina de la Universidad Evangélica de El Salvador por recibirnos amablemente y apoyarnos con el uso de equipo, materiales y reactivos necesarios para la parte de biología molecular.

A Dra. Apolinaria García, por sus consejos y sugerencias.

A Dra. Marisabel Valdéz, Dr. Belkin Rogel, Sra. De Morán, y pacientes del área de gastroenterología del Hospital Zacamil quienes nos apoyaron durante el proceso de recolección de muestras.

A MSc. Guillermo Emilio Alvarenga Marroquín por sus palabras de ánimo y buenas vibras

A Sr. Wilber Guzmán y Sr. Oscar Coreas, laboratoristas de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia por su colaboración y apoyo.

A cada uno de ellos, infinitas gracias y bendiciones masivas.

Kevin Díaz y Daniela Vargas

DEDICATORIA

Este trabajo de graduación lo dedico en especial a mi padre Dios, por su infinito amor, su ayuda y apoyo, sin él nada de esto hubiese sido posible.

A mi mami, Ada Vargas García, por su apoyo en todo el desarrollo de mi carrera, sus palabras de aliento, sus consejos y su amor incondicional. Este logro también es suyo.

A mi mamá, Ady García Pineda, porque siempre ha estado a mi lado para apoyarme en lo que necesite, por todos sus consejos y el gran amor que me tiene.

A mi hermana y amiga, Naara Vargas, por animarme con sus palabras de aliento, por apoyarme siempre y quererme tanto.

A mis tíos Mirna de Hernández y Miguel Hernández, a mis primas Alejandra Aurora y Gabriela Aurora, a mis sobrinas Adriana Hernández e Isabela Hernández, por todo su cariño y apoyo durante el desarrollo de toda mi carrera.

A mis compañeros de área y amigos, por su apoyo para el desarrollo de este trabajo de graduación, por compartir su energía y alegría conmigo en los días difíciles.

A mi compañero de tesis y mejor amigo, Kevin Díaz, por su bonita amistad, su tolerancia durante todo el tiempo que trabajamos juntos, por aceptarme tal cual soy, apoyarme sin juzgarme y haber soportado la prueba valientemente junto a mí.

Erika Daniela Cañas Vargas

DEDICATORIA

Este trabajo de graduación se lo dedico en primer lugar a Dios Todopoderoso por permitirme culminar con éxito este reto, por su infinito amor e infinita misericordia.

A mi amada abuela, Judith Ortiz uno de mis pilares, gracias por siempre estar conmigo en todo momento por apoyarme incondicionalmente, por cuidarme y estar pendiente de mí.

A mi madre, Laura Díaz, por apoyarme y proveerme todo lo necesario para cumplir mis metas, por darme palabras de ánimo y lo más importante creer y confiar en mí.

A mi tía Ana de Kemnitz, por brindarme sus sabios consejos y por ser mi modelo a seguir para convertirme en un profesional con ética y moral.

A mis hermanos, Laura Mejía, Marcela Mejía y Alexis Díaz, por todo su apoyo y cariño en este largo camino.

A mis compañeros, amigos y colegas, por sus consejos y palabras de ánimo, por estar pendientes de cada avance y compartir su alegría y sincera amistad.

A mi compañera de tesis y mejor amiga, Daniela Vargas, gracias por tu amistad, tolerancia y confianza, por enfrentar este reto conmigo, por enseñarme que debo afrontar cada obstáculo con valentía y carácter.

A todas las personas que de manera directa o indirecta me apoyaron y me alentaron para culminar con éxitos cada etapa de este trabajo de graduación.

Kevin Fernando Díaz Ortiz

3.2.4.1	Gastritis	33
3.2.4.2	Úlcera péptica	34
3.2.4.3	Cáncer gástrico	35
3.2.4.4	Linfoma	35
3.2.5	Vías de transmisión	36
3.2.5.1	Transmisión “Fecal-Oral”	36
3.2.5.2	Transmisión “Oral-Oral”	37
3.2.6	Prevalencia mundial y latinoamericana	37
3.3	Diagnóstico de <i>Helicobacter pylori</i>	39
3.3.1	Métodos invasivos	39
3.3.1.1	Estudio histológico	39
3.3.1.2	Cultivo	40
3.3.1.3	Prueba rápida de ureasa	41
3.3.2	Métodos no invasivos	42
3.3.2.1	Prueba del aliento	42
3.3.2.2	Serología	43
3.3.2.3	Antígeno en heces	44
3.3.3	Métodos moleculares: PCR ARN 16s	45
3.4	Tratamiento antimicrobiano	46
3.4.1	Indicaciones de tratamiento	47
3.4.2	Esquemas de tratamiento	47
3.4.3	Causas de fracaso de tratamiento	49
3.4.3.1	Resistencia de <i>H.pylori</i> a los antibióticos	49
3.4.3.1.1	Metronidazol	49
3.4.3.1.2	Claritromicina	50
3.4.3.1.3	Amoxicilina	50
Capítulo IV		
4.0	DISEÑO METODOLOGICO	53

4.1 Tipo de estudio	53
4.2 Investigación bibliográfica	53
4.3 Investigación de campo	54
4.3.1 Universo	54
4.3.2 Muestra	54
4.3.3 Tipo de muestreo	54
4.3.4 Criterios de inclusión	54
4.3.5 Criterios de exclusión	54
4.4 Parte experimental	55
4.4.1 Obtención y transporte de la muestra	55
4.4.2 Procesamiento de la muestra y aislamiento del microorganismo	55
4.4.2.1 Preparación y siembra de la muestra	55
4.4.2.2 Transporte de las placas de cultivo a incubadora de CO ₂ .	56
4.4.2.3 Incubación de la muestra y observación de los cultivos	56
4.4.3 Identificación del microorganismo	56
4.4.3.1 Caracterización macroscópica y microscópica	56
4.4.4 Pruebas bioquímicas	57
4.4.4.1 Prueba de la ureasa	57
4.4.4.2 Prueba de la oxidasa	57
4.4.4.3 Prueba de la catalasa	57
4.4.5 Subcultivo del microorganismo	58
4.4.6 Respuesta a la terapia antimicrobiana por el método de Kirby Bauer	58
4.4.6.1 Antibiograma	58
4.4.6.2 Lectura de los halos	59

4.4.7	Conservación de la cepa	59
4.4.8	Verificación de la presencia del gen ARN 16s	60
4.4.8.1	Reanimación de la cepa	60
4.4.8.2	Extracción y purificación del ADN	60
4.4.8.3	Preparación del gel de agarosa	61
4.4.8.4	Preparación de la cuna del gel	61
4.4.8.5	Preparación del master mix	62
4.4.8.6	Preparación de las muestras	62
4.4.8.7	Realización de los ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ARNr 16s	63
4.4.8.8	Preparación de la muestra para la electroforesis en gel	63
4.4.8.9	Carga de la muestra y corrida del gel	64
4.4.8.10	Visualización de las bandas de ADN	64
Capítulo V		
5.0	RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	66
Capítulo VI		
6.0	CONCLUSIONES	84
Capítulo VII		
7.0	RECOMENDACIONES	87
BIBLIOGRAFIA		
ANEXOS		

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Formato de consentimiento informado
2. Obtención y transporte de muestra
3. Preparación y siembra de la muestra
4. Transporte e incubación de las muestras
5. Caracterización macroscópica y microscópica
6. Prueba de la ureasa
7. Prueba de oxidasa
8. Prueba de catalasa
9. Sub-cultivo del microorganismo
10. Respuesta a la terapia antimicrobiana por el método de Kirby Bauer
11. Conservación de la cepa
12. Materiales, equipos y reactivos
13. Reanimación de la cepa
14. Extracción y purificación del ADN
15. Preparación del gel de agarosa
16. Preparación de la cuna del gel
17. Preparación del master mix
18. Preparación de las muestras
19. Realización de los ciclos de la PCR ARNr 16s
20. Preparación de muestras para la electroforesis en gel

21. Carga de las muestras y corrida del gel
22. Visualización de las bandas
23. Equipo, endoscopio y pinzas Olympus® utilizadas por el médico gastroenterólogo para la realización de endoscopia digestiva y toma de muestras
24. Realización de endoscopia digestiva y toma de muestras.
25. Termociclador Techne prime® y Transiluminador UVP®
26. Estudiantes investigadores realizando actividades de biología molecular
27. Banda característica de 110 pb, evidencia del gen ARN 16S
28. Antibiogramas de cepa 1 y cepa 2
29. Resultados de histopatología de los pacientes involucrados en el estudio
30. Placas de cultivo de muestra 5-A y 5-C, morfología macroscópica, morfología microscópica.
31. Placas de cultivo de muestra de pinza para toma de biopsias en agar nutritivo y agar Columbia con 7% de sangre de cordero y suplemento DENT, morfología microscópica.
32. Mortero y pistilo utilizados en el procesamiento de las muestras.
33. Placas de cultivo de muestra 3-C; 12-A; 28-A; 33-C y 44-A donde se evidencia el crecimiento de microorganismos no compatibles con *Helicobacter pylori*.
34. Morfología microscópica de muestras 3-C; 12-A; 28-A; 33-C y 44-A, todos corresponden a Bacilos Gram negativos

35. Caracterización de posible Lactobacilo: Crecimiento en medio MRS, bacilos Gram positivos, oxidasa y catalasa negativas.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág. N°
1. Configuración externa del estomago	26
2. Morfología microscópica de <i>Helicobacter pylori</i>	27
3. Morfología macroscópica <i>Helicobacter pylori</i> en medio selectivo; Agar Columbia más sangre desfibrinada de cordero al 7% y suplemento DENT	28
4. Prevalencia mundial de <i>Helicobacter pylori</i>	38
5. Fundamento de la prueba de aliento con urea marcada con ¹³ C	43
6. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16s	46
7. Algoritmo para el tratamiento inicial y de rescate de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	48
8. Productos de amplificación por PCR de la región ARN 16s	79

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	Pág. N°
1. Criterios de clasificación para la respuesta de <i>Helicobacter pylori</i> ante los antibióticos de prueba.	59
2. Componentes del Mix para la PCR.	62
3. Programa PCR ARNr 16s.	63

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág. N°
1. Resultados de aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i> por cultivo microbiológico para muestras de antro (A) y cuerpo (C) gástrico.	66
2. Descripción morfológica de las cepas aisladas compatibles con <i>Helicobacter pylori</i> .	76
3. Caracterización bioquímica de las cepas aisladas compatibles con <i>Helicobacter pylori</i> .	77
4. Respuesta in vitro de las cepas aisladas a los antibióticos de prueba.	80

ABREVIATURAS

AINES:	Antiinflamatorio no esteroideo
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosómico
BHI:	Brain Heart Infusion – Infusion Cerebro Corazón
<i>CagA:</i>	Gen Asociado a Citotoxinas
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
IARC:	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
IgA:	Inmunoglobulina A
IgG:	Inmunoglobulina G
IgM:	Inmunoglobulina M
KDa:	Kilo Dalton
MALT:	Tejido Linfoide Asociado a Mucosa
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Nm:	Nanómetro
OMS:	Organización Mundial de la Salud
RNA:	Ácido Ribonucleico
UFC/mL:	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
<i>VacA:</i>	Gen Asociado a Vacolización

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria que coloniza principalmente el moco gástrico y la superficie del epitelio gástrico, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades digestivas como gastritis crónica, dispepsia, úlceras, linfoma y cáncer gástrico. La infección por esta bacteria es un problema de salud pública y ocurre con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo, actualmente hay diversas opciones de tratamiento, entre ellos, el sugerido por el Consenso de Maastricht a nivel internacional, que tiene como propósito alcanzar o superar el 90% de curación, este se compone de un inhibidor de bomba de protones y la combinación de dos o tres antibióticos; sin embargo, hasta el momento aún se presentan dificultades para curar la infección, favorecidas principalmente por la resistencia de la bacteria a los antibióticos de terapia.

En El Salvador existen escasos estudios publicados sobre esta temática, por lo que esta investigación fue realizada para generar conocimiento actualizado de las características de la bacteria y su respuesta a la terapia antimicrobiana propuesta a nivel internacional. Para ello, se realizaron aislamientos de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas, obteniéndose un 2% de aislamientos positivos y un 98% negativos; y se evaluó la respuesta de las cepas aisladas a los antibióticos de terapia de primera línea propuestos por el Consenso de Maastricht, donde se obtuvo sensibilidad a Amoxicilina y resistencia a Claritromicina y Metronidazol. El bajo porcentaje de aislamiento limitó la posibilidad de presentar datos significativos para establecer una tendencia general del comportamiento de la bacteria en nuestro país hacia los antibióticos evaluados, este fenómeno se asoció a deficiencias en aspectos como: inadecuada preparación de los pacientes, número de muestras utilizadas por paciente, procesamiento lento de las muestras y baja selectividad del medio de cultivo empleado, por lo que se recomienda corregirlos para obtener mayores porcentajes de aislamiento que permitan conocer mejor las características y susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a los antibióticos de terapia.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, curvada, micro aerófila, productora de enzimas como ureasa, catalasa y oxidasa, útiles para su crecimiento e identificación; sus sitios principales de crecimiento incluyen el moco gástrico, la superficie del epitelio gástrico, la base de las criptas presentes en el estómago y el interior de las células epiteliales. Esta bacteria está asociada a diferentes enfermedades digestivas como gastritis crónica, dispepsia, úlcera péptica o duodenal, linfoma y cáncer gástrico.

La infección por *Helicobacter pylori* es una de las más comunes en el hombre y aunque ocurre en todo el mundo, la prevalencia aumenta cuando disminuye el nivel de desarrollo. Para el manejo de la infección, el Consenso de Maastricht recomienda cuatro líneas de tratamiento antimicrobiano cuyo objetivo es alcanzar o superar el 90% de curación de la infección; sin embargo, hasta el momento aún existen dificultades para lograrlo, favorecidas por circunstancias como resistencia a los antibióticos, falta de adherencia al tratamiento e inadecuada supresión del ácido estomacal.

En El Salvador existen pocas investigaciones publicadas al respecto, a pesar que en América Central la prevalencia de la infección es de 53% aproximadamente y los estudios en esta región no se actualizan frecuentemente. Además, en nuestro país no hay datos publicados que proporcionen información de la susceptibilidad de la bacteria a los antibióticos de la terapia de primera línea (Claritromicina, Amoxicilina y Metronidazol) propuesta a nivel internacional.

La investigación se llevó a cabo con el propósito de generar información sobre la bacteria *Helicobacter pylori* aislada de pacientes salvadoreños y determinar su respuesta a la terapia antimicrobiana de primera línea que propone el Consenso de Maastricht, compuesta por Claritromicina, Amoxicilina y Metronidazol.

En este estudio se realizó el aislamiento de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas que fueron tomadas por un médico residente del servicio de gastroenterología a pacientes de dicha área del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández”, Zacamil, previa firma de un consentimiento informado. Con los aislamientos se procedió a hacer identificación microscópica, macroscópica y pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa), las cepas positivas se utilizaron para demostrar la respuesta in vitro a Claritromicina, Amoxicilina y Metronidazol, además se amplificó el gen que codifica el ARN 16s en las cepas positivas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La investigación fue desarrollada en las instalaciones del Laboratorio de Control de Calidad Microbiológica de la Facultad de Química y Farmacia, Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología, ambas de la Universidad de El Salvador y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Evangélica de El Salvador en los meses de julio a diciembre de 2019.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas y determinar su respuesta a la terapia antimicrobiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Obtener cultivos microbiológicos de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias de cuerpo y antro gástrico.
- 2.2.2 Caracterizar las cepas aisladas de *Helicobacter pylori* por medio de morfología macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas: ureasa, catalasa y oxidasa.
- 2.2.3 Verificar la presencia del gen ARN 16s en las cepas aisladas por medio de técnicas de biología molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ARN 16s.
- 2.2.4 Determinar la respuesta *in vitro* de las cepas aisladas a los antibióticos de terapia de primera línea establecidos en el Consenso de Maastricht: Claritromicina, Amoxicilina y Metronidazol.
- 2.2.5 Proporcionar los resultados de la investigación al servicio de Gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández”.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 ANATOMIA DEL ESTOMAGO

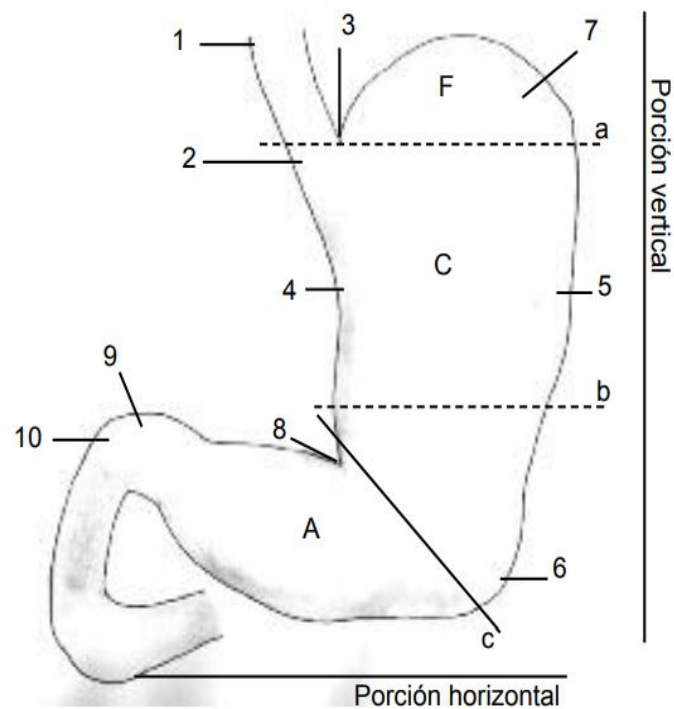
El estómago es un reservorio muscular con forma de J interpuesto entre el esófago y el duodeno, está situado en el cuadrante superior e izquierdo del abdomen. Clásicamente se divide en 3 porciones: fondo, cuerpo y antro, mediante 2 líneas convencionales: una horizontal que pasa por el cardias, y otra vertical desde la incisura angularis hasta la curvatura mayor.

En su configuración externa se distinguen (Ver Figura N°. 1) ⁽²²⁾:

- Una porción vertical, en la cual se distinguen los segmentos:
 1. Fondo, es la parte más alta y ancha del estómago
 2. Cuerpo, tiene forma cilíndrica y está bien limitado por sus bordes laterales
- Una porción horizontal, donde se encuentra el antro, es oblicua hacia arriba y a la derecha configurando un embudo que se estrecha en dirección al píloro.
- Dos bordes o curvaturas, una mayor y una menor
- Dos orificios: de cardias y pilórico

En su configuración interna presenta una capa cubierta por mucosa que presenta un conjunto de pliegues longitudinales grandes y alargados que tienen la función de multiplicar la superficie de la mucosa. Cuando el estómago se llena, los pliegues desaparecen y reaparecen de nuevo cuando tiene lugar el proceso de vaciado.

En la superficie interna de los pliegues, existen un conjunto de orificios que se llaman criptas, en donde desembocan las glándulas gástricas.



Estómago. Configuración externa

- F. Fondo
- C. Cuerpo
- A. Antro
- a. Límite entre fondo y cuerpo
- b. Límite entre antro y cuerpo (descripción con criterio histológico)
- c. Límite entre cuerpo y antro (descripción anatómica clásica)
- 1. Esófago abdominal
- 2. Cardias
- 3. Incisura cardiaca (ángulo de His)
- 4. Curvatura menor
- 5. Curvatura mayor
- 6. Tuberosidad menor
- 7. Tuberosidad mayor
- 8. Incisura angularis
- 9. Píloro
- 10. Primera porción duodenal

Figura. N° 1. Configuración externa del estómago

3.2. ASPECTOS GENERALES DE *Helicobacter pylori*.

3.2.1 TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

La clasificación taxonómica de *Helicobacter pylori* según Marshall y Warren es la siguiente:

- Dominio: Bacteria
- Filo: Proteobacteria
- Clase: Epsilonbacteria
- Orden: Campylobacterales
- Familia: Helicobacteraceae
- Género: *Helicobacter*
- Especie: *pylori*

Helicobacter pylori es un microorganismo curvado, microaerófilo que mide de 2 a 4 μm de longitud y de 0.5 a 1 μm de ancho, con 1 a 3 espirales. Presenta de 5 a 7 flagelos enfundados, unipolares, de aproximadamente 3 μm de longitud protegidos de la degradación debido al medio ácido por una vaina de estructura lipídica. (12, 15, 17, 29) Microscópicamente es un bacilo Gram negativo, que presenta forma curva o de S (Ver figura N° 2), macroscópicamente en Agar Columbia suplementado con sangre y antibióticos, las colonias se observan puntiformes, brillantes y transparentes o con un leve color grisáceo (Ver figura N° 3).

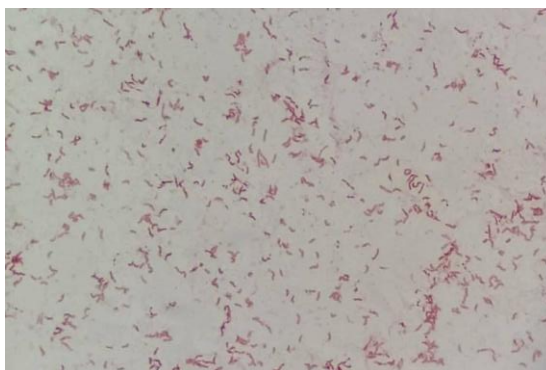


Figura. N° 2 Morfología microscópica de *Helicobacter pylori*.

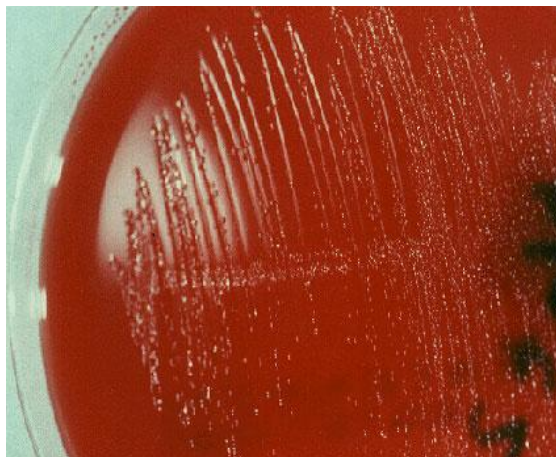


Figura. Nº 3. Morfología macroscópica *Helicobacter pylori* en medio selectivo: Agar Columbia más sangre desfibrinada de cordero al 7% y suplemento DENT.

