

Línea de investigación en
Helicobacter pylori para la formación
de recurso humano en ciencia,
tecnología e innovación en el
programa de microbiología

Editores
Adalucy Alvarez Aldana. PhD.
Olga María Henao Trujillo. MSc.



UNIVERSIDAD LIBRE®



Línea de investigación en *Helicobacter pylori* para la formación de recurso humano en ciencia, tecnología e innovación en el programa de microbiología

Editores:

Adalucy Alvarez Aldana. PhD.

Olga Maria Henao Trujillo. MSc.

Línea de investigación en *Helicobacter pylori* para la formación de recurso humano en ciencia, tecnología e innovación en el programa de microbiología

Risaralda, Colombia, Pereira
© **Universidad Libre Pereira**
Sede Belmonte
www.unilibrepereira.edu.co
tel: +57-6-3401043 ext: 6950

Centro de investigaciones Facultad de Ciencias de la Salud
Primera edición- Volumen 1: octubre de 2020
ISBN digital: 978-958-8859-73-6

Diagramación:

Kerynd Barona Duque
Adalucy Alvarez Aldana

Diseño:

@luisdiazcalle
Centauro Impresos y Oficina
Cra 4 # 27-77 Pereira Colombia
Tel. +57 (6) 3360570
www.centauroimpresosyoficina.com

Editor (es):

© **Adalucy Alvarez Aldana**
© **Olga María Henao Trujillo**

Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción total o parcial de esta obra, ni su incorporación a un sistema informático, ni su transmisión en cualquier forma o por cualquier medio (electrónico, mecánico, fotocopia, grabación u otros) sin autorización previa y por escrito de los titulares del copyright. La infracción de dichos derechos puede constituir un delito contra la propiedad intelectual.

Autores y coautores

- **PhD. ADALUCY ÁLVAREZ ALDANA**
Bacterióloga y Laboratorista Clínica del Colegio Mayor de Antioquia, Magister en Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira y Doctora en Ciencias Biomédicas de la Universidad Tecnológica de Pereira. Docente investigadora del Programa de Microbiología de la Universidad Libre Seccional Pereira, líder del grupo de investigación en microbiología y biotecnología (MICROBIOTEC) e integrante del grupo de investigación en enfermedades infecciosas (GRIENI) de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- **MSc. OLGA MARÍA HENAO TRUJILLO**
Enfermera de la Universidad Andina de Pereira, Especialista en Administración de la Salud y Magister en Pedagogía de la Universidad Católica de Manizales. Directora del Centro de investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Salud. Docente catedrática del programa de Enfermería de la Facultad de Ciencias de la Salud. Integrante del grupo GERENCIA DEL CUIDADO y MICROBIOTEC.
- **PhD. DANIEL ARTURO LEÓN RODRIGUEZ.**
Microbiólogo. Magíster en ciencias. Doctor en biomedicina. Docente investigador del Programa de Microbiología en la Universidad Libre Seccional Pereira.
- **PhD. FERNANDO RAFAEL SILLER LÓPEZ.**
Químico farmacobiólogo. Magíster en ciencias. Doctor en biología molecular en medicina. Docente investigador del Programa de Microbiología en la Universidad Libre Seccional Pereira
- **PhD. FABIANA LORA SUÁREZ.**
Licenciada en biología y educación ambiental. Magíster en ciencias biomédicas. Doctora en ciencias biomédicas. Docente de la Universidad del Quindío.
- **MSc. BRENDA LUCÍA ARTURO ARIAS.**
Docente Investigadora. Grupo Investigación Médica. Universidad de Manizales. SES Hospital Universitario de Caldas
- **MSc. ELEAZAR VARGAS MENA**
Químico, magister en química. Docente del Programa de Microbiología de la Universidad Libre.
- **MSc. JOSÉ IGNACIO MONCAYO ORTIZ**
Licenciado en biología y química. Magister en microbiología. Docente de la Universidad Tecnológica de Pereira. Líder del grupo de investigación en enfermedades infecciosas (GRIENI) de la Universidad Tecnológica de Pereira.

- **MSc. JORGE JAVIER SANTACRUZ IBARRA**
Licenciado en biología y química. Magister en microbiología. Docente de la Universidad Tecnológica de Pereira. Integrante del grupo de investigación en enfermedades infecciosas (GRIE-NI) de la Universidad Tecnológica de Pereira
- **MSc. LUIS JAVIER CASTAÑEDA CHÁVEZ**
Médico, especialista en gastroenterología. Centro de Especialistas de Risaralda.
- **MSc. ROBINSON PACHECO LÓPEZ**
Bacteriólogo, Magíster en epidemiología. Magíster en ciencias biomédicas con mención en control de infecciones y epidemiología hospitalaria. Docente de la Universidad Libre.
- **MSc. YINA MARCELA GUACA GONZÁLEZ**
Bacterióloga, Magister en biología molecular y biotecnología. Docente de la Universidad Tecnológica de Pereira. Integrante del grupo de investigación en enfermedades infecciosas (GRIE-NI) de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- **MSc. TATIANA MEJÍA VALENCIA**
Enfermera, Magister en epidemiología. Docente del Programa de Enfermería de la Universidad Libre.
- **MSc. EDUARD HINCAPIÉ LADINO**
Ingeniero Físico. Magister en física aplicada a medicina y biología. Docente de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- **MSc. JAVIER TORRES-OSORIO**
Ingeniero eléctrico. Magister en instrumentación física. Candidato a PhD en Ciencias Agrarias. Docente de la Universidad de Caldas
- **MSc. FELIPE ANTONIO GALLEGO LÓPEZ.** Matemático. Especialista en estadística. Magister en ciencias de Matemática aplicada. Docente auxiliar de la Universidad Nacional y docente asistente de la Universidad de Caldas.
- **ÉRICA VANNESA HENAO FRANCO**
Enfermera de la Universidad Católica de Manizales.
- **LUISA MARÍA DUQUE QUINTERO.**
Bacterióloga. Universidad Católica de Manizales
- **MARÍA EUGENIA POSADA TRUJILLO**
Enfermera. Especialista en Epidemiología.
- **MARÍA ALEJANDRA CALLE.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.

- **VALENTINA GIRALDO.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **MANUEL ALEJANDRO VELANDIA LÓPEZ.** Microbiólogo. Egresado Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **ÁNGELA MARIA ARANGO.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **MIGUEL ÁNGEL CARDONA LÓPEZ.** Microbiólogo. Egresado Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **JULIANA BOTERO CARDONA.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **WENDY L OSPINA JOAQUI.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **CATALINA RAMÍREZ OSORIO.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **ANYI ARISTIZÁBAL GIRALDO.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **MARÍA CAMILA ISAZA BEDOYA.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **MARÍA ALEJANDRA BUITRAGO GÓMEZ.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **LAURA DÍAZ RAMÍREZ.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **MICHELLE MEJÍA ROMERO.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **MARÍA CAMILA GALEANO CORTÉS.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **LILY JOHANNA BLANDÓN LOZADA.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **DANIA STEFANY ROJAS VÁSQUEZ.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.

- **MARÍA JOSÉ CASTAÑO VILLEGAS.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **MARCELA SANTA GÓMEZ.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **VALERIA CEBALLOS TORO.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **MARÍA DEL MAR ÁLVAREZ QUINTERO.** Microbióloga. Egresada Universidad Libre. Exintegrante del semillero Obvio Microbio
- **KERYND BARONA DUQUE.** Estudiante del programa de microbiología. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **JUANITA SALGADO RIVERA.** Estudiante del programa de microbiología. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **DAVID M GUZMÁN JOJOA.** Estudiante del programa de microbiología. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **LINA MARÍA GAVIRIA RODRÍGUEZ.** Estudiante del programa de microbiología. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **LILIAN MARYERI DELGADO CORREA.** Estudiante del programa de microbiología. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.
- **MIGUEL ÁNGEL CHARRY CABALLERO.** Estudiante del programa de microbiología. Exintegrante del semillero Obvio Microbio.

Tabla de contenido

CAPITULO I	11
Importancia de investigar sobre la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> e historia de la línea de investigación en <i>H. pylori</i> para la formación de recurso humano en ciencia, tecnología e innovación en el programa de Microbiología.	
CAPITULO II	16
<i>Helicobacter pylori</i> : Descubrimiento, microbiología, enfermedades, diagnóstico y prevención de la infección.	
CAPITULO III	28
El metodo de cultivo para la detección de <i>Helicobacter pylori</i> .	
ARTICULO ORIGINAL	34
Comparación de diferentes metodologías de siembra y zonas de toma de muestra gástrica para la detección de <i>Helicobacter pylori</i> por cultivo en pacientes que asisten a endoscopia de las ciudades de Pereira y Manizales.	
CAPITULO IV	46
Prevalencia de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> y su relación con diversas características sociodemográficas.	
ARTÍCULO ORIGINAL	50
Características sociodemográficas en pacientes que asisten a endoscopia y su asociación con la infección por <i>Helicobacter pylori</i> de las ciudades de Pereira y Manizales.	
CAPITULO V	66
Generalidades sobre la erradicación de la infección y métodos fenotípicos para la detección de la susceptibilidad en <i>Helicobacter pylori</i> .	
ARTÍCULO ORIGINAL	71
Comparación de la concordancia entre métodos para la detección de la resistencia a claritromicina y levofloxacin en aislamientos de <i>Helicobacter pylori</i> .	
CAPITULO VI	85
Efecto del campo magnético sobre el crecimiento microbiano.	
ARTÍCULO ORIGINAL	88
Efecto del campo magnético en el crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i> .	

CAPITULO VII	97
El agua como ruta de transmisión de <i>Helicobacter pylori</i> .	
ARTÍCULO ORIGINAL	105
Detección molecular de <i>Helicobacter pylori</i> como prospectiva para su identificación a partir de cuerpos de agua.	
CAPITULO VIII	123
Caracterización epidemiológica y microbiológica de las bacteriemias y su perfil de resistencia durante el periodo junio 2011 a junio 2015.	
ANEXOS	168
ANEXO 1	
Consentimiento informado	
ANEXO 2	172
Aval del comité de bioética	

PRÓLOGO

Este libro nace de la unión de un maestro altamente calificado y alumnos dedicados con unas creatividades activas y dispuestas a trabajar por resolver los problemas que trae una bacteria a la humanidad. Las investigaciones aquí consignadas son producto de los trabajos de grado de los estudiantes del programa de Microbiología, quienes además fueron miembros del semillero de investigación, MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL “OBVIO-MICROBIO”.

Apoyados y dirigidos por la doctora Adalucy Alvarez-Aldana, quien gracias a su amplio conocimiento en el microorganismo supo sembrar curiosidad sobre el mismo durante las sesiones del semillero, incentivando a muchos de sus alumnos a dedicar su trabajo de grado a resolver alguna pregunta que les surgiera en torno a este microorganismo.

Aunque diferentes son las investigaciones, todas fueron trazadas con un fin común, entregarle a la humanidad un poco más de conocimiento sobre *Helicobacter pylori*, por esto la unión de estas investigaciones en una sola consigna, son importantes para entender más sobre todo lo que rodea esta bacteria y pretenden resolver muchos misterios que aún aquejan la epidemiología detrás de la misma. Estos trabajos son fruto de muchos esfuerzos, materiales y académicos, de personas grandiosas, de la unión de universidades, doctores y docentes de diferentes disciplinas, razón que demuestra una vez más que la unión hace la fuerza, porque solo llegarás más rápido, pero en compañía llegarás más lejos.

Además, contamos con la fortuna de tener un capítulo invitado, cuyo tema no es sobre *Helicobacter pylori*, pero sí un sobre un tópico de gran interes en la actualidad como es la resistencia bacteriana. Capítulo titulado: “Caracterización epidemiológica y microbiológica de las bacteriemias y su perfil de resistencia durante el periodo junio 2011 a junio 2015”.

Por: Juanita Salgado Rivera.

Estudiante de décimo semestre del Programa de Microbiología y futura egresada del Programa de Microbiología en el 2021.

CAPITULO I

Importancia de investigar sobre la bacteria *Helicobacter pylori* e historia de la línea de investigación en *H. pylori* para la formación de recurso humano en ciencia, tecnología e innovación en el programa de Microbiología

Adalucy Alvarez-Aldana¹, Olga Maria Henao Trujillo²

Importancia de investigar en la bacteria Helicobacter pylori

Del total anual de muertes en el mundo, 2/3 partes (56 millones / 38 millones) son a causa de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). Como las enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas y cáncer. Entre las ECNT, el cáncer es la principal causa de muerte. El cáncer gástrico (CG) ocupa el quinto lugar en incidencia y el tercero en mortalidad para ambos sexos en el mundo. En Colombia el CG ocupa el cuarto lugar en incidencia para ambos sexos y es la primera causa de muerte por cáncer. En el país se presentan diferencias en la incidencia y mortalidad entre mujeres (quinto lugar en incidencia y cuarto en mortalidad, por encima del cáncer de cérvix) y hombres (segundo lugar en incidencia y primero en mortalidad). En Colombia el CG representa un serio problema de salud pública (supervivencia absoluta a los 5 años es solo del 24,6 %) El factor de riesgo más relevante para el CG, es la infección por *Helicobacter pylori*. El pilar básico de la prevención en CG es la supresión de los factores de riesgo, en especial eliminar la infección por *H. pylori*.

H. pylori afecta aproximadamente la mitad de la población mundial y más del 80 % de las poblaciones de países en vías de desarrollo. A pesar de que infecta más de la mitad de la población mundial, solo una pequeña fracción desarrollan una variedad de enfermedades graves, incluyendo ulcera péptica, Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), y CG. La evidencia demuestra que la infección conduce a una fuerte infiltración granulocítica y linfocítica que desencadena una inflamación persistente y que sumada a condiciones de hipocloridia en el cuerpo del estomago, se constituyen como el principal factor de riesgo para el desarrollo de CG. Esa inflamación persistente provoca cambios histológicos que incluyen destrucción de uniones intercelulares, apoptosis, proliferación de células epiteliales y transformación maligna. El desarrollo de CG es un proceso de múltiples pasos iniciando por la transición de la mucosa normal a una gastritis superficial (No atrófica). La gastritis puede progresar a gastritis atrófica, luego a metaplasia intestinal, displasia y adenocarcinoma.

Como todo proceso infeccioso y especialmente procesos infeccioso ligados a cáncer

- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
- 2 Directora del Centro de investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Salud

por inflamación crónica, como es el caso de *H. pylori*, la progresión hacia las enfermedades graves debe mirarse desde dos perspectivas, el patógeno, en el cual han sido descritos diversos genes de virulencia implicados en la severidad, y desde el hospedero ya que han sido descritos polimorfismos a nivel de genes de la respuesta inmune así como los factores ambientales, dieta, consumo de cigarrillo y alcohol.

