

**CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE *Helicobacter pylori* A PARTIR DE BIOPSIAS GÁSTRICAS PARA LA CONSOLIDACIÓN DE UN BANCO DE AISLAMIENTOS EN POPAYÁN – CAUCA.**



**JESSICA ALEJANDRA LÓPEZ POLANCO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**  
**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**  
**POPAYÁN**  
**2022**

**CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE *Helicobacter pylori* A PARTIR DE BIOPSIAS GÁSTRICAS PARA LA CONSOLIDACIÓN DE UN BANCO DE AISLAMIENTOS EN POPAYÁN – CAUCA.**



**Proyecto de Grado como requisito para optar por el título de Bióloga**

**Presentado por:**

**JESSICA ALEJANDRA LÓPEZ POLANCO**

**Director:**

**M.Sc. Andrés Javier Quiroga**

**Asesora:**

**PhD. Claudia Patricia Acosta**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**POPAYÁN**

**2022**

**Nota de aprobación**

---

---

---

---

---



**Director** \_\_\_\_\_

**Andrés Javier Quiroga M.Sc.**

**Jurado (a)** \_\_\_\_\_

**Jurado (a)** \_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

***“Aunque caiga y me lastime seguiré corriendo hacia mi sueño”***

Young Forever

Con mi más grande amor y determinación a mi PADRE  
por qué sin ti yo no estaría aquí.  
A Leidy por no dejar de creer en mí.  
A Dany por el cariño y ánimo para continuar.  
A Yisel por tu amistad infinita.  
A Molly por tus garritas de amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres **LUIS ALBERTO y BEATRIZ** por su apoyo, amor y paciencia incondicional.

A mis **Hermanos y Familia** por acompañarme en cada paso que he dado, y a los ángeles en el cielo por bendecirme.

A la **Universidad del Cauca**, por brindarme las herramientas para aprender y crecer académica y críticamente.

Al M.Sc. **Andrés Javier Quiroga**, por tu paciencia y aporte de tranquilidad en el desarrollo de este proyecto, por el conocimiento que desinteresadamente brindaste para mi crecimiento investigativo. Por tu dedicación, sin tu apoyo no lo hubiera logrado.

A la PhD. **Claudia Patricia Acosta**, le agradezco por acogerme y brindarme un espacio de formación y aprendizaje, por su orientación y motivación en el proceso investigativo. Al Semillero de investigación de Genética Humana Aplicada por brindarme los espacios para el desarrollo y culminación de este proyecto.

A mis compañeros **Eliana y Juan Pablo**, sin ustedes no hubiese llegado hasta este momento, gracias por su amistad y su apoyo.

Finalmente, a **mí**, por no desfallecer, por no cansarme y por sentirme eternamente deslumbrada por la biología.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE IMÁGENES.....	7
RESUMEN .....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	9
2 JUSTIFICACIÓN.....	10
3 OBJETIVOS.....	12
3.1 GENERAL .....	12
3.2 ESPECÍFICOS .....	12
4 MARCO TEÓRICO .....	13
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
1.2 Vías de transmisión de <i>H. pylori</i> .....	14
1.3 Patogénesis de <i>H. pylori</i> .....	14
1.4 Etiología de la infección por <i>H. pylori</i> en el estómago.....	15
1.5 Consecuencias clínicas de la infección por <i>H. pylori</i> .....	16
1.5.1 Gastritis crónica no atrófica .....	17
1.5.2 Gastritis atrófica.....	17
1.5.3 Úlcera péptica gástrica .....	17
1.5.4 Displasia, Metaplasia y Cáncer Gástrico. ....	18
1.6 Pruebas de diagnóstico para <i>H. pylori</i> .....	18
1.7 Cultivo de <i>H. pylori</i> .....	19
1.8 Banco de muestras .....	19
1.9 Tratamiento .....	20
1.10 Resistencia antimicrobiana.....	21
1.10.1 Metronidazol (MTZ) .....	21
1.10.2 Amoxicilina (AMX) .....	23
1.11 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana .....	24
1.11.1 E-test®.....	25
2 ANTECEDENTES.....	27
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29

3.1	Diseño experimental.....	29
3.2	Procedimiento metodológico .....	29
3.3	Banco de cepas de <i>H. pylori</i> .....	33
3.4	Aplicación de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de Metronidazol y Amoxicilina.....	35
3.5	Definición de variables .....	36
3.6	Análisis estadístico.....	37
4	RESULTADOS .....	37
4.1	Cultivo de <i>H. pylori</i> .....	37
4.2	Banco de cepas de <i>H. pylori</i> .....	43
4.3	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de <i>H. pylori</i> .....	44
5	DISCUSIÓN.....	47
6	CONCLUSIONES .....	51
7	RECOMENDACIONES.....	52
8	BIBLIOGRAFIA.....	53
9	ANEXOS.....	61

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Medios y suplementos utilizados para realizar la recuperación de *H. pylori*.

**Tabla 2.** Pruebas para la identificación de *H. pylori*.

**Tabla 3.** Definición de variables por escala y unidad de medición.

**Tabla 4.** Descripción de las características sociodemográficas de la población de estudio.

**Tabla 5.** Tabla cruzada de la positividad de *H. pylori* en antro y en cuerpo.

**Tabla 6.** Resumen de las muestras almacenadas en el banco del Laboratorio de Genética de la Universidad del Cauca.

**Tabla 7.** Registro de resultados de revisión de muestras.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema del proceso de infección de *H. pylori* en el estómago.

**Figura 2.** Estructura química del Metronidazol.

**Figura 3.** Mecanismo de acción del Metronidazol en la célula bacteriana.

**Figura 4.** Estructura química de la Amoxicilina.

**Figura 5.** Mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos en la célula bacteriana.

**Figura 6.** Formación de la elipse en una prueba de E-test

**Figura 7.** Resumen del proceso metodológico para la recuperación, siembra, aislamientos, multiplicación y almacenamiento de *H. pylori*.

**Figura 8.** Grafica de resultados de las pruebas bioquímicas en los medios de prueba para la recuperación de *H. pylori*.

**Figura 9.** Diagrama de pastel de los resultados para cultivo de *H. pylori*.

**Figura 10.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana AMX y MTZ

## LISTA DE IMÁGENES

**Imagen 1.** Comparación del crecimiento de los medios A y B para la recuperación de *H. pylori*.

**Imagen 2.** Proceso de siembra y aplicación de las pruebas bioquímicas en posibles aislados de *H. pylori*.

**Imagen 3.** Formato de registro de resultados de las muestras de cultivo.

**Imagen 4.** Tabla de registro de resultados.

**Imagen 5.** Ejemplos de reducción de viabilidad en cepas.

**Imagen 6.** Resultados de la aplicación de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana para Metronidazol y Amoxicilina.

## RESUMEN

La infección por *H. pylori* es una de las más extendidas a nivel mundial, siendo un precursor de enfermedades gástricas, el cultivo de esta bacteria es una herramienta indispensable para su almacenamiento para investigaciones futuras además es la única manera para aplicar pruebas de susceptibilidad y evaluar su toxicidad. El cultivo posee una especificidad del 100% y una sensibilidad que oscila entre el 60 y 90% siendo afectada por diferentes condiciones.

**Objetivo:** En este estudio se establecieron las condiciones del cultivo de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas para conformar un banco de aislamientos; además se aplicaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para Metronidazol y Amoxicilina.

**Materiales y Métodos:** Se procesaron 20 muestras de biopsias gástricas obtenidas de pacientes dispépticos las cuales fueron sembradas en dos medios: el A fue Agar Base Sangre, mientras que el B fue Agar Tripticasa de Soya. Para la conformación de banco de muestras se procesan 154 muestras de tejido gástrico, material sembrado en un medio de cultivo B. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a Metronidazol y Amoxicilina se realizaron a 13 aislamientos con el método de E-test®.

**Resultados:** La tasa de recuperación de la bacteria en el medio de cultivo A fue 35%, mientras que en B fue del 55%. En el medio B el crecimiento fue óptimo mientras que en A se observó menor cantidad de colonias y mayor contaminación. El banco de muestras se estableció con 55 muestras almacenadas a -80°C. Con relación a las pruebas de susceptibilidad se evidenció que la resistencia a Metronidazol y Amoxicilina fue del 84,6% (11/13) y 38,5% (5/13) respectivamente.

**Conclusiones:** Se evidenció un mayor rendimiento en el medio B, donde las colonias se observan más brillantes y abundantes, así mismo las condiciones de transporte y la maceración, se consideran herramientas que mejoran la recuperación. Esto permitió el establecimiento del banco de aislamientos. Adicionalmente, aplicamos un plan piloto de pruebas de resistencia a los antimicrobianos AMX y MTZ que nos permitió observar un incremento progresivo en los valores de resistencia de la bacteria a los antibióticos, lo que debe impulsar una investigación más amplia en este campo.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, Cultivo, E-test, Banco, aislamiento.

# 1 INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico (CG) se refiere a los adenocarcinomas del estómago, que representan un 95% de los tumores malignos de este órgano (Arana & Bautista, 2004). En la actualidad esta enfermedad ocupa el cuarto lugar en mortalidad por cáncer a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2020). Además de esto en 2018 se estimó que tuvo una incidencia de 11.1 millones de personas y una mortalidad de 8,2 millones según las estadísticas del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) (GLOBOCAN, 2018).

En Colombia, el CG está clasificado dentro de los cinco cánceres con mayor frecuencia, siendo el segundo el de mayor incidencia en los hombres, el tercero en las mujeres y consolidándose como la tercera causa de mortalidad por cáncer en el territorio nacional (GLOBOCAN, 2020). El HIGIA<sup>1</sup> incluye al Cauca dentro del ranking de los 10 departamentos con mayor incidencia de esta enfermedad para el año 2019, siendo Popayán la ciudad con mayor número de diagnósticos de esta patología (Cuenta de Alto Costo, 2019).

Los estudios epidemiológicos han permitido evidenciar la presencia de factores de riesgo asociados al CG, entre los cuales, se reconoce a *H. pylori* (*H. pylori*) como uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades gástricas como úlcera gástrica y péptica, gastritis crónica y aguda, entre otras gastropatías (Gómez Zuleta et al., 2009; Jiménez & Bayona, 2016).

*H. pylori* es una bacteria de tipo Gram negativo, la cual presenta uno de los procesos de infección de la mucosa gástrica de los seres humanos con mayor incidencia a nivel mundial. La capacidad biológica que posee esta bacteria de sintetizar proteínas, enzimas entre otros le permite adaptar y transformar el ambiente ácido y hostil del estómago en un nicho ideal para su colonización (E. G. Cervantes, 2006).

Según los reportes de la literatura científica para el Cauca no se han registrado proyectos que se hayan enfocado en el aislamiento de *H. pylori* a partir de cultivo. En este sentido, este estudio tuvo como objetivo establecer las condiciones óptimas para el aislamiento y cultivo de *Helicobacter pylori*, para de esta manera conformar un banco de aislados bacterianos para la región suroccidental del país. Además de esto se utilizaron para la aplicación de pruebas de sensibilidad antimicrobiana; fomentando a mediano y largo plazo el inicio de nuevas investigaciones que aporten y enriquezcan el conocimiento sobre esta infección en nuestra región.

---

<sup>1</sup> HIGIA: Herramienta que facilita el análisis y la gestión de información en patologías de alto costo en Colombia.

## 2 JUSTIFICACIÓN

Desde hace más de 30 décadas, debido a estudios alrededor del mundo se estableció la asociación de la infección por *H. pylori* y las enfermedades gastroduodenales, reconociendo a esta bacteria como la causa inicial de la gastritis y entendiendo que con el progreso en los diagnósticos se puede establecer una asociación epidemiológica de este microorganismo con el Cáncer gástrico.

En la actualidad la infección por *H. pylori* es una de las más extendidas a nivel mundial, convirtiéndose en uno de los objetivos principales de investigación para médicos y científicos (Varón, 2014). De la misma manera Colombia se ubica como una región de alta incidencia de infección por este patógeno, ubicando al suroccidente como una de las zonas del país donde la presencia del microorganismo es alta. Sin embargo, se encontró que desde la salud pública los enfoques para erradicar y contrarrestar la aparición de patologías asociadas no han sido suficiente (Pardo et al., 2017).

Por lo anterior, es importante desarrollar proyectos e investigaciones que contribuyan a mejorar las rutas de atención de enfermedades con amplio impacto como el cáncer de estómago y las enfermedades asociadas como gastritis, úlcera entre otros. Es así como este proyecto aportará al conocimiento científico a través de la creación de un banco de aislados de *H. pylori*; esto con el fin de conocer las características genéticas que circulan en el suroccidente colombiano, buscando de esta manera apuntar a la investigación regional, encaminado en la búsqueda de una mayor visibilización de los pacientes y generando material para futuras investigaciones. A través de este banco se espera disponer de material biológico mediante el cual se puedan realizar diferentes pruebas de tipo molecular y pruebas de resistencia de los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica contra esta infección, lo que ayudará a mejorar las rutas de tratamiento y la prevención de enfermedades gástricas en la sociedad caucana.

Este tipo de investigaciones son apoyadas desde políticas aplicadas a través del Plan Decenal de Salud por el Minsalud y las departamentales con el Plan Estratégico Departamental y Tecnología del Cauca, las cuales buscan priorizar la atención y promover el desarrollo de estrategias destinadas a disminuir la incidencia, mortalidad y morbilidad del Cáncer; además de brindar una atención integral a los pacientes que padecen este tipo de enfermedad. Así mismo lo que se quiere alcanzar son mejores estrategias o rutas de prevención, diagnóstico temprano, atención y tratamiento de las personas que presenten cáncer.

De manera adicional, este proyecto se desarrolló en el marco de la investigación denominado "*Patrones de expresión de los antígenos Lewis B y sialyl-Lewis X y la variabilidad de los genes BabA y SabA de Helicobacter pylori: un estudio en pacientes con lesiones gástricas*" cuyo objetivo principal fue establecer la relación

entre la variabilidad genética de BabA y SabA de *H. pylori* y la expresión de los antígenos de Lewis en células epiteliales en pacientes con lesiones gástricas; promoviendo así las redes de conocimiento, alianzas y participación de entidades regionales tanto investigadores como de prestadores de servicios de salud en la región (Centro de diagnóstico y cirugía endoscópica Andes del Sur, Universidad del Cauca) y a través de alianzas internacionales (Washington University in St. Louis, EEUU) con el fin de posibilitar la creación y la innovación a nivel internacional como estrategia en la prevención del cáncer de estómago a nivel global.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GENERAL

- Caracterizar el método de cultivo de *H. pylori* a partir de biopsias de pacientes con lesiones gástricas para la consolidación de un banco de aislamientos.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Adaptar las condiciones de transporte, crecimiento, almacenamiento y viabilidad del cultivo de *H. pylori* en el laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca.
- Consolidar un banco de aislamientos de *H. pylori* a partir de las biopsias de pacientes con lesiones gástricas en el laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca.
- Establecer los parámetros básicos para la aplicación de la prueba de sensibilidad y resistencia antimicrobiana para Metronidazol y Amoxicilina a partir de los aislamientos de *H. pylori* obtenidos en laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca.

## 4 MARCO TEÓRICO

### 1.1 *Helicobacter pylori*

En 1982 Marshall y Warren reportan por primera vez a la comunidad científica el hallazgo de una bacteria presente en el estómago de pacientes con gastritis y úlcera péptica; esta tiene características de forma en espiral, Gram negativa y a la que denominan *Campylobacter like organism* (organismo parecido al *Campylobacter*) (Warren & Marshall, 1983) y fue nombrada inicialmente como *Campylobacter pyloridis*. Estudios genéticos realizados a la bacteria, muestra particularidades a nivel genético que obliga a la conformación de un nuevo género conocido como *Helicobacter* en el cual esta es agrupada junto a otras y es renombrada como *H. pylori*. Clasificándose taxonómicamente en la subdivisión Proteobacteria, orden Campylobacteriales y género *Helicobacter* (Windsor & O'Rourke, 2000).

Este organismo posee características propias como ser microaerófila, catalasa, oxidasa, y ureasa positivos (Dunn et al., 1997). Es un microorganismo Gram negativo que mide de 2-4  $\mu\text{m}$  de largo y de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho, aunque generalmente tiene forma de bacilo espiral, también puede aparecer en forma cocoide, tiene de 2-6 flagelos polares de 3  $\mu\text{m}$  de largo, estos le confieren movilidad permitiéndole desplazarse rápidamente en soluciones viscosas (Goodwin et al., 1985).

La bacteria se encuentra con mayor frecuencia debajo de la capa de moco del estómago y del duodeno (Cava & Cobas, 2003). Produce una variedad de enzimas (ureasa, proteasa, lipasa, fosfolipasa y otras) que atacan la capa de moco y el epitelio gástrico. La actividad de la ureasa es importante debido a que cuando se descompone la urea genera amonio y  $\text{CO}_2$  (Langton & Cesareo, 1992). El pH neutro creado por el amonio facilita que el microorganismo se proteja del ambiente ácido dentro del estómago, favoreciendo la degradación de la capa de moco facilitando así la retro difusión de ácido y la posterior colonización por *H. pylori* (Pérez & Vallín-Cárdenas, 1998).

Para el año 1994, la Oficina Internacional de Investigación de Cáncer clasifica a *H. pylori* como un carcinógeno de tipo I o causante de cáncer en los humanos, a pesar de los resultados contradictorios en aquel tiempo. Desde entonces, la colonización del estómago con por esta bacteria se ha aceptado cada vez más como causa necesaria pero no suficiente del cáncer de estómago y del linfoma gástrico de tejido linfoide asociado con la mucosa (Cava & Cobas, 2003).

Adicionalmente, la infección por microorganismo ha sido relacionado con diferentes lesiones del sistema digestivo (úlceras pépticas, gastritis, MALT), tanto benignas como malignas. En cualquier población, este se considera el mayor causante tanto de la úlcera gástrica y duodenal. Ha sido asociada, además, con el descubrimiento de linfomas gástricos non-Hodgkin y con otros desórdenes linfoproliferativos, MALT

(Linfoma de Tejido Linfoide Asociado a Mucosas) gastritis crónicas, úlcera péptica, adenoma y adenocarcinoma del colon, posibles adenocarcinomas pancreáticos, enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, cutáneas entre otras enfermedades (Cava & Cobas, 2003; J. P. Gisbert, 2011).

## **1.2 Vías de transmisión de *H. pylori***

Es considerada una de las infecciones bacterianas más extendidas a nivel mundial. Ha sido encontrada en estómagos humanos en todas las partes del mundo y no parecen existir reservorio<sup>2</sup> de *H. pylori* fuera de estos, salvo en primates y gatos como excepciones particulares (Cava & Cobas, 2003; Dunn et al., 1997).

Los estudios reconocen tres vías muy probables de transmisión:

1. Transmisión fecal-oral: Es quizás la más fuerte ruta de contagio. Aunque *H. pylori* logra con éxito ser aislada de heces de niños infectados, los residuos de las heces contaminan el agua, funcionando ésta como ruta de transmisión, y considerando a este recurso no tratado como una fuente de infección. También se debe considerar que la bacteria no se puede aislar de este medio con facilidad (Cava & Cobas, 2003; Pérez-Pérez, 2018).