3.2.2 CONDICIONES MICROBIOLÓGICAS PARA EL CULTIVO DE *Helicobacter pylori*.

La utilidad e importancia del cultivo para *Helicobacter pylori* radica en poder conocer sus características de crecimiento, diversidad genética, epidemiología y en la posibilidad de determinar la resistencia bacteriana a los antibióticos usados en el tratamiento de erradicación, debido a ello es imprescindible conocer y proporcionar las condiciones en las cuales se puede lograr un crecimiento óptimo del microorganismo. ⁽²⁾

Helicobacter pylori es un microorganismo nutricionalmente exigente, frecuentemente requiere medios suplementados con sangre o suero, estos actúan como fuentes adicionales de nutrientes y lo protegen del efecto tóxico de los ácidos grasos de cadena larga. ⁽²⁾ Los medios de cultivo sólidos bases más frecuentes son agar Mueller-Hinton y agar Columbia y los suplementos más comúnmente empleados son la sangre o derivados de ella. Otros suplementos son el suero de caballo, lisado de eritrocitos y hemina, extracto de levadura, peptona, e Isovitallex (suplemento químico de enriquecimiento).

Dos aspectos importantes a considerar en relación con la sangre son, en primer lugar, la cantidad utilizada, ya que un aumento en la proporción al 7-10% mejora significativamente el crecimiento en comparación con el 5%. En segundo lugar, el tipo de sangre utilizada, encontrándose un crecimiento más denso con sangre de caballo al 10% y lisada al 7%. ⁽¹⁾

Con el objeto de evitar el crecimiento de contaminantes que pueden acompañar a *Helicobacter pylori* en la biopsia es necesaria la utilización de inhibidores que no afecten su viabilidad; esta bacteria es resistente in vitro a la vancomicina, sulfametoxazol, trimetoprim, cefsulodina y polimixina B, los cuales pueden utilizarse en los medios selectivos para su aislamiento exclusivo. ⁽²¹⁾ Actualmente es utilizado el suplemento selectivo DENT, que contiene vancomicina, trimetoprim, polimixina B y anfotericina B. ⁽²⁾

Respecto a las condiciones de incubación, *Helicobacter pylori* requiere para su crecimiento una atmósfera con las siguientes características ⁽¹⁾:

- 5-10% de O₂, 5-10% de CO₂ y 80-90% de N₂
- Temperatura de 35-37°C que asemeje la temperatura corporal normal
- Humedad del 95% e
- incubación de hasta 10 días antes de considerar negativo el cultivo.

Estas condiciones se obtienen utilizando cabinas de microaerofilia o con sobres comerciales que proporcionen las características anteriores. Estos últimos proporcionan resultados muy buenos, pero tienen como inconveniente la necesidad de reemplazar los sobres una vez abiertas las jarras. ⁽¹⁾

3.2.3 FACTORES DE VIRULENCIA

La búsqueda de los factores causantes de ulceración se ha intensificado en los últimos años, señalándose entre ellos a la ureasa bacteriana, adhesinas, catalasa y la producción de citotoxinas. ⁽²⁰⁾

3.2.3.1 UREASA

Epidemiológicamente el estómago se conoce como una barrera ácida que es capaz de eliminar a muchas bacterias que llegan al estómago con la ingesta de agua y alimentos. Por lo tanto, la colonización de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* implica la capacidad de esta bacteria para sobrevivir y adaptarse en ese ambiente ácido gracias a la producción de la enzima ureasa.

(20)

La enzima ureasa es producida por todas las cepas de *Helicobacter* y es una enzima extremadamente activa, con un peso molecular de 600 kDa. (10) Esta enzima degrada la urea formando amonio y carbamato, con el cual el entorno de la bacteria es relativamente alcalino, permitiendo a la bacteria a sobrevivir en pH de 1.5 – 2 por periodos cercanos o superiores a las 2 horas siempre y cuando disponga de cantidades suficientes de urea. (1)

La ureasa es capaz, por si misma, de estimular la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos, activar los macrófagos e inducir una respuesta humoral. Por otro lado, el amonio resultante de la hidrolisis de la urea es un potente toxico para las células eucariotas. (8) El potencial de virulencia de esta enzima se refleja en la fuerte respuesta de inmunoglobulinas séricas generada contra ella, detectada en pacientes con gastritis activa debido a *Helicobacter pylori*, siendo responsable de una mayor activación y estimulación del sistema inmune. (10)

3.2.3.2 ADHESINAS

Helicobacter pylori tiene una especial afinidad para adherirse al epitelio de la mucosa gástrica, lo cual sugiere la existencia de adhesinas específicas. (10) La colonización de la mucosa lleva implícito como paso previo la capacidad de la de

bacteria para adherirse al epitelio gástrico, lo cual es esencial para la inducción de gastritis. Esta adherencia ocurre mediante la interacción entre las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedero que están representados por algunas proteínas de la matriz extracelular. ⁽⁸⁾

La adhesión de *Helicobacter pylori* a las células epiteliales gástricas provocan lesiones que se caracterizan por la pérdida de las microvellosidades del epitelio gástrico en el sitio de adhesión, lo que conduce a la formación de una estructura similar a un pedestal de unos 5 nM de diámetro, con uniones estrechas entre la bacteria y la superficie celular. ⁽⁸⁾ La adhesión a la mucosa gástrica hace que la toxina se libere justo en el epitelio blanco. Además, estudios *in vitro* demuestran que la adherencia es necesaria para la inducción y liberación de citocinas proinflamatorias; por lo tanto, la adherencia no debe ser considerada como un evento aislado sino más bien como parte de un proceso complejo que involucra quimiotaxis. ⁽¹⁰⁾

3.2.3.3 CATALASA

Esta enzima actúa protegiendo a la bacteria de la agresión por parte de los metabolitos de oxígeno, especialmente de peróxido de hidrógeno. Se cree que este efecto es importante en algunas bacterias como mecanismo de resistencia a la destrucción provocada por los neutrófilos, que son una fuente importante de radicales de oxígeno. *Helicobacter pylori* no solo posee una elevada actividad catalasa, sino que esta catalasa no es inhibida por altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. ⁽⁸⁾

3.2.3.4 CITOTOXINAS

Se han descrito dos posibles tipos de citotoxinas producidas por *Helicobacter pylori*, una de efectos vacuolizantes (*vacA*) y otra de naturaleza citolética (*cagA*).

3.2.3.4.1 *vacA* (“vacuolization associated gen”)

La proteína *vacA*, también denominada “toxina vacuolizante” tiene una secuencia homóloga a las proteínas transportadoras de iones de la mucosa gástrica (H^+ / K^+ ATPasa) y es una proteína termolábil de 82 a 87 kDa. ⁽¹²⁾ Se ha clonado el gen (*vacA*) que codifica esta proteína que está presente en todas las cepas; sin embargo, menos de la mitad expresan la citotoxina, hecho que parece estar en relación con la diferencia de diferentes alelos. ⁽¹⁰⁾

Se han logrado identificar diferencias genéticas entre el alelo *vacA* de las cepas productoras llamadas (s1) y de las no productoras de la toxina in vitro llamadas (s2), comprobando que las cepas *vacA* tipo s1 están asociadas con mayor inflamación gástrica y úlcera duodenal, mientras que las de s2 se asocian con menor inflamación y menor prevalencia de úlcera. ⁽¹⁰⁾

Por lo tanto, las cepas que expresan la citotoxina *vacA* se caracterizan por que producen la formación de vacuolas en las células epiteliales, induciendo una respuesta inmunológica logrando realizar la detección de anticuerpos anti-*vacA* en suero. ⁽¹⁾

3.2.3.4.2 *cagA* ("cytotoxin associated gen")

La búsqueda de una respuesta para la incongruencia entre la citotoxicidad y la presencia del *gen vacA*, llevó al hallazgo del *gen cagA* cuya presencia se relaciona con la expresión del *gen vacA* y por lo tanto con la toxigenicidad. ⁽⁸⁾

Este gen codifica una proteína de 120 kDa, denominada citotoxina *cagA*, la cual parece liberarse dentro de la célula epitelial gástrica. Esta citotoxina es capaz de generar una respuesta inmunológica en el individuo infectado, generando anticuerpos circulantes, lo cual ha permitido el desarrollo de test serológicos para el diagnóstico de las cepas portadoras del *gen cagA*. ⁽¹⁾

Mediante la identificación del tipo de estos dos genes y sus proteínas, las cepas de *Helicobacter pylori* se han clasificado en dos grupos: la cepa tipo I expresan ambas proteínas (CagA+ / VacA+) presentes en el 56% de los casos, y el tipo II que no produce ninguna proteína (CagA- / VacA-) presente en el 16% de los casos. La cepa cagA+ al ser más virulentas están asociadas con ulceración duodenal, gastritis atrófica, adenocarcinoma y recientemente se ha demostrado que producen una profunda inflamación con una densidad bacteriana en el antro gástrico de alrededor de 5 veces la inducida por cepas cagA-. ^{(8) (1)} Por lo tanto, la identificación de los genes *vacA* y *cagA* permite identificar las cepas con mayor virulencia y por tanto asociadas con cuadros clínicos más severos.

3.2.4 PATOLOGIAS ASOCIADAS

Helicobacter pylori coloniza la mucosa gástrica y el epitelio, pudiendo causar el desarrollo de múltiples patologías o ser asintomático. Su patogenicidad está definida por factores como: ⁽¹³⁾ producción de ureasa muy activa que le permite sobrevivir a pH ácido; gran movilidad que facilita su penetración en la capa de moco gástrico; presencia de adhesinas en su superficie, y producción de enzimas (proteasas, lipasas) y citotoxinas que lesionan directamente las células epiteliales gástricas.

Actualmente a nivel mundial se reconocen enfermedades digestivas causadas por *Helicobacter pylori*, entre ellas se encuentran: gastritis, úlcera péptica (duodenal, o gástrica), adenocarcinoma del estómago distal (antro) y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés: Mucosa Associated Lymphoid Tissue). ⁽¹⁴⁾

3.2.4.1 GASTRITIS

Actualmente se considera a la infección por *Helicobacter pylori* como la causa más común de gastritis alrededor del mundo (un 70% de los casos asociados con

gastritis crónica activa) ⁽⁵⁾ esta puede ser de predominio antral, la cual predispone a ulceración duodenal, o bien, predominante en cuerpo que se relaciona a ulceración gástrica y adenocarcinoma gástrico distal.

El mecanismo por el cual se provoca la gastritis no está actualmente del todo claro; sin embargo, se ha visto que, por una parte, durante la infección se elevan los niveles de gastrina, la cual juega un papel muy importante en la regulación fisiológica de la secreción de ácido gástrico, que, a su vez, es factor en el desarrollo de úlcera péptica, ya que estos pacientes presentan una tasa de secreción gástrica tres veces más alta que los individuos no infectados y, por otra, el mecanismo inhibitorio representado por la somatostatina, se encuentra alterado debido a la inflamación provocada por la infección. ⁽¹⁴⁾

3.2.4.2 ULCERA PEPTICA

Helicobacter pylori puede dañar la mucosa protectora del estómago y del intestino delgado. A causa de esto, el ácido estomacal puede producir una llaga abierta (úlceras) gástrica o duodenal ⁽⁵⁾

El 90-95% de los pacientes con úlcera duodenal presentan este microorganismo y la úlcera cicatriza al erradicarse la bacteria. Con respecto a la úlcera gástrica sólo un 70% de este tipo de úlcera está asociado con la presencia del microorganismo, debido a que el resto de ellas están producidas por consumo de antiinflamatorios no esteroideos.

En la formación de la úlcera intervienen diversos mecanismos, cobrando importancia el hecho de que en los individuos infectados se encuentra un desequilibrio entre la carga de ácido y la capacidad amortiguadora, así como en la secreción de bicarbonato, hecho demostrado por la normalidad en la secreción de este último ante la erradicación de la bacteria. ⁽²⁰⁾

3.2.4.3 CANCER GASTRICO

En julio de 1994, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer y la Organización Mundial para la Salud clasificaron a *Helicobacter pylori* como un carcinógeno categoría 1, los datos que soportaron la decisión para establecer la categoría como carcinógeno se fundamentaron en el análisis de sus mecanismos de colonización, patogenicidad, prevalencia elevada en países con alta incidencia de cáncer gástrico, alto porcentaje de positividad en casos de gastritis (85%), úlcera duodenal (10%) y gástrica (70%), y el análisis de once series de casos de cáncer gástrico donde se documentó mediante estudio histopatológico la presencia del bacilo en 43% a 83% de los casos. ⁽²³⁾

Helicobacter pylori se relaciona principalmente con el desarrollo de cáncer localizado con mayor frecuencia en el cuerpo y/o antro gástrico, durante el proceso carcinogénico es posible detectar cambios histológicos ordenados en una secuencia establecida que se originan en la inflamación, formación de gastritis no atrófica y luego atrófica, metaplasia intestinal, displasia y, finalmente, la presencia del adenocarcinoma gástrico.

3.2.4.4 LINFOMA DE TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSAS (MALT)

Desde 1990, se encontró la participación de *Helicobacter pylori* en la presencia del desarrollo de linfoma MALT, asociación ahora innegable e importante debido a que representa el linfoma gástrico y, probablemente, gastrointestinal más común, el cual es un linfoma de células B. La infección por esta bacteria causa una respuesta inmunológica que lleva a una gastritis crónica con formación de folículos linfoides dentro del estómago, preferentemente en el antro, que, en un individuo sano, no debería de ocurrir. Se sabe que el MALT es producto de una defensa inmune contra la infección y que la proliferación es debida al estímulo antigénico. ⁽¹⁴⁾

3.2.5 VIAS DE TRANSMISIÓN

Los mecanismos exactos por los cuales se adquiere *Helicobacter pylori* son en gran parte desconocidos. Este microorganismo tiene un rango de huéspedes estrecho y se encuentra casi exclusivamente en humanos y algunos primates, aunque en ocasiones ha sido posible aislarlo a partir animales de compañía; por lo tanto, la presencia de mascotas puede ser un factor de riesgo para la infección por *Helicobacter pylori*. ⁽¹⁵⁾

Se ha postulado que la infección con *Helicobacter* se adquiere en la infancia, además, esta infección que afecta a más de la mitad de la población mundial, se presenta con mayor prevalencia en países en desarrollo que en países industrializados, lo que se ha asociado con el nivel sociocultural y económico de la población, En tal sentido se han propuesto dos vías de transmisión fundamentales, la vía “fecal - oral” y la vía “oral – oral”. ⁽¹²⁾

3.2.5.1 TRANSMISIÓN “Fecal – Oral”

En esta vía *Helicobacter pylori* adherido a la mucosa gástrica como consecuencia del rápido recambio celular de la misma es eliminado a la luz gástrica. El contenido gástrico pasa al intestino, alcanzando el colon y expulsándose con las heces al medio ambiente. De esta forma se contaminan aguas y alimentos y a través de los mismos forma un círculo infeccioso. ⁽¹²⁾

Existen muchos argumentos a favor de una transmisión fecal – oral de la infección. Así, no solo se ha podido detectar *Helicobacter pylori* en las heces de pacientes con gastritis mediante técnicas moleculares, sino que también han podido cultivarse formas viables de muestras procedentes de heces. ⁽²⁸⁾ Además su detección en muestras de aguas residuales, apoyan el papel del agua como vehículo transmisor de la infección.

3.2.5.2 TRANSMISION “Oral – Oral”

En esta vía se propone que *Helicobacter pylori* presente en el jugo gástrico, y como consecuencia del reflujo gastroesofágico, alcanzaría la cavidad oral contaminando la saliva y a través de la misma transmitirse a otras personas, pudiendo actuar como vehículo de transmisión las manos, fómites, gotitas de Pflüge, vómitos y diversos instrumentos como son los endoscopios. ⁽¹⁵⁾

La base de esta propuesta ha sido el hallazgo de *Helicobacter* en placa dental, en saliva o bien la identificación de su genoma en saliva; también se apoya en las reacciones positivas de ureasa en muestras de saliva; pero otras bacterias de la flora oral podrían dar esta prueba positiva, por lo que tal prueba no es muy aceptada. ⁽¹²⁾

3.2.6 PREVALENCIA MUNDIAL Y LATINOAMERICANA

La infección por *Helicobacter pylori* es una de las más comunes en el hombre y varía globalmente según los factores socioeconómicos y los niveles de higiene, su prevalencia aumenta cuando disminuye el nivel económico, siendo más frecuente en los países emergentes o en vías de desarrollo, en los que puede superar el 70%. ⁽⁷⁾

Más de la mitad de la población mundial está infectada, en agosto de 2017 fue publicado un análisis realizado en base a datos proporcionados por MEDLINE y EMBASE durante los años 1970 a 2010 acerca de 184 estudios para examinar la prevalencia de *H. pylori* en 62 países del mundo en diferentes momentos, el cual demostró que a nivel mundial las regiones con mayor prevalencia fueron África (70,1%), Sudamérica (69,4%) y Asia occidental (66,6%); las regiones con la prevalencia más baja fueron Oceanía (24,4%), Europa occidental (34,3%) y América del Norte (37,1%). ⁽¹³⁾

Los países con mayor prevalencia fueron Nigeria (87.7%), Portugal (86.4%) y Estonia (82.5%); los países con la prevalencia más baja fueron Suiza (18.9%), Dinamarca (22.1%) y Nueva Zelanda (24.0%). ⁽¹³⁾

Comparando los períodos de 1970 – 1999 y 2000 – 2016, la prevalencia de *H. pylori* disminuyó en Europa (48,8% a 39,8%) y en América del Norte (42,4% a 26,6%), pero se mantuvo sin cambios en Asia occidental (53,6% a 54,3%) y América Latina / Caribe (62.8% a 60.2%). ⁽¹³⁾

Las cifras a nivel de América Latina y el Caribe se asocian a los bajos marcadores de nivel social, económico y cultural. Los datos de prevalencia manejados hasta 2017 son El Caribe 52.6%, América Central 53.0%, Sur América 69.4% y América del Norte 37.1%.

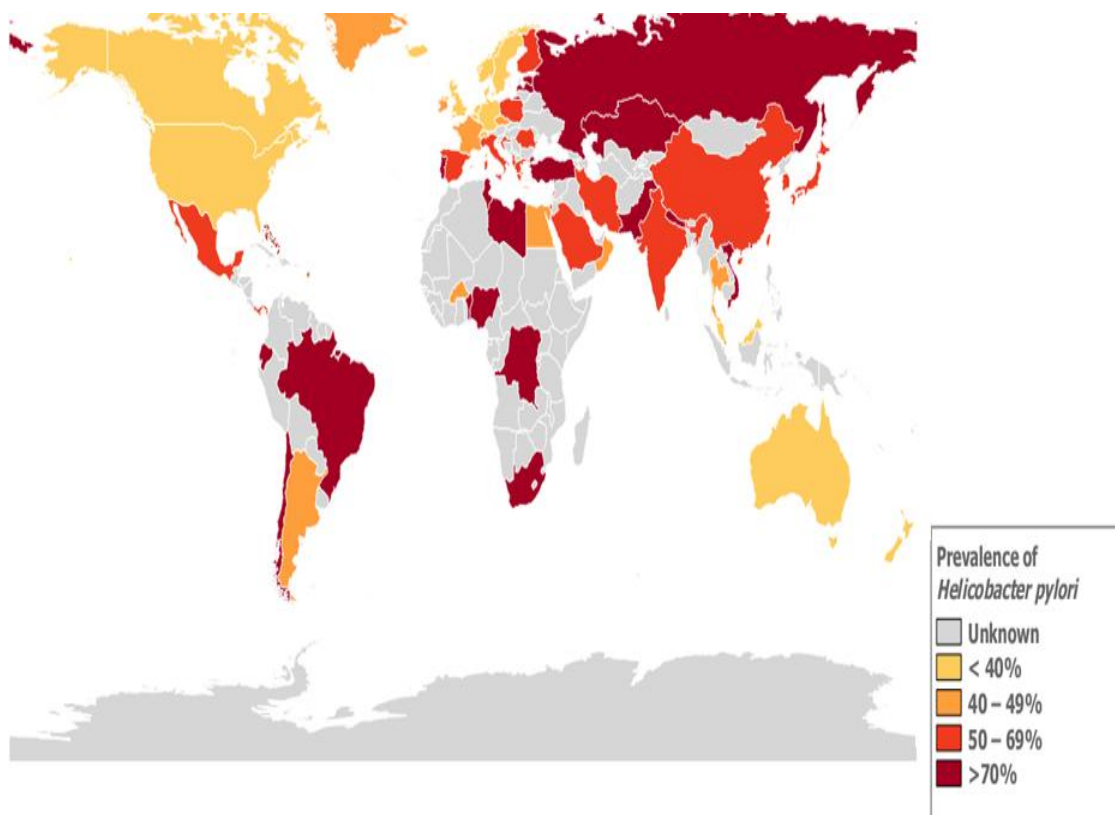


Figura. N° 4. Prevalencia mundial de *Helicobacter pylori*

3.3 *Helicobacter pylori*, DIAGNOSTICO

Para diagnosticar la infección por *Helicobacter pylori* se pueden realizar métodos invasivos (requieren endoscopia con toma de biopsia gástrica) o métodos no invasivos (no requieren endoscopia previa).

La elección del método depende en gran medida de la disponibilidad y el costo; además, hay que distinguir entre los análisis utilizados para establecer el diagnóstico de infección y aquellos que buscan confirmar la erradicación de esa infección. Otros factores importantes son: situación clínica, prevalencia de la infección en la población, probabilidad de la infección antes del análisis, diferencias en la realización del test y factores que puedan incidir en los resultados, tales como el uso de tratamiento contra la secreción y antibióticos.

3.3.1 MÉTODOS INVASIVOS

Estos métodos precisan la realización de una endoscopia, la toma de una biopsia y la identificación de la bacteria en el tejido gástrico; son considerados un estándar de referencia para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* y son los indicadores principales para iniciar un tratamiento y lograr demostrar su erradicación.