H. pylori fue clasificado como carcinógeno tipo I desde 1994 y ratificado por el grupo de estudio de la IARC (agencia internacional para la investigación del cáncer) en el 2012. Pero, el resultado de la infección en cada individuo es impredecible, así como la velocidad de progresión de la lesión en la mucosa gástrica. Sin embargo, la progresión puede ser detenida por la erradicación de *H. pylori*, si se logra la eliminación antes de la aparición de alteraciones atrófica.

Los esquemas de tratamiento para la infección por *H. pylori* están basados en estrategias empíricas, debido a la dificultad de cultivar la bacteria. Un antibiótico por sí solo no es capaz de erradicarla, y están basados entonces en la combinación de un inhibidor de bomba de protones (IBP, para suprimir el ácido del estómago y mejorar la absorción de los antibióticos), con dos o más antibióticos entre los cuales los principalmente utilizados son claritromicina, tetraciclina, amoxicilina, metronidazol y levofloxacina, en diversas combinaciones de esquemas. Desde la inicial que es conocida como terapia triple estándar (TTE), y se llama estándar porque el antibiótico base es la claritromicina, hasta las basadas en levofloxacina o metronidazol, y las variantes que han tenido que salir como alternativas y son combinaciones como la secuencial que es mitad del esquema con amoxicilina y la otra mitad cambiando los

antibióticos, o la concomitante que es el IBP más tres antibióticos o la cuadruple que es el IBP más sales de bismuto y dos antibióticos. Con el problema actual de la resistencia adquirida por la bacteria hay recomendaciones de cuáles esquemas de primera línea y cuáles en caso de falla en la erradicación. Para que un esquema de tratamiento se considere exitoso, se debe erradicar la infección en más del 90 %. Pero, con el problema de resistencia actual está claro que hay una correlación inversa entre el éxito de la tasa de erradicación y las tasas de resistencia. Otro punto es que la resistencia es variable según la zona geográfica estudiada

Historia de la línea de investigación en Helicobacter pylori como estrategia para la formación de recurso humano en CTel y la investigación formativa en el programa de Microbiología.

La línea en la Universidad Libre inicia con la llegada de la profesora Adalucy Alvarez Aldana después de un proceso de concurso docente al programa de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud, en el año 2014, en donde además se integra al Grupo de investigación en Microbiología y Biotecnología (MICROBIOTEC), creando la línea de microorganismos de interés. Previamente, había desarrollado proyectos de investigación en conjunto con los profesores Ignacio Moncayo y Jorge Santacruz en el programa de Medicina de la Universidad Tecnológica de Pereira, pioneros en la región en el estudio de *H. pylori*. Los tres profesores levantaron el estado del arte en el Eje Cafetero con respecto a la prevalencia de la infección, los métodos para diagnosticar la infección y la prevalencia de la resistencia en *H. pylori*. Estas investigaciones se realizaron desde el Grupo de investigación centro de biología molecular y biotecnología, cuyo grupo de

investigación se terminó y posteriormente fundaron el Grupo de investigación en enfermedades infecciosas (GRIENI), con el cual desde el año 2015 MICROBIOTEC trabaja en cooperación.

La línea de investigación en *H. pylori* en la Universidad Libre inicia su consolidación con la creación del semillero MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL “OBVIO-MICROBIO” y la financiación del primer proyecto de investigación en la convocatoria

05 del año 2014 y continúa de manera constante sometiendo proyectos a las convocatorias internas de la Universidad Libre como la 07 y 08 de los años 2016 y 2017 (Tabla 1). Por el semillero han pasado entre los diferentes años alrededor de 40 estudiantes diferentes, de los cuales 20 se fortalecieron en el semillero y se convirtieron en tesis de pregrado en nueve tesis diferentes. La figura 1 es una recopilación de fotos del histórico del semillero, los tesis, sus publicaciones y los eventos en los que participaron.

Tabla 1. Histórico de proyectos financiados en la línea de investigación de *H. pylori*.

<u>TITULO</u>	<u>FINANCIACIÓN (MONTO) Y ESTADO</u>	<u>PRODUCTOS</u>
Correlación entre genes de virulencia en aislamientos de <i>Helicobacter pylori</i> provenientes de pacientes dispépticos del Eje Cafetero y diagnóstico clínico j	Convocatoria interna ULP-05 (14 MILLONES). UTP (REACTIVOS Y EQUIPOS) TERMINADO	UNA TESIS DE PREGRADO
Comparación de diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos en <i>H pylori</i>	UTP (REACTIVOS Y EQUIPOS) TERMINADO	UNA TESIS DE PREGRADO
Terapia triple estándar como primera línea de tratamiento para la erradicación de <i>Helicobacter pylori</i> en pacientes dispépticos del Eje cafetero	Convocatoria interna ULP-07 (25 MILLONES) Convocatoria interna UTP (35 MILLONES) TERMINADO	CINCO TESIS DE PREGRADO
Factores asociados a la infección y/o enfermedad por <i>Helicobacter pylori</i> en pacientes dispépticos del Eje Cafetero. Proyecto hijo del proyecto terapia triple estándar....	Convocatoria interna ULP-08 (14 MILLONES) TERMINADO	UNA TESIS DE PREGRADO Y UNA TESIS DE MAESTRÍA
Estandarización de un método molecular para la detección de <i>Helicobacter pylori</i> a partir de agua	Convocatoria interna ULP-08 (12 MILLONES) TERMINADO	UNA TESIS DE PREGRADO

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN EN *HELICOBACTER PYLORI* PARA LA FORMACIÓN DE RECURSO HUMANO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN EL PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA



SEXTO ENCUENTRO DEPARTAMENTAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN DE RISARALDA

La Red Regional de Semilleros de Investigación RREDI - Capítulo Risaralda

HACE CONSTAR QUE
ÁNGELA MARÍA ARANGO LONDOÑO

VI Encuentro Regional de Semilleros de Investigación

Encuentro Nacional de Experiencias Significativas en Investigación Formativa | Encuentro de estudiantes de Movilidad del programa Duetto

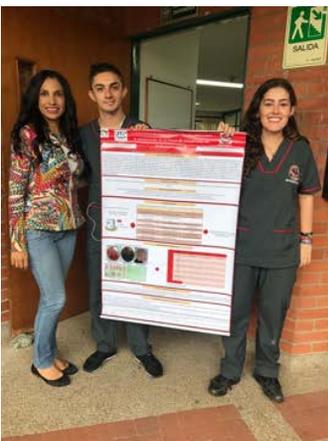
Organizador
UNIVERSIDAD La Gran Colombia
Escuela de Armas

MICRO CIENCIA
Aplicación de la Química

Microciencia
La búsqueda de nuevas técnicas analíticas que sean de alta sensibilidad y selectividad, que logren la detección de compuestos que se encuentren a nivel de trazas en las diversas matrices es uno de los retos de química, además que respondan a los principios de una química verde, donde se minimice el uso de solventes orgánicos, y a su vez las técnicas conlleven a una fácil preparación de la muestra, se reduzcan el número de pasos de todo el proceso

Ver revista | Número actual

Volumen 5 (2016)



SEPTIMO ENCUENTRO DEPARTAMENTAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN DE RISARALDA

Conocimiento y Sociedad

Mayo 17 de 2017
Universidad Libre Sede Belmonite – Edificio de Poigrado

CONVOCA
Red Regional de Semilleros de Investigación – RREDI
Capítulo Risaralda

Características, métodos de cultivo y resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*

Artículo de revisión

Bonero Cardona, J., Cardona López, M.A., Álvarez Aldama A.*

Volumen 7 (2018)

RESUMEN

Helicobacter pylori es la principal especie del género *Helicobacter* responsable de una gran variedad de patologías gastrointestinales en países desarrollados y en vía de desarrollo. La importancia de cultivarla radica en la capacidad de conocer sus características de crecimiento, su diversidad genética, su epidemiología, determinar la resistencia bacteriana a los antibióticos usados en determinado tratamiento y la posibilidad de realizar una detección exitosa en pacientes que se sospeche la presencia del microorganismo. Actualmente no se provee de un medio de cultivo universal para mantener el crecimiento de *H. pylori* y pocos medios han sido identificados que proveen significativamente el crecimiento ventajoso *in vitro*. Este artículo tiene como objetivo realizar una revisión de los diferentes medios de cultivo utilizados para el crecimiento *in vitro* de *H. pylori*, así como los mecanismos de resistencia de la bacteria.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, crecimiento bacteriano, medios de cultivo, resistencia antibiótica.



Figura 1. Imágenes del semillero

Referencias Bibliográficas:

1. <https://gco.iarc.fr>
2. Pardo, C. & de Vries, E. Supervivencia global de pacientes con cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología (INC). Rev. Colomb. Cancerol. 21, 12-18 (2017).
3. Parsonnet, J. et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N. Engl. J. Med. 330, 1267-1271 (1994)
4. Wroblewski, L. E., Peek, R. M. & Wilson, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. Clin. Microbiol. Rev. 23, 713-39 (2010)
5. Zhang RG, et al. Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of gastric carcinoma. World J Gastrointest Pathophysiol. 2016;7(1):97-107
6. Mascellino MT, Porowska B, De Angelis M, Oliva A. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in *Helicobacter pylori* infection. Drug Des Devel Ther. 2017;11:2209-2220

CAPITULO II

***Helicobacter pylori*: Descubrimiento, microbiología, enfermedades, diagnóstico y prevención de la infección**

Autores: Adalucy Alvarez-Aldana¹, Daniel Arturo León-Rodríguez¹

Actualmente la infección por *H. pylori* es una de las más extendidas en el mundo, afectando al 50 % de la población mundial. Es adquirida en la niñez y puede persistir durante muchos años si no es tratada con antimicrobianos. Las condiciones para que *H. pylori* genere una infección no están establecidas, pero por toda la información recopilada en estudios científicos, se cree que está influenciada por factores tales como las variaciones geográficas, variación genética, edad, condiciones socioeconómicas, sexo, y malas condiciones higiénico-sanitarias.

Reseña historia: Los primeros indicios acerca de microorganismos que habitan la mucosa gástrica fueron reportados a finales del siglo XIX, Bizzozero en el año 1893 observó por primera vez organismos Gram negativos, los cuales habían sido aislados de células parietales y glándulas gástricas de perros (1). Posteriormente, algunos patólogos, a principios del XX, reportaron bacterias con forma de espiral en el estómago de animales, y que, también se habían logrado observar en el estómago de humanos que padecían la enfermedad ulcero-péptica y cáncer gástrico (2). El investigador australiano John Robin Warren logró visualizar por primera vez la bacteria el 11 de junio de 1979, comentan-

do en su hallazgo lo siguiente “Trabajaba en mi tarea diaria de examinar las preparaciones para el estudio microscópico de las biopsias gástricas. En una preparación de mucosa gástrica con gastritis crónica activa observé una línea azul en la superficie del epitelio gástrico. Con mayor aumento, pude distinguir numerosos pequeños bacilos que componían dicha línea azul, firmemente adheridos a la superficie del epitelio. Con el objetivo de inmersión confirmé mi sospecha” (3). Warren se dedicó gran parte de su tiempo a investigar estas bacterias que había encontrado. Este investigador recolectó más casos en los cuales la bacteria siempre estaba presente en lesiones histológicas de gastritis. Convencido de lo que él veía, tenía claro que esta bacteria que está presente en el tejido inflamado, se debía considerar el agente causal de la patología. Sin embargo, sus hallazgos iban en contra del dogma de que los microorganismos no sobreviven en un medio tan ácido como es el estómago (4). Nadie creía en los argumentos y evidencias del investigador, exceptuando su esposa Win, la cual lo animaba con mucho entusiasmo a que continuara con su investigación sin importar las críticas (4). Empleando diferentes coloraciones, como la tinción de Gram y la de Warthin-Starry, este médico consi-

1. Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.

guió teñir las bacterias y así diferenciarlas de las células epiteliales. Analizando con un microscopio electrónico secciones más delgadas de la mucosa que presentaban el microorganismo, observó que la bacteria se adhiere con firmeza a la superficie del epitelio (5).

El investigador Warren trabajó en solitario hasta el año 1981, año en el que recibió a Barry Marshall, un investigador escéptico sobre la investigación de Warren, la cual era tildada de imposible por querer convertir la gastritis en una enfermedad infecciosa (6). Marshall tenía la tarea de recolectar biopsias de pacientes en donde las endoscopias no arrojaban inflamación, para así comprobar que la bacteria no estaba presente en la mucosa gástrica no inflamada. Este investigador ayudó realizando una técnica de cultivo adecuada que favoreció el crecimiento de esta “nueva bacteria”. Al observar que la bacteria resultaba parecida a *Campylobacter*, ambos científicos decidieron elegir el medio y tiempo de incubación que se emplea para este género bacteriano. El método en primera instancia no dio resultados positivos, no obstante, después de unos días de vacaciones en los cuales ellos habían dejado por casualidad una placa de cultivo incubando, se comprobó la existencia de diminutas colonias de color transparentes, que al ser identificadas resultaron ser similares a las observadas en los tejidos de biopsias gástricas (6).

Para dar cumplimiento de los postulados de Koch, Marshall inoculó cultivos puros de *Campylobacter* en cerdos, considerado el animal más apto para esta prueba. Desafortunadamente, estos experimentos fueron un fracaso, ya que no observaron cambios en estos animales. Sin embargo, en un momento determinado, el investigador decidió auto inocularse la bacteria, algo que se podría

considerar controversial y peligroso, pero el analista justificó esta acción indicando que él no se exponía a un gran riesgo porque se había comprobado que tenía cura (7). Antes de inocularse la bacteria, se comprobó que Marshall no sufría de ninguna molestia estomacal como gastritis, además, mediante endoscopia, se vio que el científico tenía una mucosa gástrica sana. Marshall, por otra parte, venía siguiendo la evolución de un paciente que tenía la bacteria y que fue tratado con antibióticos, teniendo éxito en la erradicación. Al comprobar que el paciente tuvo la bacteria y se curó, él decidió utilizar la biopsia gástrica de ese paciente, tomándose 30 mL del cultivo junto con 400 mg de cimetidina para disminuir la secreción de ácido en el estómago, facilitando la infección (7). Posterior a esto, Marshall empezó a tener síntomas como náuseas y vómitos durante un periodo de seis días. Al décimo día el investigador se somete a una endoscopia, en la cual se encontró signos de gastritis y en un cultivo realizado con nuevas muestras, creció *Campylobacter*. Luego de estos resultados, él se sometió a un tratamiento con sales de bismuto y metronidazol durante catorce días, donde posteriormente en una tercera endoscopia, la cual fue realizada un mes después de finalizar el tratamiento, la mucosa gástrica había recuperado su estado normal y la bacteria ya no apareció (8).

