

ESTRATEGIAS DE CULTIVO DE *Helicobacter pylori* EN AGUAS RESIDUALES



**Stephanie Bernal López
Tatiana Carolina Cadavid Hincapié**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar por el título de**

Bacteriólogo(a)

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C
2013**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo de grado a Dios, a nuestras familias y a todo el equipo de laboratorio quienes se han hecho parte de este proyecto de formación académica, brindándonos su ayuda y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Pontificia Universidad Javeriana, por ser parte de nuestra formación académica, ética y moral permitiéndonos así formarnos como mejores personas y profesionales.

A la Dra. Alba Alicia Trespalacios y Dra. Azucena Arévalo por darnos la oportunidad de ser parte de este proyecto, aportándonos sus conocimientos y experiencia que conllevaron a la realización de este.

También le agradecemos a nuestros compañeros de laboratorio de Bacteriología Especial de la Pontificia Universidad Javeriana, que incondicionalmente nos brindaron su ayuda.

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar estrategias de cultivo adecuado para la recuperación de *Helicobacter pylori* a partir de aguas residuales

MATERIALES Y METODOS: Muestras de aguas residuales fueron obtenidas del río Arzobispo de Bogotá; con el fin de evaluar dos estrategias de cultivo, reportadas en la literatura para la recuperación de *H. pylori* en aguas, para ello, la muestra fue concentrada mediante filtración y posteriormente fue resuspendida en PBS, seguido de cultivo líquido y sólido. Adicionalmente se realizó PCR para detectar genes de virulencia de *H. pylori* con el fin de confirmar su presencia en la muestra de agua residual.

RESULTADOS: El ensayo de cultivo realizado con aguas residuales del río Arzobispo no tuvo resultados exitosos ya que no se pudo recuperar *H. pylori* a partir de estas, observándose pruebas bioquímicas y coloración de Gram no correspondientes para la bacteria. Mediante la técnica PCR se demostró la presencia de genes *vacAm1* y *ureA* de *Helicobacter pylori*.

CONCLUSIONES: La recuperación de *H. pylori* a partir de aguas residuales no fue posible mediante las estrategias de cultivo evaluadas debido a que las condiciones ambientales en que se encuentra dicho microorganismo contribuyen al cambio cocoidal, dificultando su recuperación en medio de cultivo. Sin embargo se pudo determinar su presencia en agua residual por técnica de PCR.

PALABRAS CLAVES: *Helicobacter pylori*, formas cocoides, aguas residuales.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	8
2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3. MARCO TEORICO	11
3.1 MORFOLOGIA DE <i>Helicobacter pylori</i>	11
3.2 TRANSMISION Y SUPERVIVENCIA DE <i>Helicobacter pylori</i>	11
3.3 FORMA COCOIDE Y BIOPELICULAS DE <i>Helicobacter pylori</i>	11
3.4 VIABILIDAD Y VIRULENCIA DE <i>Helicobacter pylori</i> EN ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE	12
3.5 FORMAS COCOIDES Y METABOLISMO DE <i>Helicobacter pylori</i>	12
3.6 CRECIMIENTO EN CULTIVOS DE <i>Helicobacter pylori</i>	13
3.7 FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Helicobacter pylori</i>	13
4. OBJETIVOS	14
4.1 OBJETIVO GENERAL	14
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
5. METODOLOGIA	15
5.1 ESTRATEGIAS DE CULTIVO	15
5.1.1 MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO	15
5.1.2 COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO	15
5.1.3 CONDICIONES DE CULTIVO Y MICROAEROFILIA	16
5.1.4 MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO	16
5.2 ENSAYO DE CULTIVO EN AGUAS RESIDUALES DE RIO ARZOBISPO	16
5.2.1 ESTANDARIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO	16
5.2.2 ENSAYO DE CULTIVO EN AGUAS RESIDUALES DEL RIO ARZOBISPO	17
5.3 AMPLIFICACIÓN DE GENES <i>cagA, vacA, ureA,</i>	17
5.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA	17
5.3.2 AMPLICACIÓN DE LOS GENES <i>cagA, vacA, urea</i>	17
6. RESULTADOS	19
7. DISCUSION	25
8. CONCLUSIONES	25
9. RECOMENDACIONES	26
BIBLIOGRAFIA	27

1. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es actualmente reconocido como agente etiológico principal de la gastritis en humanos, capaz de colonizar la mucosa gástrica y causar gastritis crónica, úlceras gástricas, duodenales, pépticas y cáncer gástrico (1) (11). La infección por *H.pylori* se presenta en todo el mundo, pero su prevalencia varía con respecto al área geográfica, presentándose desde 20-50% en países industrializados, hasta un 80% en países subdesarrollados. El microorganismo se puede adquirir durante la infancia o en cualquier etapa de la vida por vía oral-oral, oral-fecal además se ha reportado una fuerte asociación entre la prevalencia de *H pylori* y las fuentes de aguas, permaneciendo por largo tiempo y en ocasiones con ausencia de síntomas (2) (22). El curso y la evolución clínica de la infección por *H.pylori* están determinados por una interacción compleja entre la influencia del ambiente, las características genéticas e inmunes del huésped y los factores de virulencia del microorganismo (9)

Durante la infección, la mayoría de las bacterias están presentes en formas espiral Gram negativa en la mucosa gástrica, sin embargo, por envejecimiento o en condiciones desfavorables como modificación de pH, tensión de oxígeno, temperatura, exposición a antibiótico y ausencia de nutrientes, *H. pylori* da lugar a un cambio morfológico de forma bacilar a formas cocoides, las cuales pueden ser viables y posiblemente infecciosas (6). Se ha postulado que las formas cocoides son una etapa latente de *H. pylori* que desempeñan un papel importante de supervivencia de la bacteria en un medio hostil (12), en donde la mayor persistencia de estas formas ha sido informada en aguas debido a la carencia de nutrientes y exposición a oxígeno. El hecho de que *H. pylori* puede convertirse en formas cocoides ha sido ampliamente informado y ha estimulado algunas hipótesis sobre la importancia de esta conversión (12) donde se ha encontrado que *H. Pylori* tiene una cantidad razonable de ATP, una cadena respiratoria activa y diversas proteínas como (VacA, CagA) y actividad ureasa en las formas cocoides lo que sugiere su viabilidad (6).

Dado que *H. pylori* se ha recuperado muy rara vez de fuentes que no sean el estómago humano, debido a que la acidez de la secreción gástrica es esencial en el establecimiento de la colonización del estómago por *H. pylori* en donde una breve exposición a pH bajo, aumenta la expresión de proteína de choque térmico que mejora la fijación de la bacteria al epitelio gástrico(15), se acepta que un ambiente fuera del epitelio gástrico es desfavorable para la bacteria y por lo tanto estimula su conversión a formas cocoides no cultivables que juegan un papel crucial en la transmisión y en la recaída de la infección (6).

Debido a que las formas cocoides de *H. pylori* han demostrado ser de difícil recuperación por métodos de cultivo convencionales utilizados en el laboratorio, varios estudios se han centrado en desarrollar métodos para mejorar las

condiciones de dichos medios a fin de lograr la reversión de la forma cocoide a forma bacilar (14)(16), lo cual no sucede con facilidad. Dichos métodos se basan en simular un ambiente semejante al gástrico en donde la bacteria puede retornar a forma espiral y de esta manera lograr su recuperación.