3.3.1.1 ESTUDIO HISTOLÓGICO

Este método diagnóstico ha sido catalogado por algunos como el estándar de oro para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. Es un método sencillo que consiste en la observación de la bacteria en los cortes histológicos de las biopsias. ⁽¹⁾

Una de las grandes ventajas de la histología es que permite evidenciar los cambios patológicos asociados con la infección por esta bacteria como

inflamación, atrofia, metaplasia intestinal y malignidad, mediante el examen histológico es posible distinguir las gastritis producidas por *Helicobacter pylori* de las causadas por *Helicobacter heilmannii*, que es una bacteria también espiral. ⁽¹²⁾

Las muestras obtenidas para estudio histológico pueden conservarse hasta el momento de su procesamiento en formaldehído y no precisan ningún medio de transporte especial. ⁽¹⁰⁾ Se recomienda que para un estudio histopatológico la obtención de muestras gástricas debe ser de dos sitios diferentes: cuerpo y antro gástrico, además la sensibilidad del método se ve afectada por el uso de medicamentos como antibióticos, bismuto e inhibidores de la bomba de protones. ⁽¹²⁾

3.3.1.2 CULTIVO

Es otro método de diagnóstico altamente específico para la identificación de infección activa por *Helicobacter pylori*. ⁽¹⁰⁾ las muestras para su cultivo son la mucosa del estómago obtenidas con biopsias, así como también del jugo gástrico ya que por el continuo recambio y descamación del epitelio gástrico puede desprenderse hacia el lumen. ⁽²⁰⁾

Para el cultivo de *Helicobacter pylori* las muestras se obtienen de mucosa gástrica principalmente en el cual el tiempo que tarda en formar las colonias es de 4 a 7 días en condiciones de 5 – 10% O₂, 5-10 % CO₂, 80 – 90 % N₂, humedad del 95% y temperatura entre 35 y 37°C en un medio complejo de sangre, suero y antibióticos. ⁽¹⁷⁾ Se recomienda para la toma de muestras se sigue el protocolo recomendado para la toma de biopsias en pacientes con gastritis crónica propuesto por el sistema Sidney, que consiste en tomar 5 biopsias 2 muestras antrales, 2 muestras de cuerpo y una muestra a partir de la incisura angularis; en pacientes con un tratamiento previo con antibióticos es necesario esperar al menos 4 semanas tras la última dosis. ⁽²⁰⁾

Las biopsias deben ser trituradas y/o pulverizadas con suero fisiológico antes de emplearse al medio, se debe tomar una asada y extenderse en la superficie aplicando el método de extensión para aislamiento; para el transporte de las biopsias se debe realizar en tubos con rosca estériles con 0.5 mL de suero fisiológico en un máximo de 6 horas; en la identificación se siembra en diferentes caldos y agares entre ellos agar Columbia y tripticasa de soja suplementados generalmente con suero fetal de bovino, lisado de eritrocitos, extracto de levadura, peptona y extracto de cianobacterias adicionando sangre de bovino o equino entre un 7 a 10% y antibióticos. ⁽²⁰⁾ Para la conservación de la bacteria se realiza en caldo tripticasa soja o BHI con glicerol al 20% las cuales se almacenan en congelador a -80°C o N₂ líquido. ⁽¹²⁾

3.3.1.3 PRUEBA RÁPIDA DE UREASA

Por su sencillez, rapidez y bajo costo, se considera como una técnica de elección para el diagnóstico inicial de la infección por *Helicobacter pylori* en aquellos pacientes que se someten a endoscopia. ⁽¹⁰⁾ La prueba rápida de ureasa es una técnica que determina la actividad de la enzima ureasa en una pequeña muestra de mucosa gástrica, dicha prueba es universalmente empleada para detectar la presencia de este microorganismo.

Para su realización se coloca una muestra de biopsia gástrica en un tubo con urea que contiene un indicador que cambia la coloración del medio al variar el pH. Si la muestra contiene ureasa (y por lo tanto *Helicobacter pylori*) se hidroliza la urea y se forman iones amonio ($\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2\text{-ureasa} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$) esta reacción es alcalina lo que modifica el color del indicador que cambia de color amarillo a rojo señalando el resultado positivo. ⁽¹²⁾

La prueba se puede realizar a temperatura ambiente, aunque la sensibilidad es mayor si se incuba a 37 °C, se realiza con urea de Christensen al 2% con

resultado a las 24 horas, la rapidez del resultado depende de la cantidad de bacterias presentes en la muestra, siendo suficiente una mínima cantidad de $>10^4$ UFC/mL. ⁽¹⁰⁾

3.3.2 MÉTODOS NO INVASIVOS

Estos métodos utilizan las características de la bacteria (como la capacidad de producir ureasa) y la respuesta inmunológica del huésped (detección de anticuerpos específicos) para establecer el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. Por no precisar la realización de una endoscopia, reciben también el nombre de métodos «no invasores».

3.3.2.1 PRUEBA DEL ALIENTO

Es una prueba utilizada para el diagnóstico de la bacteria antes del tratamiento, está basada en la capacidad de la ureasa producida por *Helicobacter pylori* para hidrolizar una solución de urea previamente marcada con ^{13}C o ^{14}C . El paciente ingiere la solución y se recogen muestras de aire espirado tras determinados períodos de tiempo, comenzando 30 minutos después de la ingestión; previamente y tras un ayuno nocturno se habrá recogido otra muestra de aliento basal. Si *Helicobacter pylori* se encuentra en el estómago, éste hidroliza la urea gracias a su ureasa y se libera CO_2 marcado con el isótopo de carbono utilizado, el cual se absorbe, difunde a sangre, se transporta a los pulmones y es excretado a través del aliento espirado (Ver figura N° 5). ⁽²⁰⁾

Los resultados de cada muestra del aliento son emitidos por un espectrómetro de masas y se expresan en unidades delta, definidas como la expresión en tantos por mil de la relación de ^{13}C o $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la prueba con respecto al estándar ⁽²⁰⁾, si se detecta un incremento significativo, se revela la presencia de *Helicobacter Pylori*. Como precaución para evitar falsos negativos se debe cumplir con un

ayuno de 8 horas previas y no realizarse después de un tratamiento con antibióticos ni antiácidos. ⁽¹⁶⁾

Las mayores ventajas que presenta la utilización de ^{13}C es que se trata de un isótopo natural estable y no radiactivo, por lo que se puede repetir la prueba tantas veces como sea necesario, incluso en niños y en mujeres embarazadas. El principal inconveniente es que para la lectura del aire espirado se necesita un espectrómetro de masas, lo que supone una elevada inversión inicial.

Por otro lado, la urea marcada con ^{14}C es más barata. Sin embargo, aunque la dosis de radiación administrada al paciente es baja, es necesaria la licencia para su manejo, precisa un almacenamiento adecuado y no puede realizarse en niños ni en mujeres embarazadas. ⁽¹⁾

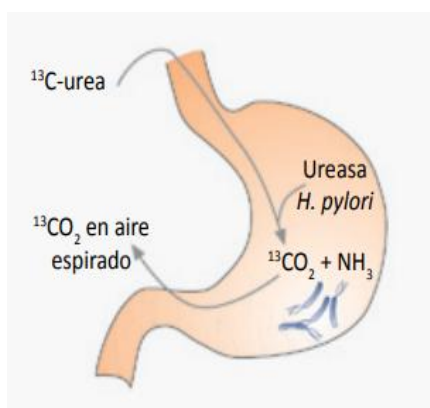


Figura. N° 5. Fundamento de la prueba de aliento con urea marcada con ^{13}C

3.3.2.2 SEROLOGIA

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* se basan en estudiar la presencia de anticuerpos específicos en suero, saliva u orina frente a antígenos de este microorganismo que aparecen como consecuencia de la respuesta inmunitaria que se produce tras la infección. Por ello, estas técnicas indican únicamente una exposición previa al microorganismo, pero no discriminan entre personas con infección activa y enfermedad e individuos sanos previamente expuestos a la infección. ⁽¹⁾

Entre las técnicas serológicas ensayadas para detectar *Helicobacter pylori* destacan dos: Western Blot y la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA); el Western Blot es la mejor técnica para identificar y caracterizar bioquímicamente las preparaciones antigénicas y sus variaciones pero es laboriosa, ELISA es una técnica poco compleja que puede ser realizada por personal relativamente inexperto y permite obtener resultados cuantitativos, sin embargo es difícil seleccionar el antígeno más adecuado para la prueba.

Helicobacter pylori provoca una respuesta inmunitaria consistente en un aumento transitorio de IgM, seguido de un aumento de anticuerpos de los tipos IgG e IgA que persisten durante la infección. Puesto que los anticuerpos IgM se detectan sólo transitoriamente, tienen poco valor para el diagnóstico. La principal respuesta sistémica es de tipo IgG por lo que la detección de estos anticuerpos es la más utilizada para el diagnóstico por la técnica de ELISA. ⁽¹⁾ En la técnica del Western Blot se estudia la respuesta frente a antígenos concretos, como *cagA* y *vacA*. ⁽¹⁾

La principal ventaja de las técnicas serológicas es que no se ven afectadas por el tratamiento reciente con antibióticos o antiácidos, que pueden aclarar temporalmente la infección por *Helicobacter pylori* e inducir un falso resultado negativo con otros métodos diagnósticos.

3.3.2.3 ANTÍGENO EN HECES

Se trata de un ensayo cualitativo que permite la detección de antígeno de *Helicobacter pylori* en muestras de heces. Existen varios sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de antígeno en heces con anticuerpos policlonales o monoclonales. ⁽¹⁾ Se ha descrito como válida para establecer el diagnóstico inicial, verificar la eficacia del tratamiento en las cuatro o seis semanas posteriores a su realización y comprobar la reaparición de una infección.

En general consiste en una técnica de enzimoimmunoanálisis preparado con anticuerpos policlonales anti- *Helicobacter pylori* y se ha asociado con una elevada sensibilidad y especificidad. Las principales ventajas son su sencillez, rapidez y economía. ⁽¹⁰⁾

3.3.3 MÉTODOS MOLECULARES: PCR ARN 16s

Este método invasivo permite la detección de *Helicobacter pylori* aunque este no sea visible mediante tinción histológica y no muestre reacciones cruzadas con otros microorganismos, con la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es capaz de detectar pequeñas cantidades de ADN, utilizando cebadores o primers que derivan de secuencias de fragmentos clonados de la bacteria, secuencias de nucleótidos del gen de la ureasa clonado (UreA) secuencias del gen 16S ARNr o de la proteína de 26 kDa específica de *Helicobacter pylori*. ⁽¹²⁾ Una de las grandes ventajas de este método para la detección de *Helicobacter pylori* es que no se requiere un método especial de transporte de muestras obtenidas y que no es preciso que la bacteria está viva para hacer el diagnóstico, además proporciona un rápido resultado de detección de la infección (aproximadamente un día) y es tan sensible como el cultivo para confirmar la erradicación y detectar un fracaso terapéutico. Sin embargo, debido a su alta sensibilidad, el PCR tiene el riesgo de proporcionar falsos resultados positivos como consecuencia de la existencia de residuos de ADN de *Helicobacter pylori* en los endoscopios por una mala limpieza o desinfección o por contaminación durante su uso en el laboratorio. ⁽¹²⁾

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye 3 etapas: a) Amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) Determinación de la secuencia de nucleótidos de la ampliación, y c) Análisis de la secuencia, (Ver figura N° 6). ⁽³⁰⁾

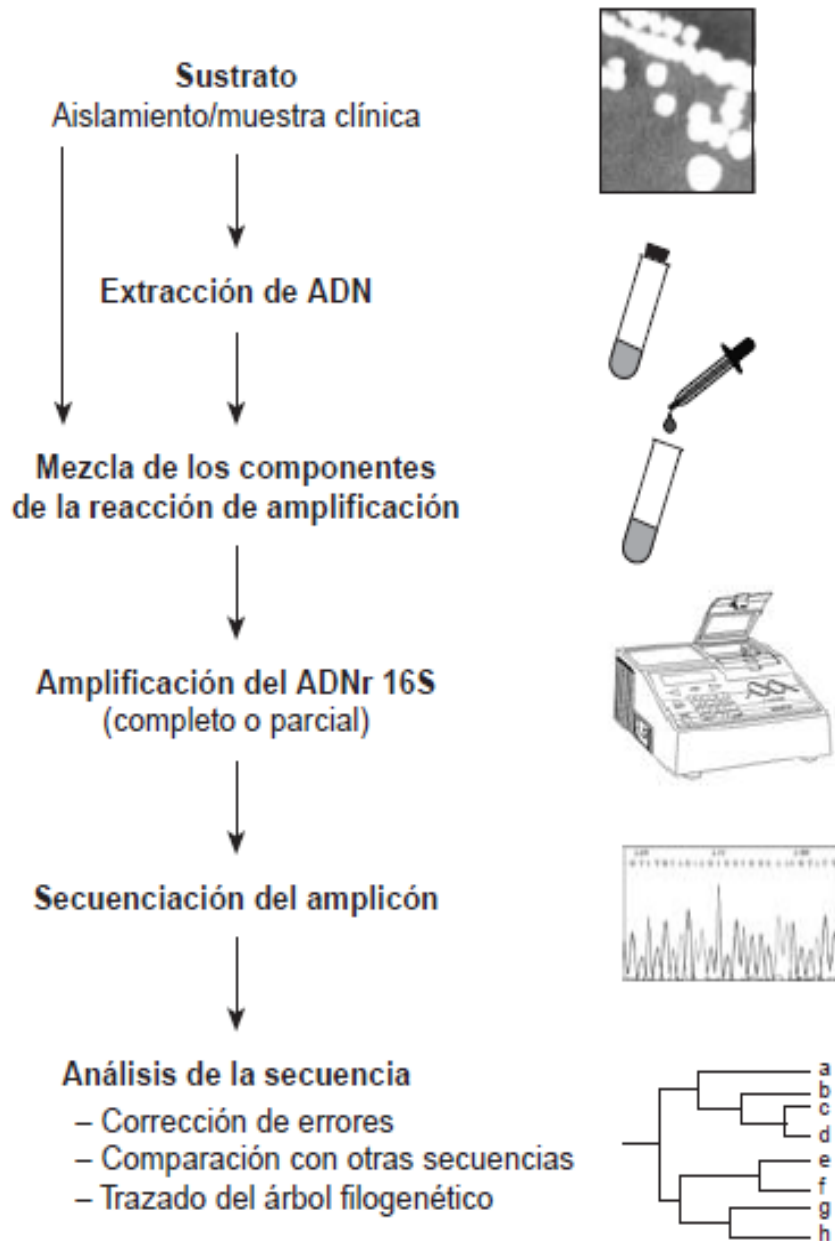


Figura N° 6. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S. ⁽⁹⁾

3.4 TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO

3.4.1 INDICACIONES DE TRATAMIENTO

El Consenso de Maastricht aborda aspectos relacionados con la infección por *Helicobacter pylori*, entre ellos el tratamiento a seguir para su erradicación, el cual está indicado en los siguientes casos: úlcera péptica, posterior a resección parcial por cáncer gástrico, linfoma gástrico tipo B de la zona marginal (MALT), gastritis atrófica, metaplasia intestinal, pacientes con infección por *Helicobacter pylori* y antecedente de familiar de primer grado con cáncer gástrico, consumidores crónicos de inhibidores de bomba de protones, anemia ferropénica no explicable por otras causas, uso crónico de antiinflamatorios no esteroides (AINES) en pacientes con antecedente de úlcera péptica y en casos de púrpura trombocitopénica idiopática e infección por *Helicobacter pylori*.⁽⁷⁾

Son indicaciones relativas para el tratamiento de erradicación, el consumo crónico de AINES sin antecedente de úlcera péptica y la dispepsia con evidencia de infección por *Helicobacter pylori*.

3.4.2 ESQUEMAS DE TRATAMIENTO

Desde cuando fue descubierto *Helicobacter pylori*, su erradicación ha constituido uno de los más importantes retos en la gastroenterología, a nivel mundial la terapia de primera línea recomendada es la triple terapia convencional.^{(7) (28)} Esta continúa siendo en todas las guías internacionales el tratamiento inicial para la erradicación de *Helicobacter pylori*, que incluye un inhibidor de bomba de protones más la combinación de 2 antibióticos, ya sea claritromicina con amoxicilina o metronidazol, durante al menos 7 días, según dicta el algoritmo para el tratamiento de la infección⁽²⁸⁾ (Ver figura N° 7).

La eficacia de la terapia triple en los estudios publicados ha sido siempre inferior al 75%. En un estudio multicéntrico reciente utilizando la terapia triple durante 14

días con dosis altas de IBP se consiguió incrementar la eficacia hasta el 81%.⁽¹⁷⁾ Actualmente se recomienda que un tratamiento erradicador sea considerado efectivo cuando sea capaz de curar la infección por *Helicobacter pylori* en un porcentaje próximo o preferiblemente superior al 90% de los pacientes. Sin embargo, en todos los consensos europeos y españoles previos se había establecido que una tasa de curación igual o superior al 80% podía ser considerada suficiente.⁽¹¹⁾

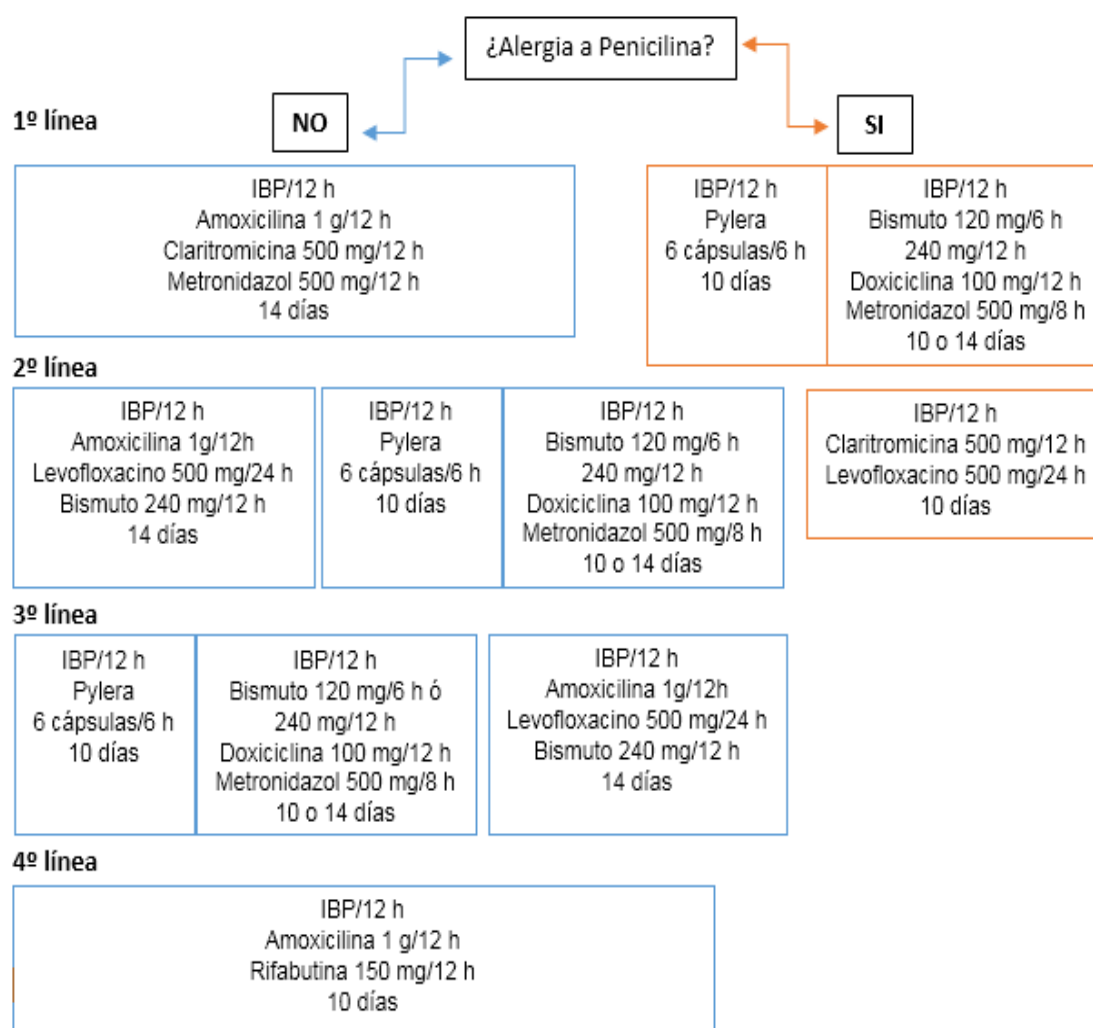


Figura Nº 7. Algoritmo para el tratamiento inicial y de rescate de la infección por *Helicobacter pylori*.⁽¹¹⁾

3.4.3 CAUSAS DE FRACASO DE TRATAMIENTO

En el fracaso del tratamiento pueden intervenir factores relacionados con el mismo tratamiento, factores del paciente y factores de las cepas. ⁽¹⁾

Entre los primeros se pueden destacar las dosis inadecuadas, una duración incorrecta del tratamiento y el tipo y la dosis del inhibidor de la bomba de protones utilizado.

Entre los factores del paciente destaca el cumplimiento del tratamiento (por el elevado número de dosis, por los efectos secundarios, etc) y el país donde se realizó el ensayo.

Entre los factores del microorganismo es muy importante la resistencia a los antibióticos y quizá las características particulares de la cepa.

3.4.3.1 RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori* A LOS ANTIBIOTICOS

Actualmente, los niveles de resistencia reportados a nivel mundial son: metronidazol (50-80%), claritromicina (5-25%), tetraciclina (0-5%) y amoxicilina (0-1%). Estudios realizados sobre la resistencia de esta bacteria a los antibióticos en el Salvador, han demostrado una alta resistencia a Metronidazol (86%) y Tetraciclina (8%) y baja o nula a Claritromicina y Amoxicilina (0%). ⁽¹⁸⁾

3.4.3.1.1 METRONIDAZOL

En el tratamiento contra la infección por *Helicobacter pylori*, el Metronidazol (Mtz) ha sido uno de los antibióticos más utilizados, pero su empleo en otras infecciones ha traído como resultado el desarrollo de niveles elevados de resistencia, varios estudios demuestran que la resistencia reduce el éxito de la triple terapia convencional en un promedio del 37,7%. ⁽¹⁸⁾

El principal mecanismo de resistencia a los nitroimidazoles involucra dos genes denominados *rdxA* y *frxA*. El gen *rdxA* codifica para una NADPH nitrorreductasa insensible al oxígeno, dona electrones y activa al metronidazol. El gen *frxA* codifica para la NADPH flavinoxidorreductasa y contribuye en la activación del metronidazol en el interior celular. Las mutaciones que inactivan el gen *rdxA* originan codones de parada o sustituciones que hacen a la proteína disfuncional. En algunos casos, el gen *frxA* promueve la aparición de resistencia y en otros se presenta mutando junto con el gen *rdxA*.⁽¹²⁾

La resistencia a metronidazol se ha relacionado con el uso frecuente en enfermedades parasitarias e infecciones dentales y puede aumentar en mujeres por su uso en infecciones ginecológicas.