Luego de muchos intentos de mostrar sus resultados en las revistas médicas, los cuales eran rechazados por no ser lo suficientemente relevantes para la medicina, Warren y Marshall enviaron resúmenes por separado a la revista Lancet. Ambos escritos tenían el mismo título “*Unidentified curved bacilli on gastric epithelium inactive chronic gastritis*”. Ambos enviaron sus artículos por aparte, ya que Warren reclamaba su derecho a ser el descubridor original de la bacteria, mien-

tras que Marshall reclamaba su autoría por la elaboración de cultivos, el ensayo clínico y sus contactos con otros microbiólogos que apoyaron la investigación. Finalmente, el 4 de junio de 1983 fueron publicados ambos artículos con el mismo nombre (9).

La bacteria fue incluida en el género de *Campylobacter*, de forma provisional ya que compartía la morfología espiral, microaerófila y la capacidad de crecer en el mismo medio de cultivo junto con otras características bioquímicas. Sin embargo, la nueva bacteria difería en dos rasgos esenciales como la presencia de múltiples flagelos en uno de sus extremos y su gran capacidad de generar la enzima ureasa. “Cuando fue analizada por microscopía electrónica, se observó que su morfología es distinta a las del género *Campylobacter*, mostrando mayor semejanza con *Aquaspirillum* (10). Luego, unos investigadores aplicaron el método de medir el porcentaje del contenido de guanina y citosina del ADN bacteriano, que ha sido utilizado exitosamente en la clasificación taxonómica de otras especies, dando como resultado que el contenido de estas bases nitrogenadas en *Campylobacter pylori* era más parecido a las bacterias del recién descubierto género *Helicobacter* (10). Finalmente, un grupo de investigadores liderados por Goodwin demostraron, mediante el análisis de ácidos grasos por cromatografía líquida, que *Campylobacter pylori* no pertenecía al género *Campylobacter*, sino que, basados el resultado obtenido del análisis, esta nueva bacteria tenía una semejanza más grande con el género *Helicobacter*. En 1989, con todos los datos recopilados, este grupo de colaboradores publicaron un artículo en el cual exponen los hechos para cambiar el nombre de *Campylobacter* por *Helicobacter pylori*, el cual fue finalmente reconocido y aceptado por toda la comunidad científica (11). Con todo esto, el descubrimiento de *Helicobac-*

ter pylori implicó cambios conceptuales en la comprensión de las enfermedades gastro-duodenales (11).

Taxonomía: Con las publicaciones hechas en el año 1983, diversas patologías gástricas finalmente fueron esclarecidas gracias al descubrimiento y caracterización de un bacilo curvo hallado en muestras de tejido de personas con gastritis crónica activa (1). Como se mencionó anteriormente, este bacilo en principio recibió el nombre de *Campylobacter pyloridis*, tiempo después sería renombrado como *Campylobacter pylori*, y finalmente, con base en los resultados conjuntos de ensayos moleculares (en donde se analizó el ARN ribosomal 16s), análisis bioquímicos, estudios morfológicos, y estudios estructurales, este bacilo pasó a nombrarse *Helicobacter pylori* en 1989. Este género en conjunto con otros microorganismos como *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Wollinella* hacen parte de la clase *Epsilonbacteria* en la subdivisión *Thiobacteria* de la división *Proteobacteria*. Este género incluyó a las especies *Helicobacter pylori* y *Helicobacter mustelae*, consideradas las primeras bacterias aislada de la mucosa gástrica (12,13).

Morfología celular de *Helicobacter pylori*: *H. pylori* es una bacteria en forma helicoidal, curva o espiral, posee bordes redondeados y tiene un tamaño entre 0,5 a 1 μm de ancho y de 2,5 a 4,5 μm de largo. En uno de sus extremos presenta entre dos a ocho flagelos, los cuales le facilitan la movilidad por la mucosa gástrica. Esta bacteria dadas sus características de pared se clasifica dentro del grupo de las bacterias Gram negativas y en su pared celular se observan estructuras similares a anillos, los cuales corresponden a la ureasa que se localiza en la superficie extracelular, la cual, es una sustancia esen-

cial para la supervivencia de *H. pylori* en el estómago (14).

Una particularidad en esta especie bacteriana es cuando las condiciones externas no son favorables (pH, déficit de nutrientes, A_w , temperatura, etc.), *H. pylori* tiene la capacidad de pasar a un estado metabólicamente poco activo o casi inactivo. Esta característica le permite a la bacteria protegerse de estas condiciones adversas, y este estado se le conoce como forma “cocoides”, ya que éstas reducen su tamaño (pareciendo cocos), volviéndose más resistentes y con menores requerimientos nutricionales (15).

Morfología de las colonias: En un medio de cultivo, a 37°C, las características morfológicas de las colonias de *H. pylori* se demoran en aparecer entre tres y siete días. Cuando las colonias se forman, éstas presentan una forma circular, de color gris, y pueden medir entre 1 y 2 mm. Además, son convexas, húmedas, y presentan un aspecto translúcido. Por otra parte, cuando es sembrada en agar sangre, *H. pylori* presenta una ligera hemólisis alrededor de las colonias (16).

Genoma: En 1997 fue publicada la primera secuencia completa del genoma de *H. pylori*. Luego, en el año de 1999, *H. pylori* se convirtió en la primera bacteria a la cual se le hicieron dos secuencias del genoma a partir de dos cepas diferentes, y que ambas secuencias se pusieron a disposición en las bases de datos. A partir de esa información disponible, fue posible evidenciar elementos cruciales en cuanto a la genética de *H. pylori*, hallándose por un lado que ambas cepas mostraron diferencias genómicas significativas en la secuenciación, y por otro lado, se evidenció que el contenido de genes hallados por métodos de predicción diferían significativamente entre ambas cepas analizadas.

Esto permitió demostrar en cierta medida el hecho de que *H. pylori* es un microorganismo que es reconocido por ser naturalmente transformable, y que por sus características presenta un alto grado de variabilidad genética y genómica (17,18).

Con el avance de la tecnología y la mayor disponibilidad de secuencias de genomas completos, el estudio de microorganismos tales como *H. pylori* ha tenido un importante avance, en donde cada vez más han aparecido un importante número de estudios comparativos, los cuales han proporcionado información de importancia de la historia evolutiva de esta especie bacteriana (19). Dicho esto, es importante mencionar que *H. pylori* se encuentra en el grupo de microorganismos patógenos más recombinantes de los que hoy se conocen, este microorganismo tiene la capacidad de intercambiar de una forma rápida material genético entre diferentes linajes mediante su mecanismo de transferencia horizontal de genes (HGT), creando así una población con tasas evolutivas relativamente altas (13).

Diversos estudios genéticos se han enfocado en las regiones del genoma de *H. pylori* que se encuentran involucradas en el mecanismo de patogenicidad del microorganismo y como éste se adapta al entorno en el que se encuentra (es decir el huésped) (20). Uno de los métodos más usados para el estudio de estas regiones genómicas en las cepas analizadas es por medio de la tipificación de secuencia multilocus (MLST). Actualmente, en plataformas como el NCBI se encuentran hasta 500 secuencias del genoma de diversas cepas de *H. pylori* que se obtuvieron de distintas regiones geográficas en el mundo, aunque muchas de estas secuencias no se encuentran ensambladas (20).

Características Bioquímicas: *Helicobacter*

pylori es una bacteria que presenta una baja reactividad bioquímica en distintas pruebas. Esta especie bacteriana es oxidasa y catalasa positiva, y algunas especies de este género tienen la capacidad de reducir nitratos. Por otra parte, es un microorganismo microaerófilo, lo que le permite acomodarse al ambiente del sistema gástrico. Además, esta especie tiene la capacidad de desdoblar la urea gástrica, lo que genera una gran cantidad de amonio en su entorno, neutralizando así el ácido clorhídrico, lo que lo convierte en un microorganismo capaz de sobrevivir en un ambiente ácido (pH 4). En adición a lo anterior, todas estas características hacen que el entorno de la bacteria se transforme en un ambiente neutro, lo cual licúa el moco gástrico, lo que le confiere la capacidad de desplazamiento a través del tejido, trayendo entre sus consecuencias más conocidas la gastritis (21).

Las especies presentes de *Helicobacter* son quimiorganotrofos, poseen un metabolismo respiratorio, estos microorganismos son asacarolíticas o sea no hay fermentación y tampoco oxidación de azúcares, aunque si ocurre la oxidación de glucosa, este patógeno en el cultivo tiene requerimientos como que el medio sea suplementado con suero o sangre de cordero debido a que funcionan como una adición de nutrientes adicional a esto los protegen de los efectos tóxicos de los ácidos grasos de cadena larga, estos también se pueden omitir por medio del complemento con suplementos como β -ciclodextrinas, IsoVitaleX o por la adición de carbón activado en el medio de cultivo (12).

Factores de virulencia: *H. pylori* puede colonizar las células epiteliales gástricas y dar lugar a que se presenten diferentes enfermedades, gracias a sus factores de virulencia. Unos de los factores de virulencia más im-

portantes de esta bacteria es la ureasa, que como se había mencionado previamente, desdobla la urea dando como productos el amoníaco y dióxido de carbono, disminuyendo la acidez de la mucosa gástrica (22).

Otro factor importante es la presencia de flagelos en este microorganismo, entre dos y seis por célula. Este factor es el que le permite la colonización y así llegar al epitelio de la mucosa gástrica. Un estudio reciente demuestra la asociación de este factor con el factor de virulencia de la ureasa. Las fosfolipasas de *H. pylori* son otro factor de virulencia provocan la elaboración de productos como la lisotenia que afecta la capa protectora que contiene gran cantidad de fosfolípidos en la membrana apical de las células de la mucosa gástrica (23). Diferentes estudios han demostrado que el factor más importante de virulencia de *H. pylori* es la proteína CagA, codificada por el gen *cagA* se encuentra en la mayoría de las cepas de este microorganismo. Es una citotoxina con acción pleiotrópica, puede provocar gran cantidad de efectos negativos como: estimulación de linfocitos, desregulación del ciclo celular, apoptosis celular, elaboración de citocinas inflamatorias, dando un lugar a una inflamación crónica. Debido a esto y otras características, la CagA se encuentra catalogada como una proteína oncogénica (24). Un elemento importante para tener en cuenta es que la presencia de la proteína CagA se encuentra directamente relacionada con la citotoxina vaculante o citotoxina vacuoladora (VacA); la cual toma el puesto del segundo factor de virulencia más estudiado en *H. pylori*. VacA es un factor que produce en el tejido adyacente daño epitelial gástrico, asimismo, esta toxina provoca la alteración del tráfico vesicular. Un evento de importancia es que ésta inhabilita la estimulación de los linfocitos T, interceptando el proceso de péptidos especí-

ficos en la presentación de antígeno. El gen *vacA* se encuentra en todas las cepas de *H. pylori*, y en términos genéticos se encuentra epidemiológicamente ligada a diferentes patologías gastroduodenales (25).

Enfermedades asociadas a la infección:

Cuando una persona adquiere la infección puede presentar síntomas que son transitorios como son las náuseas, vómitos y dolor abdominal. Un hecho comprobado es que toda persona que tiene una infección por *H. pylori* desarrolla gastritis crónica superficial, la cual, si no es erradicada del todo, dicha infección se puede prolongar durante bastante tiempo (26).

Sin embargo, las personas que portan *H. pylori* se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con su sintomatología. Esto es que algunos portadores pueden ser pacientes asintomáticos, mientras que otros individuos pueden sufrir gastritis aguda con un cuadro de dolor epigástrico y vómitos, la cual puede avanzar hasta convertirse en gastritis crónica activa. También muchos pacientes presentan síntomas recurrentes, pero no presentan úlceras gástricas (27). La gastritis es una inflamación aguda o crónica de la mucosa gástrica con predominio de células inflamatorias (monocitos, linfocitos, neutrófilos), y su cuadro clínico se caracteriza por dolor en el epigastrio, náuseas, vómitos etc. Cuando ésta está asociada a infección con *H. pylori* suele ocasionar gastritis antral y predisposición a úlceras duodenales, que en los casos más severos puede ocasionar o avanzar a cáncer duodenal. Aproximadamente el 1-10 % de paciente infectados tienen riesgo de tener gastritis crónica (28).

Un hecho que se ha comprobado en las infecciones con *H. pylori*, es que a medida que éstas van avanzando y se van desarrollando, se incrementa de manera exponencial la población de linfocitos T CD4+. Estos linfo-

citocitos generan a su vez un incremento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH-II), que, sumado a las secreciones gástricas, están implicados en la aparición de úlceras gástricas (29).

Por su parte, una úlcera péptica es una lesión de la mucosa gastro-duodenal que abarca hasta la submucosa. Cuando es poco profunda se denominan erosiones, pero este tipo de lesiones son precursoras de la lesión ulcerativa. Las lesiones tienen dos etiologías principales que son: 1) la infección por *H. pylori* y 2) por el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos. No obstante, es importante aclarar que solamente alrededor del 15 % de los pacientes infectados desarrollan esta enfermedad (30).

La presencia de gastritis crónica que cursa con atrofia glandular, metaplasia y displasia más la infección por *H. pylori* (carcinogénico tipo I) se ha asociado a la aparición de cáncer gástrico en el 0.1-3 % de los pacientes debido al daño molecular que induce la bacteria sobre las células gástricas y la expresión de oncogenes (30).

Diagnóstico de la infección: *Helicobacter pylori* causa una de las infecciones bacterianas crónicas con mayor prevalencia en los seres humanos, sumado al hecho de que este patógeno puede estar presente en el estómago durante toda la vida (31). Su diagnóstico es de gran importancia debido a las diferentes circunstancias clínicas ligadas a su presencia, por ello, es necesario utilizar dos diferentes métodos de diagnóstico, y que de esta manera se pueda realizar un diagnóstico temprano, o al menos, un rastreo de la enfermedad que se encuentra relacionada con la infección. Este diagnóstico se implementa a partir de la combinación de las dos modalidades de pruebas para que el diagnóstico

sea significativo, lo que implica que tenga un alto poder de detección. Además, esas pruebas son tanto invasivas como no invasivas, permitiendo que la sensibilidad y especificidad sean mayores al 90 %. La elección de la modalidad a manejar depende de contextos clínicos del paciente a examinar: primero la disponibilidad de la prueba y el rango de error que tenga la misma, y segundo, el costo que tenga la prueba, y por último, la efectividad que contenga el análisis de la prueba (32). A continuación, se hará un repaso de distintos métodos.