2 Latrogénica: Material en contacto con la mucosa gástrica de una persona infectada que es luego puesta en contacto con otra persona. Los endoscopistas que no usan guantes incrementan el riesgo de estar infectados (Cava & Cobas, 2003).

3. Transmisión oral-oral: Se identifica en África por mujeres que pre masticaban alimentos para sus hijos. Además de los niños infectados que vomitan y tocan objetos a los que otros infantes pueden tener acceso e ingresar a su boca; en esta categoría también se incluyen los fómites<sup>3</sup> (Pérez-Pérez, 2018).

Las infecciones por vía ambiental o a través reservorios animales no pueden ser descartadas. De hecho, los perros y gatos sirven de depósito de *H. heilmannii*, que se asocia a *H. pylori* en la infección y produce casos de gastritis en humanos (Cava & Cobas, 2003).

## **1.3 Patogénesis de *H. pylori***

El estómago es el órgano del cuerpo humano encargado del proceso de digestión, durante este proceso el cuerpo secreta diferentes sustancias como ácidos y enzimas que ayudan en la digestión y además provee una barrera que previene del paso de microorganismos desde el intestino (Rodríguez & Benavides, 2010). La mucosa gástrica cuenta con un sistema de defensa y reparación que le ayuda a

---

<sup>2</sup> Reservorio: Portador alterno o pasivo que hospeda organismos patógenos, que pueden afectar a otros individuos.

<sup>3</sup> Fómite: Objeto inerte que puede extender una enfermedad, e igualmente transportar agentes infecciosos.

resistir los cambios que se pueden provocar por la exposición a agentes nocivos endógenos y exógenos. A pesar de los mecanismos de defensa con los que cuenta el estómago y la hostilidad del entorno *H. pylori* ha logrado transformar las condiciones de la mucosa y convertido a este órgano en su nicho ecológico (Roldán, 2011; Wong et al., 2000).

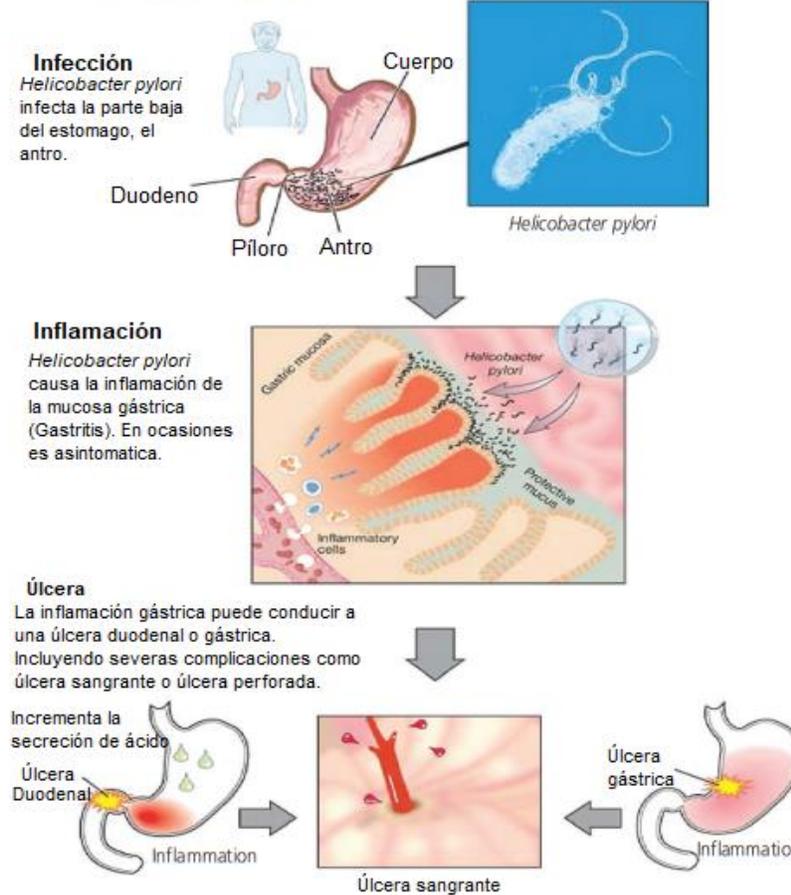
#### **1.4 Etiología de la infección por *H. pylori* en el estómago**

El microorganismo ingresa a nuestro cuerpo a través de la boca y llega al estómago, donde gracias a sus flagelos logra movilizarse hasta la capa de mucus que recubre las células del epitelio gástrico (Bai et al., 2010). *H. pylori* posee adhesinas como la Bab A y la OipA las cuales ayudan en la adherencia de la bacteria a las células foveolares superficiales donde puede evitar los movimientos de vaciado estomacal (López & González, 2011). Adicionalmente, logra colonizar con mayor facilidad gracias a la acción de la ureasa que ayuda a neutralizar el ambiente ácido del estómago (Fig 1) (Mahdavi et al., 2002).

La bacteria posee un sistema de secreción tipo IV induce acción citotóxica a nivel de la mucosa gástrica, esta se codifica por genes ubicados en una región denominada “Isla de patogenicidad CagA o Cag-PAI”, a través de la cual se facilita la entrada de proteínas como cagA y vacA quienes tienen una actividad citopática (Atherton, JC, 1995).

Además de esto, *H. pylori* para establecerse y colonizar utiliza fosfolipasas que ayudan en la hidrolización de las membranas celulares, conllevando a la liberación de lisolecitinas, las cuales constituyen un factor ulcerogénico (Ramis et al., 2010). Adicionalmente cuenta con lipopolisacáridos (LPS), peptidoglucanos, tetrapéptidos, entre otros PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) los cuales logran estimular gran variedad de receptores extra e intracelulares como el Nod 1, provocando un efecto quimiotáctico sobre los eosinófilos y neutrófilos, facilitando su multiplicación y persistencia. La activación de estas células desencadena la liberación de citoquinas, lo cual genera una respuesta inflamatoria amplificante, lesionando aún más la mucosa mediante la liberación de mediadores inflamatorios (Fritz et al., 2007).

## Helicobacter pylori



**Figura 1. Esquema del proceso de infección por *H. pylori* en el estómago.** Se observa el proceso de infección de *H. pylori* desde que este ingresa al cuerpo humano, como este se ancla al tejido e induce un proceso inflamatorio (Gastritis), que puede desencadenar a otras enfermedades gástricas (Úlceras). Tomado y modificado de (Pajares & Gisbert, 2006)

Los factores ambientales, hábitos y condiciones de vida que actualmente se conocen como Exposoma son un factor determinante del curso de una infección bacteriana y especialmente en el tracto gastrointestinal son muy amplios como la dieta, exposición a otros microorganismos como el Virus de Epstein Barr (López & González, 2011).

### 1.5 Consecuencias clínicas de la infección por *H. pylori*

El desarrollo clínico de la infección por este patógeno es impredecible y variable, influenciado por diferentes factores tanto de la bacteria como del huésped, entre ellas la distribución de gastritis la cual se ha correlacionado fuertemente con el

riesgo de secuelas clínicas ya sea úlcera duodenal, gástrica, atrofia de la mucosa, carcinoma o linfoma gástricos (Kusters et al., 2006).

El proceso precanceroso de avance de las diferentes enfermedades que preceden al cáncer gástrico es tan prolongado que puede durar décadas, ofreciendo de esta manera múltiples oportunidades para lograr diagnosticar y dar tratamiento a las diferentes enfermedades. Cuando se llega a un estadio avanzado en las patologías, el control endoscópico con regularidad es importante para identificar lesiones o daños antes de alcanzar la etapa de cáncer (Correa, 2011).

### **1.5.1 Gastritis crónica no atrófica**

Es considerada una enfermedad inflamatoria crónica de la mucosa gástrica la cual puede ser producida por agentes exógenos y endógenos desencadenando los síntomas dispépticos atribuibles a la enfermedad. Cuando se sospecha de esta patología el paciente debe someterse a una valoración clínica, a una endoscopia y además se necesita una confirmación histológica. Es una enfermedad asociada al *H. pylori*, que suele ser superficial, sin atrofia, conocida también como gastritis tipo B (Roldán, 2011).

### **1.5.2 Gastritis atrófica**

Esta patología está altamente relacionada con la infección por *H. pylori* y consiste no tanto en un proceso inflamatorio (gastritis), sino en una serie de cambios de pérdida epitelial (atrofia), adelgazamiento de la mucosa gástrica y reemplazamiento de células epiteliales gástricas por otros tipos de células (Manzano & Morillas, 2004), a los que se asocia, casi siempre la Metaplasia (seudopilórica, pancreática o intestinal), cambio en principio adaptativo-protector, que sustituye al epitelio gástrico perdido (Ortego & Cebrián, 2001).

### **1.5.3 Úlcera péptica gástrica**

Es una lesión en la mucosa gastrointestinal que permanece como consecuencia de la actividad ácida del jugo gástrico la cual se extiende más allá de las fibras musculares (muscularis mucosae), esta lesión se puede presentar en el estómago o en el duodeno (Vázquez-Anovega et al., 2014).

Una de las causas más comunes de la patología ulcerosa péptica (PUD) es la infección por *H. pylori* y el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluyendo el ácido acetilsalicílico (aspirina) (Reddy & Marsicano, 2018)

#### **1.5.4 Displasia, Metaplasia y Cáncer Gástrico.**

##### Displasia gástrica

Es la combinación variable de alteraciones microscópicas que se caracteriza por la variación en el tamaño, la forma y la orientación de las células epiteliales, el agrandamiento y la atipia de los núcleos, y la distorsión de la disposición glandular normal. La evaluación de la displasia es a menudo difícil y la concordancia interobservador en la displasia de clasificación es deficiente (De Vries et al., 2007).

##### Metaplasia intestinal (MI)

Se define como el reemplazo de las células epiteliales columnares gástricas por células caliciformes o goblet cells, en disposición similar al intestino delgado con células absortivas con bordes en cepillo (metaplasia completa) o en disposición similar al intestino grueso con pocas células absortivas (metaplasia incompleta) (Chacaltana et al., 2009).

El MI probablemente sea el resultado de la diferenciación desviada de las células madre gástricas hacia las células del intestino delgado o del fenotipo colónico (De Vries et al., 2007).

##### Cáncer Gástrico

El CG finalmente es la suma de múltiples factores de riesgo presentes en la persona; es el resultado de una infección extendida, una inflamación gástrica severa (gastritis extensiva al cuerpo, hipoclorhidria y atrofia), pero además de interacciones complejas entre la edad en que fue adquirida la infección, los mecanismos de respuesta inmune del huésped, la virulencia de la bacteria y la dieta, entre otros aspectos (Ishaq & Nunn, 2015).

##### **Linfoma del Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT)**

Esta patología se puede localizar mayormente en la región del antro de la cavidad gástrica, lugar donde se presenta mayor tejido de tipo linfoide. Adicionalmente, estudios preexistentes asocian a *H. pylori* con esta patología debido a que una vez se erradica la bacteria se observa una regresión del linfoma (Alarcón et al., 2004).

#### **1.6 Pruebas de diagnóstico para *H. pylori***

La alta tasa de infección por este patógeno ha empujado a los investigadores a desarrollar pruebas que detecten eficazmente la presencia de dicha bacteria en el organismo, por lo anterior se han desarrollado diferentes métodos agrupados en dos categorías técnicas invasivas y no invasivas. Las técnicas invasivas denominadas de esta manera porque es necesaria una endoscopia para la toma de

muestra de tejido (biopsia) para su aplicación, incluye prueba rápida de la ureasa, tinciones histológicas, cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); y las técnicas no invasivas donde se agrupan la prueba del aliento C13 (urea marcada carbono 13), serología y detección de antígenos en heces fecales (Bermúdez Díaz et al., 2009; Gatta et al., 2003). En este caso como el objetivo de investigación es cultivo abordaremos este, a continuación.

### **1.7 Cultivo de *H. pylori***

Es el método más específico para el diagnóstico de infecciones por *H. pylori* (Cervantes, 2016). Dentro de las ventajas que posee esta técnica están la clasificación genotípica de la bacteria, la sensibilidad antimicrobiana, la evaluación de virulencia y toxicidad, la resistencia antibiótica y el diagnóstico microbiano (Frías & Otero, 2017). Además, es la única herramienta a través de la cual se puede obtener y conservar cepas para posteriores estudios de genómica y proteómica. La desventaja de su uso está asociada a un mayor costo y consumo de tiempo, debido a los requerimientos especiales para el transporte, procesamiento y requerimiento de suplementos para cultivo de la bacteria. Adicionalmente, el diagnóstico puede tardar varios días, así como su baja sensibilidad en condiciones no óptimas (Díaz et al., 2009).

Para lograr el aislamiento de *H. pylori* se han utilizado varios medios de cultivo, entre los que se encuentran los que contienen agar, como caldo cerebro-corazón (BHI), TSA, Columbia, Brucella, Wilkins-Chalgren y Mueller-Hinton. Los medios son usualmente enriquecidos con 5-10 % de sangre de caballo, carnero o humana u otros aditivos, como la hemina, isovitalax, ciclodextrina y almidón; además de una combinación de no menos de cuatro antibióticos selectivos (Lee et al., 1997). Este microorganismo requiere una atmósfera de microaerofilia, alta humedad, temperatura de 35-37 °C y un tiempo de incubación de 5 a 10 días (Van Der Hulst et al., 1996).

*H. pylori* se identifica en base a la forma de la colonia (colonias pequeñas, redondeadas, lisas y transparentes de aproximadamente 1 mm de diámetro), la tinción de Gram, y su positividad en las pruebas de actividad de la ureasa, la catalasa y la oxidasa (Alarcón et al., 2004; Kusters et al., 2006).

### **1.8 Banco de muestras**

La mayor entidad que representa a las colecciones de siembras de microbianos es la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC), esta organización es la encargada de generar los lineamientos básicos para establecer un cepario que

cumpla con las expectativas tanto propias como las de las personas que pueden llegar a requerir de las muestras almacenadas. En la actualidad se encuentran registradas alrededor de 614 colecciones en 71 países registradas en la WFCC (IBUN, 2014). El objetivo principal en la creación de un banco de cultivos es el mantenimiento de cepas de microorganismos viables, con cambios de tipo morfológico, fisiológico o genético, además de promover desarrollo en las técnicas de preservación, las cuales han ido cambiando con el pasar de los años debido a los avances en la biotecnología (Hunter et al., 1986; IBUN, 2016; WFCC, 2010).

En relación a Colombia, se busca enfrentar los problemas en áreas como la salud, agricultura y el medio ambiente, haciendo uso de este tipo de ceparios de microorganismos, teniendo como referencia el Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), el cual está debidamente registrado ante el Ministerio del Medio Ambiente y el Instituto Alexander Von Humboldt (IBUN, 2014).

## **1.9 Tratamiento**

Desde que se descubrió *H. pylori* uno de los retos más grandes para médicos y científicos ha sido encontrar la manera más efectiva para erradicar completamente la bacteria o por lo menos de un 80% con una mínima inducción de resistencia y sin efectos secundarios considerables. Una vez terminada la línea de tratamiento el porcentaje de reinfección es baja, lo que significa que los beneficios del tratamiento son durables (Otero et al., 2009; Suebaum & Michetti, 2002). Sin embargo, los antibióticos no pueden actuar solos ya que el pH ácido del estómago influencia sobre la efectividad de los agentes antimicrobianos usados, por esta razón se usan en combinación con un inhibidor de la bomba de protones (PPI) o ranitidina citrato bismuto (Gerrits et al., 2006).

Se debe tener presente que no hay medicamentos exclusivos para erradicar *H. pylori* (Morcillo-Muñoz et al., 2018). Desde hace décadas se dispone de los mismos antibióticos como: bismuto, amoxicilina, tetraciclina, claritromicina, metronidazol y furazolidona. Más recientemente quinolonas como la levofloxacin, sitafloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin y rifabutina (Malfertheiner et al., 2017; Shiotani et al., 2017). Las fluoroquinolonas, macrólidos e imidazoles, tienen resistencia cruzada con los de la misma clase. El aumento progresivo de la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos ha determinado que en la actualidad la eficacia de las terapias triples sea solo del 60-70% en contraste con la eficacia del pasado que era más del 90% (J. Gisbert et al., 2016; J. P. Gisbert & McNicholl, 2017; Malfertheiner et al., 2017)

En cuanto a los esquemas de erradicación para el 2018 los consensos coinciden en que el tratamiento debe durar 14 días excepto los que contienen rifabutina, que

pueden ser de 10 días. La eficacia mínima exigida es 90% por ITT (intención de tratar) (Shiotani et al., 2017). Ningún esquema es 100% eficaz, por lo cual se debe disponer de tratamientos de segunda, tercera línea, y de rescate o salvamento (J. P. Gisbert & McNicholl, 2017; Malfertheiner et al., 2017; Otero R. et al., 2015).

La erradicación se verifica después de cuatro semanas de terminado el tratamiento. Las pruebas de diagnóstico que se utilizan usualmente son prueba de aliento (UBT: urea breath test) o antígenos fecales ambas consideradas no invasivas. La endoscopia digestiva alta, no se recomienda, excepto cuando es necesaria para evaluar la enfermedad inicial, como úlceras gástricas, linfoma MALT gástrico o cáncer gástrico (Malfertheiner et al., 2017; Shiotani et al., 2017).

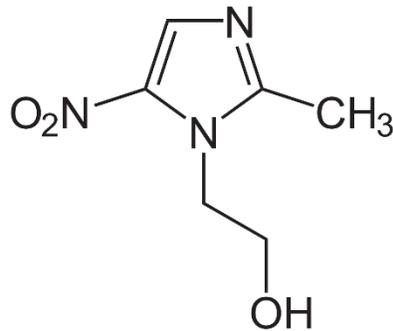
## **1.10 Resistencia antimicrobiana**

La mayoría de las bacterias tiene la capacidad de adaptarse con rapidez para sobrevivir, por esto la resistencia bacteriana es la principal causa del fracaso de los esquemas antimicrobianos para contrarrestar una infección (Francis Mégraud, 1998). La resistencia del *H. pylori* puede ser, primaria o natural, definiéndose como la incapacidad intrínseca del antibiótico para erradicar la infección desde el primer tratamiento y la secundaria o adquirida, que se desarrolla después de un tratamiento con un antimicrobiano al cual la bacteria era sensible (Chuah et al., 2011; Martínez M. et al., 2014).

La resistencia desarrollada por *H. pylori* se ha asociado con la capacidad de adaptación de la bacteria a ambientes hostiles y al uso de los antibióticos; ya que debido a esta última se pueden desarrollar mutaciones en genes cromosomales que se transmite en forma vertical a la descendencia por poblaciones bacterianas resistentes con un aumento progresivo de la resistencia. Esta característica está dada por mutaciones en genes cromosomales se considera diferente de aquella por plásmidos, en donde se transmite de manera rápida en forma horizontal en la población bacteriana que lo adquiere (Martínez M. et al., 2014; F. Mégraud, 2004; Pajares et al., 2007).