Debido a que no existen métodos de cultivo establecidos para la detección de *H pylori* viable en el medio ambiente algunos estudios han logrado revertir la bacteria a forma bacilar pero los resultados no han tenido gran impacto debido a su bajo porcentaje de recuperación, lo que sugiere que las formas cocoides juegan un papel importante en resistencia a condiciones desfavorables e infección.

Por el contrario las técnicas moleculares como PCR han demostrado la presencia de *H pylori* en aguas especialmente en sistemas con biopelículas, lo que demuestra la presencia de este en agua, pero el aislamiento de DNA no proporciona ninguna indicación de viabilidad de la bacteria (8).

Teniendo en cuenta que el agua es uno de los posibles medios de transmisión de *H pylori* la mayoría de estudios se han centrado en tratar de revertir la forma cocoide a bacilar de la bacteria a partir de dicha fuente, utilizando medios selectivos o haciendo diversas modificaciones a los medios de cultivo utilizados, encontrándose con resultados no alentadores ya que la recuperación ha sido mínima o nula en donde además de el cambio morfológico sufrido por la bacteria, el tiempo de exposición a condiciones desfavorables parece jugar un papel crucial a la hora de su recuperación. Por ello este estudio experimental evaluará estrategias de cultivo para revertir las formas cocoides de *H. pylori* a forma bacilar espiral a partir de muestras de aguas residuales del río arzobispo en Bogotá, para lo cual utilizamos medios de cultivo líquido y sólido bajo condiciones adecuadas de microaerofilia a fin de garantizar la optimización del crecimiento y técnica PCR para confirmar la presencia de la bacteria en aguas.

2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Helicobacter pylori es actualmente uno de los patógenos humanos de mayor importancia debido a la gran incertidumbre existente acerca de su transmisión ambiental y la dificultad de su detección en fuentes no humanas. Estudios epidemiológicos han establecido que el agua contaminada con materia fecal es una fuente de infección para la población debido a su consumo. Además de jugar un papel importante en su transmisión, se ha determinado que *H. pylori* está presente en diversas fuentes de agua: lagos, ríos, aguas municipales, residuales entre otras (7) (10).

Los cambios de la forma normal espiral bacilar de *H. pylori* a forma cocoide no cultivable están relacionados con condiciones ambientales adversas a las que se enfrenta la bacteria logrando así su supervivencia; dado que estas formas cocoides son difíciles de recuperar en medios de cultivo demostrar su presencia en el agua es un desafío que enfrenta la microbiología actualmente (16).

Recientes estudios se han enfocado en desarrollar métodos que demuestren la presencia de *H. pylori* en el agua, los cuales han contribuido a la hipótesis de la transmisión acuática de este patógeno, en donde su crecimiento en ambientes diferentes al estomago ha sido difícil, por lo cual se han hecho esfuerzos por cultivar esta bacteria en muestras de agua usando medios de cultivo bajo condiciones similares al gástrico (7) (16)

Teniendo en cuenta la dificultad para recuperar *H. pylori* a partir de aguas debido a la forma cocoide en que se encuentra la bacteria, este proyecto busca evaluar diferentes estrategias de cultivo que permitan recuperarla y así facilitar su detección, utilizando a su vez técnicas moleculares para evidenciar su presencia en aguas.

3. MARCO TEORICO

CARACTERISTICAS DE *Helicobacter pylori*

3.1 MORFOLOGÍA DE *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pilory*) es un bacilo Gram negativo, curvado con crecimiento optimo microaerofílico a temperaturas de 35-37°C, tiene una morfología bacilar-espiral que se puede perder cuando la bacteria se enfrenta a condiciones no favorables y por tanto adopta una forma cocoide que le permite resistir dichas condiciones, con un tamaño de 0.5 a 1.0 micras de largo y 3 de ancho y 2 a 6 flagelos monopolares fundamentales para su movilidad que permiten a la bacteria penetrar en la mucosa del epitelio gástrico donde se encuentra, además sus flagelos se encuentran cubiertos por una estructura lipídica que tiene como función la degradación del medio acido al que se enfrenta la bacteria en el estómago (16).

3.2 TRANSMISIÓN Y SUPERVIVENCIA DE *Helicobacter pylori*

La transmisión de *H. pylori* incluye varias rutas entre las cuales se encuentran; zoonosis, persona a persona (oral-fecal y oral-oral), iatrogénica o mediante alimentos y agua, aunque es poco probable que la bacteria crezca en la mayoría de los alimentos pero se le atribuye la capacidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en la humedad del medio ambiente además de ambientes acuáticos debido a cambios morfológicos y metabólicos que sufre en dichos medios como mecanismo de defensa (24).

Aunque *H. pylori* no forma esporas, puede adoptar un estado viable no cultivable cuando se ve enfrentada a condiciones desfavorables como falta de protección contra el oxígeno, desecación, privación de nutrientes, exposición a agentes antimicrobianos o largos tiempos de incubación en las cuales su morfología celular sufre un cambio importante ya que adquiere una forma cocoide y pierde su morfología espiral, sin embargo y a pesar de estos cambios que permiten a *H. pylori* resistir este ambiente se cree que su capacidad infectiva no se ve lo suficientemente alterada para no causar infección, además al encontrarse la bacteria en un estable viable no cultivable y teniendo en cuenta sus exigencias de crecimiento microaerofílico se dificulta su detección y aislamiento (24).

3.3 FORMA COCOIDE Y BIOPELÍCULAS DE *Helicobacter pylori*

La forma cocoide es una característica común de los bacilos Gram negativos cuando están en condiciones de estrés, en el caso de *H. pylori* se presentan tres etapas: formas espirales, formas cocoides y formas degenerativas. En forma espiral encontrada generalmente en epitelio gástrico la bacteria es viable,

cultivable y altamente infectiva con capacidad para colonizar en inducir una respuesta inmune, las formas cocoides de la bacteria se presenta cuando esta se ve enfrentada a un ambiente hostil en el cual sufre un cambio morfológico que le permite resistir dicho ambiente, en esta forma, *H. pylori* puede ser viable pero no cultivable, además pierde su capacidad infectiva y por ende es menos propensa a colonizar e inducir inflamación que las formas espirales (3)(13).

H. pylori puede sobrevivir durante un largo periodo de tiempo en el agua ya que la forma cocoide no cultivable es capaz de persistir durante varios meses (3) (13) (14). Cuando el *H. pylori* pasa a la fase degenerativa, se cree que los sistemas enzimáticos y orgánulos se pierden mientras que las proteínas principales y el material genético permanece sin cambios durante un tiempo prolongado. Además de la capacidad de alterar su morfología a fin resistir condiciones adversas *H. pylori* tiene características que la hace capaz de formar biopelículas *in vitro*, esta formación de biopelículas implica la unión de las bacterias individuales de manera tridimensional lo cual provee un ambiente protector (3).