Exámenes invasivos: Aunque para el diagnóstico de *H. pylori* existen diversas pruebas, cada una de ellas tiene ventajas y desventajas. Muchas de estas pruebas tienen poca sensibilidad o especificidad. El “método estándar de oro” o “Gold-Standard” es el cultivo, con una especificidad del 100 %, pero con sensibilidad muy variable y la mayoría de las veces muy baja. Las pruebas más utilizadas para la detección de *H. pylori* generalmente son: examen histológico, cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su sigla en inglés). Aunque los resultados por medio de estas pruebas son más satisfactorios, estos tienen varias desventajas como son el costo de estos ensayos, que solo se puede realizar en laboratorios especializados y lo más importante, que son invasivos (33). Por lo tanto los métodos invasivos requieren de la endoscopia, el procedimiento tiene como ventaja que además de evaluar la integridad de la mucosa gástrica de manera macroscópica, si el clínico lo considera esta la posibilidad de obtener biopsias de diferentes zonas de la mucosa gástrica y estas son la fuente para los diferentes métodos invasivos, como por ejemplo el cultivo para detectar la presencia de la bacteria (34). Se ha demostrado que, para aumentar el rendimiento diagnóstico en la detección de la bacteria, es necesaria la elección de un sitio óptimo para

la toma de la biopsia. Sin embargo, el mejor sitio para la toma de la biopsia debe ser evaluado según la zona de ubicación de la bacteria en el estómago. Las tres partes en las que se puede tomar la biopsia es antro, cuerpo y fondo (35). Se ha comprobado que *H. pylori* migra desde el antro hasta el estómago proximal luego de una terapia de supresión ácida. También se ha demostrado que la intervención con antimicrobianos o con inhibidores de la bomba de protones suprime a *H. pylori*, así que, someterse a tratamientos subóptimos de erradicación y la toma de medicamentos disminuyen la sensibilidad para la detección de *H. pylori*. Es por esto que se recomienda tomar más de una biopsia, por ejemplo antro y cuerpo gástrico, para mejorar las tasas de detección, sobre todo en los pacientes que han tenido exposición a antibióticos (36).

- Examen histológico: tiene varios factores que influyen en su precisión, tales como el sitio donde se toma la muestra, los métodos de tinción, el tamaño de las biopsias, el consumo de inhibidores de bomba de protones, agentes antimicrobianos y la persona que tome las muestras. Se recomienda por lo menos la obtención de dos muestras de biopsia. A las biopsias previamente teñidas se les hace hibridación in situ fluorescente de ácido nucleico peptídico (FISH), y esta prueba es esencial para casos en los que la bacteria está en forma cocoides, la cual es la forma que corresponde a la etapa en que es más difícil la detección de la bacteria (37).
- Prueba rápida de ureasa: Esta prueba se basa en la toma de una biopsia gástrica, la cual se somete a un kit de ureasa. Una vez se hace el procedimiento que el kit requiera y haya un viraje a color (según el tipo de kit),

se revelan los resultados de acuerdo con el manual de éste (38).

- Cultivo: Los cultivos de *H. pylori* generalmente se realizan de las biopsias gástricas extraídas de pacientes con la infección. El medio de cultivo para el aislamiento de este microorganismo puede ser un medio TSA, BHI, agar Columbia, enriquecido y lo más importante sangre, que puede ser sangre de cordero o sangre de caballo (39)
- Ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Con esta técnica primero se extrae el ADN de la biopsia y tiene como propósito amplificar *in vitro* copias de una región en específico del ADN de la bacteria. La sensibilidad y especificidad es de 95 %. Esto también depende de los oligonucleótidos que se utilizan para la amplificación (40).
- Exámenes no invasivos: Las pruebas no invasivas como indica su nombre, no requieren del procedimiento de endoscopia ni de biopsia gástrica, generalmente son indirectos, lo que significa que se realizan para detectar un componente o compuesto que genera el microorganismo (40), o que el cuerpo humano produce en respuesta ante la presencia de la bacteria. A continuación, se enumeran algunos
- Test de ureasa (prueba del aliento): Por medio de esta prueba se detecta la acción de la enzima ureasa de *H. pylori*. Esta enzima es capaz de hidrolizar la urea y convertirla en CO₂ y amonio. El CO₂ generado se difunde por la mucosa gástrica a la circulación general, esta se difunde por el plexo capilar

hasta los alveolos, para finalmente ser expulsado en aliento espirado. Para la prueba de ureasa se usa moléculas de carbono marcadas como el 13C y 14C, el cual detecta el CO₂ en muestras de aire espirado. Esta prueba cuenta con una sensibilidad y especificidad entre el 88 % y 95 % (40).

- Pruebas serológicas: Mediante esta prueba se detectan anticuerpos IgG o IgA para *H. pylori*, se puede detectar en suero, sangre total u orina del paciente. Para su detección se usa la técnica inmuno-enzimática ELISA. Su sensibilidad varía entre el 90 % a 100 % y su especificidad esta entre 76 % a 96 %. También existe otra variante en la cual la muestra analizada son las heces del paciente (41).
- Pruebas bioquímicas para la detección de *Helicobacter pylori*: En la actualidad se encuentran una gran diversidad de pruebas para la detección de *Helicobacter pylori*, entre las cuales encontramos las pruebas bioquímicas que abarcan las pruebas tales como oxidasa, catalasa, ureasa (42).
- La prueba de ureasa se basa en una enzima que se presenta en *H. pylori* en gran cantidad y esta va directamente ligada con el pH del entorno del microorganismo. Como se ha mencionado, el ambiente normal para su desarrollo se encuentra bajo la capa mucosa, ya que este entorno tiene un pH neutro, la ureasa es denominada una metaloenzima capaz de catabolizar la hidrolisis de la urea que se encuentra en el estómago convirtiéndola en amonio y dióxido de carbono, el amonio que produce este

microorganismo ayuda a que el pH del medio incrementa pasándolo de uno neutro a un pH de seis o siete. Es importante mencionar que la ureasa se debe regular debido a que se incrementa la actividad de alcalinidad debido a la producción de amonio que genera el patógeno, esto ocurre por medio de un transportador dependiente del pH llamado UREL, el cual tiene la característica de dejar entrar la urea, pero éste llega a inactivarse cuando el entorno alcanza un pH de seis a siete, como se mencionó anteriormente, el amonio que produce esta bacteria trae como consecuencia una serie de daños de las células epiteliales superficiales y la microcirculación interviene en el desarrollo de patologías asociadas a la gastritis, incrementa las infecciones virales y la carcinogénesis (12).

- La prueba de la catalasa como su nombre lo indica trabaja con una enzima llamada catalasa. Esta enzima se encuentra en gran parte de las especies de microorganismos que poseen citocromos, los cuales son capaces de sintetizar esta enzima e hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y el oxígeno gaseoso, el cual empieza a liberarse en forma de burbujas. Las peroxirredoxinas son enzimas que son las encargadas de catalizar la reducción de las peroxirredoxinas y otros hidroperóxidos orgánicos en alcoholes (43). El procedimiento de la prueba de catalasa se realiza aplicando una pequeña gota de peróxido al 3 % sobre un porta-objetos que contenga una pequeña muestra, luego, pasado un tiempo, se deja reaccionar y se puede

presenciar liberación de oxígeno gaseoso cuando el microorganismo es capaz de hidrolizar la encima de la catalasa (39).

- La prueba de la oxidasa se basa en la enzima citocromo oxidasa. Esta enzima pertenece al grupo porfirina férrica, la cual es capaz de oxidar el citocromo c reducido. La prueba hace uso de tiras impregnadas con el reactivo N.n.n.n-tetrametil,1-4, fenilendiamina, el cual pasa a tener un color púrpura al ser oxidada (44). La tira impregnada por N.n.n.n-tetrametil,1-4, fenilendiamina se transfiere una pequeña cantidad de la muestra y se espera el viraje del color de la tira con lo cual se hará la interpretación correspondiente del análisis.

Estrategias de prevención: Como ya se sabe, la vía de transmisión de *H. pylori* es fecal oral y oral-oral. Sin embargo, hay estudios que han evidenciado indirectamente la presencia de *H. pylori* en aguas potables y otras fuentes ambientales (45). Por otra parte, los patrones de propagación de la bacteria en condiciones de alta prevalencia difieren de los de los países desarrollados. En niños, que es la etapa en la cual se puede adquirir de manera más fácil *H. pylori*, es recomendable evitar que los adultos usen los cubiertos, los chupetes y los biberones. También es aconsejable no degustar ni masticar la comida de los niños ya que el jugo gástrico, las heces y la saliva han sido descritos como vehículos potenciales para una infección por *H. pylori*. Dicho esto, es recomendable no usar el mismo cepillo de dientes, no poner en la boca materiales que use él bebe y el lavado de manos es esencial para evitar una infección por la bacteria. La falta de higiene, infecciones recurrentes y el consumo de alimentos

sin lavar o lavados con aguas no potables también aumenta el riesgo de contraer una infección por *H. pylori* (46). Otros estudios han demostrado que el consumo de probióticos como *Lactobacillus* y *Sacharomyces boulardii* hacen que se disminuya la carga bacteriana de *H. pylori* pero no la erradica de la mucosa gástrica (47). Por esto es aconsejable tratar de consumir alimentos preparados en casa con las condiciones de higiene necesarias.

Referencias Bibliográficas

1. Sáenz R. “*Helicobacter pylori*, hoy”. una historia de 30 años. Rev Médica Clínica Las Condes. 2015;26(5):572–8.
2. Nobel P. Descubrimiento de la bacteria. 2006;139–64.
3. Pajares García JM, Pajares-Villarroja R, Gisbert JP. *Helicobacter pylori*: resistencia a los antibióticos. Rev Española Enfermedades Dig. 2007;99(2):63–70.
4. Marcelle E, Ghetti DP. Artículos de Revisión *Helicobacter Pylori*: un problema actual. 2013;36(2):108–11.
5. Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social (Costa Rica) F, Caja Costarricense de Seguro Social. P. Historia natural de la infección por *helicobacter pylori*, su tratamiento antimicrobiano y el empleo de plantas medicinales. Rev Costarric Cienc Med. 2003;24(3–4):149–65.
6. Pajares JM, Gisbert JP. Pdv 0916 Pajares. 2006;98:770–8. <http://www.grupoaran.com/mrmUpdate/lecturaPDF-fromXML.asp?IdArt=458313&%3BTO=RVN&%3BEng=0>
7. Stanley B. Prusiner. Physiology or Medicine for 1997. La Asamblea Nobel en el Instituto Karolinska. 2019.
8. Jombo GT, Gyuse AN, Odey F, Ibor S. International Journal of Biological {&} Medical Research. J Biol Med Res. 2010;6(2):5518–21.
9. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients With Gastritis and Peptic Ulceration. Lancet. 1984;323(8390):1311–5.
10. Felipe C, Guillermo C. Dos décadas de *Helicobacter pylori*. Cent Biol Mol “Severo Ochoa”, Univ Autónoma Madrid Madrid Españ. 2014;(1):1–10.
11. Raúl Lazarte C. La historia de los científicos involucrados en el descubrimiento del *Helicobacter pylori*. 2009.
12. Pena. Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por *Helicobacter pylori*. Kas.Unibe.Ch. 2010. 211 p.
13. Jiménez GJ. *Helicobacter Pylori* Como Patogeno Emergente En El Ser Humano. Rev Costarric Salud Pública. 2018;27(1):65–78.
14. Luís J, Guerrero S, Carolina G, Vera R, Herreros M. Dialnet-*Helicobacter-Pylori* RevisionDeLosAspectosFisiologico-4054204. 2011;
15. Kondo M, Tsuchiya K. Effect of combination of cefsulodin and meclillinam. J Antibiot (Tokyo). 1981 Jun;34(6):727–38.
16. Graber M. Foreword: from the counter-majoritarian difficulty to juristocracy and the political construction of judicial power. Maryl Law Rev. 2006;65(1):1–14.
17. van Vliet AHM. Use of pan-genome analysis for the identification of lineage-specific genes of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett. 2017;364(2):1–7.
18. Mégraud F, Lehours P, Vale FF. The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomi-

- crobiology. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(11):922–7.
19. Thompson LJ, De Reuset H. Genomics of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2002;7(SUPPL.):1–7.
 20. Cao D-M, Lu Q-F, Li S-B, Wang J-P, Chen Y-L, Huang Y-Q, et al. Comparative Genomics of *H. pylori* and Non-*Pylori Helicobacter* Species to Identify New Regions Associated with Its Pathogenicity and Adaptability . *Biomed Res Int*. 2016;2016:1–15.
 21. Álvarez VMS. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Vitamina A , inmunocompetencia e infección. *Helicobacter*. 2001;15(2):121–9.
 22. Kalali B, Mejías-Luque R, Javaheri A, Gerhard M. *H. pylori* Virulence Factors: Influence on Immune System and Pathology . *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1–9.
 23. Chang WL, Yeh YC, Sheu BS. The impacts of *H. pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):1–9.
 24. Heras JM. Factores de virulencia de *Helicobacter pylori* involucrados en su persistencia, colonización y patogenicidad. 2017;19.
 25. Hernández-Hernández L del C, Lazcano-Ponce EC, López-Vidal Y, Aguilar-Gutiérrez GR. Relevance of *Helicobacter pylori* virulence factors for vaccine development TT - Relevancia de los factores de virulencia de *helicobacter pylori* para el desarrollo de vacunas. *Salud Publica Mex*. 2009;51(supl.3):s447–54.
 26. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014 Sep 28;20(36):12781–808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278678>
 27. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2007;21(2):205–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382273>
 28. Premoli G, González A, Millán-Mendoza B, Percoco T, Vielma A. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Med Trop*. 2004;56(2):85–90.
 29. Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*. 2004 Aug;9(s1):1–6.
 30. Backert S, Neddermann M, Maubach G, Naumann M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2016;21(3):19–25.
 31. Leyva LM, Belinda D, Cowan G, Luis B, Zamora OR, Linares YV, et al. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* mediante serología , histología y cultivo Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by serology , histology and culture. *Rev Cuba Med Mil*. 2016;45(3):344–53.
 32. Frías Ordoñez JS, Otero Regino W. Revista de gastroenterología del Perú órgano oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú. *Rev Gastroenterol del Perú*. 2017;37(3):246–53.
 33. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. 2014;20(36):12847–59.
 34. Diaconu S, Predescu A, Moldoveanu A, Pop CS, Fierbințeanu-Braticevici C. *Helicobacter pylori* infection: old and new. *J Med Life*. 2017;10(2):112–7.
 35. Cho J-H, Jeon SR, Kim HG, Jin S-Y, Park S. Factors for improving the diagnostic efficiency of the rapid urease

- test from the gastric corpus. *Scand J Gastroenterol.* 2017 Dec;52(12):1320–5.
36. Wong A, Ching SS, Long AS. The use of a second biopsy from the gastric body for the detection of *Helicobacter pylori* using rapid urease test. *Singapore Med J.* 2014;55(12):644–7.
 37. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SSW, et al. Diagnosis of *helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol.* 2015;21(40):11221–35.
 38. Ricci C, Holton J, Vaira D. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007 Apr;21(2):299–313.
 39. Ogata SK, Kawakami E, Patrício FR, Pedroso MZ, Santos AM. Evaluation of invasive and non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic children and adolescents. *Sao Paulo Med J.* 2001;119(2):67–71.
 40. Talkington DF. PCR Detection of Microbial Pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(8):1–8
 41. J. Muñoz Gutierrez, H. Iglesias Franco, M. L. Fidalgo García. *Helicobacter pylori* y patología gastroduodenal: patogenia, diagnóstico y pautas terapéuticas. *Atención Primaria.* 1997;19(7):377–82.
 42. Khelkal IN, Aziz FN, Naji EN, Aziz SN, Abdualkader SS, Raauff AM. Inhibition of *helicobacter pylori* growth by oral streptococci. *J Pharm Sci Res.* 2018;10(7):1656–9.
 43. Cervantes-García E. www.mediagraphic.org.mx *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab.* 2016;63(2):100–9.
 44. López-Brea M, Alarcón T, Baquero M, Domingo D, Royo G. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Procedimientos en Microbiol Clínica.* 2004;1–25.
 45. Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, Manica A, Balloux F, Owen RJ, et al. Horizontal versus Familial Transmission of *Helicobacter pylori*. Maiden MCJ, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2008 Oct 24;4(10):e1000180. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000180>
 46. Yucel O. Prevention of *Helicobacter pylori* infection in childhood. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(30):10348. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i30/10348.htm>
 47. Homan M, Orel R. Are probiotics useful in *Helicobacter pylori* eradication? *World J Gastroenterol.* 2015;21(37):10644–53.