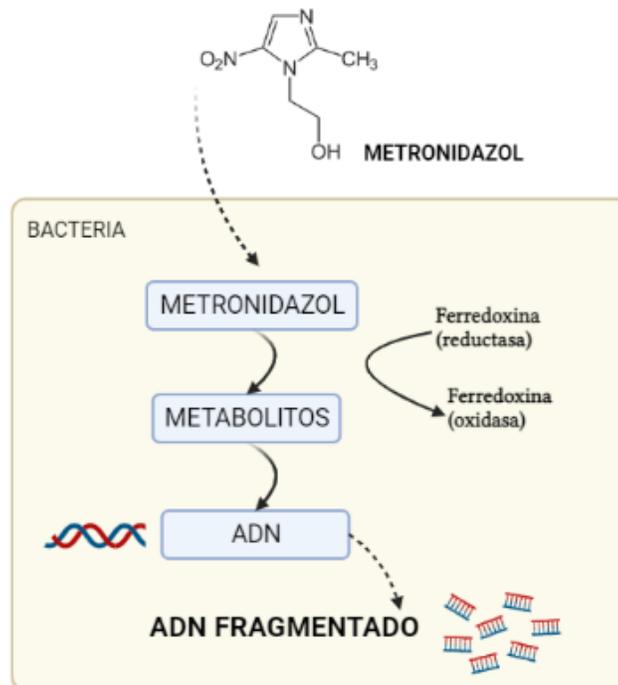
### **1.10.1 Metronidazol (MTZ)**

Es una sustancia de origen sintético descubierta en 1950 en un laboratorio francés cuya nomenclatura es [1-(2-hidroxietil)-2-metil5-nitroimidazol] (Figura 2) con función antibacteriana y antiparasitaria que pertenece a la clase de los nitroimidazoles; originalmente su indicación estaba relacionada con el tratamiento de infecciones provocadas por *Trichomonas vaginalis*, pero con el paso del tiempo se ha ampliado su espectro de acción, siendo utilizado en una variedad de organismos con alta eficacia para combatir bacterias anaerobias tanto Gram-negativas como Gram-positivas y protozoos (Bendesky, 2001; Freeman et al., 1997).



**Figura 2. Estructura química del Metronidazol.** Imagen tomada de (Bendesky, 2001)

El Metronidazol es relativamente inactivo hasta que es metabolizado en organismos de tipo anaerobio que tienen la capacidad de convertirlo con la ayuda de enzimas tipo redox piruvato-ferredoxina oxidorreductasa o flavodoxina. El grupo nitrilo del MTZ es reducido por la ferredoxina o por un mecanismo análogo y los productos de la reacción son los responsables de desestabilizar y dañar el ADN o formando aductos con las proteínas, inhibiendo de esta manera la síntesis de ácidos nucleicos (Figura 3) (Bendesky, 2001).

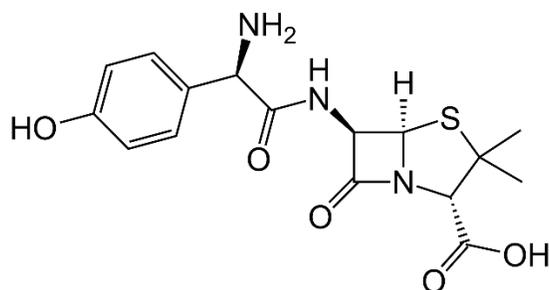


**Figura 3. Mecanismo de acción del Metronidazol en la célula bacteriana.** Se puede observar una de las vías de acción del Metronidazol en las células bacterianas y como este induce la fragmentación del ADN como un proceso de erradicación de *H. pylori*. Realizado: BioRender.com

El MTZ se activa mediante el mecanismo de transferencia de electrones, que genera radicales nitros con la capacidad de destruir el ADN. Las mutaciones en el gen que codifica una NADPH nitrorreductasa independiente del oxígeno (*rdxA*) son la principal causa de la resistencia de *H. pylori* a este compuesto. Adicionalmente mutaciones en otros genes como *fdxA* que codifica para la NADPH flavinoxidorreductasa o *fdxB* que codifica para la ferredoxin-like protein que pueden inducir resistencia (Cisneros, 2009; Martínez M. et al., 2014).

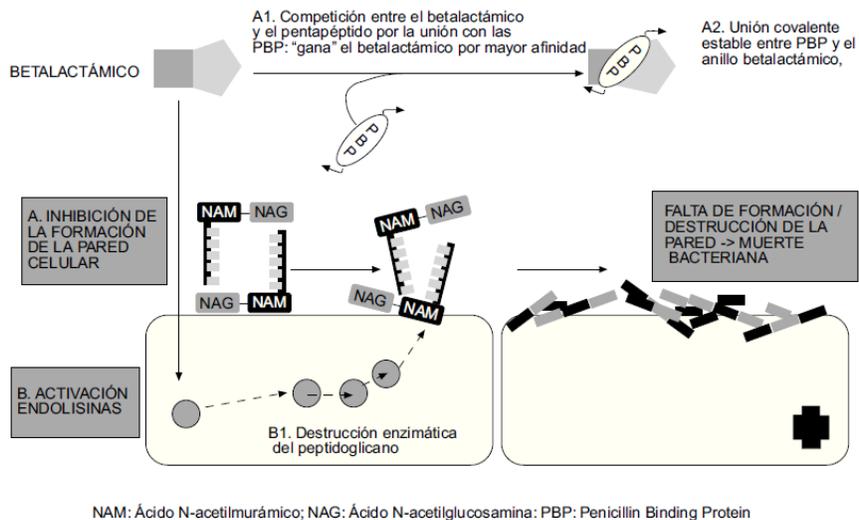
### 1.10.2 Amoxicilina (AMX)

Es un fármaco de tipo semi sintético bactericida de amplio espectro, clasificado como una aminopenicilina, la cual se forma al agregar un grupo amino adicional a la penicilina. La AMX es sintetizada por primera vez en 1972 en un laboratorio en Inglaterra, cuya nomenclatura es acetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptano-2-carboxílico (Figura 4). La AMX está indicada para el tratamiento de infecciones de bacterias de tipo Gram-positivo, Gram-negativo y de otros microorganismos como la *Salmonella* y *Shigella*. Además de esto es un fármaco desarrollado para combatir la resistencia a los antimicrobianos (Figuroa et al., 2012; Marín & Gudiol, 2003)).



**Figura 4. Estructura química de la Amoxicilina.** Imagen tomada de (Marín & Gudiol, 2003)

La forma en que AMX actúa es inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas llamadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) localizadas en la pared celular, inhibiendo la unión cruzada de las cadenas lineales al polímero peptidoglucano. Al impedir la construcción de la pared celular de manera adecuada, la amoxicilina ocasiona una lisis de la bacteria y su muerte (Figura5)(Marín & Gudiol, 2003).



**Figura 5. Mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos.** Este proceso afecta la formación de la pared celular, se puede observar como el anillo  $\beta$ -lactámico de la Amoxicilina presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido lo que le permite unirse a las enzimas en el espacio periplásmico de forma covalente e impedir de esta manera la formación de la pared celular, exponiendo a la bacteria al medio y que esta muera. Tomada de Suárez & Gudiol, 2009

Los mecanismos de resistencia de *H. pylori* están mayormente asociados con la mutación de la proteína de unión a penicilinas *PBPs*, en el gen *pbp1A*, aunque también se conocen otras mutaciones que pueden implicar resistencia en otros genes como *pbp2*, *pbp3*, *hefC*, *hopC* y *hofH*. También se puede generar resistencia a AMX por una alteración en la permeabilidad de la membrana; la pérdida, reducción y modificación de las porinas pueden generar una resistencia a los  $\beta$ -lactámicos. (Cisneros, 2009; Puerto et al., 2004).

### 1.11 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Los antibiogramas son métodos que ayudan a probar la capacidad de uno o varios agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento bacteriano de manera *in vitro* bajo condiciones de laboratorio estandarizadas. Uno de los objetivos principales de aplicar este tipo de estudio es ayudar al especialista a establecer la medicación más adecuada para un paciente con una infección específica, pero este tipo de correlaciones entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica es difícil de predecir, debido a factores que influyen la interacción entre el antibiótico, el microorganismo y el hospedero. Los datos que se logran acumular a través de este tipo de pruebas son importantes para la vigilancia epidemiológica de la resistencia a los antibióticos a diferentes niveles (regional, departamental y regional) que

ayudan a construir mejores líneas de atención para los pacientes infectados. (Arena et al., 2015; Khan et al., 2019).

Los resultados de una prueba de antibiograma se pueden dar en Concentración Mínima Inhibitoria CMI (mg/L) o se pueden mostrar con halos de inhibición, dependiendo del tipo de prueba que se aplique. Estos datos junto con criterios microbiológicos, farmacológicos y clínicos nos mostrarán los puntos de corte (*breakpoints*), a través de los cuales se podrá asignar a la bacteria en una categoría clínica de sensible (S) o resistente (R) (EUCAST, 2013; Leegaard et al., 2000).

Sensible: el crecimiento de la bacteria está inhibido *in vitro* por una concentración de un agente antimicrobiano utilizando una dosis habitual o que su efecto terapéutico es aplicable.

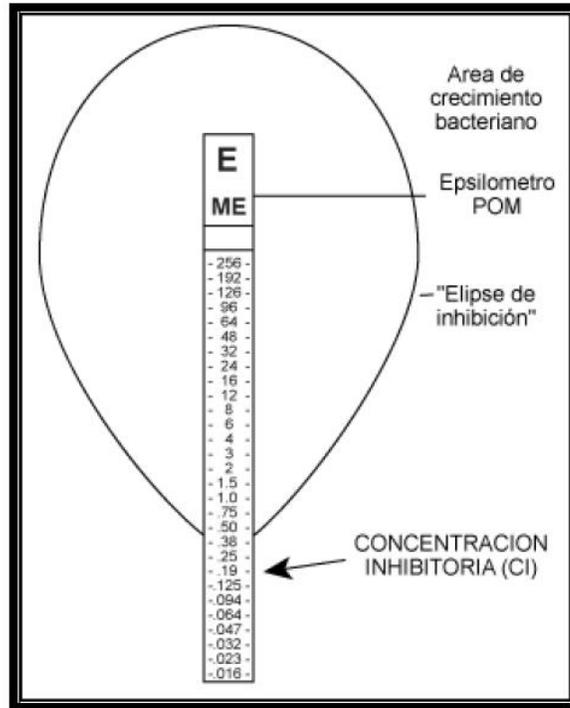
Intermedio: el crecimiento de la cepa bacteriana es inhibido de manera *in vitro* por la concentración máxima recomendada de un agente antimicrobiano y esto se puede asociar a un efecto terapéutico incierto.

Resistente: el crecimiento de la cepa bacteriana no puede ser inhibida de manera *in vitro* por una concentración segura de un antimicrobiano lo cual se va a asociar con una alta probabilidad de fracaso terapéutico (EUCAST, 2013; IDDEX, 2018).

Existen dos clasificaciones a través de las cuales se clasifican a los métodos de susceptibilidad antimicrobiana. La primera son los métodos cuantitativos los cuales en su procedimiento permite determinar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) definiéndose como la concentración mínima a la que un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y la concentración bactericida mínima (CBM) definiéndose esta como la concentración mínima que en un periodo de tiempo determinado tiene la capacidad de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana. Las pruebas que nos pueden arrojar estos resultados son la de dilución en caldo, dilución en agar y el epsilómetro test (E-test®). Los métodos cualitativos en este caso la prueba de difusión en disco, ayudan a clasificar directamente a un microorganismo como sensible, intermedio o resistente (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2008; Taroco et al., 2008).

### **1.11.1 E-test®**

Dentro de los métodos de gradiente antibiótico se encuentra la prueba del epsilómetro o también conocida como E-test® (Figura 6). El principio de este método consiste en depositar una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo y 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de un antibiótico equivalente a 15 diluciones. Mediante este método podemos observar la formación de un halo de inhibición y de esta manera obtener el CMI (Taroco et al., 2008).



**Figura 6. Formación de la elipse de una prueba E-test®.** Tomado de: Cavalieri & Coyle, 2005

## 2 ANTECEDENTES

Desde la descripción de *H. pylori* por los médicos australianos Barry Marshall y Robin Warren en 1982 (Warren & Marshall, 1983), estos sembraron un hito en la investigación que se ha extendido por casi 40 años y que aún no se detiene en la necesidad de conocer las formas de acción de este microorganismo en la población humana.

En 1991 y luego de casi una década de investigación y una variedad en los resultados que presentan las investigaciones que por ende resultaron en controversias, se decide iniciar una serie de consensos en los cuales se unifica y acepta que la infección por esta bacteria desempeña un papel importante en la génesis de la gastritis, úlcera péptica duodenal, úlcera péptica gástrica, cáncer gástrico y el linfoma tipo MALT, por esto la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC) y la Organización Mundial para la Salud (OMS), le dieron a *H. pylori* la clasificación como un Carcinógeno de tipo I (Parsonnet et al., 1991)

Desde la descripción de *H. pylori* los científicos han desarrollado y ajustado diferentes técnicas a través de las cuales se puede detectar la presencia de la bacteria. Así como existen diferentes técnicas también es imposible no caer en las comparaciones para establecer cuál es la más adecuada es así como Lage y colaboradores en 1995 plantean un estudio donde comparan los diferentes métodos invasivos utilizados en el diagnóstico (Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cultivo, prueba rápida de ureasa y tinción de Giemsa) llegando a conclusiones tales como que PCR y cultivo poseen valores similares de sensibilidad, y adicionalmente concluyendo que se puede detectar *H. pylori* por amplificación (Lage et al., 1995).

Para el año del 2001 se impone el aspecto microbiológico, describiendo de una manera más exacta las condiciones que se deben tener en cuenta a la hora de decidir incursionar en la recuperación de una bacteria como *H. pylori*, microorganismo que se ha considerado exigente en sus requerimientos nutricionales y específico en sus necesidades de transporte, siembra y aislamiento (Majalca-martínez et al., 2001).

En el 2006 Kusters y colaboradores publican un compendio en donde abordan los diferentes aspectos de la naturaleza patológica de *H. pylori*, en este documento se encuentran resaltados sus características morfológicas y fisiológicas generales como su forma usualmente espiralada, pero también resalta aspectos tales como que esta adquiere su forma coccoide cuando pasa un tiempo prolongado en cultivo y cuando se somete a tratamientos con antibióticos, se considera que las formas coccoides no son cultivables y en algunos casos se cree que representan células muertas. Adicionalmente, se considera un neutrófilo, esta bacteria sobrevivirá a pH<4 pero solo cuando se expone en un tiempo corto, pero el crecimiento óptimo

se dará en el rango del pH entre 5.5-8.0 por lo cual se considera que la bacteria tiende a ser acidófila (Kusters et al., 2006).

El científico colombiano Pelayo Correa en el 2011 presenta un modelo secuencial de lesiones gástricas que preceden al desarrollo de Cáncer gástrico. Se considera que la infección por *H. pylori* es un factor determinante pero no necesario en el desarrollo de esta enfermedad, ya que se ha demostrado que la infección por esta bacteria tiene una asociación causal con la gastritis y la úlcera péptica, y por consecuencia con el C.G. (Correa, 2011).

Un aspecto de suma importancia en la investigación desde la descripción de *H. pylori* son los diferentes esquemas de erradicación que se han desarrollado a lo largo de las investigación y aunque no son exclusivamente para la bacteria combinan uno o dos antibióticos y además un medicamento inhibidor de la bomba de protones los cuales ayudan en la eliminación del microorganismo, debido a las implicaciones médicas que esta infección puede desencadenar, de esta manera abordamos uno de los problemas principales y es el aspecto de la resistencia y de los mecanismos que la bacteria ha desarrollado para poder combatir y persistir como una de las infecciones más extendidas a nivel mundial (Moreno, 2009)

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Diseño experimental

Se llevó a cabo un estudio el cual fue dividido en dos partes: una etapa experimental *in vitro* y otra etapa observacional descriptiva. La fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca, aplicando las medidas dispuestas en los protocolos de bioseguridad de las instalaciones. La etapa observacional descriptiva fue aplicada de pacientes mayores de 18 años que asistieron a consulta en la Unidad de Endoscopia, del Hospital Susana López de Valencia, localizada en la ciudad de Popayán durante el periodo 2020 – 2021.

#### 3.2 Procedimiento metodológico

##### Medios para transporte y cultivo de muestras

Con base en la búsqueda bibliográfica realizada previamente y en los recursos de los que disponía el laboratorio, se seleccionaron medios de cultivo para determinar las condiciones de transporte, procesamiento y siembra de las muestras clínicas con posible presencia de *H. pylori*.

Se preparó un medio de transporte el cual fue Brain Heart Infusion (BHI - Scharlau) con 20% de Glicerol (Sigma Aldrich) y dos medios de cultivo denominados; Medio A que contenía Agar Base Sangre (Merck KGaA), y el medio B con Agar Tripticasa de Soya (TSA – Scharlau), los cuales fueron suplementados como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 1. Medios y suplementos utilizados para realizar la recuperación de *H. pylori***

(A) AGAR BASE SANGRE (500 mL)	(B) AGAR TRIPTICASA DE SOYA (500 mL)
1,5 gr Triptona (BBL™)	10 gr de Caseína
1,7 gr de Caseína hidrolizada	0,22 gr de Carbonato de Calcio
0,15 gr Carbonato de Sodio	1 gr de Carbón Activado
1 gr Carbón activado	7 % de Glóbulos rojos de caballo desfibrinados
10% de Glóbulos rojos de carnero (EOLabs LTDA)	10% de Suero de Bovino Adulto (Thermo Fisher Scientific Inc)
4 mL de Suplemento selectivo (DENT)	4 mL de Suplemento Vitox Oxoid™

4 mL de Oxoid™ Suplemento Selectivo de <i>Helicobacter pylori</i>
-------------------------------------------------------------------

### **Toma y Transporte de la muestra**

Las muestras biológicas (tejido de mucosa gástrica humana) fueron tomadas mediante procedimiento de gastroduodenoendoscopia llevada a cabo por el gastroenterólogo usando una pinza de biopsia Captura® en la unidad de especialistas, siguiendo el protocolo de Sydney modificado (Dixon et al., 1996), cada muestra se depositó individualmente en un tubo centrifuga de 1,5mL eppendorf® que contenía 1 mL de medio BHI con 20% de Glicerol estéril (Merck®). Se utilizó un código para cada paciente haciendo una distinción del área del estómago de la cual provenía la biopsia, antro o cuerpo respectivamente. Los tubos con las muestras se depositaron en una crio-caja y fueron mantenidos en nevera de Icopor® con geles congelados para conservar la cadena de frío. Al final de la jornada la nevera fue transportada al laboratorio de Genética de la Universidad del Cauca.