3.4 VIABILIDAD Y VIRULENCIA DE *Helicobacter pylori* EN ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE (VNC).

Uno de los principales factores asociados con el desarrollo de formas VNC de *H. pylori* ha demostrado ser la temperatura ya que muestras incubadas en temperaturas de 4-15°C contienen formas VNC mientras que muestras incubadas a temperaturas entre 22-37°C muestran pérdida completa de la actividad metabólica, demostraron que usando sales de tetralozio como citoquímico indicador de metabolismo oxidativo, las formas VNC de *H. pylori* mostraban niveles significativos de actividad metabólica a temperaturas de 4°C además de demostrar la viabilidad de formas VNC con técnicas como inmunotinción (13).

3.5 FORMAS COCIDES Y METABOLISMO DE *Helicobacter pylori*

Según varios ensayos realizados con formas cocoides y espirales de *H. pylori*, se ha descrito que las formas cocoides muestran una membrana externa intacta y composición nuclear similar a la de las formas espirales, además de no mostrar signos de degeneración celular, lo que sugiere que las formas cocoides de *H. pylori* son utilizadas como mecanismo de resistencia implicadas en la transmisión e infección (4). La presencia de poli-p e inclusiones de hierro ha sido demostrada tanto en las formas espirales y cocoides de la bacteria, lo que demuestra la capacidad para sintetizar ATP celular en respuesta a una falta de nutrientes (17) y por tanto viabilidad de las mismas; además se ha comprobado que la bacteria en forma cocoide tiene cadena respiratoria activa, DNA y RNA, actividad ureasa y proteínas como VacA y CagA detectable, sin embargo no se ha demostrado que exista síntesis *de novo* de proteínas (6), también se ha evaluado la expresión del gen *cdrA* implicado en la morfología de la bacteria y aunque se ha visto reducción en comparación con las formas espirales se ha logrado demostrar su expresión (20).

Aunque han sido varios los estudios que sustentan que las formas cocoides de *H. pylori* son viables y se encuentran en un estado latente donde hay una represión de actividad metabólica apoyada en la reserva de polifosfato como suministro de ATP a la célula, otros autores han sostenido que la conversión a formas cocoide indica una pérdida de la viabilidad en donde la bacteria ya no puede ser cultivada (21).

3.6 CRECIMIENTO EN CULTIVOS DE *Helicobacter pylori*

Los hallazgos que hasta ahora se han reportado en la literatura con respecto a la recuperación de *H. pylori* en medios de cultivo, se observa en el siguiente cuadro:

AÑO	AUTOR	HALLAZGO EN CULTIVO
2012	<i>Sulami A.A. et, al</i>	La tasa de recuperación de <i>H.Pylori</i> fue del 1,2% en Agar Columbia modificado. De 471 muestras de agua de grifo y de tanque, Sólo 6 fueron morfológicamente y bioquímicamente identificados como <i>H. pylori</i> , en donde se confirmó su presencia con el gen 16SrRNA.
2012	<i>Moreno et. al</i>	De 45 muestras de agua residual, 13 cultivos eran sospechosos de <i>H. pylori</i> , en donde la bacteria no podía ser completamente aislado debido al crecimiento de la biota competitiva en el agar selectivo. Cuando se analizaron las muestras presuntivas, se observaron células Gram-negativas que eran típicas formas de <i>H. pylori</i> , pero se mezclaron con otras formas no bacilares de <i>H pylori</i> . Por lo tanto, para confirmar la presencia de células de <i>H. pylori</i> se utilizó la prueba FISH y PCR. Tan solo 6 cultivos se confirmaron la presencia de <i>H. pylori</i> .

3.7 FACTORES DE VIRULENCIA DE *Helicobacter pylori*

Los principales factores de virulencia de *H. pylori* utilizados para detectar su presencia mediante biología molecular son: CagA (relacionado con el riesgo de carcinogénesis), VacA (citotoxina vacuolizante) y ureA (síntesis de ureasa). Con respecto a la frecuencia del gen *cagA*, está presente entre el 50-70% en cepas de *H. pylori*. El gen *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori* varían en dos regiones, la región s1 o s2 y la región m presente como los tipos alélicos m1 y m2 (18). Y para el gen *ureA* se encuentran todas las cepas de la bacteria. Por ende, la amplificación de estos genes a partir de aguas, nos va a indicar la presencia de la bacteria, pero no su viabilidad (8).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar estrategias de cultivo adecuado para la recuperación de *Helicobacter pylori* a partir de aguas residuales

4.2 OBJETIVO ESPECIFICO

- Evaluar la reversión de formas cocoides a formas bacilar-espiral de *H. pylori* a partir de aguas residuales en diferentes medios de cultivo
- Evaluar la presencia y/o ausencia de *H. pylori* en aguas residuales mediante la técnica de PCR

5. METODOLOGIA

5.1 ESTRATEGIAS DE CULTIVO

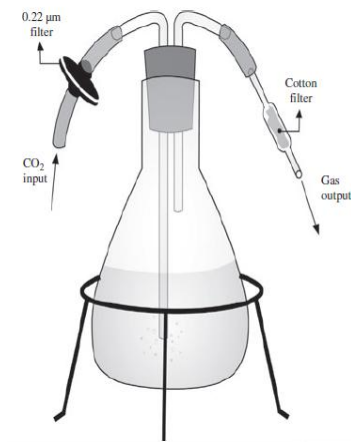
5.1.1 MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO

La selección del protocolo a utilizar para nuestro trabajo de grado se hizo teniendo en cuenta un estudio previamente realizado en el laboratorio de Bacteriología especializada de la Pontificia Universidad Javeriana (10), que se estandarizó para la recuperación e incremento de la biomasa de *H. pylori*, el cual consiste en medio líquido que proporciona las condiciones necesarias para el crecimiento de la bacteria, además de la utilización de un minibiorreactor por medio del cual se le suministra el CO₂ al medio y por ende las condiciones de microaerofilia requeridas para el crecimiento de *H. pylori*.

5.1.2 COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Caldo Brucella (Becton Dickinson. BBL™ Brucella broth)
Sangre Caballo 3.18%
DENT 0,11%
Isovitalex (Becton Dickinson BBL™ IsoVitalax) 0,52%
Muestra 5,6%
Agarosa (Ultrapure™ Agarose Invitrogen) 1.5%
Volumen final: 76,22ml

5.1.3 CONDICIONES DE CULTIVO Y MICROAEROFILIA



Teniendo en cuenta el protocolo y las condiciones de microaerofilia requeridas por *Helicobacter pylori* se utilizó un sistema de minibiorreactor (Fig1) garantizando así el suministro de CO₂ al medio de cultivo y las condiciones de microaerofilia a temperatura de 37C en shaker a 60 rpm (Fig2).

Fig 1- Sistema minibiorreactor
Duque RJ et al, *Helicobacter* 15

5.1.4 MEDIO DE CULTIVO SOLIDO

Se ha considerado que la prueba de oro para el aislamiento de *H. pylori* es sin duda el cultivo, por ser el método más específico en el diagnóstico del microorganismo, por lo cual empleamos medio de cultivo comercial selectivo para *H. pylori* (BD, Brucella Agar) enriquecido con 5% de sangre de caballo, suplementado con DENT e Isovitalax.