CAPITULO III

El metodo de cultivo para la detección de *Helicobacter pylori*

Adalucy Alvarez-Aldana¹, Catalina Ramírez-Osorio², Wendy L Ospina-Joaqui², Miguel Angel Cardona², Juliana Botero², Yina Marcela Guaca-González³, Jorge Javier Santacruz-Ibarra³, José Ignacio Moncayo-Ortiz³, Eleazar Vargas-Mena⁴, Manuel Velandia López², Angela Maria Arango².

Presentación

El cultivo de Helicobacter pylori es considerado como la prueba de oro para el diagnóstico de la infección. Es tradicionalmente conocido por ser un microorganismo exigente para su crecimiento in vitro. En el texto siguiente se describen los requerimientos nutricionales, entre otros para el crecimiento de H. pylori en cultivo.

Para la detección de *Helicobacter pylori*, el medio de cultivo es considerado como la prueba de oro para el diagnóstico de *H. pylori*. La utilidad y ventaja principal que posee este método es que se puede estudiar la sensibilidad de las cepas a distintos agentes antimicrobianos, conocer las características de crecimiento, su epidemiología, y realizar distintos estudios con la cepa obtenida en dicho método; como desventaja se destaca que los resultados del diagnóstico del cultivo puede tomar de 3, 5 a 7 días que corresponde con el crecimiento del microorganismo (1). El método de cultivo desempeña un papel importante en los laboratorios de microbio-

logía, ya que proporciona las condiciones nutricionales necesarias para que los microorganismos crezcan y se reproduzcan. Cuando se habla de cultivo primario hace referencia a la primera siembra de un tejido o de una muestra.

El cultivo de *Helicobacter pylori* es el método más específico en el diagnóstico de la bacteria, la sensibilidad de este se encuentra entre el 70 % y 95 %, cuando se trata de material gástrico obtenido mediante biopsia, esto puede variar con relación a la toma, transporte y almacenamiento de la muestra. El medio de cultivo seleccionado y la incubación en cuestiones de porcentaje de dióxido de carbono y humedad, al igual que la inexperiencia en el cultivo de *H. pylori*, son factores que pueden influir en la detección de la bacteria por cultivo. Normalmente, la muestra para el cultivo de *H. pylori* es la biopsia antral, debido a que el microorganismo se encuentra habitualmente en esa zona gástrica, exceptuando los pacientes tratados con inhibidores de bomba de protones

- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
- 2 Exintegrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.
- 3 Docente. Programa de Medicina. Facultad ciencias de la salud. Grupo investigación GRIENI. Universidad Tecnológica de Pereira.
- 4 Docente. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.

y antihistamínicos en los cuales el microorganismo migra a cuerpo; en el transporte y conservación de la muestra se conoce que *H. pylori* es una bacteria delicada y al momento de procesarla se debe realizar de forma rápida, una vez se haya obtenido (2).

El uso de inhibidores de bombas de protones puede ser uno de los factores que disminuya la sensibilidad del cultivo debido a que el consumo de estos inhibe el ácido gástrico suprimiendo así el crecimiento de *H. pylori* por efecto del pKa de la ureasa de la bacteria, disminuyendo la densidad de *H. pylori* a nivel de la mucosa gástrica (3).

Además de *H. pylori*, *Helicobacter heilmannii* es la bacteria más común en la mucosa gástrica humana. *H. heilmannii* se encuentra generalmente en las células Foveolares asociadas con gastritis crónica leve, mientras que *H. pylori* se encuentra generalmente en el epitelio de la superficie asociada con gastritis severa. El contacto con las células epiteliales suele ser más superficial para *H. heilmannii* que para *H. pylori*. Ocasionalmente, *H. heilmannii* y *H. pylori* se encuentran simultáneamente (4).

El cultivo por impresión (touch) consiste en el primer contacto de la mucosa del tejido obtenido con el medio de cultivo, es decir, un frotis del tejido en el medio dejando en el parte de la mucosa que recubre el tejido; también se puede realizar un cultivo primario por medio de la maceración de la muestra suspendida en solución salina y su posterior siembra en el medio de cultivo apropiado.

El sistema actualizado de Sydney recomienda que las biopsias deben ser tomadas a partir de cinco sitios diferentes (dos de antro, dos de cuerpo y una de incisura angularis). La toma de biopsia se puede realizar en diferen-

tes zonas del estómago como antro cuerpo o fondo como se ha nombrado anteriormente, en algunos estudios se dice que la zona antral o angularis son altamente sensibles para detectar la infección por *H. pylori*; mientras que en otros estudios se evidencio que la zona con mejores resultados fue cuerpo (5).

Helicobacter pylori requiere de medios enriquecidos para ser cultivado; se puede cultivar tanto en medios solidos como en medios líquidos (6). Para el cultivo de *Helicobacter pylori* se utilizan medios base como los listados a continuación y la adición de sangre permite el aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes (7).

- Caldo Mueller-Hinton (MHB) Y Agar Mueller Hinton (MHA): Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además, es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes (8).
- Agar Columbia: Es una excelente base para el crecimiento de microorganismos exigentes y para la buena visualización de hemólisis con el agregado de sangre (9).
- Agar Skirrow: Medio selectivo utilizado para el aislamiento de especies de *Campylobacter* (10).
- Agar Charcoal Campylobacter: Es un medio selectivo para el aislamiento primario de especies de *Campylobacter* (11)
- Agar Johnson-Murano: Medio selectivo para especies de *Campylobacter*

y *Arcobacter* spp (11)

- Helicobacter pylori especial peptona (H. PYLORISP) y Medio Glupczynski: Medios selectivos para *Helicobacter pylori* (9).

El cultivo de *H. pylori* es complicado de realizar debido a las exigencias que tiene este microorganismo para crecer, por lo que los medios base deben de ir acompañados de suplementos que ayudan al desarrollo de *H. pylori*.

- IsoVitaleX: Es un suplemento definido químicamente que se utiliza como un aditivo para medios de cultivo de microorganismos nutricionalmente fastidiosos. (BD) Mejorando significativamente el crecimiento de *H. pylori* (11–14)
- Rojo de Tetrazolium: Se utiliza para visualizar la actividad respiratoria de las células; se basa en la reacción química de algunas enzimas (deshidrogenasa) que se encuentran en las células vivas con la sal de tetrazolio. Inicialmente estas sales son incoloras, pero al reducirse causa una precipitación insoluble de coloración intensa (rojo) conocido como formazan. Rojo de Tetrazolium se utiliza en una prueba de viabilidad bioquímica para las semillas (15).
- Suero fetal bovino (SFB): Es uno de los productos biológicos más empleados en el mantenimiento de cultivos celulares, ya que aporta factores de crecimiento, hormonas, minerales, lípidos, proteínas, vitaminas, oligoelementos y otros micronutrientes que son esenciales e indispensables

para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de las células; suplen satisfactoriamente los requerimientos metabólicos para el cultivo celular, garantizando con esto la proliferación y la adhesión celular (16,17).

- Extracto de levadura: Es un producto derivado de las células de la levadura que realiza una autólisis por enzimas naturales de la misma, los extractos producidos por este método son ricos en proteínas y aminoácidos libremente disponibles, al igual que tiene un alto contenido en vitaminas del complejo B; es utilizado en una amplia variedad de medios de cultivo como fuente de nutrientes.
- Ciclodextrinas: Son oligosacáridos cíclicos obtenidos mediante la degradación enzimática del almidón, en los últimos años ha incrementado su uso en el campo de la biotecnología. Se ha demostrado que las ciclodextrinas pueden sustituir el suero en los medios sólidos y líquidos para el crecimiento de *Helicobacter pylori*, estos medios pueden ser usados para el primer aislamiento de este microorganismo de biopsias gástricas. Las ciclodextrinas reducen la concentración de sustratos o productos que son tóxicos o inhibitorio para los microorganismos (18,19).
- Mucina: Es una glicoproteína de alto peso molecular, sintetizadas por células epiteliales, algunos investigadores sugieren que los medios suplementados con mucina crean un ambiente favorable para *Helicobacter pylori* ya que esta degrada enzimáticamente a la mucina y puede

servir como un nutriente para el crecimiento de la misma; la mucina hace que el medio de cultivo tenga un alto nivel de viscosidad proporcionando unas condiciones microaeróbicas favorables para el crecimiento de *Helicobacter pylori*, pero también puede contrarrestar el efecto inhibitorio de algunos antibióticos usados para el medio selectivo de *H. pylori*. Para mejorar el crecimiento de este en medio líquido se puede realizar una combinación de piruvato de potasio y sulfato ferroso y mucina (20,21).

- Extracto de microalgas: El extracto de cianobacterias es rico en aminoácidos, proteínas, carbohidratos y diferentes minerales que son importantes para el desarrollo de los microorganismos. Se ha demostrado que se puede reemplazar el suero fetal bovino por el extracto de cianobacterias en medios de cultivo líquido para *H. pylori*, ya que aumenta el crecimiento y la viabilidad celular, retrasando las formas cocoides consideradas células viables, pero no cultivables (22).
- Sulfato ferroso: Permite conocer si los microorganismos son capaces de producir H₂S (ácido sulfhídrico); en el medio utilizado para cultivar *H. pylori* es usado debido a que el hierro presente en la molécula es usado por dicho microorganismo, la combinación de piruvato de potasio y sulfato ferroso (FP) y mucina, ambos reducen la fase lag y mejoran el crecimiento de *H. pylori* en medio líquido (21,23).
- AlbuMaX II: Hutton usó AlbuMaX II para el crecimiento del microorganism
- Almidón: El almidón es un polisacárido que consiste en un gran número de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos. Se compone principalmente de amilosa, polímero lineal formado por moléculas de D-glucopiranosas unidas mediante enlace α-1-4 y amilopectina, un polímero ramificado de glucosa en el cual las moléculas se unen mediante enlaces glucosídicos 1-4 en su porción recta y enlaces 1-6 en sus ramificaciones. Se ha reportado en diferentes estudios un buen crecimiento de *Helicobacter pylori* en almidón (24)
- Sangre: es uno de los suplementos más importantes para el crecimiento de *Helicobacter pylori* debido al contenido de hierro, se ha reportado el uso de Sangre equina y sangre de cordero, así como sangre lisada y sangre completa para la elaboración de agar sangre y agar chocolate (10–12,14,25–27)
- Suplemento selectivo DENT: El Suplemento Selectivo de *Helicobacter pylori* (Dent) se desarrolló a partir del medio selectivo de Dent descrito para el aislamiento de *H. pylori* de biopsias gástricas. Se trata de una modificación del medio de Skirrow4 en el que se sustituye la polimixina B por cefsulodina y se añade anfotericina B para inhibir las especies de *Candida* (Oxoid).

Referencias Bibliográficas

1. Pena SA. Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por *Helicobacter pylori*. Universidad Complutense de Madrid; 2010.
2. Alarcón T, Baquero M, Domingo D, López M, Royo G. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Procedimientos en Microbiol Clínica*. 2004;17.
3. Azaña D, Egoavil M, Soto L, los Rios R. Sensibilidad de la biopsia gástrica en la detección de *Helicobacter pylori* en pacientes en tratamiento con inhibidores de la bomba de protones. *Rev Medica Hered*. 2012;23(1):11–5.
4. Andersen LP, Wadström T. Basic bacteriology and culture. In: *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. ASM press; 2001.
5. Kim CG, Choi IJ, Lee JY, Cho S-J, Nam B-H, Kook M-C, et al. Biopsy site for detecting *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(3):469–74.
6. Siu LK, Leung WK, Cheng AF, Sung JY, Ling TK, Ling JM, et al. Evaluation of a selective transport medium for gastric biopsy specimens to be cultured for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1998 Oct;36(10):3048–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738066>
7. Bessa LJ, Grande R, Di Iorio D, Di Giulio M, Di Campli E, Cellini L. *Helicobacter pylori* free-living and biofilm modes of growth: behavior in response to different culture media. *APMIS*. 2013 Jun;121(6):549–60.
8. Vega AE, Silva HJ, Cortiñas TI. Evaluation of a serum-free transport medium supplemented with cyanobacterial extract, for the optimal survival of *Helicobacter pylori* from biopsy samples and strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012 Feb;31(2):135–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21559765>
9. Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2000 Mar [cited 2017 May 21];30(3):192–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747249>
10. Krajden S, Bohnen J, Anderson J, Kempston J, Fuksa M, Matlow A, et al. Comparison of selective and nonselective media for recovery of *Campylobacter pylori* from antral biopsies. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1987 Jun;25(6):1117–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597756>
11. Cover TL. Perspectives on Methodology for In Vitro Culture of *Helicobacter pylori*. In 2012. p. 11–5.
12. Dent JC, McNulty CAM. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988 Aug;7(4):555–8.
13. Vega AE, Cortiñas TI, Mattana CM, Silva HJ, Puig De Centorbi O. Growth of *Helicobacter pylori* in medium supplemented with cyanobacterial extract. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2020 Jan 9];41(12):5384–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662915>
14. Westblom TU, Madan E, Midkiff BR. Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1991 Apr [cited 2020 Jan 9];29(4):819–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662915>

- nih.gov/pubmed/1890184
15. Victoria JA. Viabilidad en tetrazolio de semillas de caléndula y eneldo. *Acta agronómica*. 2006;55(1):31–41.
 16. Cortés Araya YA. Efecto de la suplementación de suero fetal bovino y ácido ascórbico sobre la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales (CMM) bovinas. 2013;
 17. Escobar LM, Moraantes S, Cordeiro CP, Aristizabal F. Implementación de estrategias in vitro para evaluar la funcionalidad de un suero fetal bovino colombiano. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2011;40(2):201–21.
 18. Rojas B, Alonso M. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter Pylori*. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2013;28(2).
 19. Martínez G, Gómez MA. Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. *Rev Iberoam polímeros*. 2007;8(4):300–12.
 20. Majalca-Martínez C, Rivera-Cabrera J, Ochoa-Pérez SA, Giono-Cerezo S. Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica* 2001;26(4):85–9.
 21. Jiang X, Doyle MP. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol [Internet]*. 2000 May [cited 2020 Jan 9];38(5):1984–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10790135>
 22. Vega AE, Persia FA, Salinas-Ibañez GA, Alarcón T, Lucero SMC, Cortiñas TI, et al. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Gene Expression on Abiotic Surfaces Using a Cyanobacterial Extract. *J Life Sci*. 2012;6(12).
 23. Medina M, Cabezas G. Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología. *Rev Invest (Guadalajara)*. 2012;2(4):1–42.
 24. Hutton ML, Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. The use of AlbuMAX II(®) as a blood or serum alternative for the culture of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2012 Feb;17(1):68–76.
 25. Tee W, Fairley S, Smallwood R, Dwyer B. Comparative evaluation of three selective media and a nonselective medium for the culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *J Clin Microbiol*. 1991 Nov;29(11):2587–9.
 26. Olivieri R, Bugnoli M, Armellini D, Bianciardi S, Rappuoli R, Bayeli PF, et al. Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. *J Clin Microbiol [Internet]*. 1993 Jan [cited 2017 May 25];31(1):160–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8417026>
 27. Coudron PE, Stratton CW. Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J Clin Microbiol [Internet]*. 1995 Apr [cited 2020 Jan 9];33(4):1028–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790430>

ARTICULO ORIGINAL

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

Autores: Adalucy Alvarez-Aldana¹, Catalina Ramírez-Osorio², Wendy L Ospina-Joaqui², Miguel Angel Cardona², Juliana Botero², Yina Marcela Guaca-González³, Jorge Javier Santacruz-Ibarra³, José Ignacio Moncayo-Ortiz³, Eleazar Vargas-Mena⁴, Manuel Velandia-López², Angela Maria Arango².