Se debe aclarar que las muestras utilizadas para desarrollar el objetivo 1 en la evaluación de los medios de cultivo fueron donadas por el centro de endoscopia Endovideo 2000 Ltda. Mientras que las muestras utilizadas para el objetivo 2 en el establecimiento del banco de aislados de *H. pylori* fueron obtenidas gracias al proyecto “*Patrones de expresión de los antígenos Lewis B y sialyl-Lewis X y la variabilidad de los genes BabA y SabA de Helicobacter pylori: un estudio en pacientes con lesiones gástricas*” el cual se desarrolló en conjunto con la Unidad Endoscópica y Gástrica Andes del Sur del Hospital Susana López de Valencia.

Los pacientes que aceptaron participar en el estudio “Variabilidad de los antígenos de Lewis” estos firmaron un consentimiento informado después de una explicación clara del estudio según lo dispuesto en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud (Anexo 1). La investigación fue aprobada por el comité de ética de la Universidad del Cauca. Además, se les realizó una encuesta sociodemográfica de la cual se obtuvieron variables como sexo, edad, estado civil, educación, ocupación entre otros, las cuales proporcionaron información acerca de la población estudiada (Anexo 2).

Este estudio se acogió a las pautas de confidencialidad de la información personal de los pacientes, de acuerdo, a la declaración de Helsinki (1964). Manteniendo la codificación usada en la obtención de las biopsias, asegurando así la no identificación del sujeto y del mantenimiento de la confiabilidad de la información. Solamente el investigador principal tuvo acceso a los datos que fueron resguardados y mantenidos en custodia en el Laboratorio de Genética Humana de la Facultad Ciencias de la Salud, cumpliendo así con los principios éticos básicos de bienestar y protección contra daños evitables.

### **Aislamientos e identificación de *H. pylori***

Una vez las biopsias llegaron al laboratorio se llenó un registro general de ingreso (Anexo 3) y estas fueron procesadas en el menor tiempo posible posterior a la toma, aplicando las normas de bioseguridad y protocolos dispuestos en el laboratorio de Genética de la Universidad del Cauca descritos en la Resolución R-0650 de 2021.

Cada biopsia fue triturada en el eppendorf de transporte junto con el medio BHI usando un macerador plástico estéril, el contenido fue vertido en cajas de Petri que contenían medio de cultivo (A o B) y usando la técnica de extensión, las cajas fueron rotuladas con el código asignado a la biopsia. Fueron incubadas con las siguientes condiciones: 37°C, 10 % de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> con una humedad del 95% (Cancerología, 2017) en la incubadora marca Revco Inc. Los cultivos fueron revisados diariamente de los cuales se llevó un registro de presencia/ausencia de colonias sugestivas las cuales deben cumplir en el aspecto macroscópico con las siguientes características *H. pylori* se muestra como una bacteria de colonias pequeñas, redondeadas de bordes lisos, brillantes y transparentes (Holt et al., 1993; Robin Warren & Marshall, 1983), presencia de colonias contaminantes y la evaluación de pruebas como ureasa y catalasa en colonias presuntivas a partir de la hora 48 y hasta el día 12 de cultivo. Este protocolo se utilizó para los dos medios Agar en sangre y TSA los cuales fueron empleados en la fase de aislamiento de la bacteria. Se usó el crecimiento de la cepa de referencia NCTC 11637 como control.

#### *Pruebas para la Identificación de H. pylori*

Las pruebas que se aplicaron en las colonias sugestivas para confirmar la presencia de *H. pylori* fueron agrupadas en la siguiente tabla:

**Tabla 2. Pruebas para la identificación de *H. pylori***

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO
Prueba de Ureasa	La bacteria produce la enzima ureasa que puede transformar la urea en amonio (NH <sub>4</sub> ) y bicarbonato, lo que puede posteriormente aumentar el pH del medio, este cambio pH se detecta de forma indirecta con un indicador rojo fenol desarrollando un color fucsia que indica una prueba positiva.	Se tomaron con un hisopo algunas colonias de la placa de cultivo y se sumergieron en un tubo de centrifuga 0,6 mL que contenía la mezcla de urea 1,5% y rojo fenol 0,01%. El viraje a fucsia en el color nos daba el resultado positivo.

Prueba de Catalasa	Esta prueba pone en evidencia la presencia de la enzima catalasa. Brindando la capacidad a la bacteria de descomponer el peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en O <sub>2</sub> (presencia de burbujas) y H <sub>2</sub> O. El desprendimiento de burbujas indica un resultado positivo.	Se tomaron algunas colonias de la bacteria con un hisopo, que posteriormente se sumergió en un tubo de centrifuga 0,6 mL con peróxido de hidrógeno al 10%, se observó la reacción y la aparición de burbujas indicó un resultado positivo.
Prueba de Oxidasa	Esta prueba se realiza para determinar la presencia del sistema citocromooxidasa. Para realizar esta prueba se usaron tiras impregnadas con oxalato de p-áminodimetilamina, cuando se da la reacción y ocurre la oxidación se produce un compuesto orgánico conocido como indofenol desarrollándose un color púrpura indicando un resultado positivo.	Esta prueba se realizó siguiendo la recomendación del fabricante Oxidase Test sticks (PanReac AppliChem ®), Se tomaron abundante cantidad de colonias en un asa estéril y se depositaron en la zona indicada por la tira de prueba. El resultado positivo de la prueba estuvo indicado por la aparición del color púrpura en la zona del stick demarcada en un tiempo menor o igual a 60 segundos
Tinción Gram	La tinción de Gram es un procedimiento de rutina en bacteriología compuesto por varios pasos de tinción y decoloración para la identificación y clasificación fenotípica bacteria. Las Gram positivas generalmente presentan una pared celular con mayor contenido de peptidoglucano por lo que se tiñen de color oscuro morado. Mientras que otras bacterias poseen pared celular con menor peptidoglucano, pero tienen lipopolisacáridos, estas tiñen de color rosa.	Para este proceso se hizo un extendido de la muestra, se dejó secar y se flameó al calor (3 veces). Se agregó Cristal violeta por 1 min y se lava con agua. Luego se agregó Lugol por 1 min y se lava con agua, se decolora con alcohol/acetona por 30 s y se lavó con agua. Se realizó tinción de contraste con Safranina por 1 min y se lava. Finalmente se observó en el microscopio con luz blanca. <i>H. pylori</i> se mostró como un bacilo Gram negativo (Smith & Hussey, 2005).

### Preservación de las cepas aisladas

Una vez se hizo la confirmación de la presencia de *H. pylori* con las pruebas mencionadas anteriormente, se procedió a tomar con un hisopo una o varias colonias para realizar un extendido en una nueva caja con medio fresco y se incubó a 37°C, 10 % de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> con una humedad del 95%, esto con la intención

de tener una cantidad adecuada de bacteria aislada para poder proceder a su almacenamiento (Cancerologia, 2017).

El almacenamiento se realizó en crio-viales los cuales contenían en su interior aproximadamente 1 mL de medio BHI con glicerol al 20%, cuando se obtuvo una cantidad abundante de bacteria con un hisopo estéril se procedió a tomar bacteria del aislamiento y se llevó al vial formando una suspensión bacteriana. Cada vial fue marcado con el código asignado a la biopsia y almacenado en una crio-caja. El proceso de conservación se llevó a cabo en dos etapas; primero se llevaron las muestras a un congelador con una temperatura de -30°C por 24 h, en la segunda etapa y para su preservación definitiva las muestras fueron trasladadas un congelador con una temperatura de -80°C (Bayona, 2013).

Para verificar la viabilidad de los aislamientos guardados luego de 4 semanas de almacenamiento se retiraron viales al azar del congelador y se sembraron alrededor de 400 µL de cepa en un medio TSA suplementado y se incubó bajo las condiciones de cultivo establecidas, obteniendo de esta manera la activación del aislamiento y verificando que las condiciones de almacenamiento y congelación fueron adecuadas.

### **3.3 Banco de cepas de *H. pylori***

Para llevar a cabo esta etapa fueron usadas muestras nuevas recolectadas en el Hospital Susana López y transportadas al laboratorio siguiendo el protocolo aprobado para el proyecto “expresión de los antígenos Lewis”. Se siguió el proceso de identificación, aislamiento, crecimiento y congelación bacteriana descrito en el ítem de aislamiento e identificación; se almacenaron las cepas que presentaron las siguientes características definidas para una muestra positiva: crecimiento puro sin contaminación, y pruebas positivas *H. pylori* (ureasa, catalasa y oxidasa) además que mediante observación microscópica de tinción Gram se observaron bacilos abundantes (con bajo o nulo de formas cocoides). Estas siguieron la metodología descrita anteriormente en la sección “aislamiento e identificación *H. pylori*”. Para el almacenamiento, el material biológico fue conservado en viales a -80°C en el ultracongelador (Thermo Scientific) para su preservación, se cuentan con dos viales de suspensión bacteriana de cada una de las muestras aisladas.



**Figura 7. Resumen del proceso metodológico para el aislamiento, identificación, multiplicación y almacenamiento de *Helicobacter pylori*.** **A.** corresponde al proceso de toma y transporte de la muestra, este último realizado en BHI + glicerol. **B.** se muestra un paso rápido del proceso de cultivo la imagen 2 corresponde a los medios utilizados B medio Tripticasa de Soya y A es el Agar Base Sangre; la imagen 3 al proceso de incubación y la imagen 4 corresponde a una caja de Petri sembrada con colonias presuntivas. En esta etapa realizamos las pruebas de identificación la imagen 5 donde se pueden observar colonias brillantes y extendidas por toda la caja, mientras que la imagen 6 nos revela la morfología más precisa redondeada y de borde liso características de *H. Pylori*; la imagen 7 es una prueba de ureasa positiva por su tonalidad rosada y la imagen 8 muestra la prueba catalasa con la producción de O<sub>2</sub> (burbujas); la imagen 9 se muestra una tira de prueba oxidasa donde se muestra positiva por su tono púrpura; la imagen 10 se aprecia a *H. pylori* en su forma de bacilo gran negativo. **C** muestra el proceso que seguimos para almacenar las cepas la imagen 11 muestra una caja de Petri con la bacteria crecida de manera abundante esta la tomamos con un hisopo y la guardamos en medio BHI + glicerol y finalmente la almacenamos en criocajas a -80°C imagen 12. Elaborado por: Aleiandra López Polanco.

### 3.4 Aplicación de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de Metronidazol y Amoxicilina

Los aislados de *H. pylori* almacenadas fueron descongeladas y se tomaron 400  $\mu$ L de la suspensión bacteriana, esta fue sembrada en una caja de cultivo con medio TSA suplementada e incubada en las condiciones indicadas anteriormente en la sección de aislamiento e identificación de *H. pylori*.

Según las guías expedidas por los comités internacionales encargados de determinar las pautas básicas a través de las cuales se pueden aplicar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, que se usaron como base para desarrollar este objetivo, se decidió aplicar la técnica del epsilómetro la cual está aprobada por la Administración de Drogas y Medicamentos (FDA) en Norteamérica y por el Comité Europeo de Antibiograma utilizando un medio de prueba estandarizado (CLSI, 2016; EUCAST, 2013)

Se utilizó la técnica de E-test® (bióMeurieux, Francia) para cada uno de los antibióticos, estas se aplicaron en medio Mueller-Hinton (Scharlau) el cual fue suplementado con 10% de Glóbulos rojos Equinos desfibrinados (Microgen ®) y Suplemento Vitox Oxoid™. Se usó la escala de turbidez de McFarland numero 3 como patrón para realizar una siembra comparable de cada muestra, a partir de un cultivo no mayor a 72 h se suspendió la bacteria en caldo BHI, Este proceso ayudó a no exceder la cantidad de bacteria sembrada.

Para la aplicación de la prueba de E-test® se realizó un inóculo a partir de cultivo puro, con una densidad bacteriana de 3 en la escala de McFarland la cual equivale a  $9 \times 10^8$  UFC y se sembró en medio con agar Mueller-Hinton (Scharlau). Se empleó una placa para cada anti-microbiano debido al tamaño de los halos. En cada caja de Petri se agregaron 200  $\mu$ L del inóculo el cual se distribuyó de manera homogénea en la caja, se esperó alrededor de 10 minutos para que el medio absorbiera parte de la bacteria y se procedió a depositar la tira de E-test®, adicionalmente se sembró una tercera caja para mantener un control de crecimiento sin tira de antibiótico. Se incubó bajo las siguientes condiciones 37°C, con 10% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 90%. Se realizaron lecturas a las 24h, 48h y 72 h. Además de esto se utilizó la cepa de referencia NCTC<sup>4</sup> 11637 como control para el crecimiento en el medio y para las pruebas aplicadas (Pereyra et al., 2017).

Las muestras fueron clasificadas en Sensible (S) y Resistente (R); utilizando los breakpoints o MIC (mg/L) del EUCAST<sup>5</sup> y el NCCLS<sup>6</sup>. Para su clasificación los aislamientos fueron considerados como resistentes a AMX (Amoxicilina) con un MIC > 0.5  $\mu$ g/ml y sensible con un MIC < 0.5. En el caso de MTZ (Metronidazol) el

---

<sup>4</sup> National Collection of Type Cultures, London

<sup>5</sup> Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos

<sup>6</sup> Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico

aislamiento se considera resistente con un MIC >8 µg/ml y se considera sensible con un MIC ≤ 8. En el proceso de lectura se tomó registro de los resultados y evidencia fotográfica durante las 3 revisiones para lograr una valoración más precisa utilizando adicionalmente la una caja #3 sin tira para referencia de crecimiento (EUCAST, 2013).

### 3.5 Definición de variables

**Tabla 3.** Definición de variables por escala y unidad de medición.

Tipo de Variable	Variable	Escala	Unidad de medición
Dependientes	TIPO DE MEDIO	Nominal	Agar Base Sangre/ Agar Tripticasa de Soya
	TIPO DE ANTIBIOTICO	Nominal	Amoxicilina/Metronidazol
Independiente	GENERO	Nominal <sup>7</sup>	Femenino / Masculino
	EDAD	Razón <sup>8</sup>	Años
	ESTADO CIVIL	Nominal	Soltero/Casado
	OCUPACIÓN	Nominal	Independiente/Ama de casa/Agricultor
	PROCEDENCIA	Nominal	Urbana/Rural
	NIVEL EDUCATIVO	Nominal	Primaria/Secundaria/Superior
	INGRESO ECONOMICO	Nominal	SMMLV
	SITIO DE LA MUESTRA	Nominal	Antro/Cuerpo
	CULTIVO	Nominal	Presencia/Ausencia/Contaminación
	ALMACENAMIENTO DEL AISLADO <sup>9</sup>	Nominal	Almacenado/No Almacenado
	PRUEBAS BIOQUIMICAS	Nominal	Positivo/Negativo
	TINCIÓN GRAM	Nominal	Positivo/Negativo
	PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA (AMX y MTZ)	Nominal	Sensible/Resistente

<sup>7</sup> Nominal: escala que clasifica las unidades de estudio en categorías basado en atributos o características.

<sup>8</sup> Razón: Datos cuantitativos que se caracterizan por un punto de cero absoluto, lo que significa que no hay un valor numérico negativo.

<sup>9</sup> Almacenamiento: Refiere a la variable en la que la cual hay una cantidad de bacteria suficiente para ser almacenada en el refrigerador a -80°C.

### 3.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis comparativo entre las condiciones de los medios de cultivo para la elección del más adecuado comparando los porcentajes de recuperación bacteriana en los dos medios evaluados. En el caso de las pruebas bioquímicas la unidad de medición positivo incluye pruebas catalasa, oxidasa y ureasa positivas. Con relación a la tinción Gram los bacilos y cocos gram negativos característicos de *H. pylori* se tomaron como una prueba positiva. Los datos obtenidos de estas variables fueron consignados en una base de datos en Excel®.

Se tomaron los datos de las encuestas sociodemográficas de los pacientes cultivados de la base de datos de SPSS IBM® v25 del proyecto “Antígenos de Lewis” evaluando media y desviación estándar en el caso de la edad y porcentaje en las demás variables. Se realizó una tabla de contingencia para los datos arrojados de positividad de antro y cuerpo.

Los datos preliminares de susceptibilidad obtenidos de algunos aislados de *H. pylori* con relación a los antibióticos AMX y MTZ fueron consignados en la base de datos de Excel® existente y estos se presentaron como una fracción matemática.

## 4 RESULTADOS

Los resultados son descritos acorde a los objetivos propuestos:

**Objetivo 1: *Adaptar las condiciones de transporte, crecimiento, almacenamiento y viabilidad del cultivo de Helicobacter pylori en el laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca.***

### Toma y transporte de la muestra

Con relación a la toma de la biopsia, por recomendación del gastroenterólogo, la muestra se colectó al inicio del procedimiento cuando la pinza aún no se había sumergido en formol, para de esta manera reducir el riesgo de contaminación y pérdida. En el ítem transporte se utilizó como único medio BHI con glicerol manteniendo una cadena de frío, sin evaluar ningún otro factor.

### 4.1 Cultivo de *H. pylori*

Los resultados obtenidos en la fase de estandarización en la cual se utilizaron 20 muestras donadas para someter a prueba los medios de cultivo en este proyecto fueron los siguientes: el medio de cultivo A presentó un porcentaje del 35% (7/20) de aislamientos sugestivos *H. pylori*, mientras que el medio de cultivo B tuvo un porcentaje de *H. pylori* mayor con un 55% (11/20). En el medio de cultivo B se observó un crecimiento mayor y numeroso de colonias sugestivas, mientras que en el medio de cultivo A se presentó un menor crecimiento y mayor contaminación con

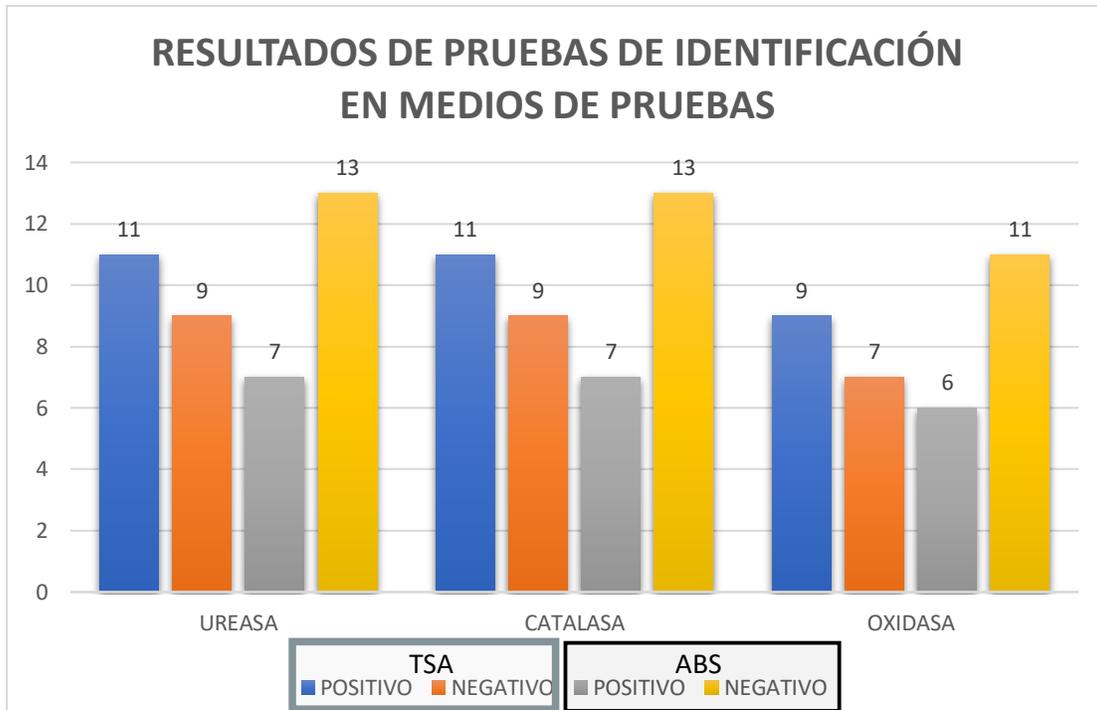
colonias grandes o abultadas, en este caso las pruebas fueron variables mostrando resultados como ureasa negativa y catalasa positiva o ureasa positiva y catalasa débil (Imagen 1A y 1B).