3.4.3.1.2 CLARITROMICINA

La resistencia a claritromicina se ha incrementado en los últimos años a nivel mundial, debido al incremento de su uso en enfermedades del tracto respiratorio superior principalmente en países desarrollados y en menor medida en países en desarrollo. Constituye el principal determinante en la efectividad de la erradicación de *H. pylori* con la triple terapia convencional (IBP-amoxicilina-claritromicina).⁽³⁵⁾

La resistencia de *Helicobacter pylori* a claritromicina es debido a diversas mutaciones en el gen del RNA ribosomal 23S y específicamente en la región de la actividad peptidiltransferasa, en el dominio V. Por lo tanto, el mecanismo de resistencia a claritromicina se debería a una disminución de la capacidad de unión del antibiótico al ribosoma, de modo que no se afecte la síntesis de proteínas.⁽¹⁸⁾

3.4.3.1.3 AMOXICILINA

La amoxicilina es un antibiótico ampliamente utilizado en diferentes patologías infecciosas, tiene acción bactericida y actúa frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, inhibiendo la biosíntesis y reparación de la pared bacteriana. En estudios mundiales y locales se ha demostrado niveles muy bajos de resistencia frente a *Helicobacter pylori*.

El mecanismo por el cual la bacteria ha creado resistencia se basa en mutaciones descritas en las proteínas de unión a penicilinas (PBP por sus siglas en inglés). Se han descrito tres PBPs (PBP1, PBP2 y PBP3). Recientemente se demostraron que cambios en la PBP1 del *Helicobacter pylori* están involucrados en la resistencia a amoxicilina y que este fenotipo es transmitido a otras cepas. Sin embargo, este solo mecanismo no es suficiente para obtener altos niveles de resistencia.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio que se realizó fue de tipo experimental, transversal y exploratorio

- **Experimental:** Ya que se aisló el microorganismo de interés a partir de biopsias gástricas de pacientes del servicio de gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández”, Zacamil; la bacteria se analizó mediante métodos microbiológicos y moleculares, y pruebas bioquímicas.

- **Transversal:** los aislamientos del microorganismo de interés en la investigación se realizaron en el periodo de septiembre a diciembre de 2019.

- **Exploratorio:** Debido a la escasa investigación de esta problemática en El Salvador, se desarrolló el estudio con el fin de generar información sobre el microorganismo *Helicobacter pylori* y determinar su respuesta *in vitro* a la terapia antimicrobiana (Amoxicilina, Claritromicina y Metronidazol) propuesta por el Consenso de Maastricht.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

La investigación bibliográfica se llevó a cabo en las siguientes bibliotecas y bases de datos

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Central, Universidad de El Salvador.
- Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador
- Universidad Alberto Masferrer (USAM)
- Universidad José Matías Delgado
- Base de Datos ELSEVIER
- Base de Datos MEDLINE

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

4.3.1 UNIVERSO

El universo lo constituyeron los pacientes del servicio de Gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández”, Zacamil.

4.3.2 MUESTRA

La muestra estuvo conformada por biopsias gástricas de 50 pacientes, del servicio de Gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández”, Zacamil.

4.3.3 TIPO DE MUESTREO

Muestreo no probabilístico por conveniencia

El muestreo fue no probabilístico ya que no se conocía la probabilidad de ser seleccionados los elementos que conforman el universo, no todos los pacientes de dicha unidad consultaron por las mismas razones; y por conveniencia pues no todos los pacientes estuvieron disponibles en el período del estudio, algunos podían tener la intervención programada para otros meses.

4.3.4 Criterios de inclusión

1. Pacientes mayores de 18 años
2. Pacientes a los cuales el médico gastroenterólogo indique toma de biopsia gástrica por presunta presencia de *Helicobacter pylori*.

4.3.5 Criterios de exclusión

1. Pacientes menores de 18 años
2. Pacientes a los cuales el médico gastroenterólogo no indique toma de biopsia gástrica por presunta presencia de *Helicobacter pylori*.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1 OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

La parte experimental comenzó con la recolección de las muestras, para ello a pacientes del área de gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández” que habían sido citados para la realización de una endoscopia por presunta presencia de *Helicobacter pylori*, se les explicó brevemente el propósito de la investigación y el beneficio que obtendrían si participaban, si los pacientes aceptaban participar, se les solicitaba firmar un consentimiento informado. (Ver anexo N° 1).

Posteriormente, los médicos gastroenterólogos realizaron la endoscopia y la toma de las biopsias, una del cuerpo y otra del antro gástrico, se colocó cada una en un criovial que contenía 0.5 mL de caldo urea, se almacenaron en una hielera para mantener las condiciones óptimas de las muestras y se transportaron las muestras bajo autorización del Director de la Institución de Salud al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia para su análisis (Ver anexo N° 2).

4.4.2 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA Y AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO

Cada biopsia fue macerada totalmente, el producto de la maceración fue cultivado en un medio sólido adecuado, suplementado con los nutrientes necesarios (Ver anexo N° 3), se incubó cada cultivo con las condiciones requeridas por un período de 5-10 días (Ver anexo N° 4). Se llevaron controles ambientales, de los medios utilizados y del equipo de toma de muestras.

4.4.2.1 Preparación y siembra de la muestra

- Macerar la muestra mecánicamente y en sentido horario, haciendo uso de mortero y pistilo estériles.

- Remojar un hisopo estéril en el macerado.
- Sembrar el macerado por hisopado en una placa de medio Agar Columbia suplementado con 7% de sangre de cordero desfibrinada y suplemento DENT en cual contiene los siguientes antibióticos (vancomicina, trimetoprim, anfotericina B y cefsulodina).

4.4.2.2 Transporte de placas de cultivo a incubadora de CO₂

- Colocar las placas (un máximo de 4 placas) en un desecador limpio y seco
- Introducir en el desecador un beaker con 3 tabletas de Alka Seltzer® y 10 mL de agua (para generar un ambiente microaerófilico).
- Tapar inmediatamente el desecador y sellar con papel parafilm.

4.4.2.3 Incubación de la muestra y observación de los cultivos

- Incubar la placa cultivada en una atmosfera con 10% CO₂ y temperatura de 35 ± 2 °C.
- Observar los cultivos después de 5 días, si el crecimiento es negativo, reincubar 5 días más, si vuelve a dar negativo reportar el resultado como negativo.

4.4.3 IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

De las muestras que presentaron crecimiento positivo se realizó una caracterización macroscópica en la cual se verificó si las colonias eran típicas de *Helicobacter pylori* por medio de una comparación con las características de *Helicobacter pylori* NCTC 11637⁽³⁶⁾ y una caracterización microscópica aplicando tinción de Gram. (Ver anexo N° 5)

4.4.3.1 Caracterización macroscópica y microscópica

- Observar las colonias y verificar si cumplen las siguientes características; colonias puntiformes, brillantes y transparentes.

- Seleccionar una colonia aislada que cumpla con las características antes mencionadas y realizar la tinción de Gram.
- Observar en un microscopio óptico con el objetivo 100x (con aceite de inmersión).
- Confirmar si posee las características de un bacilo curvo Gram negativo.

4.4.4 PRUEBAS BIOQUIMICAS

De las colonias que cumplían con la caracterización macroscópica y microscópica se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: ureasa (Ver anexo N° 6), catalasa (Ver anexo N° 7) y oxidasa (Ver anexo N° 8).

4.4.4.1 Prueba de Ureasa

- Tomar con un asa bacteriológica de dos a tres colonias.
- Introducir las colonias en un criovial que contenga caldo urea base
- Observar, un viraje de color de amarillo a rosado fucsia en un lapso de 5 minutos a una hora indica prueba positiva.

4.4.4.2 Prueba de Oxidasa

- Tomar con un asa bacteriológica de dos a tres colonias.
- Colocar las colonias sobre los discos de sensibilidad de oxidasa.
- Observar, si hay un viraje de color de blanco a violeta indica prueba positiva, si no hay cambio se reporta como prueba negativa.

4.4.4.3 Prueba de Catalasa

- Colocar sobre un portaobjetos una gota de Peróxido de Hidrogeno al 30%.
- Tomar con un asa bacteriológica de dos a tres colonias sospechosas.
- Colocar las colonias de la bacteria sobre el reactivo.
- Observar si hay formación de burbujas o efervescencia, esto indica prueba positiva, si no se reporta como prueba negativa.

4.4.5 SUBCULTIVO DEL MICROORGANISMO

Se realizó un subcultivo en un medio no selectivo (Agar Columbia y 7% de sangre de cordero desfibrinada) de cada aislamiento de *Helicobacter pylori* que se obtuvo en el medio selectivo (Agar Columbia, 7% de sangre desfibrinada de cordero y suplemento DENT). Se incubaron en ambiente microaerófilico por 48-72 horas. (Ver anexo N° 9)

- Tomar con un hisopo estéril una colonia aislada de los cultivos que demostraran resultados positivos para pruebas de ureasa, catalasa, oxidasa y correspondan a la morfología de *Helicobacter pylori*.
- Sembrar la colonia aislada en placas con medio Agar Columbia suplementado con sangre al 7% por el método de hisopado.
- Incubar las placas en una atmosfera de 10% CO₂ y temperatura de 35 ± 2°C por un tiempo 48 a 72 horas.

4.4.6 RESPUESTA A LA TERAPIA ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE KIRBY BAUER

Los subcultivos obtenidos se utilizaron para realizar un antibiograma utilizando los siguientes antibióticos: Claritromicina 15 µg, Amoxicilina 10 µg y Metronidazol 5 µg (Ver anexo N° 10)

4.4.6.1 Antibiograma

- Seleccionar del subcultivo del microorganismo una colonia aislada y tomarla con un hisopo estéril.
- Sembrar la colonia por hisopado en placas de Agar Mueller-Hinton suplementado con 7% de sangre de cordero desfibrinada.
- Colocar con una pinza estéril los discos de antibióticos de prueba.
- Incubar las placas en una atmosfera con 10% CO₂ y temperatura de 35 ± 2°C por un tiempo de 3 a 5 días.

4.4.6.2 Lectura del antibiograma

- Retirar las placas de la incubadora
- Medir los halos producidos (si los hay) con un pie de rey y anotar los resultados, considerando lo establecido en la Tabla N°. 1

Tabla N°1. Criterios de clasificación para la respuesta de *Helicobacter pylori* ante los antibióticos de prueba. ⁽⁹⁾

Antibiótico de prueba	Concentración (µg)	Sensible (mm)	Sensibilidad intermedia (mm)	Resistente (mm)
Amoxicilina	10	>25	---	≤25
Claritromicina	15	>21	---	≤21
Metronidazol	5	>21	16-21	<16

4.4.7 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Los subcultivos obtenidos se utilizaron para llevar a cabo la conservación de las cepas y posteriormente realizar la verificación del gen ARN 16s por medio de métodos de biología molecular (Ver anexo N° 11), realizado por medio del siguiente procedimiento:

- Recolectar el subcultivo con un asa bacteriológica.
- Colocarlo en un criovial que contiene caldo infusión cerebro corazón y glicerol al 20%.
- Rotular e identificar cada criovial.
- Almacenar en un ultra congelador $\pm - 80^{\circ}\text{C}$.

4.4.8 VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL GEN ARN 16s

Se realizó mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final de las muestras positivas para caracterización macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas. Esto se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Evangélica de El Salvador.

- Materiales, equipo y reactivos (Ver anexo N°12)

4.4.8.1 Reanimación de la cepa (Ver anexo N° 13)

- Sacar los crioviales del ultra congelador y llevarlos a temperatura ambiente.
- Sembrar una placa de Agar Columbia suplementado con sangre de cordero defibrinada al 7%.
- Incubar las placas en una atmosfera con 10% CO₂ y temperatura de 35 ± 2°C por un tiempo de 3 a 5 días.

4.4.8.2 Extracción y purificación del ADN (Ver anexo N° 14)

- Recolectar con un asa bacteriológica todo el crecimiento del cultivo obtenido y colocarlo en un tubo Eppendorf
- Agregar a cada tubo 180 µL de T1
- Agregar a cada tubo 25 µL de solución de proteinasa K, homogenizar en vortex
- Dejar en baño de maria a 56 ± 2 °C por una hora.
- Homogenizar gentilmente y sin descartar el contenido, agregar 200 µL de Buffer B3.
- Incubar a una temperatura de 70 ± 2 °C por 10 minutos y homogenizar en vortex
- Agregar a cada tubo 210 µL de etanol grado molecular (absoluto 96 – 100%) y homogenizar en vortex.
- Transferir el total del contenido (640 µL aproximadamente) del tubo Eppendorf a la columna con el tubo colector y centrifugar un minuto a 11,000 rpm.
- Descartar el filtrado y el tubo colector y colocar la columna en un nuevo tubo colector.
- Realizar dos lavados, el primero con 500 µL de Buffer BW.

- Centrifugar un minuto a 11,000 rpm.
- Descartar el filtrado y colocar la columna en el mismo tubo colector.
- Realizar el segundo lavado: agregar a cada tubo 600 μ L de Buffer B5.
- Centrifugar un minuto a 11,000 rpm.
- Descartar el filtrado
- Centrifugar en seco nuevamente por un minuto a 11,000 rpm.
- Rotular nuevos tubos de microcentrifuga para guardar el ADN extraído.
- Colocar la columna en un tubo nuevo de microcentrifuga.
- Agregar a cada tubo 60 μ L de Buffer BE.
- Dejar reposar a temperatura ambiente por un minuto.
- Centrifugar un minuto a 11,000 rpm
- Descartar las columnas.
- Guardar en congelador los tubos de microcentrifuga con el ADN extraído debidamente rotulados.

4.4.8.3 Preparación del gel de Agarosa (Ver anexo N° 15)

- Pesar 1 g de agarosa (para un volumen de 50 mL y una concentración de 2%).
- Colocar la agarosa pesada en un Erlenmeyer de 250 mL y agregar 50 mL de Buffer de corrida 1x Tris-Borato-EDTA (TBE).
- Fundir la agarosa en microondas por 3 lapsos de 30 segundos **NOTA:** evitar el hervor del gel.
- Dejar enfriar el gel hasta que sea tolerable al tacto.
- Preparar la cuna del gel mientras se enfría.

4.4.8.4 Preparación de la cuna del gel (Ver anexo N° 16)

- Preparar la cuna del gel sellando los bordes con cinta en los extremos abiertos dejando que sobresalga 0.5 cm de cinta para luego retirarlo con facilidad.

- Colocar el peine en la parte superior de la cuna del gel para formar los pocillos.
- Agregar 4 μL de Gel Red en la agarosa fundida y agitar suavemente.
- Verter el gel de agarosa fundido dentro de la cuna del gel y dejar enfriar al menos 30 minutos.

4.4.8.5 Preparación del mix (Ver anexo N° 17)

- Reconstituir los oligonucleótidos forward y reverse, los cuales son específicos para la región del gen ARNr 16 s de *Helicobacter pylori*.
Forward: 5' - CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC – 3'
Reverse: 5' - ATT ACT GAC GCT GAT TGT GC – 3'
Tamaño amplicón: 110 pb.
- Agregar en un tubo de microcentrifuga los componentes de la tabla N° 2 en el siguiente orden.

Tabla N° 2 Componente del Mix para la PCR

Componentes del PCR mix	Concentración inicial	Volumen	Concentración final para Volumen final de 50 μL
Dexosinucleotidos (dNTP's)	10 mM	1 μL	0.2 mM
Cloruro de Magnesio	50 mM	3 μL	3 mM
Oligonucleotido Forward	25 pmol	5 μL	2.5 pmol
Oligonucleotido Reverse	25 pmol	5 μL	2.5 pmol
Taq Polimerasa	5 U/ μL	0.2 μL	0.02 U/ μL
Buffer	10x	5 μL	1x
Agua libre de nucleasas	----	29.8 μL	Cantidad necesaria para 50 μL

- Homogenizar en vortex.

4.4.8.6 Preparación de las muestras (Ver anexo N° 18)

- Mezclar el mix previamente preparado con 1 μL de ADN bacteriano de las cepas positivas y homogenizar en vortex.

- Preparar un control negativo con agua libre de nucleasas, mezclar el mix con 1 μ L de agua libre de nucleasas y homogenizar en vortex.
- Preparar muestras utilizando ADN bacteriano extraído y purificado de dos microorganismos diferentes a *Helicobacter pylori* obtenidos en los cultivos, mezclar el mix con 1 μ L de ADN y homogenizar en vortex.

4.4.8.7 Realización de los ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ARNr 16 s. (Ver anexo N° 19)

Preparadas las muestras y los controles negativos se procedió a la realización de 30 ciclos en la cual se llevaron a cabo 3 etapas fundamentales por cada ciclo: Desnaturalización, Alineación y Extensión.

- Colocar los tubos con las muestras y los controles negativos, en el termociclador.
- Programar el termociclador en las condiciones de temperatura y tiempos detalladas en la Tabla N° 3.

Tabla N° 3. Programa PCR ARNr 16s.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos
Ciclos PCR Realizar 30 ciclos	95°C	30 segundos
	60°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
Extensión final	72°C	8 minutos
Final	12°C	10 minutos

4.4.8.8 Preparación de muestras para electroforesis en gel (Ver anexo N° 20).

Se realizaron los siguientes pasos con el ADN amplificado de cepas positivas y ADN amplificado de dos microorganismos diferentes a *Helicobacter pylori*.

- Colocar 10 μL del ADN del segmento 16 s amplificados en un nuevo tubo de microcentrifuga.
- Colocar 2 μL de Buffer de carga 6x y homogenizar.
- Colocar 7 μL del marcador de peso molecular en un nuevo tubo de microcentrifuga.
- Colocar 2 μL de Buffer de carga 6x y homogenizar.

4.4.8.9 Carga de las muestras y corrida del gel (Ver anexo N° 21)

- Retirar cuidadosamente el peine del gel que previamente se había dejado solidificando para que los pocillos queden libres.
- Colocar el gel en la cuba de electroforesis.
- Llenar la cuba de electroforesis con el Buffer de corrida 1x.
- Cargar los pocillos, en el primer pocillo colocar los 9 μL del marcador de peso molecular.
- Cargar los demás pocillos con 12 μL de cada muestra.
- Colocar la tapa de la cuba de electroforesis controlando que los bordes negativo y positivo coincidan (rojo/rojo y negro/negro).
- Colocar los cables a la fuente de alimentación.
- Activar la corrida bajo las siguientes condiciones: 100 voltios, 500 mili - amperios y minutos.

4.4.8.10 Visualización de las bandas de ADN. (Ver anexo N° 22)

El gel de la electroforesis se visualizó bajo luz ultravioleta para ver si se presentaban fragmentos de 110 pares de base, el cual es evidencia de la presencia del gen ARN 16s.

- Sacar el gel de la cámara y llevar al transiluminador.
- Encender la lámpara ultravioleta e identificar las bandas.
- Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible para posterior análisis de resultados.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En la investigación participaron 50 pacientes del servicio de gastroenterología del Hospital Nacional Dr. Juan José Fernández, Zacamil, 11 hombres (22%) y 39 mujeres (78%), con edades entre los 18 y 88 años los cuales cumplieron los criterios de inclusión y firmaron un consentimiento informado. El médico responsable, especialista en gastroenterología empleó un equipo, endoscopio y pinzas Olympus® (Ver anexo N° 23) para realizar una endoscopia digestiva a cada uno de los pacientes para la obtención de las muestras (Ver anexo N° 24), las cuales fueron analizadas por los estudiantes investigadores, obteniendo los resultados presentados a continuación.

5.1 Cultivos microbiológicos de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias de cuerpo y antro gástrico.

Las colonias obtenidas en los cultivos microbiológicos considerados como positivos fueron categorizadas como sospechosas por medio de una comparación de sus características morfológicas con las características de la cepa de *Helicobacter pylori* NCTC 11637⁽³⁶⁾.

En el cuadro N°1 se presentan los resultados del aislamiento de colonias compatibles con *Helicobacter pylori* para las muestras de antro y cuerpo gástrico. Se obtuvieron dos cepas compatibles, una de antro gástrico proveniente del paciente 10 y la otra de cuerpo gástrico proveniente del paciente 43, las cuales fueron caracterizadas como se describirá a continuación.

Cuadro N°1. Resultados del aislamiento de *Helicobacter pylori* por cultivo microbiológico para muestras de antro (A) y cuerpo (C) gástrico.

Número de paciente	Crecimiento de colonias compatibles con <i>Helicobacter pylori</i>	
	Antro (A)	Cuerpo (C)
1	Negativo	Negativo

Cuadro N°1 (Continuación)

2	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo
10	Positivo	Negativo
11	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo

Cuadro N°1 (Continuación)

26	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo
31	Negativo	Negativo
32	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo
34	Negativo	Negativo
35	Negativo	Negativo
36	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo
38	Negativo	Negativo
39	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo
41	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo
43	Negativo	Positivo
44	Negativo	Negativo
45	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo
47	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo

El aislamiento de colonias compatibles con *Helicobacter pylori* mediante cultivo microbiológico fue positivo en 2 de los 50 pacientes involucrados (2%). Por otra parte, 48 de los 50 pacientes involucrados (98%) presentaron resultados negativos, según la literatura, el aislamiento primario de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas mediante cultivo microbiológico bajo condiciones óptimas posee una sensibilidad cercana al 90%, una especificidad de 100%, y las tasas de aislamiento generalmente oscilan entre 23.5% y 97% ⁽³⁾.

Para efectos de comparación, se solicitaron los resultados de análisis histopatológico de las biopsias por medio de tinción de Giemsa de los pacientes que se incluyeron en este estudio al área de Patología del Hospital Nacional Dr. Juan José Fernández, Zacamil y se compararon con los resultados obtenidos por medio del cultivo (Ver anexo N° 29), observándose que de los 50 pacientes, 26 pacientes (52%) tenían presencia de *Helicobacter pylori*; basándose en los porcentajes en los que oscila el aislamiento (23.5%-97%), debían obtenerse al menos 6 cultivos positivos de la bacteria de interés, que representa el 23.5% de los 26 pacientes positivos, pero únicamente se obtuvieron dos cultivos positivos, lo que sugiere que el método empleado para desarrollar este estudio presenta dificultades que deben corregirse para futuras investigaciones.

Debido a ello se identificó una serie de factores que están asociados con las bajas tasas de recuperación de *Helicobacter pylori* ⁽³⁾, los cuales pudieron influir en el método empleado, estos involucran preparación del paciente, proceso endoscópico, transporte y procesamiento de la muestra, cultivo y condiciones de incubación, los cuales se desarrollan a continuación:

- Preparación del paciente

Una de las dificultades para la recuperación de *Helicobacter pylori* por medio de cultivo microbiológico está relacionado al paciente y su preparación previa a la realización de la endoscopia gástrica para la toma de muestras.