Resumen

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo que infecta la mucosa gástrica a más de la mitad de la población mundial, causa gastritis, enfermedad ulcero-péptica, y se asocia tanto con carcinoma gástrico como linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas (mucus-associated lymphoid tissue lymphoma, MALT). El cultivo es considerado el método de referencia para el diagnóstico de la infección debido a que su sensibilidad se encuentra entre el 70 % y 95 %, así mismo, se puede estudiar la sensibilidad de las cepas a distintos agentes antimicrobianos, conocer las características de crecimiento, su epidemiología, y realizar distintos estudios con la cepa obtenida en dicho método. El sistema actualizado de Sydney recomienda que las biopsias deben ser tomadas a partir de cinco sitios diferentes áreas (dos de antro, dos de cuerpo y una de incisura angularis). Por consiguiente, de comparó diferentes metodolo-

gías de siembra y zonas de toma de muestra gástrica para la detección de *H. pylori* por cultivo en pacientes que asisten a endoscopia de las ciudades de Pereira y Manizales. Las biopsias provenientes de las zonas antral (A), cuerpo (C) y fondo (F), fueron tomadas de pacientes dispépticos y se sembraron en medios de cultivo solido mediante maceración e impresión. Los medios fueron incubados y la presencia de *H. pylori* se determinó por sus características macroscópicas, y las pruebas bioquímicas oxidasa, ureasa y tinción de Gram. Se evaluó la frecuencia de detección mediante ANOVA. Los resultados determinaron que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las metodologías de siembra maceración e impresión, así como las zonas de recolección de biopsias antro, cuerpo y fondo.

Palabras claves: Impresión, Maceración, Antro, Cuerpo y Fondo.

- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
- 2 Integrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.
- 3 Docente. Programa de Medicina. Facultad ciencias de la salud. Grupo investigación GRIENI. Universidad Tecnológica de Pereira.
- 4 Docente. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.

Abstract

Helicobacter pylori is a Gram-negative S-shaped bacterium that infects the gastric mucosa to more than half of the world population. It causes gastritis, gastric ulcers and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT). The culture medium is considered as gold standard for the diagnosis and detection due to its sensitivity that corresponds to 70 % and 95 %, furthermore, the culture allows the study of sensitivity of the strains to different antimicrobial agents, to know the characteristic growth, the epidemiology and to carry out different studies with the obtained strain. The Sydney system recommends to take gastric biopsies from different areas (two samples from antrum, two samples from body and one angular incisura). Seeing that, we compared different inoculum methodologies and gastric sampling areas for the detection of *H. pylori* through culture media in patients who attended endoscopy in the cities of Pereira and Manizales. The biopsies from the antrum, body and fundus areas, were taken from dyspeptic patients and were inoculated in solid culture media by two methodologies Printing (Touch) and maceration. The media were incubated and we determined the presence of *H. pylori* by the macroscopic features, Gram staining and oxidase and urease tests. We evaluated the frequency of detection by ANOVA. The results determined that the two inoculum methodologies and the three gastric sampling areas were not statistically significant.

Keywords: printing, maceration, antrum, body and fundus.

Introducción

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo que infecta la mucosa gástrica de más de la mitad de la población mundial, causa

gastritis, enfermedad ulcero-péptica, y se asocia tanto con carcinoma gástrico como con linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas (mucus-associated lymphoid tissue lymphoma, MALT (1,2).

El cultivo es considerado el método de referencia (patrón oro/Gold Standard) para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Debido a su sensibilidad y especificidad (3) Sin embargo, Diferentes autores han mencionado la dificultad de detectar *Helicobacter pylori* por cultivo (4-7), debido a que en medios altamente enriquecidos y en condiciones de microaerofilia no se mejoran las tasas de detección y recuperación ya que *H. pylori* puede llegar a tres estados o formas aparentes: Forma cocoide degenerativa que representa la muerte de la bacteria por la pycnosis, una bacteria cocoide viva que puede ser cultivada en medio de cultivo sólido y finalmente viable pero no cultivable (Viable But Non-Culturable, VBNC). Se sugiere que la transformación a la forma cocoide trae como resultado la reducción del metabolismo que induce a una menor modificación en los procesos fisiológicos de la bacteria y la pérdida de la recuperación del cultivo (8)

Por otro lado, se ha mencionado que el procesamiento de muestras para la siembra y el número de biopsias por paciente, mejoran la tasa de recuperación y factores como el método de transporte, la zona de toma de muestra gástrica, juegan un rol fundamental en la recuperación del microorganismo (4,5,7,9)

Considerando la información previa, este estudio pretende determinar si las tasas de recuperación de la bacteria en el cultivo son diferentes con respecto a la zona de la mucosa gástrica utilizada (antro, cuerpo, fondo) o cuando la metodología de procesamiento de la muestra es diferente (impresión, maceración).

Materiales y métodos

Tipo de estudio: Estudio descriptivo de corte transversal, llevado a cabo en las ciudades de Pereira y Manizales en un periodo de tiempo de enero a mayo del 2018.

Muestra poblacional: Pacientes mayores de edad que asistieron a endoscopia digestiva alta en la ciudad de Pereira (Centro de Especialistas de Risaralda) y ciudad Manizales (Clínica San Marcel), el gastroenterólogo determinó cuales pacientes ameritaban toma de biopsia, los cuales debían cumplir con criterios de inclusión (mayor de 18 años, no consumo de ningún tipo de medicamento 15 días antes del procedimiento, aceptación voluntaria y la firma del consentimiento informado -ANEXO 1) y exclusión (embarazadas, lactantes y/o inmunosuprimidas).

Toma de muestra: De cada paciente se tomaron biopsias (antro -A-, cuerpo -C- y fondo -F). Las muestras fueron tomadas por los gastroenterólogos y almacenadas en caldo BHI con glicerol al 20 % (medio de transporte), suplementado con antibióticos (vancomicina 10 mg/L, polimixina B 0,33 mg/L, bacitracina 1,07 mg/L y anfotericina B de 5 mg/L). Las biopsias se transportaron en forma refrigerada desde las unidades de endoscopia al laboratorio de microbiología para su posterior procesamiento.

Cultivo de las biopsias: Las biopsias se sembraron en agar Columbia (MERCK) suplementado con Sangre, IsoVitaleX y los mismos antibióticos utilizados en el medio de transporte e incubado bajo condiciones microaerófilas (5 % O₂, 10 % CO₂ y 85 % N₂) a 37°C durante 7 a 14 días. Las muestras se consideraron positivas si las UFC (unidades formadoras de colonia) eran bacilos Gram negativos en forma de espiral o curvo, oxidasa y ureasa positiva.

Coloración de Gram: Mediante un asa microbiológica se tomó una colonia del medio de cultivo se llevó a un portaobjeto que previamente contenía solución salina, para ser sometido a los reactivos adecuados para este procedimiento, en el orden y tiempo establecidos anteriormente.

Pruebas bioquímicas: De la misma forma que en la coloración de Gram, se tomó una colonia para cada prueba bioquímica, en donde para oxidasa la colonia se dispuso en una tirilla y para ureasa la colonia se dispuso en un tubo eppendorf que contenía urea al 10 % con el indicador de pH rojo de fenol.

Siembra de las biopsias por impresión: El medio de cultivo se dividió en tres para sembrar las tres diferentes biopsias (A, C, F) o sin dividirse cuando era una sola biopsia. Las biopsias se retiraron del medio de transporte con una aguja estéril y el moco de la biopsia se froto sobre la superficie del medio de cultivo. Posteriormente se incubaron como se describe previamente.

Siembra de las biopsias por macerado: En este caso se utilizó un medio de cultivo por biopsia (A, C, F). Las biopsias se sumergieron en 500 µL de solución salina estéril y se maceraron con un homogeneizador manual (Deltaware Pellet Pestle), del homogenizado se tomaron 100 µL y se inocularon sobre toda la superficie de los medios de cultivo. Las condiciones de incubación fueron las mismas descritas previamente y el tejido restante de la maceración se almaceno a -80°C en caldo BHI con glicerol.

Análisis estadístico: El análisis estadístico para establecer si había diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes zonas de mucosa gástrica y las metodologías de siembra se realizó con el paquete estadís-

tico Statgraphics a través de un análisis multifactorial ANOVA.

Consideraciones bioéticas: El proyecto marco “Terapia triple estándar como primera línea de tratamiento para la erradicación de *H. pylori* en pacientes dispépticos del eje cafe-tero” cuenta con aval bioético del comité de bioética de la UTP.

Resultados

Entre los meses de enero y mayo del 2018 se obtuvieron 41 pacientes que cumplieron con los requisitos establecidos para ingresar al estudio. De los 41 pacientes, 30 eran de la ciudad de Pereira (73.2 %) y 11 de la ciudad de Manizales (26.8 %). En la tabla 1 se describen las variables de las muestras tomadas.

Tabla 1. Variantes de las muestras

Variables	Nº Pacientes	%	IC
A-C-F	38	92.7	[84.7-100 %]
A+C+F	2	4,9	[43.5-73.6 %]
A+C	1	2,4	[43.5-73.6 %]

A-C-F muestras por separado por vial; A+C+F muestras en un solo vial; A+C muestras en un solo vial.

En la tabla 2 se describen las frecuencias de detección de las dos metodologías de siembra.

Tabla 2. Frecuencia de *H. pylori* en el cultivo por impresión

Metodología de cultivo	Positivo	Negativo	Total de muestras	Porcentaje (%)	(Intervalo de confianza*
Impresión	23	18	41	56,1	[41-71,3 %]
Macerado	24	17	41	58,5	[43-74 %]
Consolidado	28	13	41	68,3	[54 – 82,6 %]

*El porcentaje y el intervalo de confianza corresponden al número de muestras *H. pylori* (+)

En la tabla 3 se describen las frecuencias de detección de las dos metodologías de siembra.

Tabla 3. Descripción de las frecuencias de *H. pylori* en el cultivo de cada zona gástrica mediante las dos metodologías de siembra empleadas.

Metodología de siembra	Macerado				Impresión			
	Z. G	N	%	IC	Z.G	n	%	IC
	Antro	20 (38)	52.6	[36,7-68,5]	Antro	22 (38)	57.9	[42,2-73,6]
	Cuerpo	22 (38)	57.9	[42,2-73,6]	Cuerpo	21 (38)	55.3	[39,4-71]
	Fondo	19 (38)	50	[34,1 – 66]	Fondo	23 (38)	60.5	[45-76]

Z.G: Zona gástrica, n: número de pacientes positivos con respecto al total, %: porcentaje de frecuencia, IC: Intervalos de confianza 95 %.

Con los datos obtenidos previamente en la frecuencia de la infección de la población estudiada, se obtuvo por maceración 58,5 % (24) positivos con respecto a un total de 41 pacientes; en contraste a lo obtenido en culti-

vo por Impresión el cual fue un 56,1 % (23) positivos.

H0: No existe diferencia significativa en los resultados de detección de *H. pylori* para las metodologías evaluadas

H1: Existe diferencia significativa en los resultados de detección de *H. pylori* para las metodologías evaluadas

Regla de decisión: si $p\text{-value} < \alpha$ (0,05) se rechaza H0

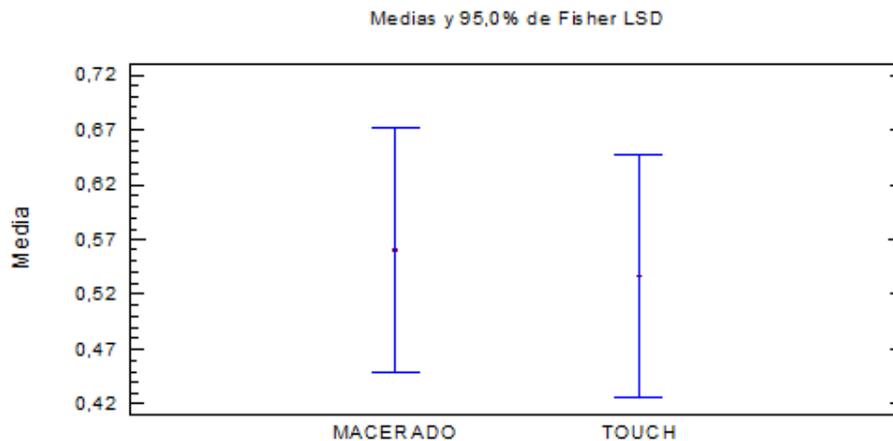
Tabla 4. Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0487805	2	0,0243902	0,10	0,9087
Intra grupos	30,5366	120	0,254472		
Total (Corr.)	30,5854	122			

Tabla 5. Resumen estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
Macerado	41	0,560976	0,502433	89,5642 %
Impresión	41	0,536585	0,504854	94,0865 %
Total	82	0,54878	0,500677	91,2345 %

Figura 1. Medias MACERADO vs IMPRESIÓN. Las medias de las dos variables estudiadas implican que no existen diferencias estadísticamente significativas.