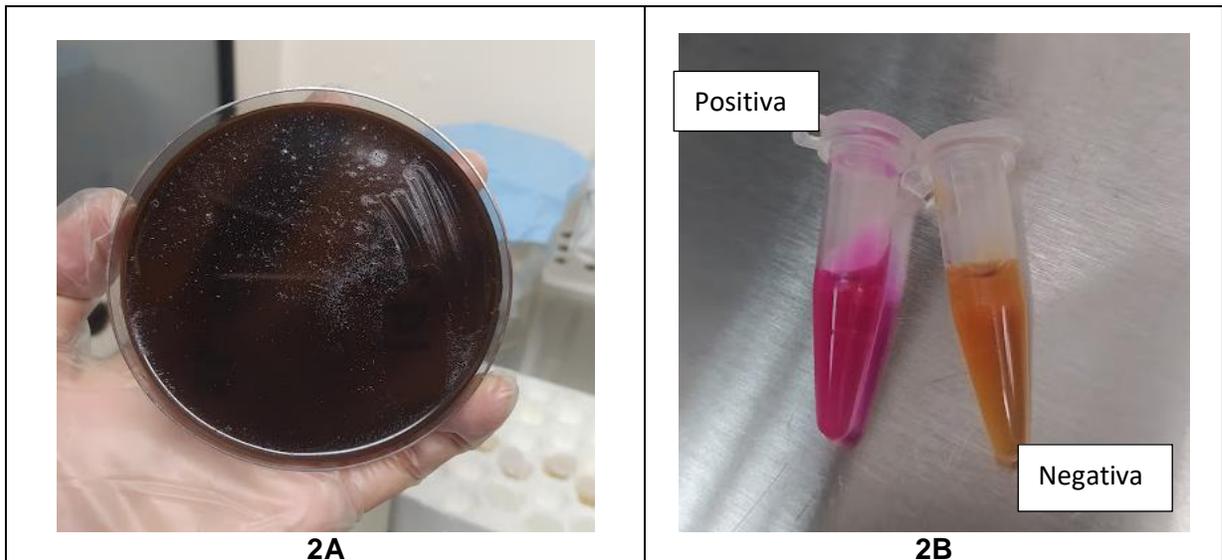
**Imagen 1. Comparación del crecimiento de los medios A y B para la recuperación de *H. pylori*.** 1A Corresponde al Agar Base Sangre el cual presentó un porcentaje menor de crecimiento y mayor de contaminación. 1B Agar Tripticasa de Soya el cual presentó mejor recuperación de la bacteria y un crecimiento abundante. Tomadas por: Alejandra López.

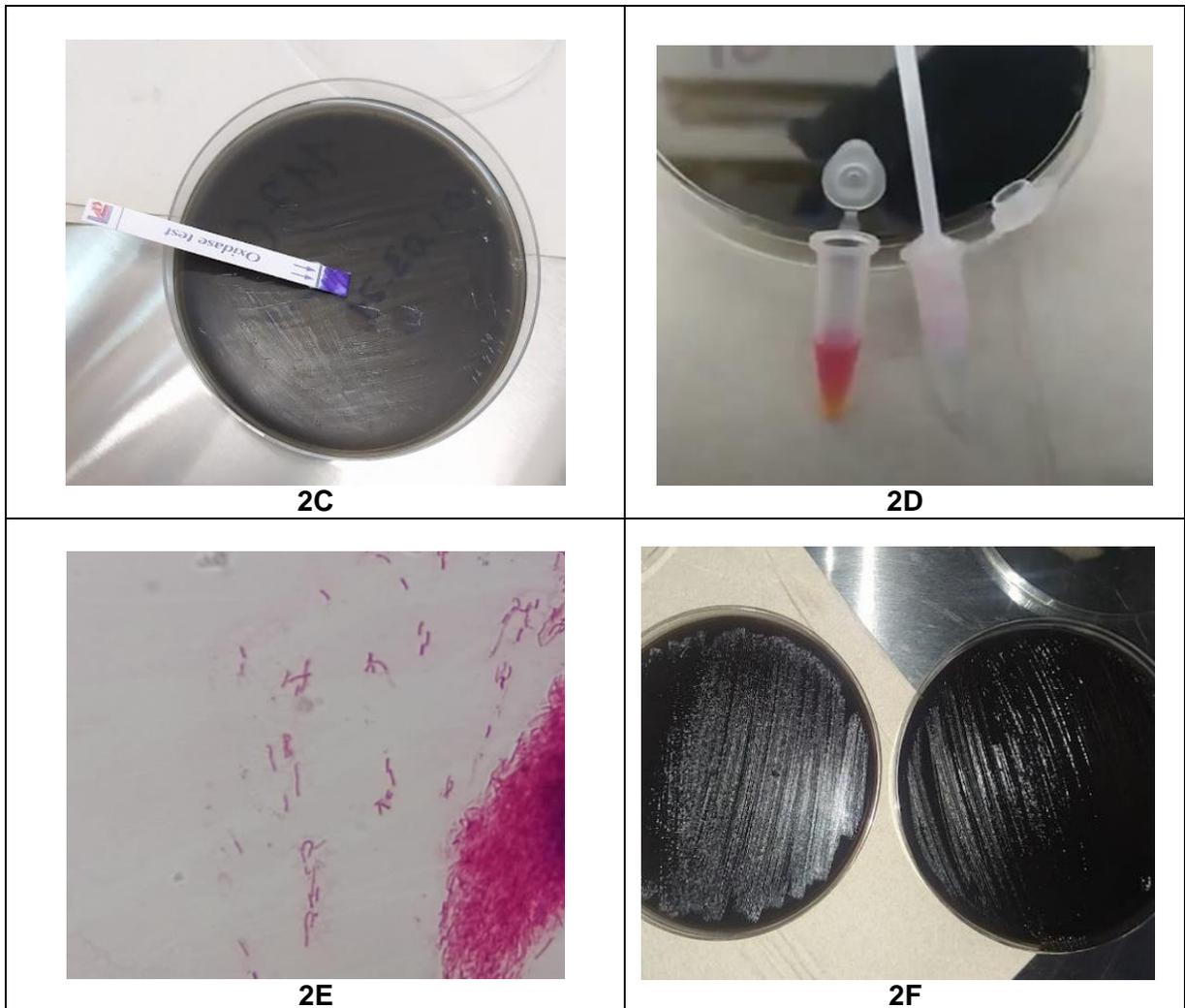
### ***Resultados de pruebas de identificación para *H. pylori****

La identificación de *H. pylori* se analizó bajo la variable crecimiento la cual fue positiva para el medio A 7/20, sin crecimiento 7/20 y contaminado 6/20 y para el medio B el crecimiento fue 11/20, sin crecimiento 5/20 y contaminación 4/20. Además, utilizamos las pruebas bioquímicas en los dos medios las cuales se agruparon en la figura 8, con relación a las pruebas ureasa y catalasa estas se aplicaron a la totalidad de las placas en las que se observaron colonias presuntivas, aunque en algunos casos cuando el cultivo estaba contaminado catalasa se mostró más débil de lo esperado; las pruebas de oxidasa se realizaron con una frecuencia menor. Con relación a la tinción Gram la presencia de bacilos y cocos característicos de *H. pylori* fueron el determinante para un resultado positivo en este caso, sin dejar a un lado la presencia de otros microorganismos sobre todo en las placas contaminadas.



**Figura 8. Grafica de barras de resultados de las pruebas bioquímicas en los medios de prueba para la recuperación de *H. pylori*.** Las columnas azules y grises representan los valores positivos para las diferentes pruebas realizadas en la identificación de la bacteria. Mientras que las columnas naranja y amarilla representan en todos los casos los valores negativos para cada medio en el cual se realizó el ensayo.





**Imagen 2. Proceso de recuperación y pruebas bioquímicas de *Helicobacter pylori*.** 2A) Se observar una siembra en TSA con presencia de colonias presuntivas de *H. pylori*. 2B) La aplicación de la prueba de ureasa positiva. 2C) Aplicación de la prueba de Oxidasa que arroja un resultado positivo. 2D) Muestra del resultado de las pruebas de Ureasa y Catalasa en las dos es positiva. 2E) Imagen de una placa en el microscopio con la Tinción de Gram en 100X en la cual se observa la forma bacilar de la bacteria. 2F) Cajas de Petri donde observamos a la bacteria totalmente aislada y con crecimiento abundante lista para almacenar. Tomadas: Alejandra López.

**Objetivo 2: Consolidar un banco de aislamientos a partir de las biopsias de pacientes con lesiones gástricas en el laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca.**

Una vez las condiciones del cultivo fueron estandarizadas se utilizó el medio B para el desarrollo de este objetivo; se procesaron y sembraron 154 muestras gástricas,

las cuales correspondieron a 77 pacientes que llegaron a la unidad de endoscopia del hospital Susana López de Valencia, en el periodo 2020-2021, las muestras procesadas pertenecieron a 54 (70,1%) mujeres y 23 (29,9%) hombres, con una edad promedio de  $47,96 \pm 15,08$  años y  $53,36 \pm 15$  años respectivamente.

Cuando se agruparon los pacientes por edad se observó que 40,3% estuvo entre 41 a 60 años, un 37,7% se encontró entre 18 y 40 años, mientras solo el 22,1% fue mayor a 61 años. (Tabla 4)

Algunas otras variables relacionadas con las características sociodemográficas (estado civil, procedencia, ingresos, educación y ocupación) de la población de estudio se presentan en la tabla 3. En esta muestra un 61% de los pacientes pertenecía al área rural o rural disperso en comparación con 39% que provenía del área urbana. de forma similar el 63,7% se agrupado en estado casado(a) o unión libre, un 66,2% de la población declaró no tener ningún tipo de ingreso económico, Por otra parte, la ocupación predominantemente de 53,2%, con ama de casa mientras que en el nivel educativo el 55,8% de los participantes estuvo en básica primaria.

**Tabla 4. Descripción de las características sociodemográficas de la muestra de estudio.**

	<b>Características</b>	<b>n = 77</b>	<b>(%)</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	23	(29,9)
	Femenino	54	(70,1)
<b>Edad</b>	Media: $47,96 \pm 15,08$		
	18 a 40 años	29	(37,7)
	41 a 60 años	31	(40,3)
	61 a 80 años	17	(22,1)
<b>Estado civil</b>	Casado/U. libre	49	(63,7)
	Soltero/separado/viudo	28	(36,3)
<b>Procedencia</b>	Urbana	30	(39,0)
	Rural cabecera/ disperso	47	(61,0)
<b>Ingresos</b>	No ingresos	51	(66,2)
	<1SMMLV	18	(23,4)
	1SMMLV	5	(6,5)
	>1SMMLV	3	(3,9)
<b>Educación</b>	Primaria	43	(55,8)
	Secundaria	18	(23,4)
	Superior	16	(20,8)

<b>Ocupación</b>	Ama de casa	41	(53,2)
	Agricultor	14	(18,2)
	Independiente	22	(28,6)

Con relación al cultivo se encontró que 100 de las 154 muestras cultivadas (65%), fueron positivas para *H. pylori* con base en criterio de observación macroscópica y pruebas de identificación mientras que 54 de las muestras (35%) fueron negativas (Figura 9) (Imagen 3).



**Figura 9. Diagrama de pastel que muestra los resultados de cultivo.** El diagrama muestra los porcentajes de crecimiento de *H. pylori*.

y SabA de *Helicobacter pylori*: un estudio en pacientes con lesiones gástricas  
 FORMATO DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA CULTIVO DE BIOPSIAS  
 ID: 4966

CÓDIGO	FECHA DE TOMA	LUGAR DE TOMA DE LA MUESTRA	FECHA DE CULTIVO	RESULTADO	PRUEBAS BIOQUÍMICAS				FECHA DE ALMACENAMIENTO	# de VIALES
					Úrea	Cata	Oxid.	T.Gram		
107 C	17-02-21	Cuerpo	17-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓	24-02-21	2V
107 A	17-02-21	Antro	17-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓	24-02-21	2V
108 C	17-02-21	Cuerpo	17-02-21							
108 A	17-02-21	Antro	17-02-21							
109 C	17-02-21	Cuerpo	17-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓	24-02-21	2V
109 A	17-02-21	Antro	17-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓	24-02-21	2V
110 C	19-02-21	Cuerpo	19-02-21							
110 A	19-02-21	Antro	19-02-21							
111 C	19-02-21	Cuerpo	19-02-21							
111 A	19-02-21	Antro	19-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓		
112 C	19-02-21	Cuerpo	19-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓	24-02-21	2V
112 A	19-02-21	Antro	19-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓	24-02-21	2V
113 C	19-02-21	Cuerpo	19-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓	24-02-21	2V.
113 A	19-02-21	Antro	19-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓		
114 C	22-02-21	Cuerpo	24-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓	01-03-21	2V
114 A	22-02-21	Antro	24-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓	01-03-21	2V
115 C	22-02-21	Cuerpo	24-02-21							
115 A	22-02-21	Antro	24-02-21							
116 C	22-02-21	Cuerpo	24-02-21	Positivo	✓	✓	✓	✓		

**Imagen 3. Formato de registro de resultados de las muestras de cultivo.**

Además, se logró apreciar que la recuperación de la bacteria a partir de las dos áreas de las cuales se obtuvieron las muestras fue similar; la positividad del crecimiento de la bacteria a partir de la zona antral del estómago fue de 51 pacientes (66,2 %) mientras que el crecimiento de la bacteria a partir del área del epitelio gástrico conocido como cuerpo, fue positiva en 49 individuos (63,3%).

Por otro lado, se realizó una comparación entre las dos áreas de toma de muestras, y mediante una tabla cruzada se evidencio que 59,7% de los individuos presento *H. pylori* tanto en antro como en cuerpo, mientras que 29,9% no se encontró evidencia por cultivo. Únicamente 3,9% (3) de los aislamientos fueron encontrados únicamente en cuerpo y 6,5% (5) solo en antro (Tabla 5).

**Tabla 5. Tabla cruzada de la positividad de *Helicobacter pylori* en antro\*  
*Helicobacter pylori* en cuerpo**

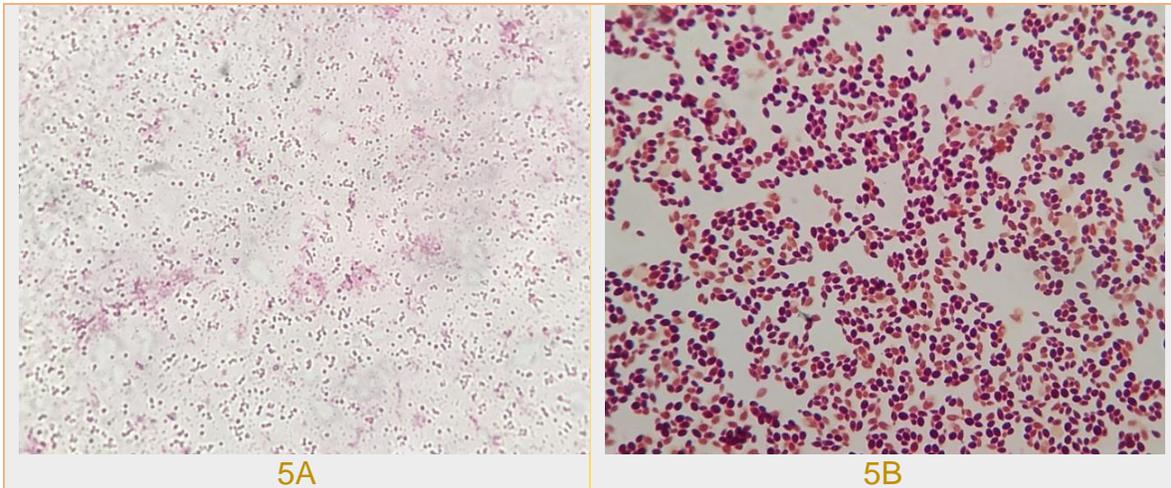
		<i>H. pylori</i> en cuerpo		Tota
		Negativo	Positivo	
<i>H. pylori</i> en antro	Negativo	23	3	26
	Positivo	5	46	51
Total		28	49	77

#### 4.2 Banco de cepas de *H. pylori*

Para establecer el banco de aislamiento de *H. pylori* se usaron las muestras obtenidas en el objetivo dos, de las 100 cepas que arrojaron un resultado positivo para *H. pylori*, en el banco se registraron 55 aislamientos recuperados viables luego de ser descongelados. Por el contrario 45 de las cepas no se lograron almacenar en el banco por causas como contaminación y el crecimiento insuficiente de la bacteria, o al cambio de morfología de bacilo a coco, lo cual afectó la viabilidad considerablemente (Tabla 6) (Imágenes 5A y 5B).

**Tabla 6. Resumen de las muestras almacenadas en el banco del Laboratorio de Genética Humana.**

<b>ALMACENADOS</b>	ACTIVOS VIABLES	55
<b>NO ALMACENADO</b>	POR CONTAMINACIÓN	7
	CRECIMIENTO INSUFICIENTE o FORMAS COCOIDE	38
<b>TOTAL</b>		100

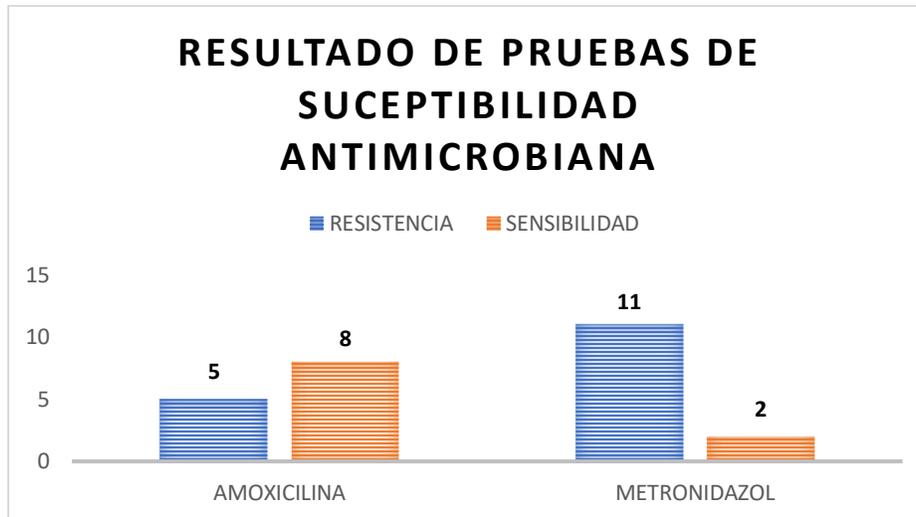


**Imagen 5. Ejemplos de reducción de viabilidad en cepas.** Estas placas corresponden a la tinción de Gram; en la imagen 5A en 100X se puede observar la presencia de *H. pylori* de un cultivo en el que se observa la presencia de cocos; mientras que la imagen 5B en 100X corresponde a una placa contaminada en la cual se observa a *H. pylori* con tono rosa una forma bacilar pequeña, mientras que las formas redondeadas de un color púrpura más intenso es un contaminante no identificado.