5.2 ENSAYOS DE CULTIVO CON CEPAS DE REFERENCIA Y MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES



5.2.1 ESTANDARIZACION DEL CULTIVO LÍQUIDO

Para la estandarización del cultivo líquido, utilizamos las cepas NCTC 11637 Y NCTC38 en condiciones óptimas (bacilar) además de forma cocoide a fin de evaluar su reversión. Para obtener las formas cocoides de las cepas de referencia NCTC 11637 y 11638 se sometieron a oxígeno ambiental durante 48 horas previas al ensayo, luego se realizó coloración de Gram para confirmar la conversión a forma cocoide de la bacteria. (Fig. 3)

Fig 2. Shaker de laboratorio Bacteriología especializada PUJ

Después se suspendieron las diferentes formas de las cepas de referencia en PBS a factor 3 McFarland siendo cultivadas en medio líquido en sistema minibioreactor, tomándose alícuotas de 50uL a las 0,12 y 24 horas para evaluar el crecimiento en medio sólido, además de realizar pruebas bioquímicas (catalasa-ureasa-oxidasa) y coloración de Gram a partir de los medios líquidos y sólidos.

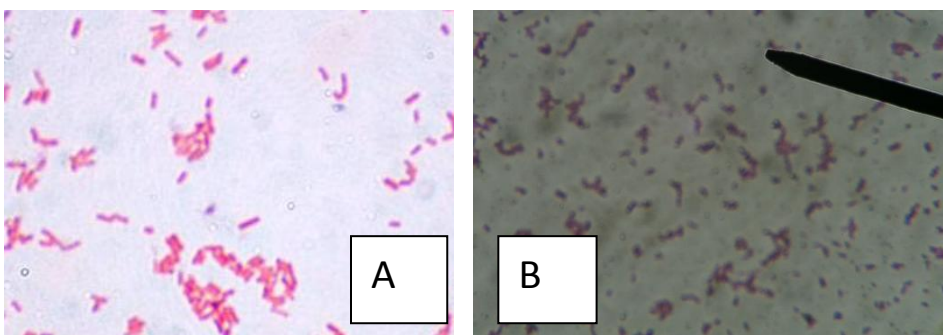


Fig. 3
(A) Cepa de referencia antes de someter a oxígeno; (B) cepa de referencia después de exponerla a oxígeno.

5.2.2 ENSAYO DE CULTIVO EN AGUAS RESIDUALES DE RIO ARZOBISPO

Se tomaron 2 muestras de agua residual de 300mL (de cada una) del río Arzobispo de Bogotá, las cuales se concentraron, utilizando filtro de membrana de 0,45- μ m posteriormente resuspendidos en PBS a factor 3 McFarland, luego cultivadas en medio líquido y sólido, tomándose alícuotas de 50 μ L a partir del medio líquido en periodos de tiempo 0, 24 y 48 horas para evaluar el crecimiento en medio sólido, además de realizar pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa, oxidasa) y coloración de Gram para confirmar la presencia y reversión de *H. pylori*.

5.2.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *caqA*, *vacA*, y *ureA*.

5.2.4 EXTRACCION DNA

Para la extracción de DNA, se empleó el protocolo establecido por el laboratorio de Bacteriología Especializada de la Pontificia Universidad Javeriana. A partir del medio de cultivo líquido se realizó la extracción de DNA, tomándose 1 mL de cultivo, se agitó y se centrifugó a 10.000 r.p.m por 4 minutos, descartándose el sobrenadante y obteniendo el pellet bacteriano.

Al pellet bacteriano se le agregó 1mL de DNAzol (invitrogen) mezclando con la pipeta hasta obtener una homogenización completa. Se centrifugó a 10.000 r.p.m. por 10 minutos, el sobrenadante obtenido se transfirió a un eppendorf estéril al que se le adiciono 500uL de etanol al 100%, mezclándose por inversión para precipitar el DNA, se centrifugó a 4.000 r.p.m. por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 75%, posteriormente se dejó evaporar el etanol y se agregaron 500-1000 μ L de NaOH 8mM sobre el DNA obteniendo una mezcla homogénea.

5.2.5 AMPLIFICACION DE LOS GENES *cagA*, *vacA* y *ureA*

La amplificación de los genes *cagA*, *ureA* y de los alelos *vacA* (*vacAs1*, *vacA s1/s2* y *vacAm1*) de *H. pylori*, se hizo en aguas residuales, utilizando como control la cepa de referencia NCTC11637, se realizó de acuerdo a los protocolos establecidos por el laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Javeriana como se muestra en la siguiente tabla:

REACTIVO	VOLUMEN
Agua	3.5uL
Cebadores F/R	0.25 uL
Taq polimerasa	5 uL
DNA	1uL
Volumen final	10uL

:

GEN	CEBADORES F/R	pb	Denaturación inicial	Denaturación	hibridación	Extensión	Extensión final	ciclos
<i>cagA</i>	TTG ACC AAC AAC CAC AAA CCG AAG CTT CCC TTA ATT GCG AGA TTC C	183	94°C- 9min	95°C- 30seg	50°C- 45seg	72°C- 45seg	72°C- 5min	40
<i>vacAs1/s2</i>	ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	259(s1) 286 (s2)	95°C- 2min	95°C- 30seg	52°C- 30seg	72°C- 30seg	72°C- 5min	40
<i>vacAs1a</i>	GTC AGC ATC ACA CCG CAA C CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	190		94°C- 1miin	52°C- 1min	72°C- 1min	72°C- 5min	35
<i>vacAm1</i>	GGT CAA AAT GCG GTC ATG G CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC	290	95°C-2min	94°C- 30seg	52°C- 30seg	72°C- 30seg	72°C- 5min	40
<i>ureA</i>		411pb	94°C-2min	94°C- 30seg	58°C- 20seg	72°C-30 seg	72°C- 5min	40

6. RESULTADOS

6.1 ESTANDARIZACION DEL CULTIVO LÍQUIDO CON CEPAS DE REFERENCIA

Después de las 12 y 24 horas, se realizaron las pruebas bioquímicas tinción de Gram (Tabla 1 y Tabla 2) a partir de los medios líquidos donde se encontraban las cepas NCTC11637 y NCTC11638 (forma bacilar y forma cocoide) como se observa a continuación:

Tabla 1. Cepas de referencia NCTC11637

A. forma bacilar

Pruebas bioquímicas/ Tinción	12 horas	24 horas
Urea	Positivo	Positivo
Catalasa	Positivo	Positivo
Oxidasa	Positivo	Positivo
Tinción de Gram	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos
Cultivo sólido	Presentó crecimiento	Presentó crecimiento

B. forma cocoide

Pruebas bioquímicas/ Tinción	12 horas	24 horas
Urea	Negativo	Negativo
Catalasa	Positivo	Positivo
Oxidasa	Negativo	Negativo
Tinción de Gram	Cocos Gram negativos	Cocos Gram negativos
Cultivo sólido	No presentó crecimiento	No presentó crecimiento

Tabla 2. Cepas de referencia NCTC11638

A. forma bacilar

Pruebas bioquímicas/ Tinción	12 horas	24 horas
Urea	Positivo	Positivo
Catalasa	Positivo	Positivo
Oxidasa	Positivo	Positivo
Tinción de Gram	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos
Cultivo sólido	Presentó crecimiento	Presento crecimiento

B. Forma cocoide

Pruebas bioquímicas/ Tinción	12 horas	24 horas
Urea	Negativo	Negativo
Catalasa	Positivo	Positivo
Oxidasa	Negativo	Negativo
Tinción de Gram	Cocos Gram negativos	Cocos Gram negativos
Cultivo sólido	No presentó crecimiento	No presentó crecimiento