Análisis estadístico: La razón-F, que en este caso es igual a 0,0480769, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, se puede inferir con un nivel del 95,0 % de confianza que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables analizadas de manera comparativa.

Comparación de los resultados obtenidos en impresión y macerado:

H0: No existe diferencia significativa en los resultados de detección de *H. pylori* para las metodologías evaluadas

H1: Existe diferencia significativa en los resultados de detección de *H. pylori* para las metodologías evaluadas

Regla de decisión: si $p\text{-value} < \alpha$ (0,05) se rechaza H0

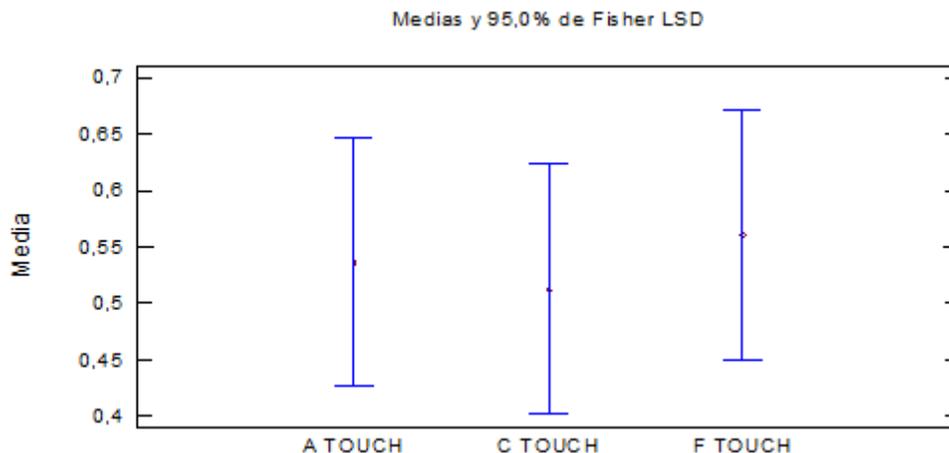
Tabla 6. Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0487805	2	0,0243902	0,10	0,9087
Intra grupos	30,5366	120	0,254472		
Total (Corr.)	30,5854	122			

Tabla 7. Resumen estadístico

	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
A Impresión	41	0,536585	0,504854	94,0865 %
C Impresión	41	0,512195	0,506061	98,8024 %
F Impresión	41	0,560976	0,502433	89,5642 %
Total	123	0,536585	0,500699	93,3121 %

Figura 2. Medias por metodología del cultivo por impresión. Las medias de las variables estudiadas implican que no existen diferencias estadísticamente significativas.



Análisis estadístico: La razón-F, que en este caso es igual a 0,0958466, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, se puede inferir con un nivel del 95,0 % de confianza, que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables para la metodología IMPRESIÓN (A, C y F).

Comparación de A, C y F para macerado:

H0: No existe diferencia significativa en los resultados de la detección de *H. pylori* en las muestras A, C y F.

H1: Existe diferencia significativa en los resultados de la detección de *H. pylori* para al menos 1 de las muestras A, C y F.

Regla de decisión: si $p\text{-value} < \alpha$ (0,05) se rechaza H0

Tabla 8. Tabla ANOVA

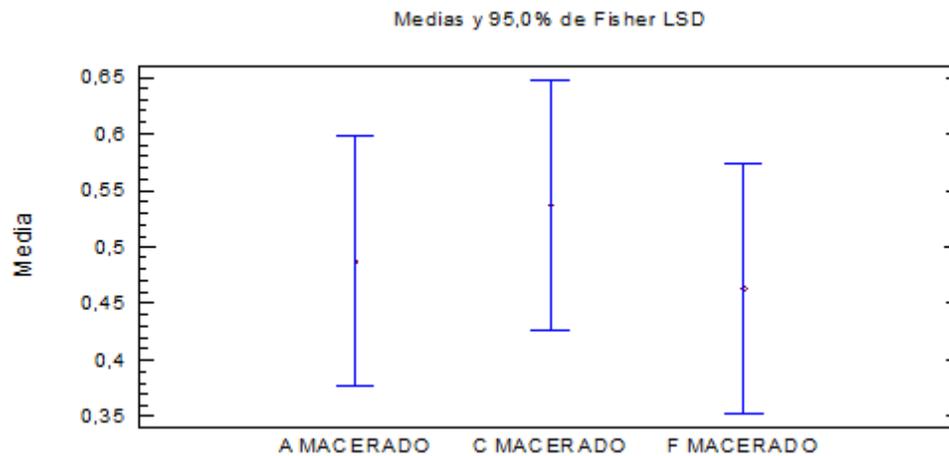
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,113821	2	0,0569106	0,22	0,8005
Intra grupos	30,6341	120	0,255285		
Total (Corr.)	30,748	122			

Tabla 9. Resumen estadístico

	Recuento	Promedio	D.E	C.V
A macerado	41	0,487805	0,506061	103,742 %
C macerado	41	0,536585	0,504854	94,0865 %
F macerado	41	0,463415	0,504854	108,942 %
Total	123	0,495935	0,502028	101,229 %

DS: Desviación estándar, **C.V:** Coeficiente de variación

Figura 3. Medias por metodología del cultivo por macerado. Las medias de las variables estudiadas implican que no existen diferencias estadísticamente significativas.



Análisis estadístico: La razón-F, que en este caso es igual a 0,22293, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, se puede inferir con un nivel del 95,0 % de confianza que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables para la metodología MACERADO (A, C y F).

Discusión

Según Hoda M. Malaty en su revisión del 2007 acerca de la epidemiología de la infección por *H. pylori*, la frecuencia de infección en los países desarrollados oscila entre el 20-40 %, y en los países en vía de desarrollo entre 70-90 % (10). Junto a esto, en Cuba se realizó una investigación de infección por *H. pylori* en pacientes atendidos en consulta de gastroenterología, donde se encontró que el 85 % eran afectados por el microorganismo (11). Los resultados obtenidos no corresponden a los porcentajes esperados para una zona poblacional como la estudiada, debido a que la frecuencia del consolidado (68,3 %) se encuentra por encima de los porcentajes para países desarrollados y por debajo del porcentaje esperado para países en vía de desarrollo; esto puede deberse a que el medio de cultivo en el que se realizó el estudio fue obtenido a partir de una investigación previa “Comparación de diferentes medios de cultivo para la recuperación de un banco de aislamientos de *H. pylori*”, donde no se obtuvo una tasa de recuperación totalmente satisfactoria, de lo que se puede deducir que el medio utilizado no contó con la sensibilidad esperada para la detección dependiente de algunos factores que pudieron afectar la muestra, como en la toma de muestra, transporte, almacenamiento, auto-medicación, inconvenientes en el transporte, inexperiencia del lector o por fallas en las condiciones

de microaerofilia o la razón también podría deberse a una posible disminución en la prevalencia de la infección, este dato se podrá confirmar una vez se termine el estudio y se tengan los resultados de otro método diagnóstico como es el examen histológico y así confirmar la disminución en la prevalencia de la infección en estas ciudades.

En un estudio realizado por Daisy Azaña *et al* en el 2012, se evidenció que la sensibilidad de la biopsia gástrica se puede ver afectada por el uso de inhibidores de bombas de protones (IBP), debido a que estos inhibidores afecta la densidad de *H. pylori* en el tejido (12). Existen diferentes estudios donde se considera que el uso de IBP aumenta la tasa de falsos negativos en la detección de *H. pylori* por biopsias gástricas (13,14).

Los resultados negativos obtenidos en el estudio, pudieron ser afectados debido a que probablemente los pacientes no interrumpieron la toma de medicamento como IBP y antibióticos, por lo cual existe la posibilidad que de que en el estudio se encuentren pacientes positivos no detectados por el método de diagnóstico.

Como se dijo anteriormente, *H. pylori* se encuentra en la mucosa gástrica, esto es debido a que la adherencia a la mucosa gástrica es un paso fundamental para la colonización de *H. pylori*; la bacteria nada a través de la mucosa gástrica viscosa, impulsada por sus flagelos polares y se adhiere a las células epiteliales gástricas. Dado que el epitelio gástrico y la mucosidad están en recambio continuo y la peristalsis (una serie de contracciones musculares, como oleadas) asegura un movimiento constante de los alimentos y los desechos celulares, *H. pylori* ha desarrollado mecanismos de adherencia y colonización para mantenerse específicamente en la mu-

cosa gástrica (15,16) Debido a la información expuesta y a los resultados obtenidos, se puede deducir que el método por impresión de la mucosa gástrica, la cual alberga mayor densidad de dicha bacteria, es un método eficiente para la detección de *H. pylori* al igual que por el método de maceración; sin embargo, en este estudio no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la comparación de las dos metodologías implementadas, lo cual indica que ambos son similares en la detección de *H. pylori*; pero si se realiza un análisis más detallado del número de pacientes positivos en ambas metodologías se podría evidenciar que gracias al método de macerado se encontró un paciente positivo para la infección que no se hubiese detectado usando solo el método de impresión y así fue posible que un paciente positivo para *H. pylori* ingresara al estudio marco de esta investigación.

Debido a los resultados expuestos anteriormente, se deduce que cualquiera de los dos métodos de siembra es útil para el diagnóstico por cultivo de *H. pylori*. Las ventajas que reluce este estudio son debido al gasto de medios de cultivo por el método de maceración, es más económico realizar el método de siembra por impresión.

Según las recomendaciones dadas por el sistema actualizado de Sídney, para una evaluación óptima de la gastritis y la infección por *H. pylori*, se deben obtener las muestras de biopsia de antro, cuerpo e incisura angularis (17), pero contrario a esto, las investigaciones que han evaluado los diferentes métodos de detección de la bacteria han evidenciado la especificidad y la sensibilidad de más de 90 % de biopsia antral (18,19); aunque en otros estudios también se identificó que la muestra de antro no fue suficiente y se determinó que cuerpo era un mejor sitio para la

detección de *H. pylori* (20). Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que contrario a la literatura consultada, antro no fue la mejor zona para la detección de *H. pylori*, dando mejores resultados en cuerpo para el método por macerado y en fondo por impresión. Esto podría estar confirmando consumo de IBP o antibióticos, a pesar del criterio de ingresar al estudio solo pacientes que no estuvieran consumiendo IBP o antibióticos quince días previo a la toma de muestra, la literatura describe desplazamiento de la bacteria de antro a otras zonas ante la presencia de medicamentos antimicrobianos (21). Aunque, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las zonas gástricas en ambas metodologías, cabe destacar que al tomar las tres biopsias se minimizo el riesgo de dejar pacientes infectados por fuera del estudio por falsos negativos.

También, en una investigación denominada “Detección de sitios intragástricos en el cual *Helicobacter pylori* evade el tratamiento con amoxicilina y cimetidina”, se encontró mediante métodos convencionales y PCR la presencia de *H. pylori* en fondo 13, cuerpo 10 y antro tres de 22 pacientes como total, donde la diferencia entre fondo y antro fue significativa, por lo cual concluyeron en el estudio que la Amoxicilina y Cimetidina son relativamente efectivos para eliminar a *H. pylori* de la zona gástrica de antro, pero este tratamiento no lo elimina, sino que obliga a la bacteria a un desplazamiento hacia las zonas gástricas de cuerpo y especialmente fondo (21). A pesar de que en este estudio no hubo diferencia significativa entre antro, cuerpo y fondo, si se detectó mayor porcentaje de frecuencia en cuerpo y fondo en ambos métodos. La investigación anteriormente descrita permite establecer un fundamento para suponer que la alta detección de

H. pylori en las zonas de cuerpo y fondo se debió a la probabilidad de que los pacientes ingresados al estudio no cumplieron con uno de los requisitos de no continuar consumiendo medicamentos.

Debido a la literatura investigada y a los resultados obtenidos, cabe la controversia sobre que sitio de biopsia es mejor para la detección y así obtener un mejor diagnóstico de *H. pylori*.

Conclusiones

- La detección de *H. pylori* por cultivo fue menor a lo esperado en una población donde se considera que debe estar por encima del 80 %.
- El método de siembra por impresión es más económico y rápido de ejecutar, en comparación con el método por maceración.
- A pesar de que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre macerado y por impresión, se detectó un paciente en el método de maceración que no se habría detectado si solo se hubiese implementado el método por impresión, lo cual aseguró el ingreso del individuo al estudio.
- Si solo se hubiera tomado la muestra de antro, por macerado se hubiera dejado de detectar dos pacientes y por impresión se hubiera dejado de detectar tres pacientes.
- El tener más de una muestra y de diferente zona gástrica, aumenta la detección de *H. pylori*.
- Se estima en nuestra zona geográfica que la prevalencia debe ser mayor del 80 % , por lo tanto todavía se encuentran deficiencias en la detección de *H. pylori* por cultivo, debido al bajo porcentaje de frecuencia

del consolidado (68,3 %) que puede estar ligada a la auto-medicación, inconvenientes en el transporte, inexperiencia del lector o por fallas en las condiciones de microaerofilia o una vez se termine la investigación y se obtengan los datos del examen histológico se podrá determinar si la frecuencia de la infección ha disminuido en esta zona geográfica.

- El hecho de haber tomado más de una muestra de zona gástrica aumentó la detección de *H. pylori* tanto por el método maceración como por el método por impresión.
- Debido a la implementación de ambas metodologías, cuatro pacientes adicionales pudieron ingresar al estudio, los cuales hubiesen sido descartados utilizando un solo método de detección de la infección.

Investigaciones futuras

- Formular una investigación que permita mejorar la sensibilidad del cultivo para la detección de *H. pylori*, independientemente de que el individuo este medicado.
- Formular una investigación que permita implementar los análisis de sangre para comprobar que los pacientes no hayan consumido medicamentos que puedan afectar la detección de *H. pylori*.
- Mediante análisis molecular poder determinar que especie de *Helicobacter* predomina en la mucosa gástrica de la población de estudio.
- Mediante análisis moleculares determinar por clonalidad si los pacientes están infectados por más de un tipo de aislamiento de *Helicobacter pylori* o si los pacientes en el eje cafero

tienen infección concomitante con otra especie del género *Helicobacter*.

- Determinar cuál es el contaminante que predomina en la siembra por Touch para así identificar que inhibidor de crecimiento se puede aplicar al medio para mejorar la sensibilidad del método.