**Objetivo 3: Establecer los parámetros básicos para la aplicación de la prueba de sensibilidad y resistencia antimicrobiana para Metronidazol y Amoxicilina a partir de los aislamientos de *Helicobacter pylori* obtenidos en laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca.**

#### **4.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori***

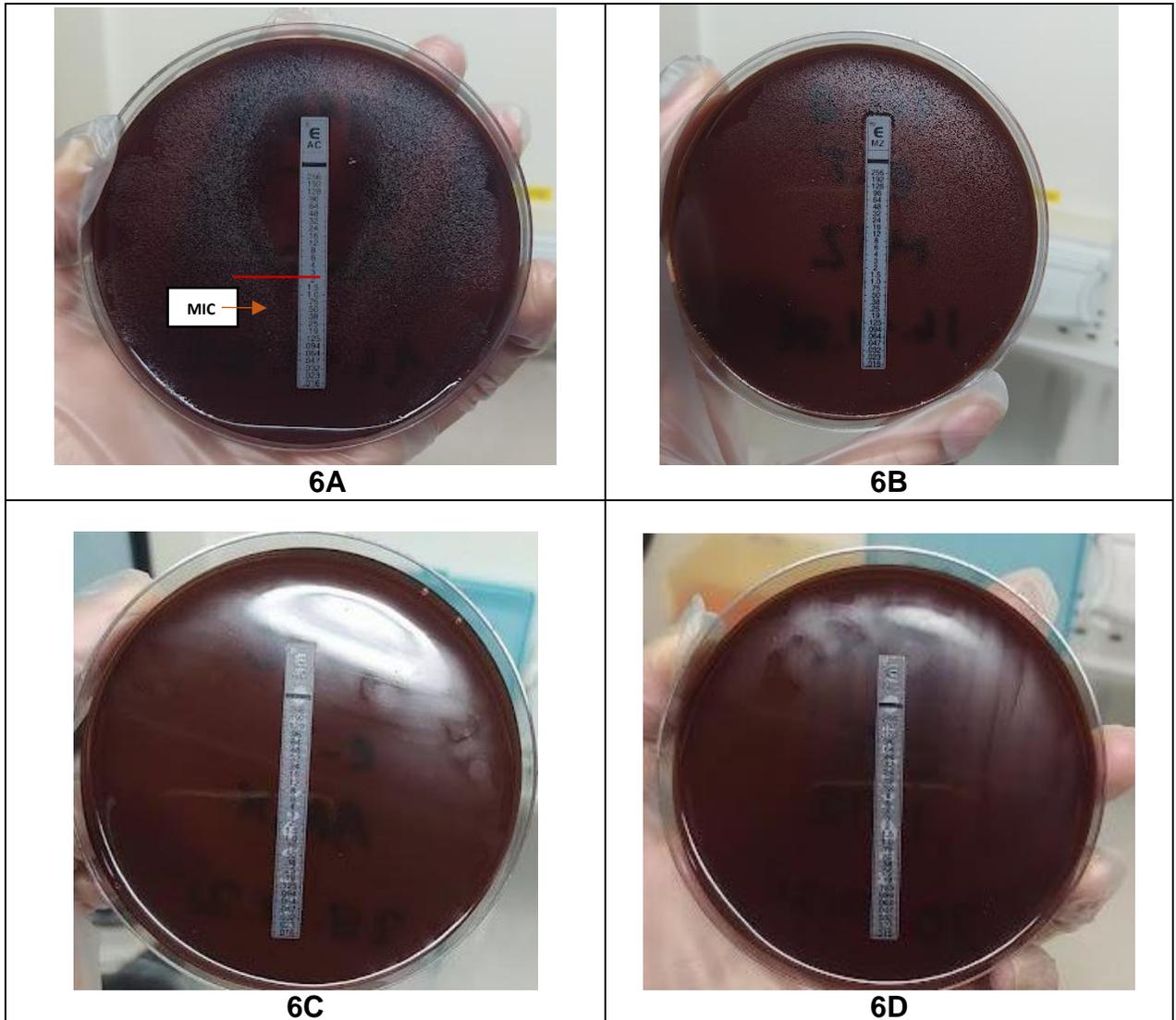
Una de las aplicaciones del cultivo de *H. pylori* es la posibilidad de realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Se aplicó la prueba de E-test® de AMX y MTZ a un total de 13 aislamientos escogidos al azar obtenidos en el desarrollo de este proyecto (Figura 10); como se muestra en la tabla 7 se encontró que los aislamientos mostraron una resistencia para Amoxicilina de 5/13, mientras que en este caso la sensibilidad fue de 8/13. Con relación a Metronidazol la resistencia fue de 11/13, y la sensibilidad llegó tan solo a 2/13 de los aislamientos evaluados (Imagen 6).



**Figura 10. Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana AMX y MTZ**

PACIENTE	OBSERVACIONES			UREA	CATA	OXID	GRAM	REPIQUES	BANCO	ANTIBIO	AMX		MTZ	
											48 h	72h	48h	72h
150 C	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	P	P	B	R-1	2V	SI	S	S	R	R
150 A	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	P	P	B	R-1	2V	SI	S	S	R	R
151 C	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	P	P	C	R-1						
151 A	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	P	P	C	R-1						
162 C	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	D	P	C	R-1						
162 A	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	D	P	C	R-1						
163 C	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	P	P	B	R-1	2V	SI	S	S	R	R
163 A	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. p + CNT</i>	P	P	P	B	R-1	2V	SI	R	R	R	R
164 C	<i>H. p ??</i>	CNT	CNT	N	N	N	N	R-1						
164 A	<i>H. p ??</i>	CNT	CNT	N	N	N	N	R-1						
165 C	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	P	P	B	R-1	2V	SI	S	S	R	R
165 A	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	P	P	B	R-1	2V	SI	S	S	R	R
166 C	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	P	P	B	R-1	2V	SI	R	R	S	S
166 A	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	<i>H. pylo</i>	P	P	P	B	R-1	2V	SI	S	S	?	?

**Tabla 7. Registro de resultados de revisión de muestras.** En plantilla observamos una tabla de registro de resultados de cultivo que tiene en la zona derecha un registro de revisión de la aplicación de las pruebas de sensibilidad. CNT: contaminado - P: positivo - D: débil - N: negativo - B: bacilo - C: coco - V: vial - S: sensible - R: resistente.



**Imagen 6 Resultados de la aplicación de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana para Metronidazol y Amoxicilina. 6A-B** Corresponden a una cepa la cual arrojó un resultado de RESISTENCIA a los dos antibióticos, en A la línea roja nos indica en donde comienza a formarse el halo de sensibilidad el cual está por encima del MIC establecido, indicado en la flecha naranja. Contrario las imágenes **6C-D** corresponden a una cepa la cual se observa un resultado de SENSIBILIDAD en la prueba de e-TEST.

## 5 DISCUSIÓN

El cultivo bacteriano es una herramienta muy útil para la identificación, diagnóstico y evaluación de infecciones, así como muchas otras aplicaciones en ámbitos de industria alimenticia o animal; además las técnicas de cultivo de alto rendimiento y los enfoques que aprovechan la formación de biopelículas son enfoques nuevos que presentan futuros prometedores en la investigación (Overmann et al., 2017). Con relación al cultivo de *H. pylori* esta es la única prueba con 100% de especificidad para el diagnóstico de la bacteria a pesar de que su sensibilidad es ligeramente menor a la de otras pruebas con un valor de 93%, esta sensibilidad se ve afectada por la exigencia en su naturaleza, la distribución de *H. pylori* dentro del estómago y alto riesgo de contaminación y pérdida en el proceso de toma de la muestra según Opavski et al., en el 2007.

El cultivo cuenta con dos ventajas relevantes, la primera es la oportunidad de aplicar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana a través de las cuales se puede ayudar a construir esquemas de tratamiento de erradicación de la bacteria; y la segunda es la única forma que permite obtener bacteria necesaria para almacenamiento y el posterior uso de esta para estudios genéticos o moleculares, herramienta que nos permite una caracterización detallada de la bacteria (Cutler et al., 1995).

Hasta el momento en el departamento del Cauca no se han registrado estudios que aborde el cultivo de *H. pylori* y la creación de un banco de aislamientos de este microorganismo para la región suroccidental del país. Adicionalmente, se debe destacar que en la revisión bibliográfica el uso de esta técnica se encuentra cada vez menos referenciada en los artículos por el crecimiento en el uso de técnicas moleculares, debido a esto consideramos que es importante retomar el uso de esta herramienta para el curso investigativo y diagnóstico.

De la misma manera, esta técnica no es muy popular en los laboratorios ni en el diagnóstico clínico, debido a las desventajas que puede tener, entre las que se pueden destacar el alto costo, la necesidad de personal capacitado y el alto consumo de tiempo, además de esto *H. pylori* es un organismo con requerimientos y condiciones muy específicas para su recuperación y crecimiento. Además, en el departamento del Cauca no existen estudios de aislamiento de cultivo como una técnica invasiva complementaria además de los histopatológicos realizados con la biopsia o los no invasivos como prueba de aliento o detección del antígeno en heces (Cava & Cobas, 2003)(Otero Regino, 2013).

El cultivo a partir de especímenes clínicos como biopsia gástrica presenta serias dificultades, las tasas de aislamiento oscilan entre 23,5% y 97% dependiendo de factores como los componentes del medio de cultivo, el transporte de las biopsias, los métodos de toma de la biopsia, la automedicación de los pacientes con

inhibidores de bomba de protones/antibióticos (Bedoya et al., 2017; Yin et al., 2009). En nuestro trabajo se aplicó un protocolo lo suficientemente consistente para el aislamiento de *H. pylori* el cual nos permitió tener una tasa de recuperación moderada con un valor de 60%.

El cultivo en *H. pylori* es complejo, no solo por lo nombrado anteriormente, sino porque es una bacteria que al momento en que adquiere su forma cocoide por envejecimiento o condiciones desfavorables (modificación de pH, tensión en temperatura, oxígeno, ausencia de nutrientes o exposición a antibióticos) aumenta la dificultad para su obtención, adicionalmente a esto se debe tener en cuenta que su nicho es el estómago, un órgano que a pesar de su hostilidad le provee de todas las condiciones para mantener su forma bacilar y poder establecerse (Francis Mégraud & Lehours, 2007), por estas razones el estudio de las condiciones en el laboratorio que le proporcionen un ambiente que remplace sus necesidades para establecerse fuera del cuerpo humano ha sido impulsado desde su descubrimiento, por lo anterior en este estudio se realizó una comparación en la recuperación de dos medios Agar Base Sangre (ABS) y Agar Tripticasa de Soya (TSA); el agar base sangre en estudios previos ha logrado una tasa de recuperación superior al 90% como se reporta por Testerman et al., en el 2001 el cual se muestra más alto al 35% que logramos en este estudio, se debe tener en cuenta que valor aportado por Testerman se logra por el uso del medio junto con sustratos definidos, colesterol y B- ciclodextrina, elementos que lo convierten en un medio de alto costoso y de baja posibilidad de replicación (Testerman et al., 2001).

Además, se debe tener en cuenta que, a pesar de no lograr una recuperación alta, en este estudio el medio TSA obtuvo un rendimiento adecuado, resultado que se compara con hallazgos previos en la zona del eje cafetero colombiano por Bedoya et al., en el 2017 y Ramirez & Ospina, en el 2018 cuyos valores en las tasas de recuperación se muestran cercanas al 60%. En esta investigación no se observó un mayor impacto en las condiciones de transporte o siembra sobre el crecimiento bacteriano a pesar de lo sugerido por Bayona Rojas, 2013, donde se especifica y recomienda que la muestra debe ser triturada en solución salina antes de ser inoculada.

Con relación a la recuperación del microorganismo a partir de cultivo, la tasa que se presentó en este estudio llega a el valor del 65% (100/154) cifra que es muy cercana a la obtenida con Bedoya et al., 2017 estudio en el cual trabajan con un medio de similares características al usado en este proyecto en el que la tasa de recuperación llega al 59,2% en la zona del eje cafetero colombiano.

Abordando la prevalencia de la infección por *H. pylori*, esta se ve relacionada fuertemente con la procedencia de la población, en este estudio el 61% de los pacientes proviene de zonas rurales, dato que establece que en el departamento del Cauca la mayor parte de su población se concentra en esta zona, se ha sugerido que la infección está afectada por las condiciones de vida deficientes que podría

favorecer la adquisición de la bacteria y posterior curso de esta infección (Parente et al., 2006). Por lo tanto, el acceso a recursos como agua potable sanitizada, alcantarillado entre otros, podrían reducir la presencia y persistencia de la infección en las zonas rurales del departamento. Estos resultados son consistentes con estudios que relacionan la incidencia de la infección por *H. pylori* con la región geográfica, específicamente con la alta prevalencia de este microorganismo en países en vías de desarrollo (Yilmaz & Koruk Özer, 2019).

Por otro lado, se debe resaltar que de los 54 pacientes que arrojaron un resultado positivo para *H. pylori* se obtuvieron 100 aislamientos, los cuales estuvieron distribuidos de manera similar en antro y cuerpo con 66,2% y 63,3% respectivamente, en contraste con la hipótesis que refiere la presencia de la bacteria con preferencial en el antro debido a la presencia de células productoras de ácido en cuerpo, esto tendería a reducir la presencia de bacteria. Sin embargo, como pacientes ya tengan gastritis o atrofia y la inflamación esto afecta las células y favorece su persistencia (Crowe, 2019).

La prueba de E-test® es una tira de plástico que contiene un gradiente de antibiótico predefinido, continuo y exponencial en un lado y una escala de CMI graduada que cubre 15 diluciones dobles en el sitio opuesto. La CMI se puede leer directamente de la escala impresa en la tira en el punto donde el borde de la elipse de inhibición del cultivo bacteriano se cruza con la tira. Esta prueba tiene un patrón estable de liberación de antibióticos y se ha encontrado que tolera la incubación prolongada. Esta es la razón principal por la cual se ha recomendado la prueba en lugar del método de difusión del disco para *H. pylori* (Buitrago et al., 2019; Piccolomini et al., 1997).

De la misma manera, en este proyecto se pretendió continuar la investigación con la aplicación de pruebas de sensibilidad antimicrobiana como un ensayo piloto en algunas de las muestras que se obtuvieron para el banco de aislamientos. En los resultados se observa que la resistencia de *H. pylori* a Metronidazol es del 84,6% (11/13) valor comparado con registros previos de Trespalacios et al., en el 2010 estudio que registró un valor de resistencia para MTZ de 81%, estos valores se consideran altos comparados con el reporte de Martínez M. et al., en el 2014 para América Latina en el cual el valor para la resisten a MTZ fue 65%. En el caso de la Amoxicilina la resistencia presentó un valor 38,5% (5/13) este contrasta en comparación con los reportes de Trespalacios et al., en el 2010 y Martínez M. et al., en el 2014 los cuales reportan valores de resistencia de 3,8%, y 6,5% respectivamente.

Los datos arrojados en este estudio se pueden comparar con los obtenidos en China por Wang et al., en el 2019 estudio en el que se reportan valores de resistencia de 78% y 31% para MTZ y AMX respectivamente, mientras que en una revisión sistemática que se realiza para América Latina en el 2014 por Camargo et al., en los artículos entre los años 1988 y 2011 los reportes muestran datos de resistencia

de 53% para MTZ y 4% para AMX, datos que solo evidencian un alarmante incremento de resistencia de la bacteria. Se debe considerar que la resistencia primaria de *H. pylori* a los antibióticos usados en las diferentes terapias de erradicación es una de las principales causas del fracaso de los tratamientos y en parte es el responsable de la persistencia de la infección. Estos resultados preliminares nos indican que se debe incrementar el seguimiento y la vigilancia de esta infección, así como a las áreas donde la bacteria persiste en la región caucana.

Finalmente, este proyecto constituye un avance en la investigación para conocer a *H. pylori* y para reconocer al cultivo como una herramienta que puede ayudar a entender el origen y los cambios que esta bacteria ha sufrido en el territorio. Además de esto, la posibilidad obtener información de aplicación clínica como lo son las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante la cual se puede construir y fortalecer las vías de tratamiento contra la infección a nivel nacional, convirtiendo este instrumento en un aliado para el diagnóstico en pro de contrarrestar la prevalencia de la infección y así mismo ayudar a reducir las enfermedades gástricas asociadas, así como el cáncer gástrico.

## 6 CONCLUSIONES

- Según nuestro estudio se pudo concluir que las condiciones del cultivo que nos permitieron una mayor recuperación de *H. pylori* a partir de biopsia fueron el uso del Agar Tripticasa Soya suplementado con 7 % de Glóbulos rojos de caballo desfibrinados, 10% de suero Bovino Adulto, 2 mL de Suplemento de enriquecimiento Vitox Oxoid™ y 4 mL de suplemento Selectivo para *Helicobacter pylori* Oxoid™, las condiciones de incubación fueron 37°C, 5% O<sub>2</sub>, con 10% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 95%.
- En este estudio se desarrolló de manera eficaz el protocolo de cultivo de *H. pylori*, logrando establecer un banco de cepas viables de esta bacteria congeladas a -80°C en el laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca. Este proceso también nos permitió la identificación de otras formas de la bacteria que no son viables.
- Se logran establecer los parámetros básicos para la aplicación de pruebas de sensibilidad antimicrobiana los cuales fueron el uso de medio Mueller Hinton, 10 % de sangre de caballo y 2 mL de Vitox Oxoid™; 300 µL de suspensión bacteriana en escala 3 de McFarland con lecturas de 48 a 72 h.
- Se establecieron los primeros resultados de una prueba piloto para el suroccidente del país sobre sensibilidad a los antimicrobianos en la cual mostró que la resistencia al Metronidazol fue del 11/13 mientras que para Amoxicilina 5/13, mostrando de esta manera que los patrones de resistencia de la región suroccidental del país siguen creciendo progresivamente.