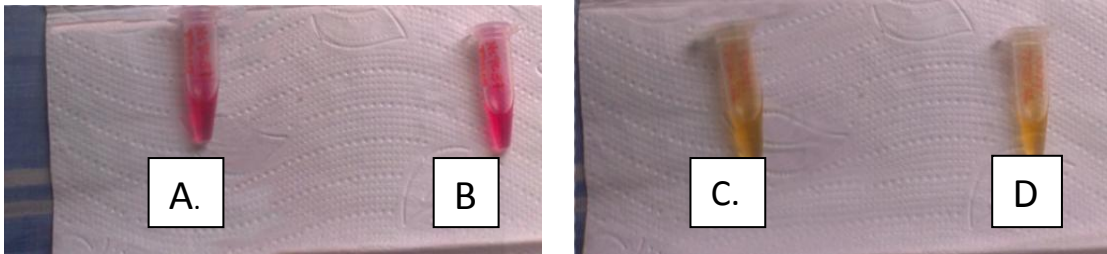


Fig. 4 Prueba urea para las cepas NCTC11637 y NCTC11638 en forma bacilar y cocoide a las 24 horas en medio líquido. (A) y (B) Cepas eNCTC11637 y NCTC11638 en forma bacilar respectivamente. (C) y (D) Cepas NCTC11637 y NCTC11638 en forma cocoide respectivamente

Dicha reversión de cocoide a bacilar en las cepas NCTC11637 y NCTC11638 en los medios de cultivo sólido a las 0, 12 y 24 horas (Tabla 3), no se observó crecimiento alguno, confirmándose con la tinción de Gram la presencia de cocos Gramnegativos y dando negativo para las pruebas de ureasa en ambas cepas a las 24 horas. A estos cultivos sólidos de las cepas de referencia que estaban en forma cocoide se les hizo seguimiento hasta por 7 días para evaluar la reversión morfológica de la bacteria, pero no se observó ningún cambio morfológico dando así en la tinción de Gram cocos Gram negativos y pruebas bioquímicas como la ureasa y oxidasa negativos y la catalasa positiva (Fig 5).

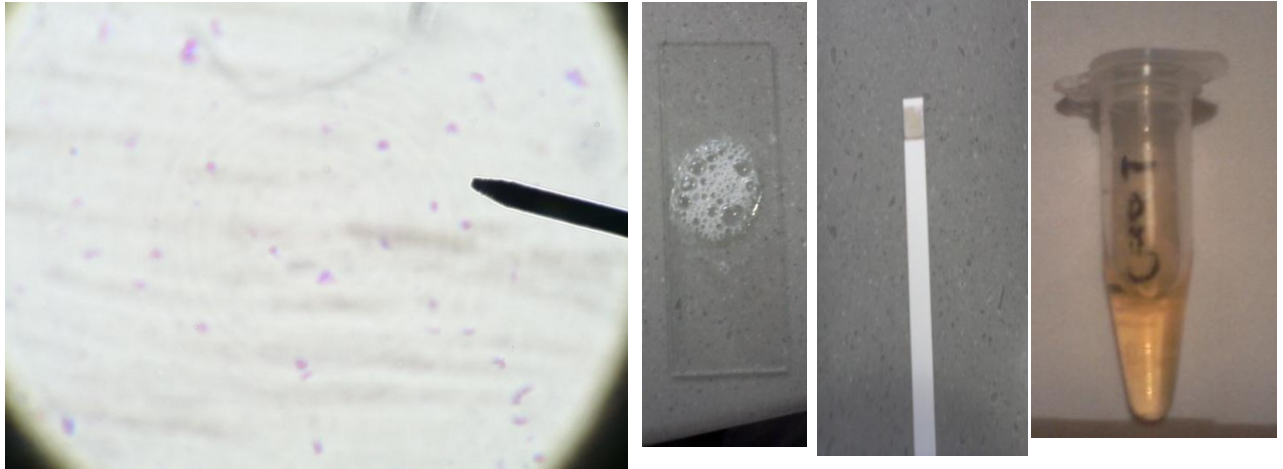


Fig. 5 Cultivo sólido de 24 horas de la cepa NCTC11637 (forma cocoide) (A) Tinción de Gram catalasa positiva; (C) oxidasa negativa; (D) ureasa negativa.

(B)

6.2 ENSAYO DE CULTIVO EN AGUAS RESIDUALES DE RIO ARZOBISPO

Para los cultivos líquidos de las 24 y 48 horas se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas (Tabla 4), (Fig. 7) y coloración de Gram.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas hechas en los medios líquidos de aguas residuales a las 24 y 48 horas

Pruebas bioquímicas / Tinción	24 horas	48 horas
Catalasa	Positivo	Positivo
Oxidasa	Negativo	Negativo
Urea	Positivo	Positivo
Gram	Cocos y bacilos Gram positivos y Gram negativos	Cocos y bacilos Gram negativos

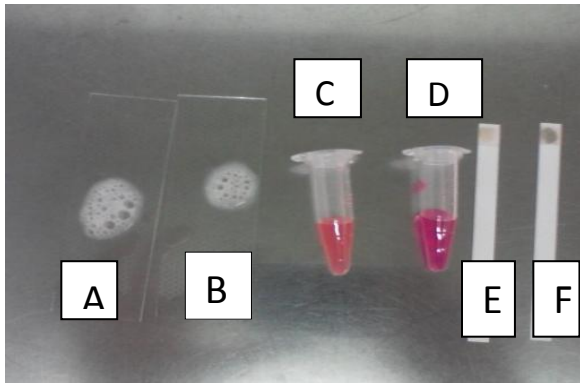


Fig. 7 pruebas bioquímicas de los cultivos líquidos de las 24 y 48 horas. (A), (C) y (E) corresponden al cultivo líquido a las 24 horas; Catalasa positivo, Ureasa positiva, Oxidasa negativa respectivamente. (B), (D) y (F) corresponden al cultivo líquido a las 48 horas; Catalasa positivo, Ureasa positiva y Oxidasa negativo respectivamente

Una vez filtrada las aguas residuales, se puso el filtro sobre el medio solido durante 30 min y se cultivó por 24 horas dando en la tinción de Gram cocos y bacilos Gram positivos y Gram negativos (Fig 8.)

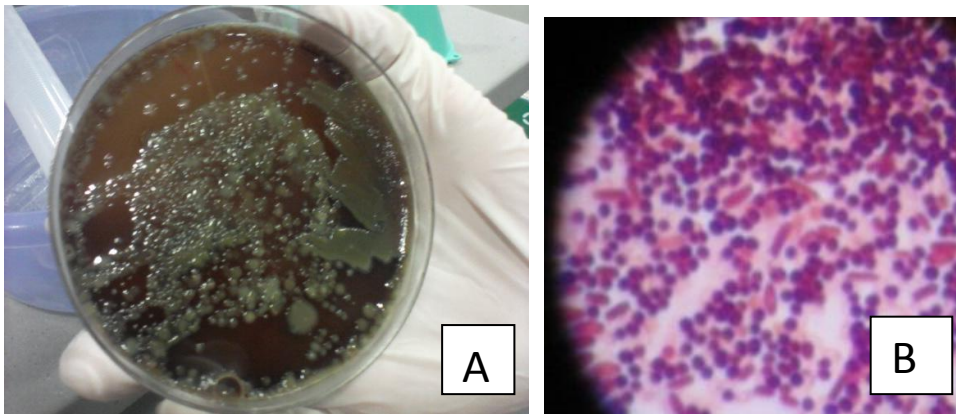


Fig. 8 (A) Cultivo a partir del filtro; (B) tinción de Gram del cultivo del filtro mostrando cocos y bacilos Gram positivos y Gram negativos

Cumplidas las 24 y 48 horas de los medios de cultivo líquidos, se sembraron en medio de cultivo sólido respectivamente en donde una vez se obtuvo crecimiento, se les realizó pruebas bioquímicas y tinción de Gram como se observa en la (Fig. 9) y (Fig. 10).