Diversas publicaciones de investigaciones relacionadas a esta temática manifiestan que para tener mayor probabilidad de éxito en la recuperación por cultivo los pacientes no deben haber consumido medicamentos que sean capaces de modular la bioquímica gástrica e inhibir *Helicobacter pylori*, tales como inhibidores de bomba de protones (Omeprazol, Lanzoprazol, Ranitidina), antibiótico, bismuto y sucralfato al menos dos semanas antes del procedimiento ⁽²³⁾; esto debido a que los inhibidores de bomba de protones como Omeprazol y Lanzoprazol pueden ejercer actividad bacteriostática, incluso bajo ciertas condiciones relacionadas a pH pueden ser bactericidas sobre *Helicobacter pylori* ^(4,14) además constituyen un factor importante en la distribución de la bacteria en el estómago, ya que al modificar el pH, la bacteria puede migrar de sus zonas de colonización habitual a otros lugares de la región gástrica, afectando directamente en el proceso de toma de muestras idóneas para realizar el cultivo, ya que pueden tomarse biopsias con muy poca o nula colonización bacteriana, dificultando su crecimiento en el medio de cultivo empleado si este no es altamente selectivo.

En esta investigación, una gran parte de los pacientes que participaron en el estudio habían estado en tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, específicamente con Omeprazol, en algunos casos por indicación médica y en otros por automedicación (se desconoce si habían consumido antibióticos, otros inhibidores de bomba de protones, bismuto o sucralfato), por lo que existe la posibilidad que el médico especialista en gastroenterología tomara muestras de una parte gástrica que no tuviera colonización de la bacteria o que esta estuviera muy poco representada por las razones antes mencionadas, favoreciendo el impedimento de su recuperación en el cultivo, ya que si había una poca carga de la bacteria, la microbiota presente en la muestra y contaminantes provenientes del equipo endoscópico sobresalían en la competencia por los nutrientes disponibles en el medio de cultivo.

Un acontecimiento que respalda este fenómeno es el hecho que la muestra 10-A, que presentó resultado positivo para *Helicobacter pylori* en cultivo y biopsia con prueba positiva de ureasa rápida, presentó resultados negativos en histopatología. Esto no significa que todas las muestras hayan tenido el mismo problema, ya que en la muestra 43-C los resultados de histopatología y cultivo son ambos positivos, pero sí constituye una de las posibles causas del bajo porcentaje de aislamiento y podría explicar la discrepancia entre los resultados de histopatología y cultivo.

- Proceso endoscópico

El procedimiento endoscópico tiene influencia sobre el cultivo de *Helicobacter pylori*, dado que este puede verse afectado por microorganismos orales o gram negativos provenientes de la orofaringe o del duodeno respectivamente, presentes en los equipos utilizados, los cuales pueden llegar a la biopsia cuando esta pasa por el canal del endoscopio ⁽⁸⁾.

Los endoscopios constituyen una fuente de contaminación por a la presencia de biopelículas bacterianas, los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomona* y *Enterobacter* son algunos de los más comunes ⁽⁸⁾.

Durante el desarrollo de este estudio, se detectó contaminación en los cultivos por el equipo utilizado, específicamente la pinza con la que el médico tomaba las muestras, el cual disminuyó su sensibilidad; esto probablemente por la deficiencia de un correcto procedimiento de limpieza del equipo e instrumentos utilizado; el endoscopio recibía una breve limpieza manual con gasas impregnadas con agua y desinfección con glutaraldehído diluido en agua y la pinza para tomar las biopsias eventualmente era sumergida en la misma solución de glutaraldehído y secada al aire. Durante las recolecciones de las primeras muestras, las pinzas solían tener contacto con el medio de transporte (caldo urea) y al cultivarlas se observó crecimiento de microorganismos con características no

compatibles con la bacteria de interés, eran colonias circulares, mucosas de color beige, microscópicamente correspondían a bacilos cortos Gram negativos (Ver anexo N° 30), por lo que se decidió verificar la probable causa de ese acontecimiento, evaluando la pinza con la que se tomaban las muestras.

Para ello se sumergieron las pinzas en un criovial con medio de transporte y se cultivaron en agar nutritivo y en agar Columbia con 7% de sangre de cordero y suplemento DENT, se incubaron en las mismas condiciones que las muestras y se obtuvo un crecimiento bacteriano con morfología macroscópica similar a la de los microorganismos obtenidos en el cultivo de las primeras muestras y su morfología microscópica correspondía a bacilos cortos Gram negativos (Ver anexo N° 31). Para evitarlo, las muestras se retiraron de la pinza con palillos estériles para ser colocadas en el medio de transporte y se pudo evidenciar un menor crecimiento de microorganismos contaminantes, pues eliminarlos completamente no era posible ya que el contacto entre la pinza y la biopsia era inevitable. Al estar presentes los microorganismos contaminantes, aumentó la competencia por los nutrientes del medio de cultivo, viéndose estos favorecidos.

- Número de muestras

El número de muestras a procesar de cada paciente debe tomarse en cuenta para tener resultados óptimos en el aislamiento de *Helicobacter pylori* por medio de cultivo microbiológico, pues la bacteria tiene una distribución en forma de parches en el estómago, de tal manera que una sola muestra de antro y una de cuerpo pueden no ser suficientes para aislar la bacteria ⁽⁵⁾.

Al aumentar el número de muestras, aumenta la posibilidad de aislar el microorganismo de interés, sobretodo en estudios que se realizan por primera vez; para esta investigación solo se utilizó una muestra de antro y una de cuerpo debido a las especificaciones del centro de salud donde se llevó a cabo la recolección de muestras, representando una limitante ya que por la distribución

irregular de la bacteria, que también se vio favorecida por el consumo de inhibidores de bomba de protones fue más difícil aislar *Helicobacter pylori*, ya que pudieron contener una baja o nula colonización de la bacteria. Actualmente se recomienda procesar al menos dos muestras de antro y dos de cuerpo (anterior y posterior) para solventar esta dificultad y tener mayor probabilidad de éxito en el cultivo ⁽²³⁾.

- Transporte y procesamiento de la muestra

El transporte del espécimen clínico y su procesamiento son etapas importantes para lograr el aislamiento de *Helicobacter pylori* ⁽³⁾, ya que ambas juegan un papel importante para evitar la pérdida de viabilidad o transformación de la bacteria a su forma viable no cultivable y poder recuperarla en el cultivo microbiológico.

Respecto al transporte, según la literatura consultada, los factores influyentes son: el medio, el tiempo y las condiciones en que se realice ⁽⁵⁾. En este estudio, el medio de transporte utilizado fue caldo urea, cada muestra fue depositada en crioviales con el medio para luego ser colocados en una hielera con tres bolsas de gel refrigerante y el tiempo promedio en que las muestras permanecían en estas condiciones antes de ser procesadas fue de dos a dos horas y media; en este caso, ninguno de ellos puede considerarse como aspectos que influyeron de forma negativa en el procedimiento, pues hay investigaciones que respaldan el uso del caldo urea como medio de transporte que no afecta la viabilidad de *Helicobacter pylori* ⁽²⁶⁾, por otra parte, el tiempo que las muestras permanecieron en este medio fue menor que las 6 horas que se recomienda ⁽²⁵⁾, también se garantizaron las condiciones óptimas para el transporte.

Según experiencia de investigadores con los que se pudo conversar, los factores que afectan durante el procesamiento son la velocidad del procesamiento y el tamaño de la cristalería utilizada. En el desarrollo del proceso, al no tener experiencia con la bacteria en estudio, el procesamiento de muestras se

realizaba en forma lenta y utilizando un mortero grande y un pistilo pequeño (Ver anexo N° 32), lo cual según estos investigadores es incorrecto, ya que al prolongar el procesamiento de las muestras se favorece la exposición de la bacteria al oxígeno y esta puede morir o cambiar su morfología bacilar a cocos ⁽³³⁾, impidiendo su recuperación en cultivo microbiológico. Así también, cuando se utilizan mortero y pistilo con una diferencia de dimensiones el movimiento circular para macerar se hace más amplio, favoreciendo la incorporación de oxígeno y afectando como ya se mencionó anteriormente.

- Cultivo y condiciones de incubación.

Si bien los aspectos anteriores son de alta influencia para obtener un aislamiento exitoso de *Helicobacter pylori*, el cultivo y condiciones de incubación tienen una mayor influencia, pues es en ellos donde se debe brindar a la bacteria en estudio los nutrientes adecuados y las condiciones óptimas de incubación para su crecimiento.

Durante la etapa del cultivo, la dificultad principal fue el crecimiento predominante de microorganismos con diversidad de morfologías macroscópicas (Ver anexo N° 33), a los cuales se les realizó tinción al Gram y se observaron en su mayoría bacilos Gram negativos (Ver anexo N° 34), sin embargo, también fue posible observar bacilos Gram positivos, que fueron identificados como posibles Lactobacilos, ya que las colonias de donde provenían fueron aisladas en medio selectivo MRS y al realizarle pruebas bioquímicas los resultados fueron compatibles con este género: oxidasa y catalasa negativa (Ver anexo N° 35), esto fue realizado debido a que se ha demostrado que varios Lactobacilos son capaces de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* in vitro. ⁽³¹⁾

Estos microorganismos limitaron el crecimiento de la bacteria de interés debido a la competencia por los nutrientes del medio ⁽¹⁹⁾, ya que los antibióticos del suplemento selectivo DENT no fueron capaces de inhibir la carga microbiana

contaminante o propia de la biopsia gástrica, ya sea porque la concentración de antibióticos no era suficiente o porque el tipo de antibióticos no eran los adecuados para realizar esa acción.

Existen investigaciones donde se demuestra que las concentraciones empleadas en el medio de cultivo (Vancomicina 0.1 mg/mL; Trimetoprim, Cefsulodina y Anfotericina B 0.05 mg/mL) son aptas para la inhibición de contaminantes en el cultivo de las biopsias sin afectar el crecimiento de *Helicobacter pylori*, la limitante es que esto fue realizado hace 32 años y en una región diferente a la nuestra. ⁽⁵⁾


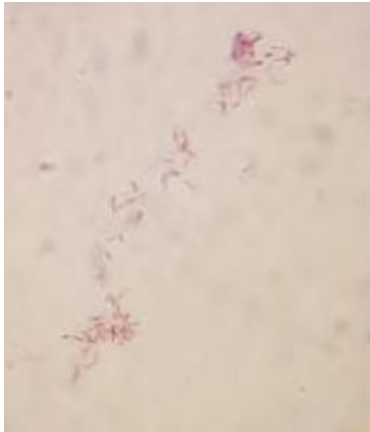
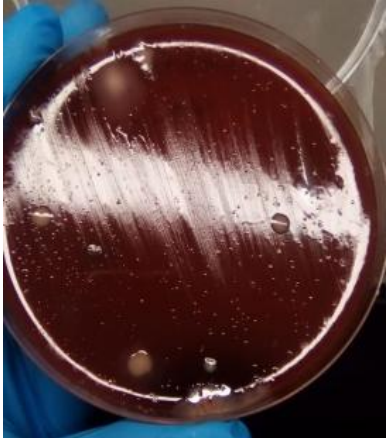
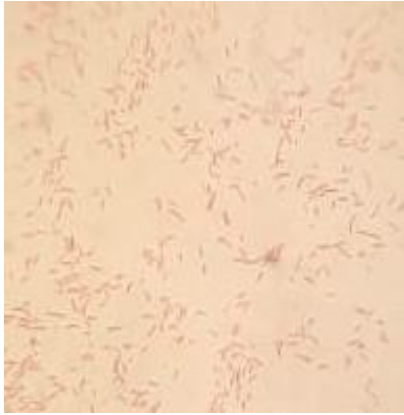
Respecto a la incubación, se realizó en una incubadora con tanque de CO₂ ubicada en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de El Salvador. Las placas cultivadas con las muestras eran transportadas a dicho lugar en desecadores limpios y desinfectados con alcohol isopropílico 70% que contenían un beaker con 3 tabletas de Alka Seltzer y 10 mL de agua destilada ^(1, 25), lo cual ayudaba a crear y mantener una atmósfera microaerofílica para evitar el cambio brusco de condiciones durante el transporte; en la incubadora las condiciones empleadas fueron: temperatura de 37°C y 10% de CO₂. Los cultivos fueron revisados al quinto día de incubación y luego a diario hasta completar 10 días. Esta es una etapa que no se consideró influyente de forma negativa, pues durante el transporte hacia la incubadora se proporcionó la atmósfera microaerofílica necesaria para el mantenimiento de *Helicobacter pylori* y las condiciones de incubación se proporcionaron tal cual dicta la literatura ⁽¹⁾.

Estos factores, individual o colectivamente pudieron haber ocasionado la obtención del 98% de muestras negativas, lo que perjudica el desarrollo de una investigación que aporte resultados significativos acerca de características de la bacteria de interés y su susceptibilidad a los antibióticos de la terapia que es recomendada a nivel internacional.

5.2 Caracterización de las cepas aisladas de *Helicobacter pylori* por medio de morfología macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas: ureasa, catalasa y oxidasa.

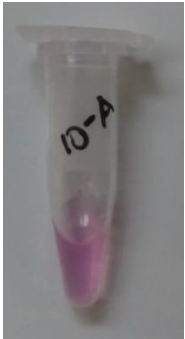





El Cuadro N°2 describe la caracterización morfológica macroscópica y microscópica utilizando tinción de Gram.

Cuadro N°2. Descripción morfológica de las cepas aisladas compatibles con *Helicobacter pylori*

Número de muestra / cepa	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
10-A 1	 <p>Colonias puntiformes grisáceas, translúcidas,</p>	 <p>Bacilos curvos Gram negativos</p>
43-C 2	 <p>Colonias puntiformes grisáceas, translúcidas,</p>	 <p>Bacilos curvos Gram negativos</p>

El Cuadro N° 3 describe la caracterización bioquímica de las cepas aisladas para pruebas de ureasa (realizada con caldo urea al 5%), oxidasa (realizada con discos de oxidasa) y catalasa (realizada con Peróxido de Hidrógeno al 30%).

Cuadro N°3. Caracterización bioquímica de las cepas aisladas compatibles con *Helicobacter pylori*

Número de muestra / cepa	Prueba de ureasa	Prueba de oxidasa	Prueba de catalasa
10-A 1	 Prueba positiva, coloración rosado fucsia	 Prueba positiva, coloración violeta	 Prueba positiva, formación de burbujas
43-C 2	 Prueba positiva, coloración rosado fucsia	 Prueba positiva, coloración violeta	 Prueba positiva, formación de burbujas

Las colonias aisladas de las muestras 10-A y 43-C fueron denominadas como *Helicobacter pylori* pues su cultivo en medio Agar Columbia suplementado con 7% de sangre desfibrinada de cordero y suplemento DENT presentó

características macroscópicas y microscópicas compatibles con las de *Helicobacter pylori* NCTC 11637. ⁽³⁶⁾

Respecto a las pruebas bioquímicas, las tres pruebas presentaron resultados positivos, indicando que ambas cepas evaluadas tenían presencia de ureasa, la cual le permite a la bacteria convertir la urea en amonio, para neutralizar el ácido del estómago y poder sobrevivir en él; catalasa, que le permite descomponer el peróxido de hidrógeno producido por la respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos durante su colonización en el estómago en agua y oxígeno; y oxidasa, presente en escasas bacterias microaerófilas, que le permite utilizar el oxígeno para generar energía.

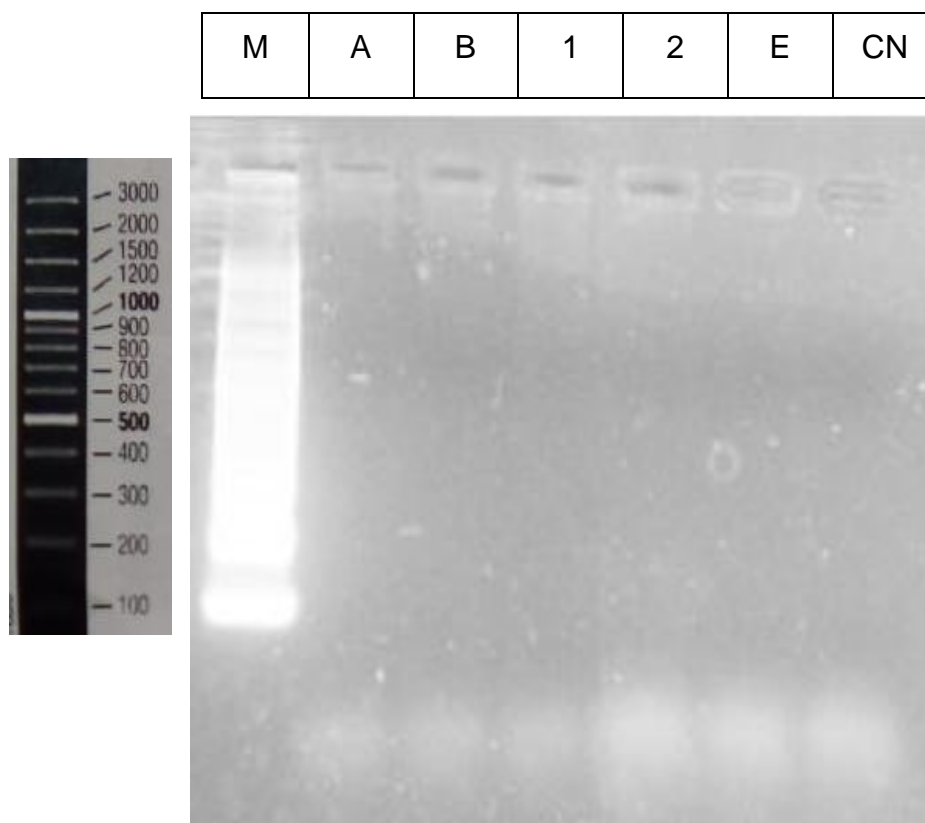
Estos resultados son compatibles con los producidos por la cepa de *Helicobacter pylori* NCTC 11637, por tanto, al cumplir con la morfología y las pruebas bioquímicas, las cepas se identificaron como *Helicobacter pylori*.

5.3 Verificación de la presencia del gen ARN 16s en las cepas aisladas por medio de técnicas de microbiología molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ARN 16s.

Se llevó a cabo el proceso de extracción de ADN de las cepas con características morfológicas y bioquímicas compatibles con *Helicobacter pylori* (10-A y 43-C) utilizando el kit de extracción NucleoSpin® Tissue, la reacción en cadena de la Polimerasa con las condiciones establecidas en un termociclador Techne prime® (Ver Anexo N° 25) y la electroforesis en gel de agarosa al 2.0% (Ver Anexo N° 26), la cual se observó en un transiluminador UVP® (Ver Anexo N° 25), obteniendo los resultados presentados a continuación.

La figura N° 8 demuestra los productos de amplificación de PCR de la región ARN 16s de las cepas 1 y 2, aisladas de biopsias gástricas sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2.0%; no se observa ninguna banda característica que

confirme la presencia del gen ARN 16s en las cepas 1 y 2, la cual se esperaba que tuviera un tamaño de 110 pb aproximadamente (Ver anexo N°27).



- M Marcador de peso molecular de 100 pb
A B ADN de cepas no *Helicobacter pylori*
1 ADN de cepa aislada de muestra 10-A
2 ADN de cepa aislada de muestra 43-C
E ADN de *Escherichia coli*
CN Control negativo

Figura N° 8. Productos de amplificación por PCR de la región ARN 16s

Respecto a esta parte, el ADN de ninguna de las cepas aisladas produjo bandas de un tamaño aproximadamente de 110 pb en el gel de agarosa al 2%, sugiriendo que no tenían presente el gen ARN 16s, sin embargo se interpretó como un resultado falso negativo ya que se observó que las placas de subcultivo utilizadas

para este procedimiento tenían muy pocas colonias, ocasionando probablemente la extracción de cantidad insuficiente de ADN, además no se evaluó la calidad que este tenía, por lo que se desconoce si ambos parámetros: calidad y cantidad, fueron los adecuados para llevar a cabo el proceso de amplificación.

5.4 Respuesta in vitro de la cepa aislada a los antibióticos de primera línea del Consenso de Maastricht: Amoxicilina, Claritromicina y Metronidazol.

El Cuadro N° 4 describe los resultados para los antibiogramas realizados por el método de Kirby Bauer (Ver Anexo N° 28) de las cepas aisladas compatibles con *Helicobacter pylori* a los antibióticos de primera línea del consenso de Maastricht: Amoxicilina, Claritromicina y Metronidazol.

Cuadro N°4. Respuesta in vitro de las cepas aisladas a los antibióticos de prueba.

Número de muestra / cepa	Amoxicilina 10 mcg (Medida de halo, lectura)	Claritromicina 15 mcg (Medida de halo, lectura)	Metronidazol 5 mcg (Medida de halo, lectura)
10-A 1	27 Sensible	0 Resistente	0 Resistente
43-C 2	25 Sensible	19 Resistente	0 Resistente

Los antibiogramas realizados permitieron obtener información sobre la susceptibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos de la terapia de primera línea del Consenso de Maastricht: Amoxicilina, Metronidazol y Claritromicina, pero sería necesario tener un mayor número de datos para establecer una tendencia general del comportamiento de las cepas de *Helicobacter pylori* en nuestro país. A pesar de ello, la tendencia sobre susceptibilidad antimicrobiana obtenida en esta investigación, donde ambas cepas fueron sensibles a Amoxicilina y resistentes a Claritromicina y Metronidazol, es similar a la que se

obtuvo en un estudio bibliográfico de publicaciones sobre este aspecto en Latinoamérica y el Caribe, ya que se tiene mayor resistencia para Claritromicina (14%) y Metronidazol (65.7%) y menor resistencia para Amoxicilina (6.5%).⁽¹⁸⁾

5.5 Informe de resultados presentado al servicio de gastroenterología del Hospital Dr. Juan José Fernández, Zacamil.

Se presentaron los resultados individuales de cada paciente al servicio de gastroenterología del Hospital Dr. Juan José Fernández, Zacamil según el siguiente formato, solicitado por las autoridades de la institución.

Los informes fueron archivados para ser utilizados como precedente de investigaciones futuras en dicha institución.



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
MICROBIOLOGÍA APLICADA**



Hoja de resultados de paciente participante en el estudio de grado: “Aislamiento e identificación de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas y su perfil antibiótico”

Nombre del paciente: XXX

Edad: XX

Número de paciente: 10

Número de registro: XXX

Fecha de toma de muestra: 09 de septiembre de 2019

Establecimiento de salud: Hospital Nacional Dr. Juan José Fernández, Zacamil

El médico gastroenterólogo tomó dos muestras, una del antro y otra del cuerpo gástrico, la de antro corresponde a la letra “A”, la de cuerpo a la letra “C”.