## 7 RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar el número de muestras que hacen parte del banco, con el propósito de enriquecer este recurso, debido a que en un futuro se puede hacer uso de este material para investigaciones que puedan enriquecer el conocimiento de la región suroccidental del país.
- Además, también se recomienda con una nueva propuesta de investigación ampliar el número de muestras y el panel de antibióticos usados con el propósito de entender los procesos de resistencia de este patógeno en él Cauca.
- Se hace la sugerencia de plantear un estudio a nivel molecular donde podamos establecer que mecanismos de resistencia están presentes en *H. pylori* en la región suroccidental y compararlos con otros estudios nacionales e internacionales.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- Alarcón, T., Baquero, M., Domingo, D., López-Brea, M., & Royo, G. (2004). Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Procedimientos En Microbiología Clínica*, 1–25. [www.seimc.org](http://www.seimc.org)
- Arana, J. C., & Bautista, A. C. (2004). Cáncer Gástrico. *Revista de La Facultad de Medicina - UNAM*, 47, 204–209. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2004/un045f.pdf>
- Arena, F., Viaggi, B., Galli, L., & Rossolini, G. M. (2015). Antibiotic susceptibility testing: Present and future. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(10), 1128–1130. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000844>
- Atherton, JC, et al. (1995). Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. *The Journal Biological Chemistry*, 270(July 28).
- Bai, H., Li, Q., Liu, X., & Li, Y. (2010). Characteristics and interactions of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-infected human gastroduodenal epithelium in peptic ulcer: A transmission electron microscopy study. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(1), 82–88. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0697-9>
- Bayona Rojas, M. A. (2013). Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 28(2), 94–99.
- Bedoya, I. J., Alvarez, A., Moncayo, J. I., Guaca, Y. M., & Santacruz, J. J. (2017). 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 Médica de Risaralda*, 23(2), 29–33. <https://doi.org/10.22517/25395203.14081>
- Bendesky. (2001). Metronidazol: una visión integral Andrés. *Revista de La Facultad de Medicina*, 44(6). <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2001/un016e.pdf>
- Bermúdez Díaz, L., Ernesto Torres Domínguez, L., & Rodríguez González, B. L. (2009). Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Medicina*, 48(1), 1–14.
- Buitrago, M. A., Ramirez, L., Mejia, M., & Álvarez, A. L. (2019). Cultivo y métodos fenotípicos para determinar el perfil de susceptibilidad en *Helicobacter pylori*. *MICRO-CIENCIA*, 148–161.
- Camargo, M. C., García, A., Riquelme, A., Camargo, C. A., Hernandez-garcía, T., Candia, R., Bruce, M. G., & Rabkin, C. S. (2014). Systematic Review in Latin America. *The American Journal of Gastroenterology*, 109(4), 485–495. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.24.The>
- Cancerología, I. N. de. (2017). *POE: Cultivo e identificación de Helicobacter pylori*.
- Cava, F., & Cobas, G. (2003). Dos décadas de *Helicobacter pylori*. *Vaccimonitor*, 1, 1–10. <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v12n1/vac01103.pdf>
- Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2008). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales. *Anales de Pediatría Continua*, 7(I), 169–172.

<https://doi.org/10.1016/b978-84-458-1845-9.50012-8>

- Cervantes, E. G. (2006). Helicobacter pylori e infecciones asociadas. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 49(004), 163–168.
- Cervantes, G. (2016). Diagnostico y tratamiento de infecciones causadas por Helicobacter pylori. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 63(4), 179–189. <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2016/pt164c.pdf>
- Chacaltana, A., Rodríguez, C., Urday, C., Ramon, W., Espinoza, J., Velarde, H., Rodríguez, I., Lucho, E., & Rauch, E. (2009). Lesiones Gástricas Preneoplásicas y Helicobacter Pylori en Despistaje Endoscópico para Cáncer Gástrico en Población de Nivel Socioeconómico Medio y Alto. *Rev. Gastroenterol. Perú*, 29(3), 218–225.
- Chuah, S.-K., Tsay, F.-W., Hsu, P.-I., Wu, D.-C., & Mcgee, D. J. (2011). A new look at anti-Helicobacter pylori therapy. *Helicobacter Pylori Therapy. World J Gastroenterol*, 17(35), 1095. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i35.3971>
- Cisneros, S. (2009). *MECANISMOS DE RESISTENCIA DE Helicobacter pylori A LOS ANTIBIÓTICOS AMOXICILINA, CLARITROMICINA, LEVOFLOXACINA Y METRONIDAZOL.*
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2016). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. *CLSI Guideline M45*, 3, 19.
- Correa, P. (2011). Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. *Revista Colombiana de Cirugía*, 111–117.
- Crowe, S. E. (2019). Helicobacter pylori Infection. *New England Journal of Medicine*, 380(12), 1158–1165. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1710945>
- Cuenta de Alto Costo. (2019). *Cáncer - Morbimortalidad - Demográfico.* <https://cuentadealtocosto.org/site/higia/cancer-morbimortalidad-demografico/>
- Cutler, A. F., Havstad, S., Ma, C. K., Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., & Schubert, T. T. (1995). Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology*, 109(1), 136–141. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90278-3](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90278-3)
- De Vries, A. C., Haringsma, J., & Kuipers, E. J. (2007). The detection, surveillance and treatment of premalignant gastric lesions related to Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00475.x>
- Dixon, M. F., Genta, R. M., Yardley, J. H., Correa, P., Batts, K. P., Dahms, B. B., Filipe, M. I., Haggitt, R. C., Haot, J., Hui, P. K., Lechago, J., Lewin, K., Offerhaus, J. A., Price, A. B., Recavarren, S., Riddell, R. H., Sipponen, P., Solcia, E., Stolte, M., & Watanabe, H. (1996). Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *The American Journal of Surgical Pathology*, 20(10), 1161–1181. <https://doi.org/10.1097/00000478-199610000-00001>
- Dunn, B. E., Cohen, H., & Blaser, M. J. (1997). Helicobacter pylori. *American Society for Microbiology*, 10(6), 720–741. <https://doi.org/10.29309/tpmj/18.4959>
- EUCAST. (2013). *EUCAST (Comité europeo del antibiograma): armonización en Europa*

con el acuerdo del ECDC y la EMA. 51. Visitado: 10-10-2021

- Figuroa, M., Cortés, A., Pazos, Á., & Bravo, L. E. (2012). Sensibilidad *in vitro* a amoxicilina y claritromicina de helicobacter pylori obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomedica*, 32(1), 32–42.
- Freeman, C. D., Klutman, N. E., & Lamp, K. C. (1997). Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs*, 54(5), 679–708. <https://doi.org/10.2165/00003495-199754050-00003>
- Frías, J. S., & Otero, W. (2017). [Practical issues in diagnostic tests for Helicobacter pylori infection: a narrative review]. *Revista de Gastroenterología Del Peru : Organo Oficial de La Sociedad de Gastroenterología Del Peru*, 37(3), 246–253. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29093589>
- Fritz, J. H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Magalhaes, J. G., Fsihi, H., Kufer, T. A., Collins, C., Viala, J., Ferrero, R. L., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2007). Nod1-Mediated Innate Immune Recognition of Peptidoglycan Contributes to the Onset of Adaptive Immunity. *Immunity*, 26(4), 445–459. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.009>
- Gatta, L., Ricci, C., Tampieri, A., & Vaira, D. (2003). *R E V I E W Non-invasive techniques for the diagnosis of Helicobacter pylori infection*. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00707.x>
- Gerrits, M. M., van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., & Kusters, J. G. (2006). Helicobacter pylori and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infectious Diseases*, 6(11), 699–709. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70627-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70627-2)
- Gisbert, J., Molina, J., Amador, J., Bermejo, F., Bujanda, L., Calvet, X., Castro-fernández, M., Lanás, Á., Martín, C., Argila, D., Mearin, F., & Montoro, M. (2016). IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por Helicobacter pylori. *Gastroenterología y Hepatología Wwww.Elsevier.Es/Gastroenterologia*, 39(10), 679–721.
- Gisbert, J. P. (2011). Enfermedades relacionadas con helicobacter pylori: dispepsia, úlcera y cáncer gástrico. *Gastroenterol Hepatol*, 34(Supl 1), 16–27.
- Gisbert, J. P., & McNicholl, A. G. (2017). Optimization strategies aimed to increase the efficacy of H. pylori eradication therapies. *Helicobacter*, 22(4), 1–13. <https://doi.org/10.1111/hel.12392>
- GLOBOCAN. (2018). *Stomach*. International Agency for Research on Cancer - WHO. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf>. Visitado: 22-11-2021
- GLOBOCAN. (2020). *Colombia*. International Agency for Research on Cancer - WHO. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf> visitado: 13-06-2021
- Gómez Zuleta, M., Otero Regino, W., & Ruiz Lobo, X. (2009). Factores de riesgo para cáncer gástrico en pacientes colombianos. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 24(2), 134–143.
- Goodwin, C. S., McCulloch, R. K., Armstrong, J. A., & Wee, S. H. (1985). *UNUSUAL CELLULAR FATTY ACIDS AND DISTINCTIVE (CAMPYLOBACTER) PYLORI (OR IDIS) FROM THE HUMAN GASTRIC MUCOSA* Departments of

*Microbiology and \* Pathology , Royal Perth Hospital , Box X 2213 , obtained from endoscopic biopsies of. 0, 257–267.*

- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., & Williams, S. (1993). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Nine Edition. In *Lippincott, Williams & Wilkins*.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1778052/>
- Hunter, J. C., Belt, A., & Halluin, A. P. (1986). Guidelines for establishing a culture collection within a biotechnology company. *Trends in Biotechnology*, 4(1), 5–11.  
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(86\)90127-7](https://doi.org/10.1016/0167-7799(86)90127-7)
- IBUN. (2014). *Instituto de Biotecnología - Universidad Nacional de Colombia*.  
<http://ibun.unal.edu.co/index.php/ct-menu-item-32/ct-menu-item-42.html>. visitado: 20-02-2021
- IBUN. (2016). *FUNDAMENTOS Y TECNICAS PARA LA PRESERVACION DE BACTERIAS, HONGOS Y LEVADURAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA*. <http://ibun.unal.edu.co/index.php/ct-menu-item-32/ct-menu-item-42.html>
- IDDEX. (2018). *Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI)*. *Cmi*, 3. <https://www.idexx.es/files/mic-guía-microbiológica-es.pdf>
- Ishaq, S., & Nunn, L. (2015). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a state of the art review. In *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* (Vol. 8).
- Jiménez, F. T., & Bayona, C. T. (2016). Fisiopatología molecular en la infección por *Helicobacter pylori*. *Salud Uninorte*, 32(3), 500–512.  
<https://doi.org/10.14482/sun.32.2.9749>
- Khan, Z. A., Siddiqui, M. F., & Park, S. (2019). Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/diagnostics9020049>
- Kusters, J. G., Van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449–490.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
- Lage, A. P., Godfroid, E., Fauconnier, A., Burette, A., Butzler, J. P., Bollen, A., & Glupczynski, Y. (1995). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: Comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(10), 2752–2756.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.33.10.2752-2756.1995>
- Langton, S. R., & Cesareo, S. D. (1992). *Helicobacter pylori*-associated phospholipase A2 activity: a factor in peptic ulcer production. 221–224.
- Lee, S. G., Kim, C., & Ha, Y. C. (1997). Successful Cultivation of a Potentially Pathogenic Coccoid Organism with Trophism for Gastric Mucin. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 65, Issue 1).
- Leegaard, T. M., Caugant, D. A., Frøholm, L. O., & Høiby, E. A. (2000). Apparent differences in antimicrobial susceptibility as a consequence of national guidelines. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(6), 290–293. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00086.x>
- López, L. G., & González, B. L. R. (2011). Patogénesis de la infección por *Helicobacter*

- pylori. *Revista Cubana de Medicina*, 50(4), 441–452.
- Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Ångström, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K. A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K. E., Norberg, T., Lindh, F., ... Borén, T. (2002). Helicobacter pylori sabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 297(5581), 573–578. <https://doi.org/10.1126/science.1069076>
- Majalca-martínez, C., Rivera-cabrera, J., Ochoa-pérez, S. A., & Giono-cerezo, S. (2001). Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de Helicobacter pylori. *Bioquímica*, 26(4), 85–89.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D. Y., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., El-Omar, E., Agreus, L., ... You, W. (2017). Management of helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*, 66(1), 6–30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), 42–55. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(03\)72873-0](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(03)72873-0)
- Martínez M., J. D., Henao R., S. C., & Lizarazo R., J. I. (2014). Resistencia antibiótica del helicobacter pylori en América Latina y el Caribe. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 29(3), 218–227.
- Mégraud, F. (2004). H pylori antibiotic resistance: Prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, 53(9), 1374–1384. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.022111>
- Mégraud, Francis. (1998). Antibiotic resistance in Helicobacter pylori. *British Medical Bulletin*, 54(1), 207–216. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000396>
- Mégraud, Francis, & Lehours, P. (2007). Helicobacter pylori Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 20(2), 280–322. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>
- Morcillo-Muñoz, J. A., Regino-Otero, W. A., & Gómez Zuleta, M. A. (2018). Helicobacter pylori: ¿cómo mejorar las terapias de erradicación? *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 33(4), 437. <https://doi.org/10.22516/25007440.314>
- Moreno, S. J. (2009). *MECANISMOS DE RESISTENCIA DE Helicobacter pylori A LOS ANTIBIÓTICOS AMOXICILINA, CLARITROMICINA, LEVOFLOXACINA Y METRONIDAZOL*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Opavski, N., Špuran, M., Đukić, S., Mijač, V., & Ranin, L. (2007). *UPOREĐIVAWE TRI DIJAGNOSTIČKA METODA ZA*. 135, 26–30.
- Ortego, J., & Cebrián, C. (2001). Precursores del cáncer gástrico: Factores de riesgo, condiciones y lesiones premalignas de la mucosa gástrica. *GH CONTINUADA*, 1, 87–92.
- Otero R., W., Trespalacios R., A. A., Otero P., L., Vallejo O., M. T., Torres Amaya, M., Pardo, R., & Sabbagh, L. (2015). Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la infección por Helicobacter pylori en adultos. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 30, 17–33.

- Otero Regino, W. (2013). La importancia de cultivar *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 28(2), 87–92.
- Otero Regino, W., Alicia Trespalacios, A., & Otero, E. (2009). *Helicobacter pylori: Current treatment An important challenge for gastroenterology*.
- Overmann, O., Abt, B., & Sikorski, J. (2017). Present and Future of Culturing Bacteria Changes may still occur before final publication. *Annual Review of Microbiology*, 71(July), 711–730. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093449>
- Pajares García, J. M., Pajares-Villarroya, R., & Gisbert, J. P. (2007). *Helicobacter pylori*: Resistencia a los antibióticos. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(2), 63–70. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082007000200001>
- Pajares, J. M., & Gisbert, J. P. (2006). *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 98(10), 770–778. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082006001000007>
- Pardo, C., De Vries, E., Buitrago, L., & Gamboa, Ó. (2017). *Atlas de Mortalidad por Cáncer en Colombia*. [www.cancer.gov.co](http://www.cancer.gov.co)
- Parente, J. M. L., Da Silva, B. B., Palha-Dias, M. P. S., Zaterka, S., Nishimura, N. F., & Zeitune, J. M. (2006). *Helicobacter pylori* infection in children of low and high socioeconomic status in northeastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 509–512. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.509>
- Parsonnet, J., Friedman, G., Vandersteen, D., Chang, Y., Vogelstein, J. H., Orentreich, N., & Sibley, R. (1991). The New England Journal of Medicine Downloaded from [nejm.org](http://nejm.org) on March 29, 2011. For personal use only. No other uses without permission. *New England Journal of Medicine*, 329(1), 21–26. <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/329/14/977%5Cnhttp://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199309303291401>
- Pereyra, L. del V., Gorordo Ipiña, R. C., Berruezo, F. A., Amieva, C. A., García, M. E., & Bottiglieri, M. T. (2017). Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric lesions. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.001>
- Pérez-Pérez, G. (2018). Infección por *Helicobacter pylori*: mecanismos de contagio y prevención. *Gastroenterol. Latinoam*, 29(S1), 13–20. <http://gastrolat.org/DOI/PDF/10.0716/gastrolat2018s1000.02.pdf>
- Pérez, N. P., & Vallín-Cárdenas, E. F. (1998). *Helicobacter pylori* y enfermedad péptica ulcerosa. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(6), 619–627.
- Piccolomini, R., Di Bonaventura, G., Catamo, G., Carbone, F., & Neri, M. (1997). Comparative evaluation of the E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1842–1846. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.7.1842-1846.1997>
- Ramirez, C., & Ospina, W. (2018). Comparación de diferentes metodologías de siembra y zonas de toma de muestra gástrica para la detección de *Helicobacter pylori* por cultivo en pacientes que asisten a endoscopia de las ciudades de Pereira y Manizales. In *Universidad Libre Seccional Pereira*.

- Ramis, I. B., Fonseca, T. L., De Moraes, E. P., Fernandes, M. S., Mendoza-Sassi, R., Rodrigues, O., Varela Juliano, C. R., Scaini, C. J., & Almeida Da Silva, P. E. (2010). Molecular basis of pathogenicity in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(10), 3776–3778. <https://doi.org/10.1128/JCM.00472-10>
- Reddy, K. M., & Marsicano, E. (2018). *Peptic Ulcer Disease and Helicobacter pylori infection*.
- Robin Warren, J., & Marshall, B. (1983). Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis. *The Lancet*, *321*(8336), 1273–1275. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92719-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92719-8)
- Rodríguez Palomo, D., & Alfaro Benavides, A. (2010). Actualización de la fisiología gástrica. *Med. Leg. Costa Rica*, *27*(2), 59–68.
- Roldán, M. V. (2011). *Gastritis y Gastropatías ARTÍCULO DE REVISIÓN*.
- Shiotani, A., Lu, H., Pina Dore, M., & Graham, D. Y. (2017). Treating *Helicobacter pylori* effectively while minimizing misuse of antibiotics. *Cleve Clin J Med*, *84*, 310–318. <https://doi.org/10.3949/ccjm.84a.14110>
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). Gram stain protocols. *American Society for Microbiology*, *1*(September 2005), 14.
- Sorlózano Puerto, A., Piédrola de Angulo, G., & Gutiérrez Fernández, J. (2004). Los antibióticos betalactámicos en el siglo XXI: Repercusiones clínicas de las resistencias emergentes. *February*.
- Suebaum, S., & Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection, Review article. *The New England Journal of Medicine*, *345*(1). <https://doi.org/10.5124/jkma.2006.49.11.1017>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacterología y Virología Médica*, *36*(Cim), 663–671.
- Testerman, T. L., McGee, D. J., & Mobley, H. L. T. (2001). *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(11), 3842–3850. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3842-3850.2001>
- Trespalacios, A. A., Regino, W. O., & Reyes, M. M. (2010). Claritromicina Y Amoxicilina En Pacientes Colombianos. *Helicobacter*, 31–38.
- Van Der Hulst, R. W. M., Verheul, S. B., Weel, J. F. L., Gerrits, Y., Ten Kate, F. J. W., Dankert, J., & Tytgat, G. N. J. (1996). Effect of specimen collection techniques, transport media, and incubation of cultures on the detection rate of *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *15*(3), 211–215. <https://doi.org/10.1007/BF01591356>
- Varón, A. R. (2014). Infección por *Helicobacter pylori*. Asociaciones causales y casuales *Helicobacter Pylori Infections: Casual and Causative Associations*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, *29*, 213–215.
- Vázquez-Anovega, H., Cruz-Carballosa, Y., Cruz-Carballosa, Y., Calzadilla-Jardínez, I., Rodríguez-Zapata, R., & López-Sánchez, Y. (2014). Caracterización de úlceras gástricas y duodenales TT - Characterization of gastric and duodenal ulcers. *Rev. Enferm. Herediana*, *7*(1), 3–9.