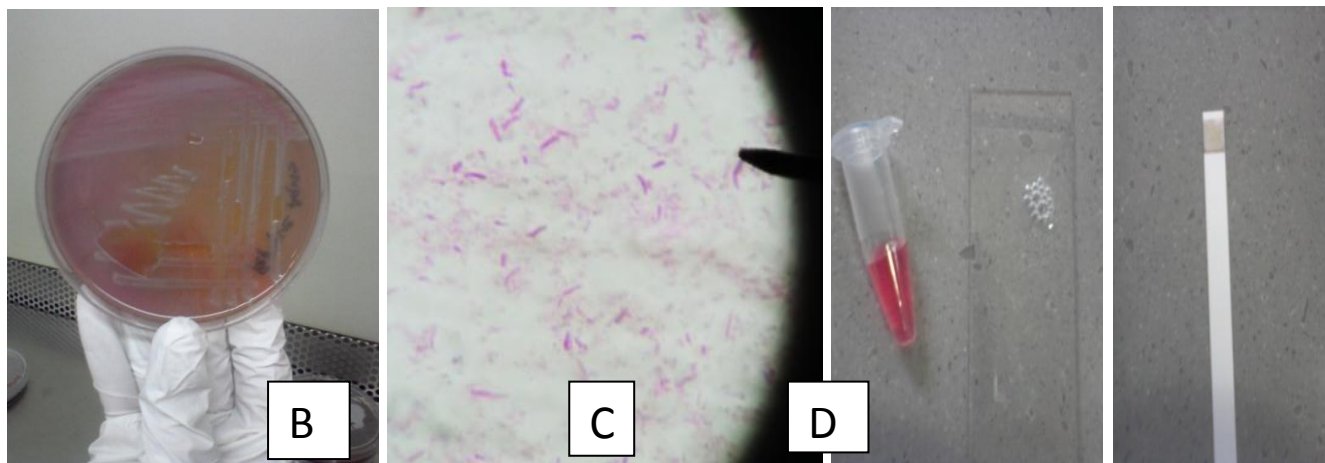


Fig. 9 Cultivo, tinción y pruebas bioquímicas a partir del cultivo líquido de las 24 horas de aguas residuales. (A) Aislamiento del cultivo sólido ; (B) tinción de Gram; (C) Urea positiva y catalasa positiva (D) oxidasa negativa.

Para el cultivo de las 24 horas del cultivo líquido (Fig. 9), se observó cocos y bacilos Gram positivos y Gram negativos en donde la prueba de la urea y la catalasa dieron positivas y la oxidasa negativa. En el de las 48 horas (Fig.10) se observó en la tinción de Gram, cocos y bacilos Gram negativos en la cual la prueba de la urea y la catalasa positiva y la prueba de la oxidasa negativa.

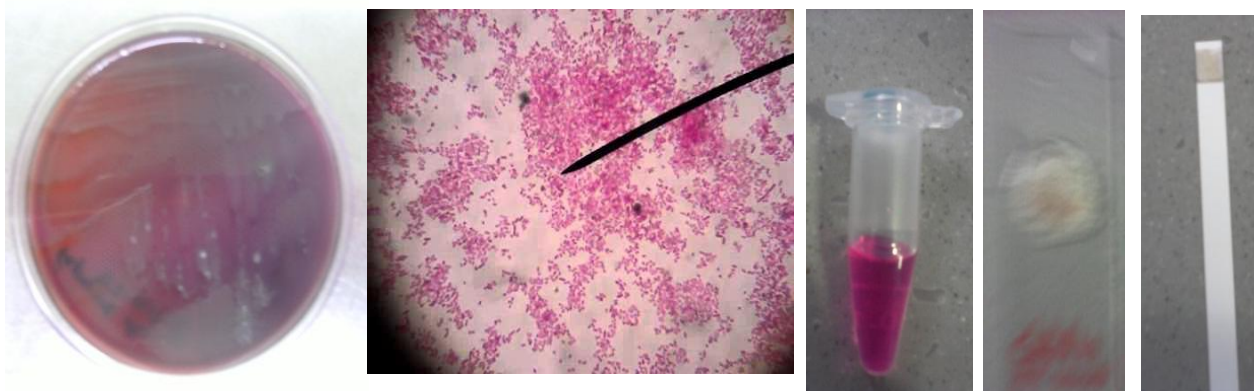


Fig. 10 Cultivo, tinción y pruebas bioquímicas a partir del cultivo líquido de las 48 horas de aguas residuales. (A) Aislamiento del cultivo en sólido (B) tinción de Gram; (C) urea positiva; (D) catalasa positiva; (E) oxidasa negativa.

6.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *caqA*, *vacA*, y *ureA*

Para la muestra de agua residual se detectó el gen *vacAm1* (Fig.11) y el gen *urea* (Fig.12) correspondientes a *H. pylori*. Lo que nos permitió comprobar su presencia en dichas muestras.