Muestra 10-A	Prueba de ureasa: Positiva Cultivo en agar Columbia 7% de sangre y suplemento selectivo: Presencia de colonias características de <i>Helicobacter pylori</i> Morfología microscópica: Bacilos gram negativos curvados compatibles con <i>Helicobacter pylori</i> , catalasa y oxidasa positivas.
Muestra 10-C	Prueba de ureasa: Positiva Cultivo en agar Columbia 7% de sangre y suplemento selectivo: Ausencia de colonias características de <i>Helicobacter pylori</i> Morfología microscópica: No corresponde a <i>Helicobacter pylori</i>

Antibiograma realizado al aislamiento de muestra 10-A

Antibiótico y concentración	Medida de halo (mm)	Susceptibilidad*
Amoxicilina 10 mcg	27	Sensible
Metronidazol 5 mcg	0	Resistente
Claritromicina 15 mcg	0	Resistente

*Obtenidos mediante comparación con la siguiente tabla:

Antibiótico de prueba	Sensible (mm)	Sensibilidad intermedia (mm)	Resistente (mm)
Amoxicilina	>25	---	≤25
Claritromicina	>21	---	≤21
Metronidazol	>21	16-21	<16

DICTAMEN:

Prueba de ureasa rápida positiva para la muestra 10-A y 10-C, únicamente se recuperaron colonias compatibles con *Helicobacter pylori* de la muestra 10-A, microscópicamente descritos como bacilos Gram negativos curvados, con prueba de oxidasa y catalasa positivas. Cepa bacteriana ensayada en antibiograma por el método de Kirby Bauer con los siguientes resultados: Sensible a Amoxicilina 10 microgramos y resistente a Claritromicina 15 microgramos y a Metronidazol 5 microgramos.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La tasa de aislamiento de *Helicobacter pylori* mediante cultivo microbiológico a partir del total de pacientes involucrados fue de 2%.
2. El 98% de los pacientes involucrados en el estudio presentaron resultados negativos para *Helicobacter pylori* mediante cultivo microbiológico.
3. La tasa de aislamiento de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas obtenida en este estudio (2%) es considerablemente menor que las reportadas en la literatura (23.5% - 97%).
4. El bajo porcentaje de aislamiento de *Helicobacter pylori* obtenida en este estudio puede estar relacionada con deficiencias en aspectos como: inadecuada preparación previa del paciente, número de muestras utilizadas por paciente, procesamiento lento de la muestra y baja selectividad del medio de cultivo empleado.
5. Se comprobó la identidad de las cepas aisladas únicamente por medio de características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) y bioquímicas (presencia de enzima ureasa, catalasa y oxidasa).
6. No se comprobó la presencia del gen ARN 16s por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa en las cepas aisladas debido a la dificultad para obtener suficiente biomasa del microorganismo en cultivo y extraer ADN en cantidad y calidad adecuadas para su amplificación.
7. Las dos cepas aisladas e identificadas como *Helicobacter pylori* por medio de características morfológicas y bioquímicas presentan sensibilidad a Amoxicilina 10 µg y resistencia a Claritromicina 15 µg y Metronidazol 5 µg.

8. El número de datos informativos sobre la susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a los antibióticos de terapia de primera línea propuestos por el Consenso de Maastricht (Amoxicilina, Claritromicina y Metronidazol) no es suficiente para establecer una tendencia generalizada sobre este aspecto en nuestro país.

9. Este estudio constituye una herramienta valiosa para futuras investigaciones, pues la información presentada será de utilidad para modificar el procedimiento y estrategias de cultivo utilizadas para obtener tasas de aislamiento suficientes que permitan conocer mejor las características moleculares y la susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a los antibióticos de terapia de primera línea propuestos por el Consenso de Maastricht (Amoxicilina, Claritromicina y Metronidazol).

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. En futuras investigaciones, solicitar un mayor número de biopsias gástricas a obtener de cada paciente, que sean al menos dos de antro y dos de cuerpo gástrico.
2. Realizar una validación de método que permita recuperar *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes que hayan consumido inhibidores de bomba de protones previo a la realización de la endoscopia digestiva y toma de muestras.
3. Realizar estudios previos de caracterización y sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos contaminantes propios del proceso endoscópico y de la microbiota humana gástrica propia de nuestro país.
4. Suplementar el medio de transporte y el medio de cultivo con antibióticos que sean adecuados para eliminar o inhibir los microorganismos que pueden limitar el crecimiento de *Helicobacter pylori*.
5. Utilizar durante el procesamiento de las muestras, morteros y pistilos de iguales dimensiones, para evitar que los movimientos de maceración sean amplios y permitan la incorporación de oxígeno.
6. Macerar las muestras lo más rápido posible, sin romper completamente el tejido.
7. Enriquecer las colonias sospechosas obtenidas en los cultivos primarios en un medio suplementado con nutrientes, previo a la realización de los subcultivos.

8. Realizar más de un subcultivo para llevar a cabo la identificación molecular de las cepas aisladas.
9. Verificar la integridad del ADN extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa, previo a la realización de la amplificación.
10. Reevaluar la susceptibilidad de cepas de *Helicobacter pylori* propias de nuestro país a los antibióticos de terapia de primera línea sugeridos por el Consenso de Maastricht (Amoxicilina, Claritromicina y Metronidazol).

BIBLIOGRAFIA

1. Alarcón, T., Baquero, M., Domingo, D., López-Brea, M., & Royo, G. (2004). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 17.
2. Bayona Rojas, M. A. (2013). Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana Gastroenterología y Hepatología*, 94-99.
3. Bedoya, I; Álvarez, A. (2018). Comparación cualitativa de diferentes medios de cultivo y condiciones de siembra para el aislamiento primario de *Helicobacter pylori* a partir de biopsia gástrica obtenidas de pacientes dispépticos. *Revista Risaralda*. 23(2), 29-33.
4. Boyanova, L; Megraud, F; Lamouliatte, H. (1991). Activity of lansoprazole against *Helicobacter pylori*. *The Lancet*, 337(8755), 1486.
5. Cercenado, E; Cantón, R. (2004). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. [En línea], Disponible en: https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientos_microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia17.pdf. Consultado el 19 de diciembre de 2019.
6. Corti, R. E. (2009). *Helicobacter pylori*: algunos aspectos epidemiológicos en Latinoamérica luego de un cuarto de siglo. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 39(3), 175-176.
7. Cruz, J., Servín, A., Pérez, J., Serralde, A., & Higuera, M. (2013). Principales indicaciones para el tratamiento de erradicación contra

Helicobacter pylori y evaluación de tres esquemas de tratamiento. Revista Médica del Hospital General de México, 76(1), 15-22.

8. Dent, J. C., & McNulty, C. A. M. (1988). Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 7(4), 555-558.
9. Foundation for Medical Education and Research (1998 - 2018) Infección por *Helicobacter pylori* (H. pylori). [En línea] Mayo Clinic. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/h-pylori/symptoms-causes/syc-20356171>. Consultado el 21 de enero de 2019.
10. Gisbert, J. P. (2000). Revisión crítica de los métodos diagnósticos de infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterología y hepatología, 23(3), 135-143.
11. Gisbert, J. P., Molina-Infante, J., Amador, J., Bermejo, F., Bujanda, L., Calvet, X., ... & Gomollón, F. (2016). IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterología y Hepatología, 39(10), 697-721.
12. González Rodríguez, J. J., & Landaverde Carpio, A. V. (2012). Tratamiento para erradicación de *Helicobacter pylori* en una población salvadoreña: Terapia secuencial vs Triple terapia convencional. Tesis de doctorado en medicina. Universidad Dr. José Matías Delgado. San Salvador.
13. Hooi, J.K., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., ... & Chan, F. K. (2017). Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. Gastroenterology, 153(2), 420-429.

14. Jöström, J. E., Fryklund, J., Kühler, T., & Larsson, H. (1996). In vitro antibacterial activity of Omeprazole and its selectivity for *Helicobacter spp.* are dependent on incubation conditions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(3), 621-626.
15. Kusters, J. G., van Vliet, A. H., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 449-490.
16. Laboratorio Duran Bellido (2010). Test de aliento para la detección del *Helicobacter pylori*. [En línea] Disponible en: <https://laboratoriodeanalisisclinico.com/test-de-aliento-helicobacter-pylori/> Consultado el 12 de enero de 2019.
17. Lera Omiste, I., Gomollón García, F., Ducons García, J., & Santolaria Piedrafita, S. (2012). Métodos diagnósticos de la infección por *Helicobacter Pylori* en Huesca. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, Prensas de la Universidad.
18. Martínez, J. D., Henao, S. C., & Lizarazo, J. I. (2014). Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en América Latina y el Caribe. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 29(3), 218-227.
19. Martínez, C; Rivera, J; Ochoa, S; Giono, S. (2001). Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica*, 26(4), 85-89.
20. Montalvo E. Montalvo-Arenas, C. E., Ortega-León, L. H., Pena-Sánchez, J., Rodríguez, A. V., Gil, A. M., & Bernal-Sahagún, F. (2009). *Helicobacter pylori*, patología gástrica y cirugía. Descubrimiento que mereció el Premio Nobel en Medicina 2005. *Cirujano General*, 31(2), 115-124.

21. Navarro, A. (2009). Anatomía quirúrgica del estómago y duodeno. Cirugía Digestiva, 1-22.
22. Ogata, S. K., Gales, A. C., & Kawakami, E. (2014). Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. Brazilian Journal of Microbiology, 45(4), 1439-1448.
23. Otero, W; Frías, J. (2017). Aspectos prácticos en métodos diagnósticos para la infección por *Helicobacter pylori*: una revisión narrativa. Revista gastroenterología del Perú. 37(3), 246-253.
24. Pereyra, L; Gorordo, R; Berruezo, F; Amieva, C; Garcia, M; Bottiglieri, M (2017) Sensibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Helicobacter pylori* aislados de lesiones gástricas. Revista Argentina de Microbiología. 49 (2), 153 -157.
25. Pérez, G. (2000) Accurate diagnosis of *H. pylori*: Culture, including transport. Gastroenterology clinics of North America, 29(4), 879-884.
26. Rautelin, H; Seppälä, K; Nuutinen, H; Kärkkäinen, P. (1997). Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies transported in biopsy urease test tubes. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 16(5), 380-383.
27. Regino, W. O. (2013). La importancia de cultivar *Helicobacter pylori*. Revista colombiana de Gastroenterología, 28(2), 87-92.
28. Regino, W. O., Trespalacios, A. A., & Otero, E. (2009). *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual. Un importante reto en gastroenterología. Revista Colombiana de Gastroenterología, 24(3), 279-292.

29. Rivas-Traverso, F., & Hernández, F. (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Revista Biomédica*, 11(3), 187-205.
30. Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.
31. Ruggiero, F. Salvatore, I. Praitano, M. (2012). Probiotics and *Helicobacter pylori* infection. *Medicina universitaria*, 14, 217-223.
32. Ruiz, A. Latarjet, M., & Liard, A. R. (2004). *Anatomía humana*. Ed. Médica Panamericana, 1339.
33. Sarem, M. & Corti, R (2015). Rol de las formas cocoides de *Helicobacter pylori* en la infección y la recrudescencia. *Gastroenterología y hepatología*, 39(1), 28-35.
34. Serrano, A., Candelaria-Hernández, M., De la Garza Salazar, J., & Herrera, L. A. (2009). *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. *Cancerología* 4, 193-204.
35. Trespalacios Rangel, A. A. (2011). Estudio de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos e implicaciones en las terapias de erradicación. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
36. Vesga, J. (2018). Detección y viabilidad de *Helicobacter pylori* en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización en la ciudad de Bogotá. Tesis doctoral. Bogotá, Colombia.

ANEXOS

ANEXO N° 1

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este formulario de Consentimiento Informado se dirige a pacientes que son atendidos en el servicio de gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández”, Zacamil, a los cuales se les invita a participar en la investigación “Aislamiento e identificación de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes del servicio de gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández” y su respuesta a la terapia antimicrobiana en el período de septiembre a diciembre de 2019”.

Investigadores principales:

- Br. Erika Daniela Cañas Vargas
- Br. Kevin Fernando Díaz Ortiz

Asesor de la investigación:

- MSc Mario Herbert Romero Rivera

Este documento de consentimiento informado consta de dos partes:

- Información sobre la investigación
- Formulario de consentimiento

INFORMACIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN

Introducción

A los investigadores principales antes mencionados, estudiantes de Licenciatura en Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador nos gustaría invitarle a participar en la investigación denominada “Aislamiento e identificación de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes del servicio de gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández” y su respuesta a la terapia antimicrobiana en el período de septiembre a diciembre de 2019”, la cual se está llevando a cabo como trabajo de graduación. Le informamos que usted puede realizar a cualquiera de los investigadores todas las preguntas que considere necesarias y si no entiende alguna de las palabras o conceptos presentados, puede hacerlo saber y se le explicará; además puede tomarse el tiempo que desee para decidir si quiere participar o no.

Propósito

El propósito de la investigación es aislar e identificar *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas y determinar su respuesta a la terapia antimicrobiana.

Tipo de intervención de investigación

La intervención será realizada por un médico gastroenterólogo, y consiste en la realización de endoscopía digestiva y toma de biopsia gástrica, la cual es una extracción de tejido del estómago para su análisis en busca de bacterias y otros microorganismos que puedan causar enfermedad o de signos de alguna enfermedad. Si elige participar, el médico gastroenterólogo tomará dos muestras adicionales (cuerpo y antro) de las que le han sido solicitadas al paciente por el gastroenterólogo y estas serán destruidas por completo para ser utilizadas únicamente en este estudio, los residuos biológicos obtenidos serán desechados siguiendo las Normas Internacionales de Protección al Medio Ambiente

Selección de participantes

Los participantes deben ser pacientes mayores de 18 años del servicio de gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández”, Zacamil, a los cuales el médico gastroenterólogo les haya indicado someterse a una toma de biopsia gástrica por presunta presencia de *Helicobacter pylori*.

Participación voluntaria

Usted tiene el derecho de decidir si participará o no en la investigación, de no participar, siempre le será realizado el procedimiento, pues ha sido solicitado por su médico gastroenterólogo, con la diferencia que no se tomarán las dos muestras adicionales para el estudio.

Procedimientos y protocolo

Ambos serán explicados por su médico responsable

Beneficios

Los participantes tendrán el beneficio de confirmar la presencia o ausencia de la bacteria en su organismo, además si hay presencia de la bacteria conocerán si esta es resistente o sensible al tratamiento antimicrobiano de primera línea propuesto por el Consenso Maastricht.

Confidencialidad

La información proporcionada por los participantes y los resultados de la investigación será expresada de forma anónima. En ningún momento los resultados serán publicados con nombre y apellido del participante, se mantendrá su privacidad.

Resultados

Los resultados serán de uso exclusivamente académico y publicado en el trabajo de graduación de los investigadores.

Derecho a negarse

Su participación es totalmente voluntaria, tiene derecho a negarse si no está de acuerdo con algún aspecto de la investigación.

Contactos

Erika Daniela Cañas Vargas 7049-7366

Kevin Fernando Díaz Ortiz 7451-9818

Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de El Salvador, que es un comité cuya tarea es asegurarse de que se proteja de daños a los participantes en la investigación.



CONSENTIMIENTO INFORMADO



Título de la investigación: “Aislamiento e identificación de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes del servicio de gastroenterología del Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández” y su respuesta a la terapia antimicrobiana en el período de septiembre a diciembre de 2019”

Objetivo de la investigación: Aislar e identificar *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas y determinar su respuesta a la terapia antimicrobiana.

Establecimiento de Salud: Hospital Nacional “Dr. Juan José Fernández”, Zacamil

Área: Gastroenterología

Nombre del participante: _____

Firma o huella dactilar del participante: _____

Fecha (Día/mes/año): _____

Nº de registro: _____

Edad: _____

Lugar de procedencia: _____

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación.

Nombre del investigador: _____

Firma o huella dactilar del investigador: _____

Fecha (Día/mes/año): _____

He leído con precisión la hoja de información al participante potencial y, en la medida de mis posibilidades, me aseguré de que el participante entienda que se hará lo siguiente:

1. Endoscopía digestiva y toma de biopsia gástrica, ambos realizados por un médico gastroenterólogo.
2. Toma de dos muestras (cuerpo y antro) adicionales a las solicitadas por el médico, las cuales serán tomadas por un médico gastroenterólogo.
3. Utilización de las muestras completas únicamente en este trabajo de investigación
4. Desecho de los residuos biológicos obtenidos siguiendo las Normas Internacionales de Protección al Medio Ambiente

Confirmando que he tenido la oportunidad de hacer preguntas sobre el estudio y todas las preguntas hechas han sido contestadas correctamente y en lo mejor de mi capacidad. Confirmando que no he sido obligado a dar mi consentimiento y el consentimiento ha sido dado libre y voluntariamente. Se me ha proporcionado una copia de este formulario de consentimiento informado.

ANEXO N° 2



Introducir la muestra recibida en un criovial que contenga 0.5 mL de Caldo Urea Base.



Colocar el criovial en una hielera y asegurarse de mantener la temperatura alrededor de 4°C.

Figura N° 9. Obtención y transporte de la muestra

ANEXO N° 3



Macerar la muestra mecánicamente y en sentido horario, haciendo uso de mortero y pistilo estériles.



Remojar un hisopo estéril en el macerado.



Sembrar el macerado por hisopado en una placa de medio Agar Columbia suplementado con 7% de sangre desfibrinada de cordero y suplemento DENT.

Figura N° 10. Preparación y siembra de la muestra.

ANEXO N° 4

TRANSPORTE E INCUBACION DE LAS MUESTRAS



Colocar las placas (un máximo de 4 placas) en un desecador limpio y seco.



Introducir en el desecador un beaker con 3 tabletas de Alka Seltzer® y 10 mL de agua (para generar un ambiente microaerofílico).



Tapar inmediatamente el desecador y sellar con papel parafilm.

Figura N° 11. Transporte de placas de cultivo a incubadora de CO₂.



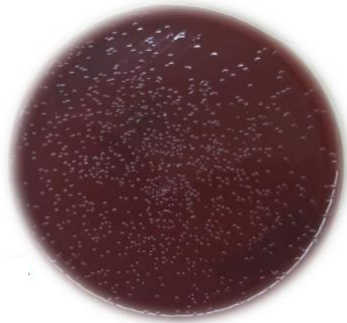
Incubar la placa cultivada en una atmosfera con CO₂ y temperatura de 35 ± 2 °C



Observar los cultivos después de 5 días, si el crecimiento es negativo, reincubar 5 días más, si vuelve a dar negativo reportar el resultado como negativo.

Figura N° 12. Incubación de las muestras y observación de los cultivos.

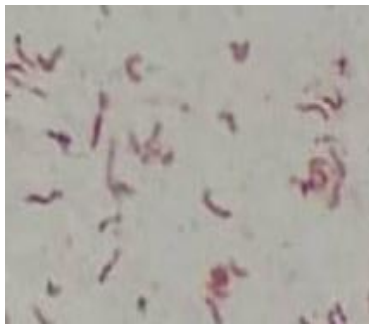
ANEXO Nº 5



Observar las colonias y verificar si cumplen las siguientes características; colonias puntiformes, brillantes y transparentes.



Seleccionar una colonia aislada que cumpla con las características antes mencionadas y realizar la tinción al Gram.



Confirmar si posee las características de un bacilo curvo Gram negativo.



Observar en un microscopio óptico con el objetivo 100x (con aceite de inmersión).

Figura Nº 13. Caracterización macroscópica y microscópica.

ANEXO N° 6



Tomar con un asa bacteriológica de dos a tres colonias.



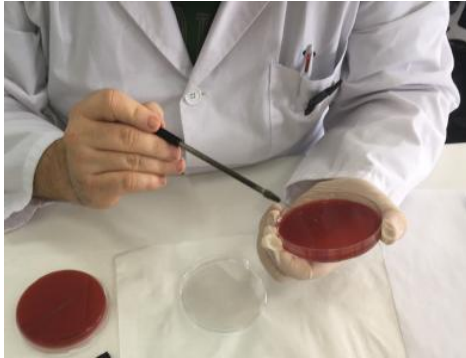
Introducir las colonias en un criovial que contenga caldo urea base.



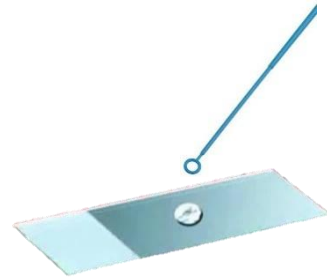
Observar, un viraje de color de amarillo a rosado fucsia en un lapso de 5 minutos a una hora indica prueba positiva.

Figura N° 14. Prueba de ureasa.

ANEXO N° 7



Tomar con un asa bacteriológica de dos a tres colonias.



Colocarlas las colonias sobre los discos de sensibilidad de oxidasa.



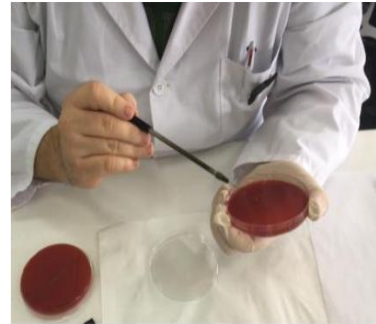
Observar, si hay un viraje de color de blanco a violeta indica prueba positiva, si no hay cambio se reporta como prueba negativa.

Figura N° 15. Prueba de oxidasa.

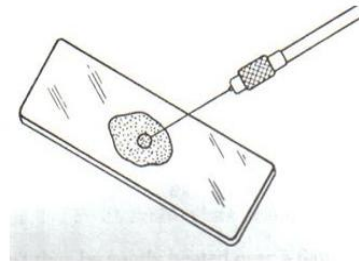
ANEXO N° 8



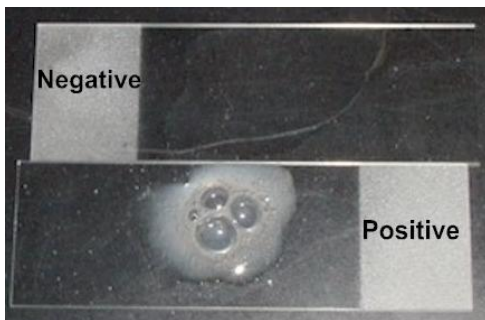
Colocar en un portaobjeto una gota de Peróxido de hidrógeno al 30%.



Tomar con un asa bacteriológica de dos a tres colonias sospechosas.



Suspender un inculo denso sobre el reactivo.



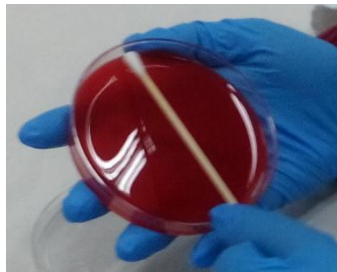
Observar, si hay formación de burbujas o efervescencia indica prueba positiva.

Figura N° 16. Prueba de catalasa.

ANEXO N° 9



Tomar con un hisopo estéril una colonia aislada de los cultivos de las muestras que hayan sido positivas para las pruebas bioquímicas y correspondan a la morfología de *Helicobacter pylori*.