<http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/RENH/article/view/2118/2108>

Wang, D., Guo, Q., Yuan, Y., & Gong, Y. (2019). The antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* to five antibiotics and influencing factors in an area of China with a high risk of gastric cancer. *BMC Microbiology*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1517-4>

WFCC. (2010). *RECOMENDACIONES PARA EL ESTABLECIMIENTO Y FUNCIONAMIENTO DE COLECCIONES DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS*.  
Vistado: 01-09-2020

Windsor, H. M., & O'Rourke, J. (2000). Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, *29*(3), 633–648.  
[https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(05\)70135-7](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(05)70135-7)

Wong, W. M., Playford, R. J., & Wright, N. A. (2000). Peptide gene expression in gastrointestinal mucosal ulceration: Ordered sequence or redundancy? *Gut*, *46*(2), 286–292. <https://doi.org/10.1136/gut.46.2.286>

Yilmaz, N., & Koruk Özer, M. (2019). The prevalence of *Helicobacter pylori* babA, homB, aspA, and sabA Genes and Its Relationship with Clinical Outcomes in Turkey. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2019.  
<https://doi.org/10.1155/2019/1271872>

Yin, Y., He, L. H., & Zhang, J. Z. (2009). Successful isolation of *Helicobacter pylori* after prolonged incubation from a patient with failed eradication therapy. *World Journal of Gastroenterology*, *15*(12), 1528–1529. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1528>

## 9 ANEXOS

### Anexo 1. Encuesta



UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

“Patrones de expresión de los antígenos Lewis B y sialyl-Lewis X y la variabilidad de los genes babA y sabA de *Helicobacter pylori*: un estudio en pacientes con lesiones gástricas” ID: 4966

Código \_\_\_\_\_ Entidad \_\_\_\_\_ Fecha: dd/mm/aaaa [ ] [ ] [ ]  
E.P.S. \_\_\_\_\_

#### SECCIÓN A. INFORMACIÓN PERSONAL

A1. DOCUMENTO DE IDENTIDAD \_\_\_\_\_

A2. NOMBRES Y APELLIDOS \_\_\_\_\_

A3. TELÉFONOS \_\_\_\_\_

A4. DIRECCIÓN PERMANENTE \_\_\_\_\_

A5. FECHA DE NACIMIENTO: dd/mm/aaaa [ ] [ ] [ ]

A6. EDAD: [ ]

A7. SEXO:

1. MASCULINO

2. FEMENINO

A8. ETNIA:

1. INDÍGENA

2. BLANCA

3. NEGRA

4. MESTIZA

5. MULATA

A9. AFILIACIÓN AL SIST. SEGURIDAD SOCIAL:

1. VINCULADO

2. SUBSIDIADO

3. CONTRIBUTIVO

A10. ESTADO CIVIL ACTUAL (INDISTINTAMENTE DEL ESTADO LEGAL):

1. CASADO(A)

2. SOLTERO(A)

3. UNIÓN LIBRE

4. SEPARADO(A)

5. DIVORCIADO(A)

6. VIUDO(A)

A11. PROCEDENCIA:

DEPARTAMENTO \_\_\_\_\_

MUNICIPIO \_\_\_\_\_

1. URBANA  (ENERGÍA, ACUEDUCTO Y PISO MÍN. CEMENTO)

2. RURAL CABECERA

3. RURAL DISPERSO

VDA/ \_\_\_\_\_

A12. EN QUE LUGAR HA VIVIDO POR MÁS AÑOS?

DEPARTAMENTO \_\_\_\_\_

MUNICIPIO \_\_\_\_\_

1. URBANA  (ENERGÍA, ACUEDUCTO Y PISO MÍN. CEMENTO)

2. RURAL CABECERA

3. RURAL DISPERSO

VDA/ \_\_\_\_\_

A13. CUANTOS AÑOS HA VIVIDO ALLÍ? [ ]

A14. EN CUANTO ESTIMARÍA USTED SUS INGRESOS MENSUALES?

1. MENOS DE UN SALARIO MÍNIMO

2. UN SALARIO MÍNIMO

3. [ ] VECES UN SALARIO MÍNIMO

#### SECCIÓN B. EDUCACIÓN Y OFICIO

B1. CUAL ES SU NIVEL EDUCATIVO?

1. NINGUNO [ ]

4. TÉCNICO [ ]

2. PRIMARIA [ ]

5. UNIVERSITARIO [ ]

3. SECUNDARIA [ ]

6. POSTGRADO [ ]

B2. OCUPACIÓN EN LA QUE HA TRABAJADO POR MAS TIEMPO?

1. AGRICULTOR [ ]

5. CONSTRUCTOR [ ]

2. AMA DE CASA [ ]

6. JUBILADO [ ]

3. COMERCIANTE [ ]

7. PROFESIONAL [ ]

4. TRAB. PUBLICO [ ]

8. OTROS [ ]

**SECCIÓN C. CARACTERÍSTICAS DE LA VIVIENDA DONDE HA VIVIDO**

**POR MÁS AÑOS**

**C1. TIPO DE PISO QUE PREDOMINAN EN SU CASA?**

1. TIERRA  3. BALDOSA Y/O GRANITO   
2. CEMENTO  4. OTROS \_\_\_\_\_

**C2. CUANTAS PERSONAS VIVEN EN SU CASA? [\_\_\_\_\_]**

**C3. CUANTAS HABITACIONES HAY EN SU CASA? [\_\_\_\_\_]**

**C4. NUMERO DE CAMAS POR HABITACIÓN? [\_\_\_\_\_]**

**C5. CUANTAS PERSONAS POR CAMA? [\_\_\_\_\_]**

**C6. DE DONDE OBTIENE EL AGUA POTABLE?**

1. ACUEDUCTO  3. RÍO O MANANTIAL   
2. POZO O ALJIBE  4. OTROS

**C7. QUE TRATAMIENTO LE DA AL AGUA?**

1. NINGUNO  2. HERVIDO   
3. FILTRADO  4. FILTRADO Y HERVIDO   
5. OTRO (ESPECIFICAR) \_\_\_\_\_

**C8. DONDE ALMACENA EL AGUA DE CONSUMO?**

1. VIDRIO  2. PLÁSTICO   
3. BARRO  4. METAL   
5. NO ALMACENA

**C8. DONDE DESECHA LAS EXCRETAS?**

1. SANITARIO  2. LETRINA  3. CAMPO ABIERTO

**SECCIÓN D. ESTILO DE VIDA**

**D1. RESPECTO AL HÁBITO DE FUMAR USTED ES?**

1. FUMADOR   
A. Fumador diario\*   
B. Fumador ocasional\*\*   
C. Ex-fumador\*\*\*   
2. NO FUMADOR

\* FUMA AL MENOS 1 CIGARRILLO AL DÍA EN EL ÚLTIMO AÑO.

\*\* FUMA AL MENOS 1 CIGARRILLO EN INTERVALOS MAYORES AL DIARIO.

\*\*\* FUMADOR DIARIO QUE HA DEJADO DE FUMAR EN EL ÚLTIMO AÑO SIN DIFERENCIA DE LA CANTIDAD.

**D2. SI USTED ES FUMADOR DIARIO, CUANTOS CIGARRILLOS POR DÍA FUMA (FUMABA)? [\_\_\_\_\_]**

**D3. SI USTED ES FUMADOR OCASIONAL, CUANTOS CIGARRILLOS POR MES FUMA? [\_\_\_\_\_]**

**D4. POR CUANTOS AÑOS HA FUMADO O FUMO? [\_\_\_\_\_]**

**D5. RESPECTO AL HÁBITO DE BEBER USTED ES?**

1. BEBEDOR   
A. Bebedor habitual\*   
B. Bebedor ocasional\*\*   
C. Ex-bebedor\*\*\*   
2. NO BEBEDOR

\* BEBE AL MENOS 1 VEZ POR SEMANA EN EL ÚLTIMO AÑO.

\*\* BEBE CON INTERVALOS MAYORES A LA SEMANA.

\*\*\* BEBIÓ AL MENOS 1 VEZ POR SEMANA Y LO DEJO EN EL ÚLTIMO AÑO.

**D6. SI USTED ES BEBEDOR, CUANTO CONSUME DE ESTAS BEBIDAS POR OCA SIÓN?**

1. AGUARDIENTE [c\_\_\_\_\_] 6. WHISKY [v\_\_\_\_\_]  
2. CERVEZA [b\_\_\_\_\_] 7. VODKA [v\_\_\_\_\_]  
3. RON [c\_\_\_\_\_] 8. TEQUILA [c\_\_\_\_\_]  
4. GUARAPO [v\_\_\_\_\_] 9. BRANDY [c\_\_\_\_\_]  
5. VINO [cp\_\_\_\_\_]

c: copa (25cc), b: botella (330cc), cp: copa vino (100cc), v: vaso (45cc).

Botella = 750cc; Media = 375cc.

**D7. POR CUANTOS AÑOS HA CONSUMIDO? [\_\_\_\_\_]**

**SECCIÓN E. ANTECEDENTES FAMILIARES**

**E1. ALGUNO DE SUS PARIENTES CERCANOS HA TENIDO ALGUNA DE LAS SIGUIENTES ENFERMEDADES?**

1. SI  2. NO  3. NO SABE

ENFERMEDAD	MAMA (1)	PAPA (2)	HERMANOS (3)	HIJOS (4)	CÓNYUGUE (5)
ULCERA GÁSTRICA (1)					
GASTRITIS (2)					
CÁNCER DE ESTÓMAGO (3)					
OTRO CÁNCER (4)					

**SECCIÓN F. ANTECEDENTES CLINICOS**

**F1. HA TENIDO ENDOSCOPIAS PREVIAS?**

1. SI  3. HACE CUANTO? \_\_\_\_\_  
 2. NO  4. DIAGNOSTICO? \_\_\_\_\_

**F2. SE DETECTÓ *H. pylori*?**

1. SI  2. NO  3. HACE CUANTO? \_\_\_\_\_

**F3. HA SUFRIDO DE LOS SIGUIENTES SINTOMAS?**

	SI (1)	NO (2)	HACE CUANTO?
ARDOR			
DOLOR EPIGÁSTRICO			
VOMITO – NAUSEAS			
LLENURA			
ANEMIA			
PERDIDA DE PESO			
ANOREXIA			
SANGRADO			
DISFAGIA			
REGURGITACIÓN			

**SECCIÓN G. ANTECEDENTES DE TRATAMIENTO**

**G1. HA RECIBIDO TRATAMIENTO DE ERRADICACIÓN PARA *H. pylori*?**

1. SI  2. NO  3. NO SABE   
 HACE CUANTO? \_\_\_\_\_

**G2. CUANTAS VECES HA SIDO TRATADO? \_\_\_\_\_**

**G3. CON CUAL ESQUEMA HA SIDO TRATADO?**

1.  METRONIDAZOL+AMOXICILINA+IBP  
 2.  CLARITROMICINA+AMOXICILINA+IBP  
 3.  OTRO ESQUEMA DIFERENTE:  
 CUAL? \_\_\_\_\_  
 4.  NO SABE

**G4. HA CONSUMIDO ANTIBIÓTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE OTRAS INFECCIONES (AMOXICILINA, CLARITROMICINA, METRONIDAZOL):**

0. NO  1. SI  3. NS

CUAL: \_\_\_\_\_

HACE CUANTO? \_\_\_\_\_

**G5. HA CONSUMIDO INHIBIDORES DE LA BOMBA DE PROTONES?**

0. NO  1. SI  3. NS

**I6. CUAL?**

0.  OMEPRAZOL  
 1.  ESOMEPRAZOL  
 2.  PANTOPRAZOL  
 3.  RABEPRAZOL  
 4.  OTRO: \_\_\_\_\_

HACE CUANTO? \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Consentimiento informado

Código \_\_\_\_\_

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Entiendo que se me ha pedido que participe voluntariamente como sujeto de investigación en la Línea de Epidemiología Molecular en Cáncer Gástrico con el proyecto "Patrones de expresión de los antígenos Lewis B y sialyl-Lewis X y la variabilidad de los genes BabA y SabA de *Helicobacter pylori*: un estudio en pacientes con lesiones gástricas" ID: 4966 bajo la dirección de la docente del Claudia Patricia Acosta del Laboratorio de Genética Humana, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán.

PROPÓSITO: Establecer la relación entre la variabilidad genética en los genes de adhesión (babA y abA) y la expresión de los antígenos de Lewis B (Leb) y Lewis X (sLex) en células epiteliales e tejido mucoso en pacientes con lesiones gástricas en una población del departamento del Cauca.

BENEFICIOS AL SUJETO: Entiendo que me beneficiare por mi participación en este estudio recibiendo un informe detallado de patología sin costo alguno; pero entiendo que no recibiré los resultados de los análisis genéticos de la muestra dado que este estudio es de tipo poblacional y no diagnóstico. Además, por mi participación no recibiré ninguna compensación económica (dinero).

BENEFICIOS A LA SOCIEDAD: portara información acerca del papel de la relación de *Helicobacter pylori* con la respuesta celular del tejido epitelial de la mucosa gástrica, para identificar los posibles biomarcadores asociados a las diferentes etapas en el desarrollo de cáncer gástrico. Los resultados de estas investigaciones contribuirán a la formulación de mejores estrategias de prevención, pronóstico y tratamiento de pacientes con lesiones gástricas en la población.

ENTIDADES PARTICIPANTES: Las investigaciones serán lideradas por investigadores de la Universidad del Cauca, en colaboración con la Unidad de Diagnóstico Especializado en Patología y financiada por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca.

NUMERO DE PARTICIPANTES: El número aproximado será de 120 pacientes.

PROCEDIMIENTOS: Si decido participar voluntariamente en estos estudios una vez haya firmado el consentimiento informado, entiendo que:

- 1) Completaré un cuestionario sobre estilo de vida y estado de salud, facilitando información como teléfono y dirección que podrá ser utilizada para contactarme si existe la necesidad en el futuro.
- 2) Permitiré que se me tomen unas biopsias de tejido gástrico, acorde con las guías actuales de práctica clínica, procedimiento que será realizado por Médicos Gastroenterólogos calificados con el fin de: extraer material genético (ADN) a partir de las biopsias de tejido tomadas para establecer el tipo de cepa de *H. pylori* presente en la mucosa gástrica, para realizar análisis de los genes objeto de estudio y la genotipificación.
- 3) Aceptaré que mis muestras sean guardadas en un Banco de Muestras Biológicas. El ADN extraído de las biopsias del tejido gástrico, será almacenado a -20 °C en una solución buffer tris-EDTA y guardado durante un periodo de 10 años en el área de custodia del Laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca.
- 4) Permitiré el uso de los datos y las muestras biológicas para estudios posteriores debidamente aprobados por los respectivos Comités de Ética en esta u otras instituciones nacionales o internacionales que pudieran colaborar en el desarrollo esta u otras investigaciones.

RIESGOS POR PARTICIPACIÓN: Entiendo que como riesgos potenciales de mi participación en este estudio se pueden presentar perforación faríngea, esofágica o gastrointestinal, así como hemorragia e infecciones en el sitio de toma de muestras. Sin embargo, estas lesiones son poco frecuentes cuando son tomadas por personal médico calificado y experimentado y serán evitadas al máximo mediante el uso de técnicas endoscópicas de alta calidad, manteniendo los estándares de asepsia. Cualquier incomodidad, dolor, riesgo o inconveniente asociado con mi participación serán atendidos por el Médico Gastroenterólogo que realice el procedimiento. Entiendo también que el consentimiento para recibir los tratamientos e intervenciones que podría necesitar para mi enfermedad será responsabilidad de la IPS que me atiende.

CONFIDENCIALIDAD: Entiendo que la información del cuestionario y todas las muestras serán identificadas con un código único para proteger mi identidad y datos personales. Esta información será mantenida bajo estricta confidencialidad por parte de los investigadores principales Claudia Patricia Acosta.

APROBACION: Se me ha informado que los protocolos y procedimientos de investigación que se emplearan en estos estudios han sido aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca.

PERSONAS A CONTACTAR: Si tengo una pregunta durante o después del procedimiento puedo contactar a PhD Claudia Patricia Acosta en el Laboratorio de Genética Humana de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca o al tel. 8209872.

- Me han dicho que la Universidad de Cauca no tiene mecanismos de compensación si algún daño físico ocurriera como resultado directo para los sujetos de investigación de estos proyectos. Sin embargo, entiendo que los tratamientos de emergencia disponibles para el público en general están disponibles para mí también.
- Me han informado que tengo derecho a la privacidad y confidencialidad de toda la información obtenida con relación a estos estudios y que solo los investigadores principales podrán tener acceso a mi historia clínica si es necesario.
- Entiendo que los resultados de estos estudios pueden ser divulgados en eventos nacionales y/o internacionales o ser publicados en revistas científicas sin identificar mi nombre.

Después de explicarme la finalidad de los proyectos con un lenguaje sencillo y comprensible, haber respondido a mis preguntas, estar conforme con las respuestas, dejo constancia que acepto voluntariamente participar como sujeto de investigación en los proyectos antes mencionados, por lo tanto, firmo o coloco mi huella digital para ingresar a la investigación.

_____	_____	_____
Nombre del participante	Firma/huella del participante	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del testigo	Firma del testigo	Fecha
Como constancia firma:	_____	_____
	Firma del director del proyecto	Fecha

AUTORIZACION PARA GUARDAR Y ENVIAR MUESTRAS A OTRAS INSTITUCIONES: Una vez procesadas las muestras biológicas colectadas, los investigadores las almacenaran en un Banco de Muestra Biológicas en el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca. Es posible que algunas de las pruebas de laboratorio que sean necesarias realizar con mis muestras no puedan hacerse en las instalaciones de la Universidad del Cauca, por lo que sería necesario enviarlas a otras instituciones de Colombia o del exterior. En caso de que esto fuera necesario mis muestras estarían marcadas solo con el código único y mi nombre o datos personales no aparecerían en ninguna parte. Entiendo también que estas muestras podrán ser utilizadas para investigaciones futuras siempre y cuando estas se desarrollen con propósitos científicos enmarcados en la línea de investigación de estos proyectos.

Para constancia,

_____	_____	_____
Nombre del participante	Firma/huella del participante	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del testigo	Firma del testigo	Fecha
Como constancia firma:	_____	_____
	Firma del director del proyecto	Fecha