Vac s1/s2, s1, m1, cagA

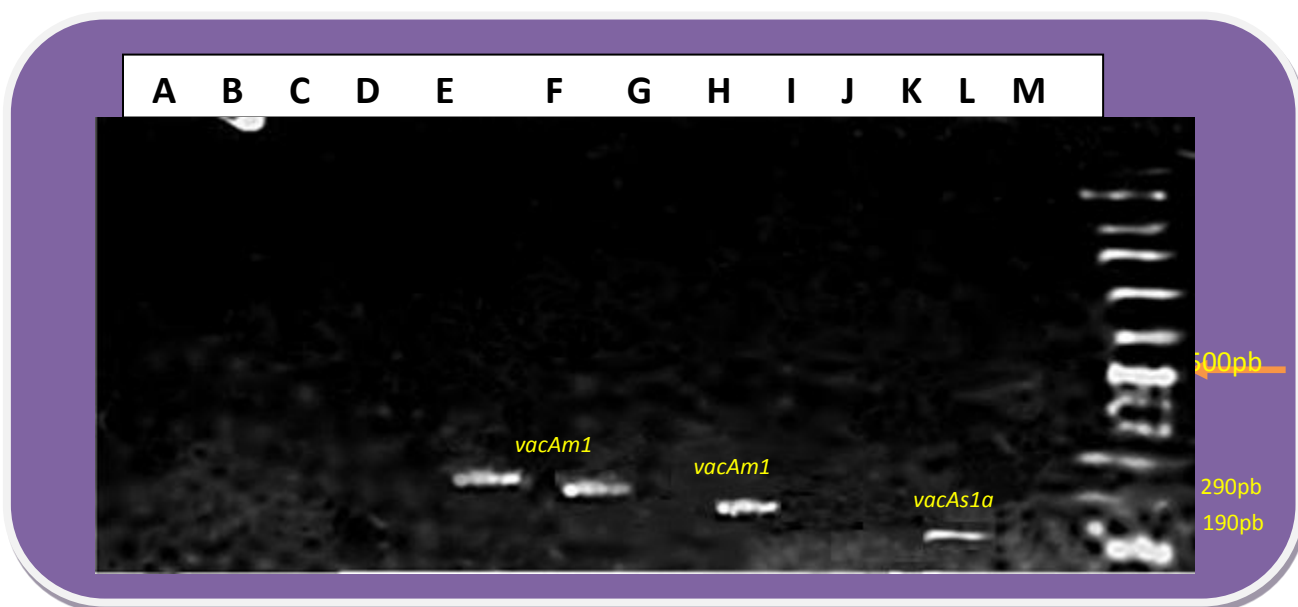


Fig.11 Amplificación de los genes *vacAs1/s2, s1,m1* y *cagA* en muestra de agua residual. Para *vacAs1/s2*: (A) blanco (B) control, (C) Muestra. Para *vacAm1*: (D) Blanco, (E) control, (F) Muestra. Para *vagAs1a*: (G) Blanco, (H) control, (I) muestra. Para *cagA*: (J) Blanco (K) control; (L) Muestra, (M) Patrón.

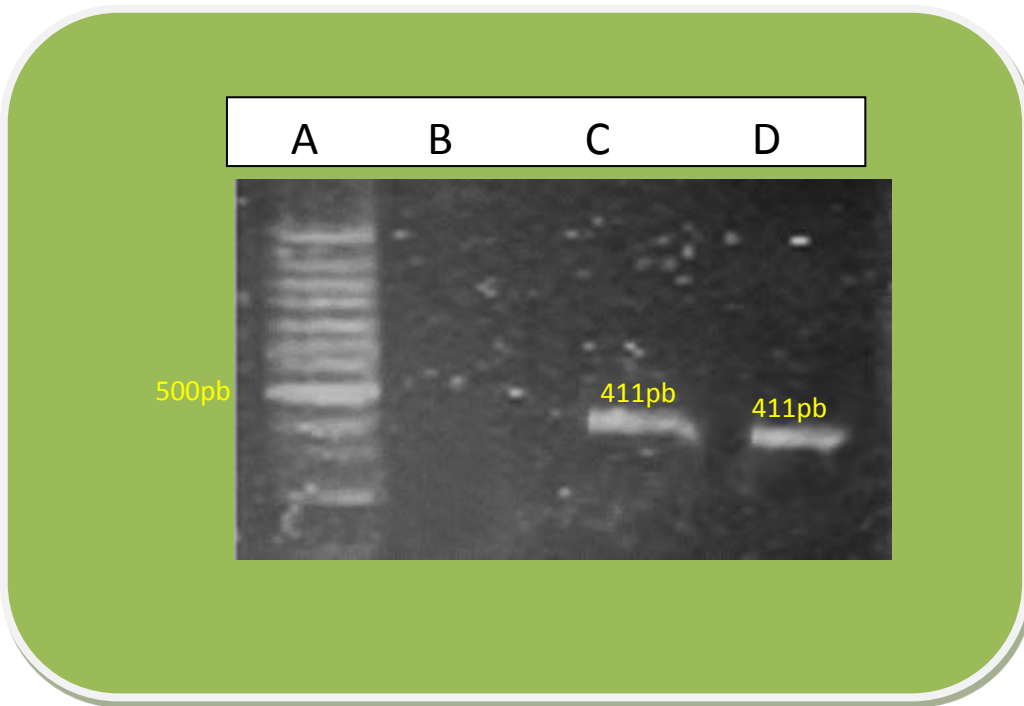


Fig. 12 Amplificación para *ureA*. (A) patrón, (B) blanco, (C) control, (D) Muestra

7. DISCUSIÓN

H.pylori es un bacilo Gram negativo espiral microaerofílico asociado a enfermedades gástricas, siendo su hábitat natural el estómago humano. Se ha propuesto que sus vías de trasmisión es mediante vía oral-oral, oral- fecal, además de existir una fuerte asociación entre la prevalencia de *H. pylori* y las fuentes de agua (22), en donde la bacteria presenta un cambio morfológico de bacilar a cocoide, dificultándose de esta manera su recuperación en cultivo. Por esta razón, en este trabajo se evaluaron diferentes estrategias para demostrar la presencia de la bacteria en aguas residuales, como cultivo, pruebas bioquímicas y amplificación de genes de virulencia (*cagA*, *vacA* y *ureA*) del microorganismo que permitieron evidenciar de manera directa (cultivo) e indirecta (PCR) la presencia de *H.pylori*.

En el presente estudio, al someter a condiciones de estrés a las cepas de *H.pylori* de referencia (NCTC 11637 y NCTC 11638), y verificar la adquisición de forma cocoide por parte del microorganismo, no fue posible recuperarlas mediante las estrategias de cultivo evaluadas, siendo negativa para la prueba de la ureasa. Este hallazgo concuerda con los resultados de (Can F. et.al. 2008), lo que nos indica que la negatividad de la ureasa puede ser debido a una disminución de la

actividad de ésta en las formas cocoides del *H. pylori* o como reporta (Sisto F. et al. 2000) la morfología cocoide de *H. pylori* es una forma degenerativa de la bacteria que indica pérdida de la viabilidad. Sin embargo, (Richards CL et al. 2012) en su estudio reporta la reversión de cepas de referencia estresadas mediante el uso de medio de cultivo líquido (caldo R) y medio sólido, resaltando la importancia del uso de sales como ZnSO₄, FeSO₄, MgCl₂, que favorecen la optimización del medio líquido contribuyendo a la recuperación del microorganismo. Es importante, tener en cuenta que esta diferencia en los resultados encontrados se puede deber a las diferentes estrategias de cultivo empleadas además de uso de técnicas moleculares.

Por otra parte, la recuperación de *H.pylori* a partir de agua residual utilizando las mismas estrategias empleadas con las cepas de referencia, no se logró. Estos hallazgos, no necesariamente significan que el microorganismo no esté presente en aguas residuales sino que su no recuperación en cultivo se pueda deber a múltiples factores como: la competencia por el medio de la microbiota acompañante, el cambio metabólico en las formas cocoides que van a influir en la recuperación en los medios de cultivo, tiempo de exposición a condiciones de estrés, lo que ha demostrado afectar drásticamente la recuperación de *H. pylori* (8), además debe tenerse en cuenta que las condiciones ambientales como lluvias frecuentes durante el tiempo en que se tomaron las muestras de agua residual, afecta la carga bacteriana y por ende su recuperación. Nuestros resultados se correlacionan con lo reportado por (Sulami, et al. 2012) en donde se obtuvo una baja recuperación del microorganismo y no se pudo demostrar la viabilidad de las formas cocoides en aguas y (Moreno, et.al 2012) reportan que la recuperación de *H. pylori* en medios de cultivo sólidos no fue posible y que la detección del microorganismo se detectó sólo con el uso de técnicas de PCR y FISH.