Sembrar la colonia aislada en placas con medio Agar Columbia suplementado con sangre al 7% por el método de hisopado.

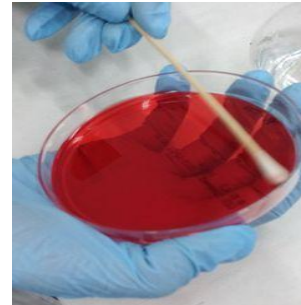


Incubar las placas en una atmosfera de CO₂ y temperatura de 35 ± 2°C por un tiempo 48 a 72 horas.

Figura N° 17. Sub-cultivo del microorganismo.

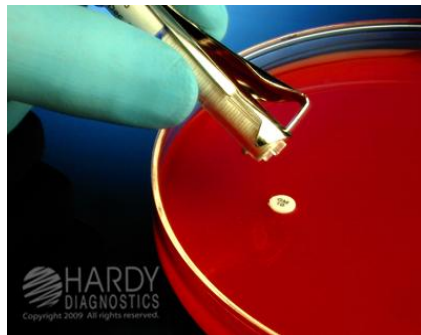
ANEXO N° 10

RESPUESTA A LA TERAPIA ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE KIRBY
BAUER



Seleccionar del sub-cultivo del microorganismo una colonia aislada y tomarla con un hisopo estéril.

Sembrar la colonia por hisopado en placas de Agar Mueller-Hinton suplementado con 7% de sangre de cordero desfibrinada.



Colocar con una pinza estéril los discos de antibióticos de prueba.

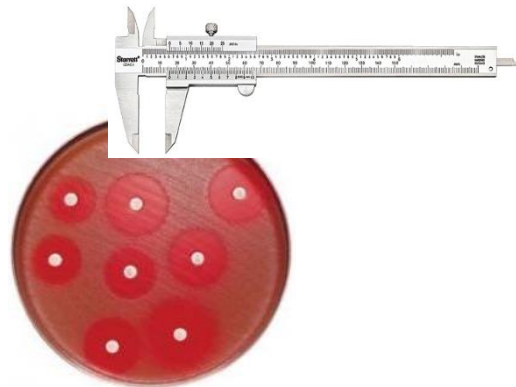


Incubar las placas en una atmosfera de CO_2 y temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por un tiempo 48 a 72 horas.

Figura N° 18. Antibiograma.



Retirar las placas de la incubadora.



Medir los halos producidos (si los hay) con un pie de rey y anotar los resultados, considerando lo establecido en la Tabla N°. 1

Figura N° 19. Lectura de halos producidos

ANEXO N° 11



Recolectar el cultivo con un asa bacteriológica



Colocar en un criovial que contiene caldo infusión cerebro corazón y glicerol al 20%.



Rotular e identificar cada criovial y Almacenar en un ultra congelador a - 80°C.

Figura N° 20. Conservación de la cepa

ANEXO Nº 12

MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Extracción y purificación del ADN.

Equipo:

- Microcentrifuga
- Baño de maría
- Vortex mixer
- Micropipetas (50 μ l - 200 μ l, 100 μ l - 1000 μ l)
- Kit de extracción NucleoSpin® Tissue

Materiales:

- Tubos de microcentrifuga
- Tubos colectores
- Puntas para micropipetas estériles

Componentes del kit de extracción del ADN NucleoSpin® Tissue

Componente	Volumen
Buffer de Lisis T1	180 μ L
Buffer de Lisis B3	200 μ L
Buffer de lavado BW	500 μ L
Buffer de lavado B5	600 μ L
Buffer de elución BE	60 μ L
Proteinasa K liofilizada	25 μ L
Buffer Proteinasa PB	1.35 mL
Columnas de tubos y tubos Nucleospin	-
Tubos colectores de 2 mL	-

Electroforesis en gel de agarosa

Equipo

- Cámara horizontal de electroforesis con los accesorios correspondientes (molde para hacer el gel, peine, cables para conectar a la fuente de alimentación)
- Fuente de alimentación
- Transiluminador (fuente de luz ultravioleta)
- Equipo fotográfico que permita tomar fotos del gel

Material

- Micropipetas.
- Puntas para micropipeta.
- Tubos tipo eppendorf
- Un matraz, probetas y vasos de precipitados para la preparación de soluciones.
- Espátulas.

Reactivos

- Agarosa (CAS N° 9012-36-6)
- Gel Red
- Buffer TBE (Tris-Borato EDTA)
- Buffer de corrida 1x
- Buffer de carga 6x

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ARN 16s.

Equipo

- Termociclador techne prime®
- Vortex mixer

Materiales

- Micropipetas.
- Puntas para micropipeta. (50 μ l - 200 μ l, 100 μ l - 1000 μ l)
- Tubos tipo eppendorf para PCR

Reactivos

- Dexocinucleotidos (dNTPs) de 10 mM
- Cloruro de magnesio de 50 mM
- Oligonucleotido Forward de 25 pmol
- Oligonucleotido Reverse de 25 pmol
- Taq polimerasa de 5 U/ μ L
- Buffer 10x
- Agua libre de nucleasas

.

ANEXO N° 13



Sacar los crioviales del ultra congelador y llevarlos a temperatura ambiente.

Sembrar una placa de Agar Columbia suplementado con sangre de cordero desfibrinada al 7%.

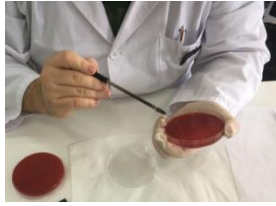


Incubar las placas en una atmosfera con 10% CO₂ y temperatura de 35 ± 2°C por un tiempo de 3 a 5 días.

Figura N° 21. Reanimación de la cepa.

ANEXO N° 14

EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ADN



Recolectar con un asa bacteriológica todo el crecimiento del cultivo obtenido y colocarlo en un tubo Eppendorf



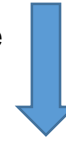
Agregar 180 μL de T1



Agregar 25 μL de solución de Proteinasa K, vortear.

Incubar en baño de maría a 56 °C por 1 hora. Vortear

Agregar 200 μL de Buffer B3.



Incubar en baño de maría a 70°C por 10 minutos



Agregar 210 μL de etanol grado molecular (absoluto 96-100%)
Homogenizar en vortex

Figura N° 22. Extracción y purificación del ADN.

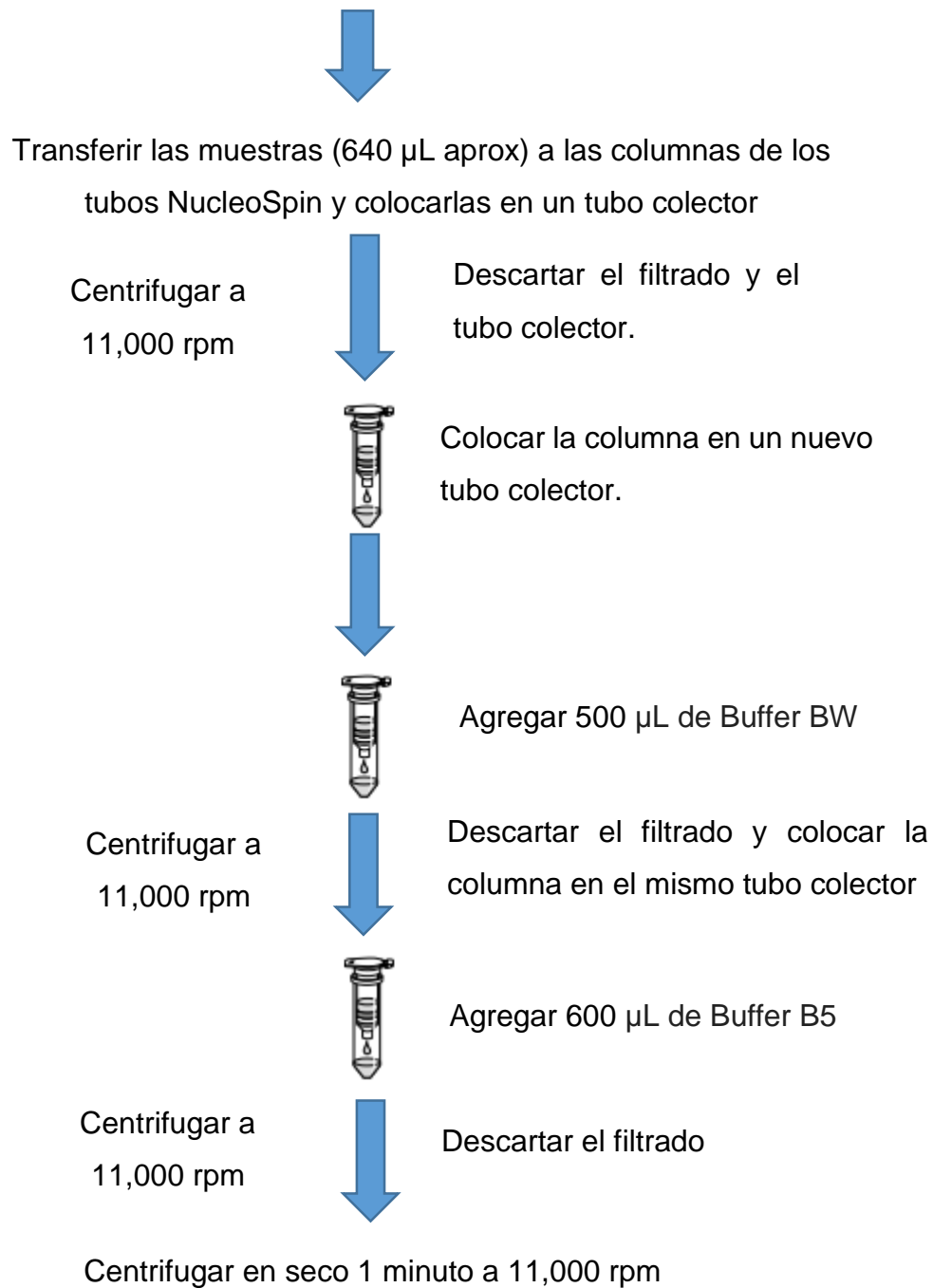


Figura N° 22. Extracción y purificación del ADN.

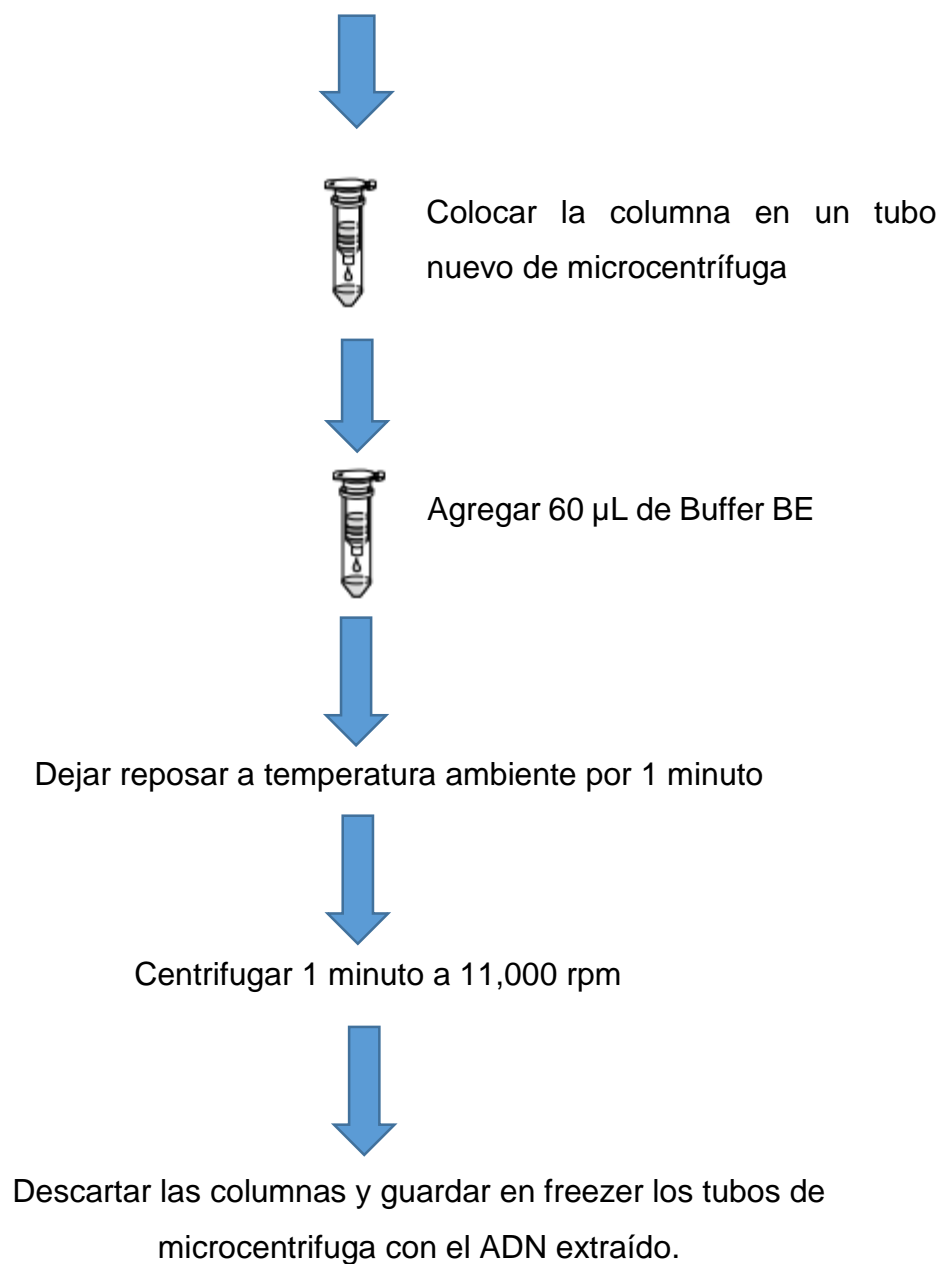


Figura N° 22. Extracción y purificación del ADN.

ANEXO N° 15



Pesar 1 g de agarosa (para un volumen de 50 mL y una concentración de 2%).

Colocar la agarosa pesada en un Erlenmeyer de 250 mL y agregar 50 mL de Buffer de corrida 1x Tris-Borato-EDTA (TBE).

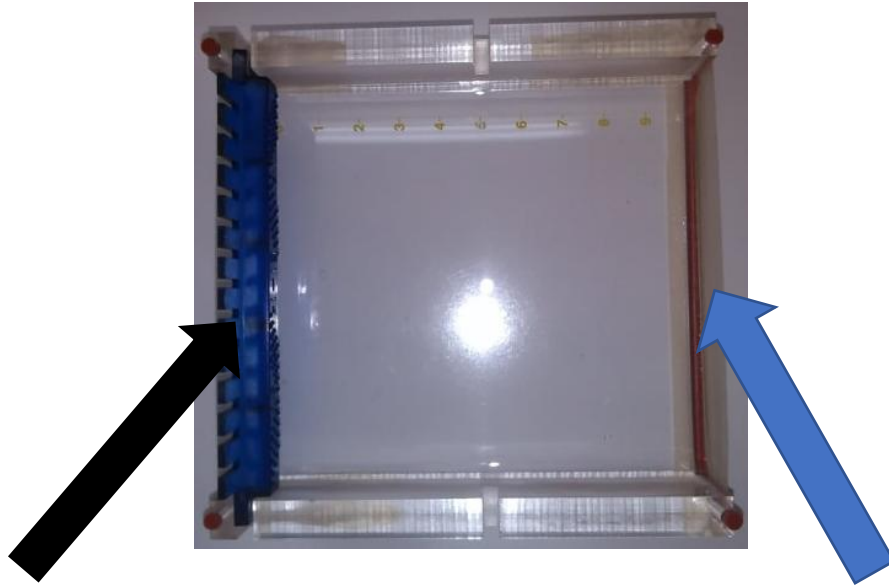


Fundir la agarosa en microondas por 3 lapsos de 30 segundos evitando el hervor del gel.

Dejar enfriar el gel hasta que sea tolerable al tacto.

Figura N° 23. Preparación del gel de agarosa

ANEXO N° 16

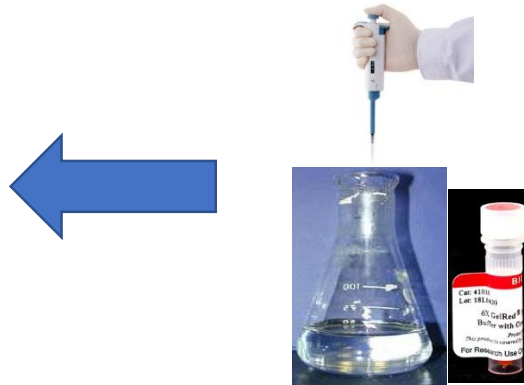


Colocar el peine en la parte superior de la cuna del gel para formar los pocillos.

Sellar los bordes con cinta en los extremos abiertos dejando que sobresalga 0.5 cm de cinta para luego retirarlo con facilidad.



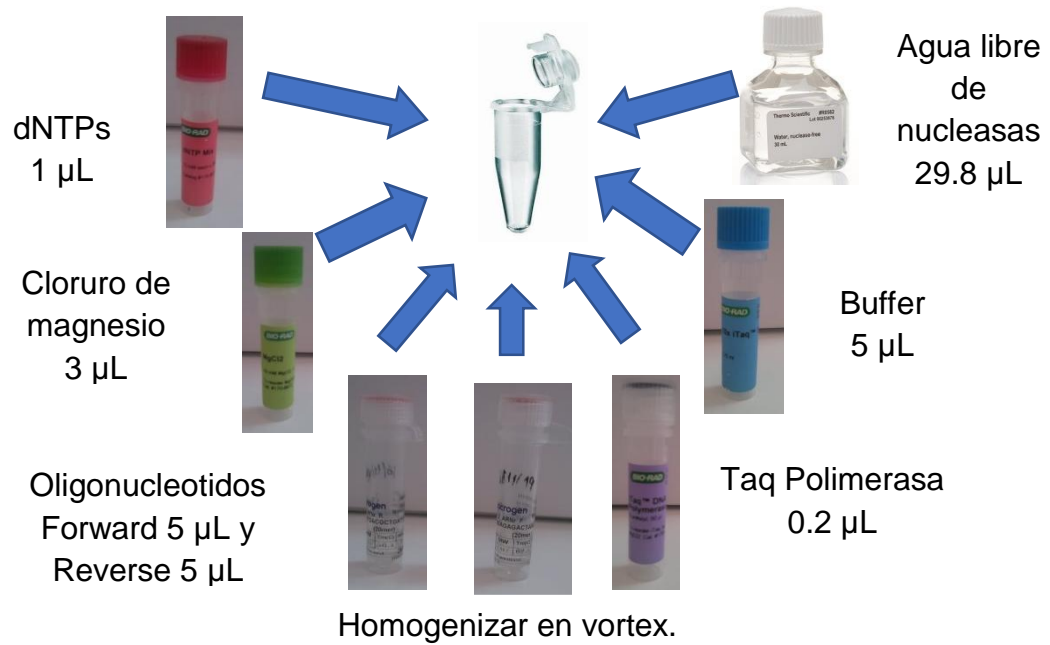
Verter el gel de agarosa fundido dentro de la cuna del gel y dejar enfriar al menos 30 minutos.



Agregar 4 μL de Gel Red en la agarosa fundida y agitar suavemente.

Figura N° 24. Preparación de la cuna del gel.

ANEXO N° 17



Agregar en un tubo de microcentrifuga los componentes de la tabla N° 2 en ese orden.

Figura N° 25. Preparación del master mix

ANEXO Nº 18



- Mezclar el mix previamente preparado con 1 μL de ADN bacteriano de las cepas positivas.
- Preparar un control negativo con agua libre de nucleasas, mezclar el mix con 1 μL de agua libre de nucleasas.
- Preparar muestras utilizando ADN bacteriano extraído y purificado de dos microorganismos diferentes a *Helicobacter pylori* obtenidos en los cultivos, mezclar el mix con 1 μL de ADN.



- Homogenizar en vortex.

Figura Nº 26. Preparación de las muestras.

ANEXO Nº 19



Colocar los tubos con las muestras y los controles negativos en el termociclador.



Programar el termociclador en las condiciones de temperatura y tiempos detalladas en la Tabla Nº 3.

Figura Nº 27. Realización de los ciclos de la PCR ARNr 16s.

ANEXO N° 20



Colocar 10 μL del ADN del segmento 16 s amplificados en un nuevo tubo de microcentrifuga.



Colocar 2 μL de Buffer de carga 6x y homogenizar en vortex.



Colocar 7 μL del marcador de peso molecular en un nuevo tubo de microcentrifuga.



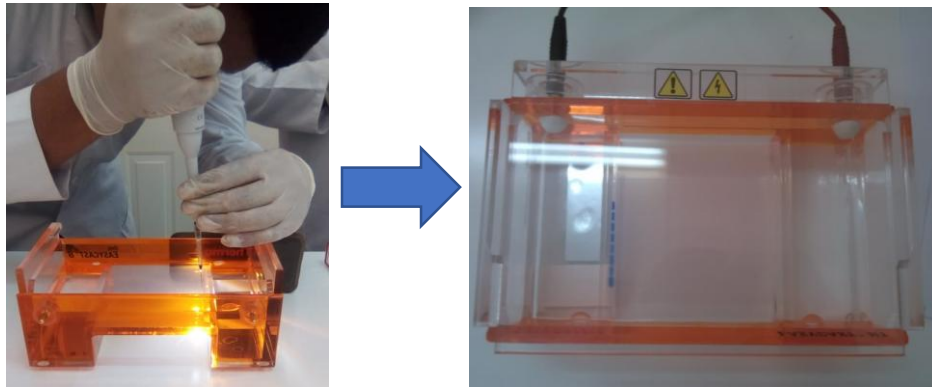
Colocar 2 μL de Buffer de carga 6x y homogenizar en vortex.

Figura N° 28. Preparación de muestras para la electroforesis en gel.

ANEXO N° 21



- Colocar la cuna del gel que previamente habíamos dejado solidificando en la cuba de electroforesis.
- Llenar la cuba de electroforesis con el Buffer de corrida 1x.
- Retirar cuidadosamente el peine para que los pocillos queden libres.



- Cargar los pocillos, en el primer pocillo colocar 9 μL del marcador de peso molecular.
- Cargar los demás pocillos con 12 μL de las muestras.
- Colocar la tapa de la cuba de electroforesis controlando que los bordes negativo y positivo coincidan (rojo/rojo y negro/negro).
- Colocar los cables a la fuente de alimentación.
- Activar la corrida bajo las siguientes condiciones; 100 voltios, 500 mili – Amperios y 45 minutos.

Figura N° 29. Carga de las muestras y corrida del gel.

ANEXO N° 22



- Sacar el gel de la cámara y llevar al transiluminador.
- Encender la lámpara ultravioleta e identificar las bandas.
- Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible para posterior análisis de resultados.

Figura N° 30. Visualización de las bandas.

ANEXO N° 23



Figura N° 31. Equipo, endoscopio y pinzas Olympus® utilizadas por el médico gastroenterólogo para la realización de endoscopia digestiva y toma de muestras.

ANEXO N° 24



Figura N° 32. Realización de endoscopia digestiva y toma de muestras.

ANEXO N° 25



Figura N° 33. Termociclador Techne prime® (1) y Transiluminador UVP® (2)

ANEXO N° 26

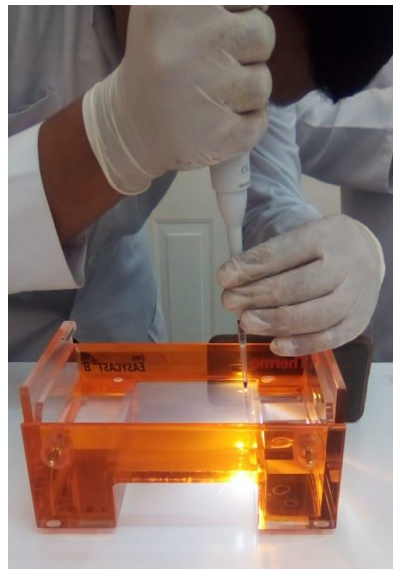


Figura N° 34. Estudiantes investigadores realizando actividades de biología molecular

ANEXO N°27

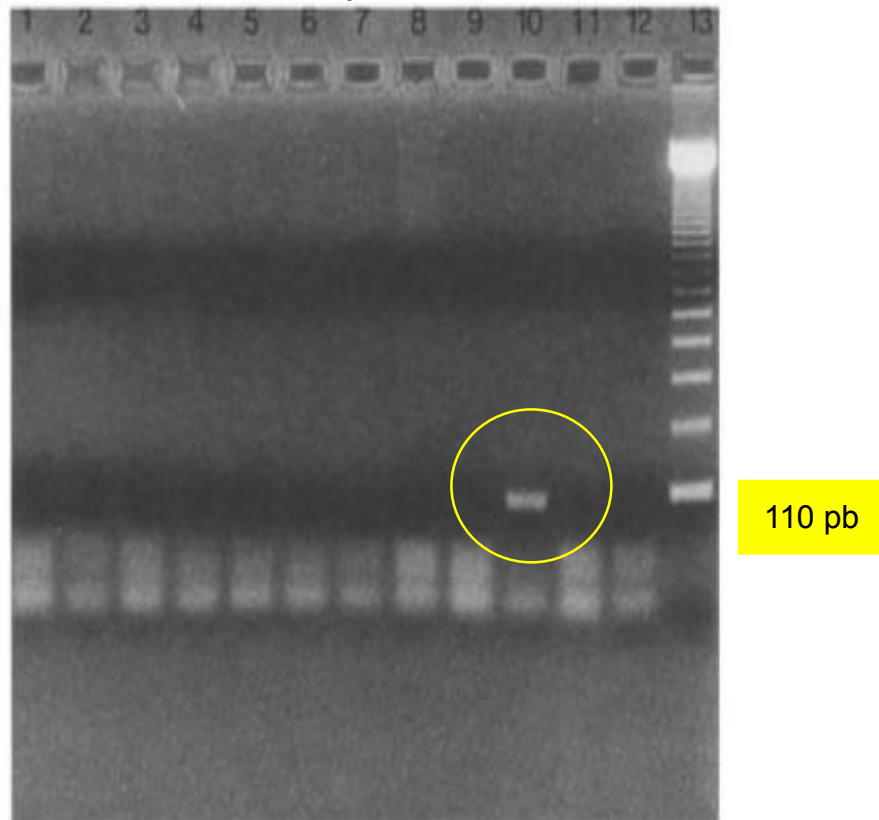


Fig. 1. A 2% agarose electrophoresis gel stained with ethidium bromide demonstrating the specificity of *H. pylori* detection obtained by PCR using primers Hp1 : Hp2. Lane 1, *H. mustelae* (F1); 2, "*C. cinaedi*"; 3, *C. fetus* subsp. *fetus*; 4, *C. laridis*; 5, *C. jejuni*; 6, *H. mustelae* (F8); 7, *C. coli*; 8, *C. sputorum* subsp. *sputorum*; 9, *E. coli*; 10, *H. pylori*; 11, *W. succinogenes*; 12, negative control; 13, 123-bp DNA ladder

Figura N° 35. Banda característica de 110 pb. Evidencia del gen ARN 16S

ANEXO N° 28

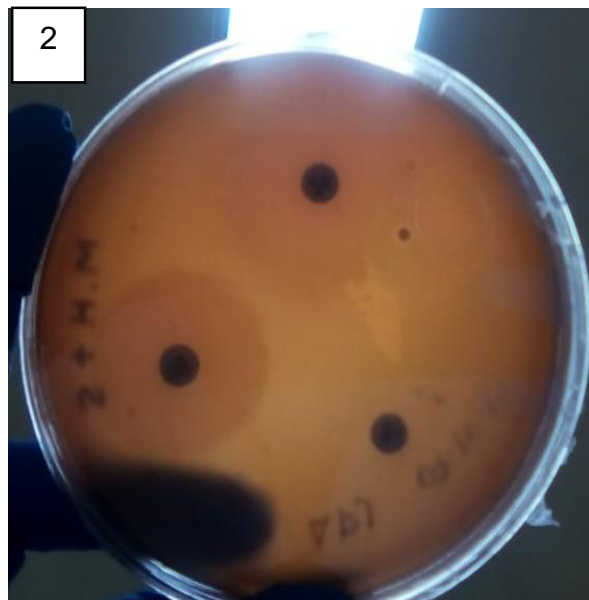


Figura N° 36. Antibiogramas de cepa 1 (1) y cepa 2 (2)

ANEXO N° 29

Cuadro N° 5. Resultados de histopatología de los pacientes involucrados en el estudio

Número de paciente	Resultado de histopatología	Resultado de cultivo
1	Positivo	Negativo
2	Positivo	Negativo
3	Positivo	Negativo
4	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo
6	Positivo	Negativo
7	Positivo	Negativo
8	Positivo	Negativo
9	Negativo	Negativo
10	Negativo	Positivo
11	Positivo	Negativo
12	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo
14	Positivo	Negativo
15	Negativo	Negativo
16	Positivo	Negativo
17	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo

Cuadro N° 5 (continuación)

21	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo
25	Positivo	Negativo
26	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo
28	Positivo	Negativo
29	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo
31	Positivo	Negativo
32	Positivo	Negativo
33	Negativo	Negativo
34	Positivo	Negativo
35	Positivo	Negativo
36	Positivo	Negativo
37	Positivo	Negativo
38	Positivo	Negativo
39	Positivo	Negativo
40	Positivo	Negativo
41	Positivo	Negativo
42	Negativo	Negativo

Cuadro N° 5 (continuación)

43	Positivo	Positivo
44	Positivo	Negativo
45	Positivo	Negativo
46	Negativo	Negativo
47	Positivo	Negativo
48	Positivo	Negativo
49	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo

ANEXO N° 30

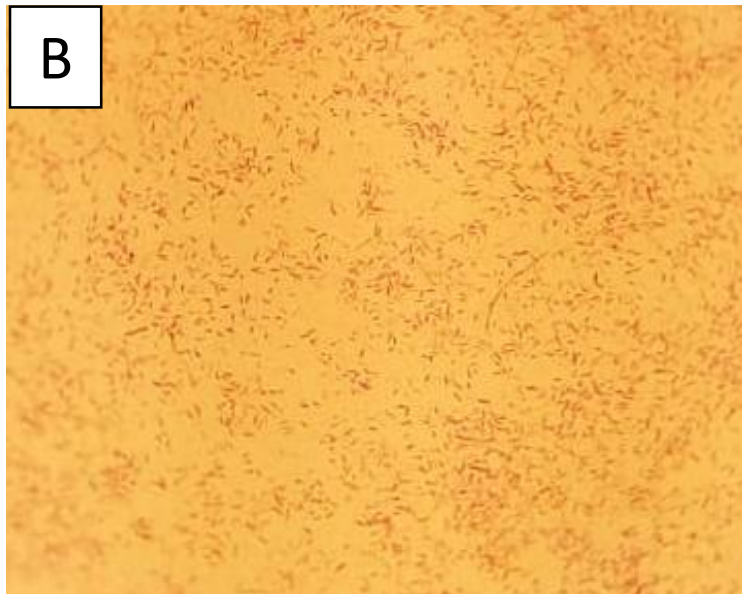
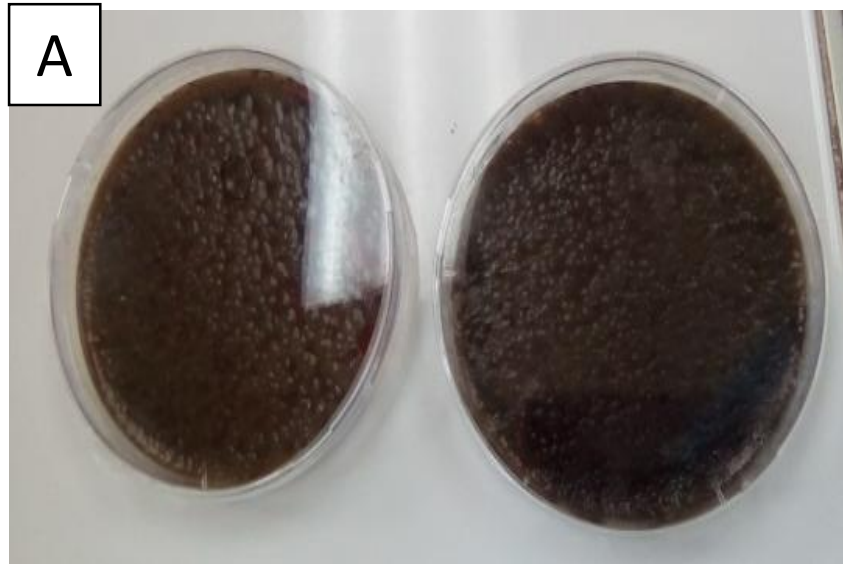


Figura N° 37. Placas de cultivo de muestra 5-A y 5-C, morfología macroscópica (A), morfología microscópica (B)

ANEXO N° 31

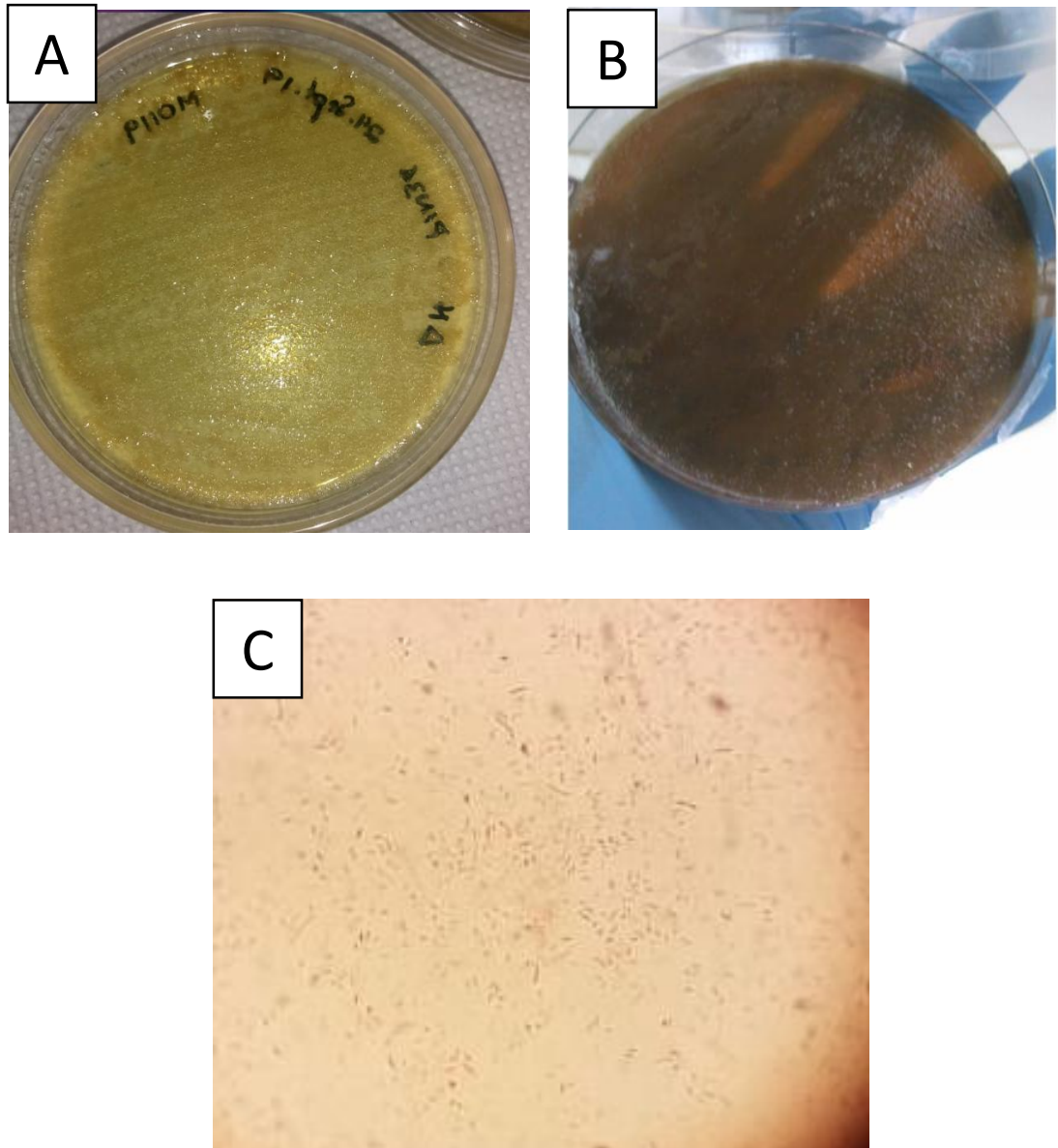


Figura N° 38. Placas de cultivo de muestra de pinza para toma de biopsias en agar nutritivo (A) y agar Columbia con 7% de sangre de cordero y suplemento DENT (B), morfología microscópica (C)

ANEXO N° 32



Figura N° 39. Mortero y pistilo utilizados en el procesamiento de las muestras.

ANEXO N° 33

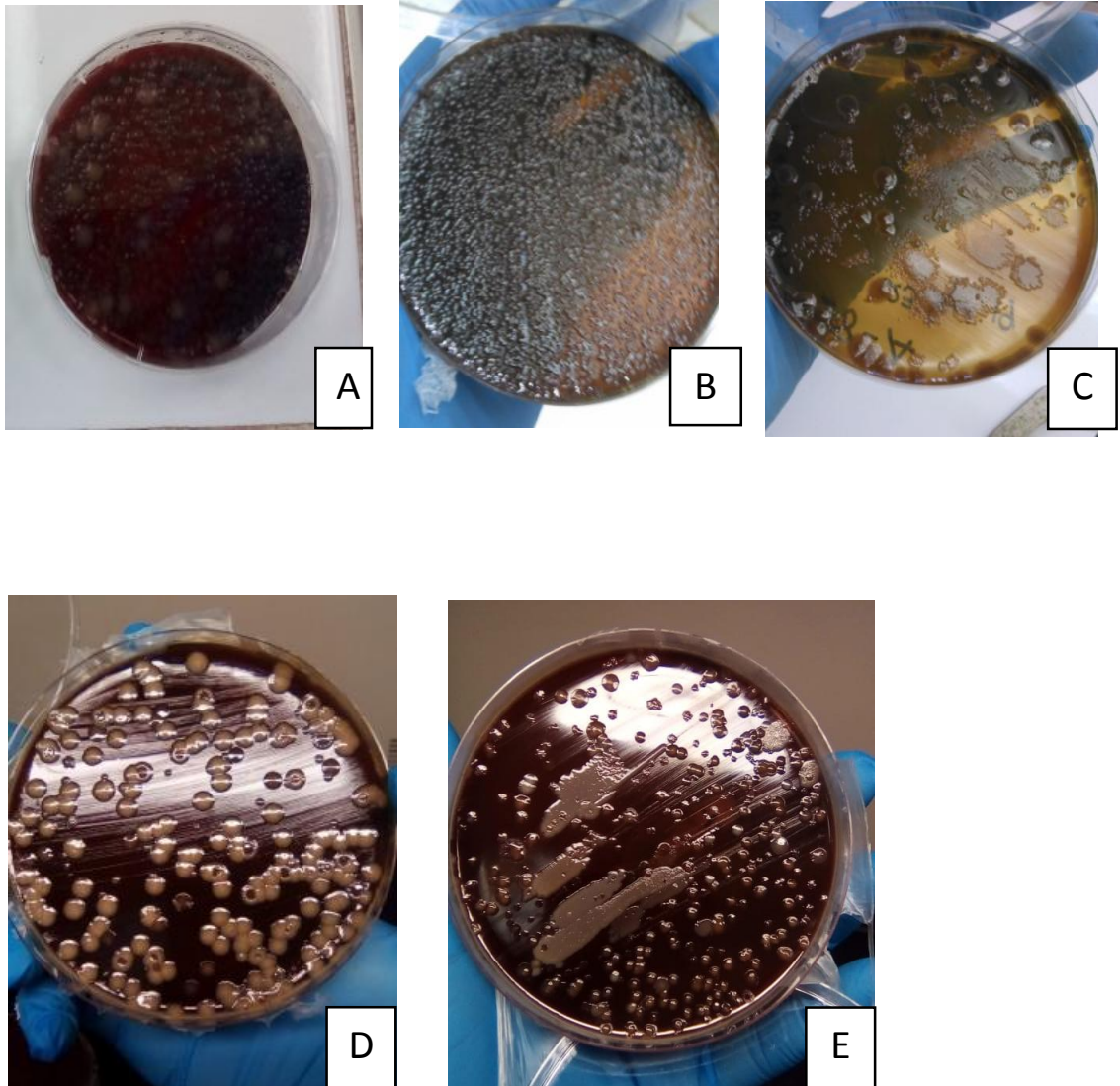


Figura N° 40. Placas de cultivo de muestra 3-C (A); 12-A (B); 28-A (C); 33-C (D) y 44-A (E) donde se evidencia el crecimiento de microorganismos no compatibles con *Helicobacter pylori*.

ANEXO N° 34

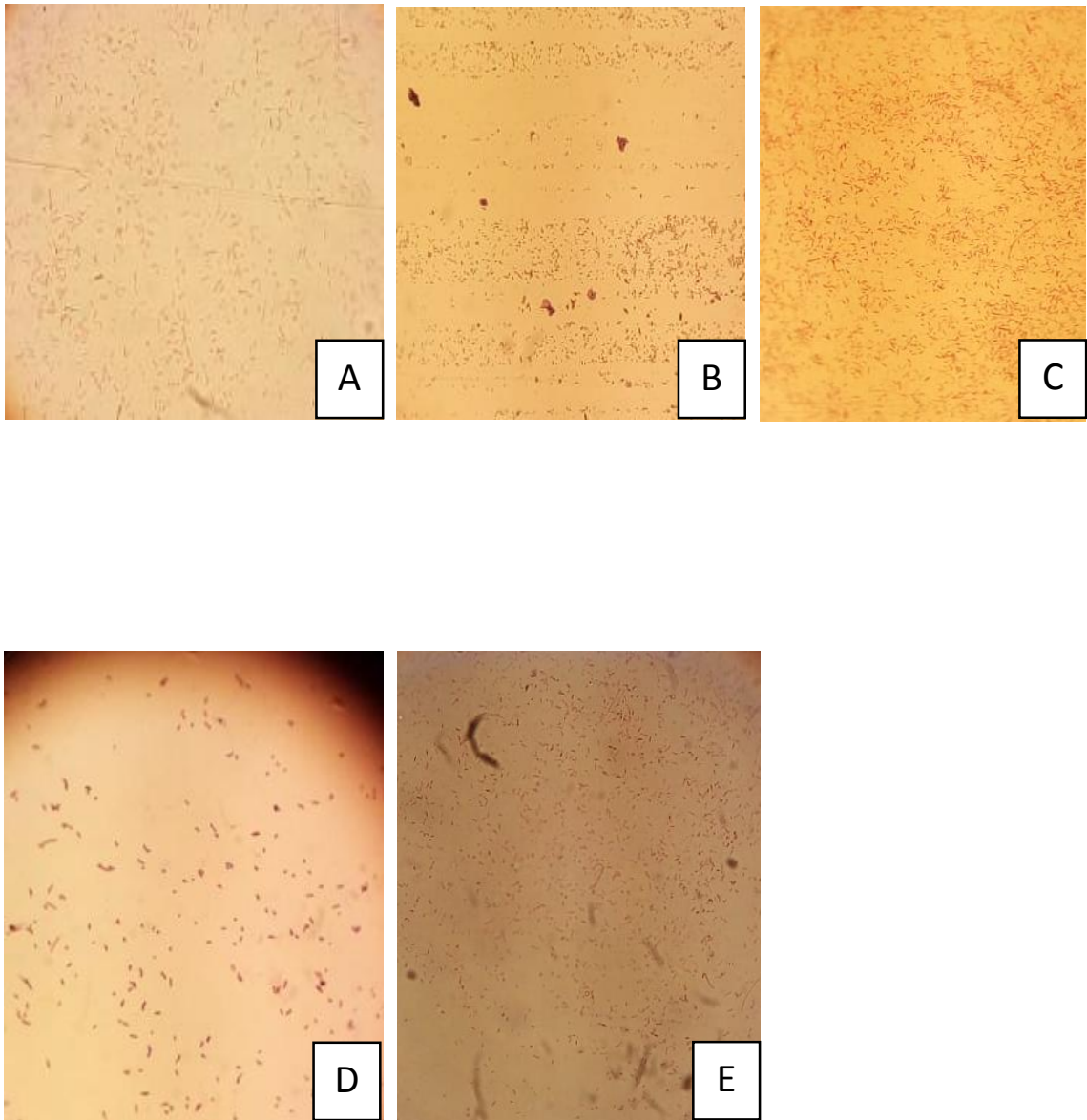


Figura N° 41. Morfología microscópica de muestras 3-C (A); 12-A (B); 28-A (C); 33-C (D) y 44-A (E), todos corresponden a Bacilos Gram negativos.

ANEXO N° 35



Figura N° 42. Caracterización de posible Lactobacilo: Crecimiento en medio MRS (A), bacilos Gram positivos (B), oxidasa y catalasa negativas (C).