Teniendo en cuenta lo que se ha reportado en la literatura y nuestros resultados, podemos afirmar que todos los intentos por recuperar *H. pylori* directamente de muestras de agua ha sido infructuoso y esto puede ser debido al hecho de que el crecimiento excesivo de otros microorganismos en los medios de cultivo llevaron a la dificultad de aislamiento de la bacteria.

Dadas las características intrínsecas del microorganismo que normalmente dificultan su recuperación inclusive estando en forma bacilar, como se mencionó anteriormente, su no recuperación en cultivo no necesariamente indica su ausencia, lo cual es apoyado mediante los resultados encontrados por biología molecular, en los que se logró evidenciar la presencia de algunos de los genes de virulencia estudiados, que en este caso particular fueron usados como marcadores de la presencia del microorganismo en la muestra de agua residual analizada. Con respecto a lo anterior, se han reportado diferentes estudios que concuerdan con nuestros hallazgos (16) (24)

Se considera que el método de PCR presenta alta sensibilidad comparado con el medio de cultivo y otras técnicas como FISH (14), nuestros resultados de PCR

permitieron evidenciar la presencia de *ureA* y *vacAm1*, confirmando así que se trata de *H. pylori* ya que el gen *vacA* y el gen *ureA* es específico de esta bacteria.

Aunque, *cagA* que es otro gen de virulencia de *H.pylori*, es importante tener en cuenta que no todas cepas del microorganismo lo presentan razón por la cual su negatividad no nos permitiría concluir que el microorganismo está ausente en el agua residual analizada (18). Por ende, la amplificación de los genes *ureA* y *vacAm1* en la muestra analizada solo nos indica la presencia de *H.pylori*, y no la viabilidad del microorganismo lo cual no se pudo corroborar por ausencia de crecimiento en el cultivo.

8. CONCLUSIONES

Con base a nuestros hallazgos, podemos concluir que la recuperación de *H. pylori* en aguas residuales no fue posible mediante las estrategias de cultivo evaluadas, adicionalmente la técnica de PCR demuestra ser una herramienta eficaz para determinar la presencia de DNA de *H. pylori*.

9. RECOMENDACIONES

Además del uso de la PCR, se recomienda la utilización de técnicas como FISH, Inmunoblot, microscopía electrónica, marcaje metabólico con metionina y cisteína, y adición de sales $ZnSO_4$, $FeSO_4$, $MgCl_2$ al medio líquido, que pueden contribuir a la identificación y recuperación de *H pylori*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aggarwal N., Snyder P., Owens SR. Unusual *Helicobacter pylori* in gastric resection specimens: an old friend with a new look. *Journal of gastroenterology*. 2010; (45) 4: 406-412
2. Amieva MR., Omar EE. Host Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*. 2008; 134 (1): 306-329.
3. Andersen LP., Rasmussen L. "*Helicobacter pylori*- coccoid forms and biofilm formation. *Immunology and Medical Microbiology*. 2009; 56 (2): 112-115
4. Benaissa M., Babin P., Quellard N., Pezennec L., Cenatiempo Y., Fauchere JL. Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to coccoid form. *Infection and immunity*. 1996; 64(6): 2331-35
5. Can F., Karahan C., Dolapci I., Demirbilek M., Tekeli A., Arslan H. Urease Activity and Urea Gene Sequencing of Coccoid Forms of *H. pylori* Induced by Different Factors. 2008. *Microbiology* (56) 150-155
6. Chaput C., Ecobichon C., Cayet N., Girardin S., Werts C., Guadagnini S., Prevost N., Lecreulx D., Labigne A., Boneca I. Role of AmiA in the morphological transition of *Helicobacter pylori* and in immune escape. *Journal of pathology*. 2006; 2 (9):1-9
7. Fernández M., Contreras M., García MA., Michelangeli F., Suárez P., Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter Pylori*. *INCI* [online]. 2008; 33(6): 412-417.
8. Giao M., Azevedo N., Wilks SA., Vieira M., Keevi CW. Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking water Biofilms. 2008; 74 (19): 5898-5904
9. Höcker M., Hohenberg P. *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. *The Lancet*. 2003; (362). 1231-1233
10. Jamaica R., Arévalo A., Poutou AR., Trespalacios AA. Sequential Statistical Improvement of the Liquid Cultivation of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2010; (15): 303-312

-
11. Katsanos KH., Tatsioni A., Tsakiris V., Christodoulou D., Tsianos VE. *Helicobacter pylori* is a major public health priority in western Balkans: An endoscopy referral center experience. *European Journal of Internal Medicine*. 2010; 21 (4): 306–309
 12. Kusters JG., Gerrits MM., Striip JA., Graus CM., Coccoid forms *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infection and immunology*. 1997; 65 (9):3672-79
 13. Lenz LS, Gemein S, Exner M, Gebel J. Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms by real-time PCR. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2010 213(3):176-182
 14. Mazari Y., Castillo G., de León SP., Cravioto A. "*Helicobacter pylori* and Other Enteric Bacteria in Freshwater Environments in Mexico City." *Archives of Medical Research*. 2001; 32(5): 458-467.
 15. Mizoguchi H., Fujioka T., Kishi K., Nishizono A., Kodama R., Nasu M. Diversity in protein synthesis and viability of *Helicobacter pylori* coccoid forms in response to various stimuli. 1998; 66 (11): 5555-5560
 16. Moreno Y., Ferrus MA. Specific Detection of Cultivable *Helicobacter pylori* Cells from Wastewater Treatment Plants. *Helicobacter*. 2012 (17): 327–332
 17. Nilsson HO., Blom J., Sould WA. Ljungh A., Andersen PL., Torkel W. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Applied and environmental microbiology*. 2002; 68(1).11-9.
 18. Paniagua GL., Monroy E., Alcantara ML., Garcia OP., Vaca Sergio. Prevalencia de *Helicobacter pylori* y de los genotipos *vacA*, y *cagA* en la saliva de pacientes con gastritis. *Revista médica del hospital de México*. (2007); 70 (3):107-114
 19. Poursuna F., Faghri J., Moghim S. Esfahani HZ., Esfahani BN., Fazeli H., Hasanzadeh A., Safaei HG. Assessment of *cagE* and *babA* mRNA expression during morphological conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid. 2003; *Microbiology* (66): 406-413
 20. Richards CL., Buchholz BJ., Ford TE., Broadway SC., Pyle BH., Camper AK. Optimizing the growth of stressed *Helicobacter pylori*. *Journal microbiology methods* 2011. (84): 174-182.
 21. Sisto F. Brenciaglia MI., Scaltrito MM., Dubini, F. *Helicobacter pylori*: *ureA*, *cagA* and *vacA* expression during conversion to the coccoid form. *International journal of antimicrobial agents* (2000); 14(4): 277-282.

-
22. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. New England Journal of Medicine. 2002; 347 (15): 1175-1185.
 23. Sulami AA Al, Edani TAA Al, Abdula AA Al- Culture Method and PCR for the Detection of *Helicobacter pylori* in Drinking Water in Basrah Governorate Iraq. Gastroenterology Res Pract. 2012; 2012: pp1-5
 24. Velasquez F. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. International Journal of Ozone on *Helicobacter pylori*. Applied and environmental microbiology. 2002; 68(2): 981–984