Referencias Bibliográficas

1. Bayona-Rojas MA. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. Rev Colomb Gastroenterol [Internet]. 2013;28:94–9. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337731609002>
2. Zhang W, Lu H, Graham DY. An Update on *Helicobacter pylori* as the Cause of Gastric Cancer. Gastrointest tumors [Internet]. 2014 Aug;1(3):155–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26672968>
3. Majalca-Martínez C, Rivera-Cabrera J, Ochoa-Pérez SA, Giono-Cerezo S. Transporte, aislamiento, identificación y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. Bioquímica. 2001;26(4):85–9.
4. Vega AE, Silva HJ, Cortiñas TI. Evaluation of a serum-free transport medium supplemented with cyanobacterial extract, for the optimal survival of *Helicobacter pylori* from biopsy samples and strains. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2012 Feb;31(2):135–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21559765>
5. Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. Lett Appl Microbiol [Internet]. 2000 Mar [cited 2020 Jan 9];30(3):192–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747249>
6. Siu LK, Leung WK, Cheng AF, Sung JY, Ling TK, Ling JM, et al. Evaluation of a selective transport medium for gastric biopsy specimens to be cultured for *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol [Internet]. 1998 Oct;36(10):3048–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738066>
7. Xia HX, Keane CT, Chen J, Zhang J, Walsh EJ, Moran AP, et al. Transportation of *Helicobacter pylori* cultures by optimal systems. Vol. 32, Journal of Clinical Microbiology. 1994. p. 3075–7.
8. Duś I, Dobosz T, Manzin A, Loi G, Serra C, Radwan-oczko M. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research – new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria Rola metody PCR w diagnostyce i badaniach naukowych *Helicobacter pylori* – nowe możliwości poznawcze formy kokoidalnej i spir. Postep Hig i Med Dosw. 2013;261–8.
9. Deshpande M, Calenoff E, Daniels L. Rapid large-scale growth of *Helicobacter pylori* in flasks and fermentors. Appl Environ Microbiol [Internet]. 1995 Jun [cited 2020 Jan 9];61(6):2431–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7793966>
10. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007;21(2):205–14.
11. García Capote E, Crespo Ramírez E, Guancho Garcell H. Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes atendi-

- dos en consulta de gastroenterología. Rev Ciencias Médicas Pinar del Río. 2014;18(3):453–62.
12. Azaña D, Egoavil M, Soto L, los Rios R. Sensibilidad de la biopsia gástrica en la detección de *Helicobacter pylori* en pacientes en tratamiento con inhibidores de la bomba de protones. Rev Medica Hered. 2012;23(1):11–5.
 13. Dickey W, Kenny BD, McConnell JB. Effect of proton pump inhibitors on the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. Aliment Pharmacol Ther. 1996 Jun;10(3):289–93.
 14. Logan RPH, Walker MM, Misiewicz JJ, Gummett PA, Karim QN, Baron JH. Changes in the intragastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole. Gut. 1995;36(1):12–6.
 15. Hazell SL, Lee A, Brady L, Hennessy W. Campylobacter pyloridis and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. J Infect Dis. 1986 Apr;153(4):658–63.
 16. Andersen LP, Wadström T. Basic bacteriology and culture. In: *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. ASM press; 2001.
 17. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol. 1996 Oct;20(10):1161–81.
 18. Cutler A, Havstad S, Ma C, Blaser M, Perez-Perez G, Schubert T. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. 1995;
 19. Laheij R, de Boer W, Jansen J, van Lier H, Sneeberger P, Verbeek A. Diagnostic performance of biopsy-based methods for determination of *Helicobacter pylori* infection without a reference standard. J Clin Epidemiol. 2000;
 20. Kim CG, Choi IJ, Lee JY, Cho S-J, Nam B-H, Kook M-C, et al. Biopsy site for detecting *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric cancer. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24(3):469–74.
 21. Atherton JC, Cockayne A, Balsitis M, Kirk GE, Hawkey CJ, Spiller RC. Detection of the intragastric sites at which *Helicobacter pylori* evades treatment with amoxicillin and cimetidine. Gut. 1995;36(12):670–4.

CAPITULO IV

Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* y su relación con diversas características sociodemográficas

Tatiana Mejía Valencia¹, Adalucy Alvarez-Aldana², Maria Camila Isaza-Bedoya³, Anyi Aristizábal-Giraldo³, Robinson Pacheco López⁴, Yina Marcela Guaca-González⁵, Jorge Javier Santacruz-Ibarra⁵, José Ignacio Moncayo-Ortíz⁵, Brenda Lucia Arturo-Arias⁶, Luis Javier Castañeda-Chávez⁷, Daniel Arturo León-Rodríguez², Eleazar Vargas⁸, Lina Maria Gaviria Rodriguez³, Lilian Maryeri Delgado Correa³, Miguel Angel Charry Caballero³.

Presentación

Helicobacter pylori es uno de los microorganismos con mayor incidencia a nivel mundial y ha sido identificado como el agente causal de cáncer gástrico y diversas enfermedades gástricas. A través del tiempo, el área de las ciencias de la salud se ha enfocado en estudiar sus mecanismos de virulencia y los posibles factores de riesgo relacionados a la prevalencia de esta infección. Se ha encontrado que los países subdesarrollados presentan mayores de tasas de prevalencia y que los individuos más afectados viven en condiciones poco favorables. Sin embargo, no se ha relacionado de manera directa que tanto influyen estas características en la tasa de infección. De tal manera que, al estudiar a fondo las características de los individuos que presentan alteraciones gástricas, se podría establecer una relación significativa

entre la frecuencia de infección y los factores de riesgo.

La infección por *H. pylori* es asociada con la presentación de úlceras pépticas y con el desarrollo de un tipo especial de linfoma gástrico que se denomina MALT (linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas); de igual manera participa en el desarrollo del cáncer gástrico. La organización mundial de la salud (OMS) ha clasificado a dicho patógeno como agente biológico carcinógeno para el hombre (categoría 1) donde la incidencia más alta se encuentra en países en vía de desarrollo y parece estar relacionada con condiciones económicas e higiénico-sanitarias desfavorables; por tal motivo, es un microorganismo de interés en salud pública (1,2).

- 1 Docente. Programa de Enfermería. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación Gerencia del Cuidado. Universidad Libre Pereira.
- 2 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
- 3 Exintegrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira..
- 4 Docente. Programa de Maestría en Epidemiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación GRIEPI. Universidad Libre Cali.
- 5 Docente. Programa de Medicina. Facultad ciencias de la salud. Grupo investigación GRIENI. Universidad Tecnológica de Pereira.
- 6 Docente Investigadora. Grupo Investigación Médica. Universidad de Manizales. SES Hospital Universitario de Caldas..
- 7 Medico gastroenterólogo. Centro de especialistas de Risaralda.
- 8 Docente. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.

Dada la prevalencia de la infección por *H. pylori* y la resistencia al tratamiento, la comunidad científica plantea que la infección puede ser adquirida desde la niñez sin presentar sintomatología aparente y ser influenciada por las variaciones geográficas, por factores genéticos, por la edad, el sexo, las condiciones socio-económicas, el bajo nivel socio-cultural, las condiciones higiénico-sanitarias, entre otras; esta bacteria coloniza la mucosa gástrica, constituyéndose en el agente causal de enfermedades como dispepsia, úlcera péptica, gastritis crónica, linfoma gástrico tipo MALT y cáncer gástrico.

La alta prevalencia de *H. pylori* en países en vías de desarrollo o en comunidades socialmente deprimidas hace pensar que el principal factor de riesgo para la infección es el bajo nivel económico-higiénico-sanitario, pero no están determinados los posibles factores predisponentes por parte del huésped. Por esto, se plantea un estudio de corte transversal que permita establecer los factores asociados a la infección por *H. pylori* en pacientes dispépticos de las ciudades de Pereira y Manizales, las condiciones etiológicas del huésped y su hábitat.

La tasa de prevalencia está decreciendo en países desarrollados mientras que en países en vía de desarrollo permanece en un 80 % (3). En un estudio realizado por Bravo *et al.*, (2003) reportan una prevalencia de 69.1 % en 16 ciudades de Colombia sin diferencias significativas según el género. Un estudio realizado por Correa *et al.* en el año 2015, determinaron la prevalencia de *H. pylori* en la ciudad de Medellín, está fue de 65 % menor que la presentada por Bravo *et al.* (4,5). Otros autores también han relacionado la prevalencia de la enfermedad con el nivel de virulencia de la cepas y factores vinculados al huésped. Es por esto que la infección pue-

de iniciar desde edades muy tempranas sin presentar sintomatología aparente y puede pasar toda la vida sin tratamiento o generar rápidamente enfermedades asociadas (6). Por ejemplo, hay reportes en la literatura de mayor prevalencia de las cepas citotóxicas (cagA+, cagE+ y vacA s1/m1,) en pacientes con cáncer, metaplasia y úlcera en comparación con la observada en pacientes con gastritis no atrófica, lo que ha caracterizado los vacA s1/m1 y cagA como marcadores de virulencia (7–10).

Mediante una investigación llevada a cabo en el 2013 en Etiopía, se evaluaron alrededor de 209 pacientes con el fin de determinar los factores de riesgo que presentan mayor incidencia en la infección por *H. pylori*; a cada paciente se le extrajo una muestra de sangre para la detección de la IgG asociada a la infección. Se obtuvo información sociodemográfica mediante encuestas con las siguientes preguntas: prácticas higiénicas, consumo de alcohol, fuentes de consumo de agua y tipos de letrina (11).

Por otro lado, en 2016 se condujo un estudio transversal enfocado a determinar la asociación entre los hábitos alimenticios y la infección por *H. pylori* en pacientes que atendían un centro de salud en el Líbano; esta investigación se desarrolló mediante la recolección de información socio-demográfica, estilos de vida y tipo de alimentación, a través de la aplicación de encuestas a los pacientes seleccionados; estos se sometieron a endoscopias donde se tomaron biopsias de antro, cuerpo y fondo para su posterior estudio (12) En otra investigación realizada en Alemania, se enfocaron en estudiar la prevalencia de la infección en una población de niños que cursaban el bachillerato; los estudiantes fueron sometidos al test de aliento y adicionalmente fueron encuestados con el fin de determinar

características como: nacionalidad de los padres, número de personas en la vivienda, nivel de educación de los padres y lugar de nacimiento de los padres para poder establecer una relación entre dichos factores de riesgo y la infección por *H. pylori* (13) *but to date there has been no long-term follow-up study in a large group of children confirming this hypothesis. METHODS Following up our study of H. pylori among school starters and 2nd graders in 1998 and 2000, we conducted a third phase of this study in 2006 using the [13C]-Urea Breath Test and a detailed parent-completed epidemiological questionnaire to evaluate the development of prevalence among the overall population of 8th graders in the city of Leipzig (n = 1,905.*

Otro estudio realizado en Bolivia en el 2013, se evaluó la prevalencia de *H. pylori* en una población de diferentes niveles socioeconómicos, en donde se valoraron alrededor de 776 pacientes mediante esofagogastroduodenoscopia (EGDC) a personas de nivel socioeconómico medio y alto, que acudieron a la consulta externa por presentar crónicamente síntomas del tracto gastro-intestinal superior. Esta investigación se llevó a cabo mediante el diseño un formulario de recolección de datos para establecer el nivel socioeconómico de los pacientes se interrogó sobre: lugar y zona de residencia, nivel educativo, ocupación, nivel de ingresos por mes, tipo de vivienda, abastecimiento de agua y desagüe, grupo familiar y acceso a servicios de salud (14).

Por esto es necesario además de caracterizar y tratar a la bacteria, caracterizar primero al huésped y a su hábitat, determinando los factores asociados a la adquisición de la infección y el desarrollo de las enfermedades gastroduodenales en las ciudades de Pereira y Manizales. Con este estudio de corte trans-

versal, se pretende hallar asociaciones estadísticamente significativas entre diversas variables de interés, medidas en cada individuo a través de una encuesta aplicada al proceso inicial, durante el seguimiento y con el desenlace de la infección por *H.pylori* a todos los sujetos de investigación.

Referencias Bibliográficas

1. Rojas B, Alonso M. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter Pylori*. Rev Colomb Gas-trinterología. 2013;28(2).
2. Zhang W, Lu H, Graham D. An Update on *Helicobacter pylori* as the Cause of Gastric Cancer. Gastrointest tumors. 2014;1(3):155–65.
3. Porras C, Nodora J, Sexton R, Ferreccio C, Jimenez S, Dominguez RL, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). Cancer Causes Control. 2013 Feb;24(2):209–15.
4. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS, Bravo P. et al. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. Colomb Med. 2003;34(3):124–31.
5. Correa S, Cardona AF, Correa T, Correa LA, García HI, Estrada S. Prevalencia de *Helicobacter pylori* y características histopatológicas en biopsias gástricas de pacientes con síntomas dispépticos en un centro de referencia de Medellín. Rev Colomb Gastroenterol. 2016;31(1):9–15.
6. Choi SS, Chivers PT, Berg DE. Point mutations in *Helicobacter pylori*'s fur regulatory gene that alter resistance to metronidazole, a prodrug activated by chemical reduction. PLoS One. 2011 Mar;6(3):e18236.

7. Quiroga AJ, Cittelly DM, Bravo MM. Frecuencia de los genotipos babA2, oipA y cagE de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica*. 2005;25(3):325–34.
8. Arévalo Galvis A. Prevalencia de los genotipos de virulencia de *Helicobacter pylori* cagA, vacA, babA2 e iceA en pacientes colombianos con dispepsia funcional. Facultad de Ciencias; 2010.
9. Cittelly DM, Huertas MG, Martínez JD, Oliveros R, Posso H, Bravo MM, et al. Los genotipos de *Helicobacter pylori* en gastritis no atrófica difieren de los encontrados en úlcera péptica, lesiones premalignas y cáncer gástrico en Colombia. *Rev Med Chil*. 2002;130(2):143–51.
10. Trujillo E, Martínez T, Bravo MM. Genotipificación de los factores de virulencia vacA y cagA de *Helicobacter pylori* en individuos de dos regiones de Colombia con riesgo opuesto de cáncer gástrico. *Biomédica*. 2014;34(4):567–73.
11. Abebaw W, Kibret M, Abera B. Prevalence and risk factors of *H. pylori* from dyspeptic patients in northwest Ethiopia: a hospital based cross-sectional study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(11):4459–63.
12. Assaad S, Chaaban R, Tannous F, Costanian C. Dietary habits and *Helicobacter pylori* infection: a cross sectional study at a Lebanese hospital. *BMC Gastroenterol*. 2018 Apr;18(1):48.
13. Bauer S, Krumbiegel P, Richter M, Richter T, Röder S, Rolle-Kampczyk U, et al. Influence of sociodemographic factors on *Helicobacter pylori* prevalence variability among schoolchildren in Leipzig, Germany. A long-term follow-up study. *Cent Eur J Public Health*. 2011 Mar;19(1):42–5.
14. Domínguez RR, Huanca Poma A. Prevalencia de infección por *H. pylori* en una población de nivel socioeconómico medio y alto. *Rev Médica La Paz*. 2013;19(1):35–9.

ARTÍCULO ORIGINAL

Características sociodemográficas en pacientes que asisten a endoscopia y su asociación con la infección por *Helicobacter pylori* de las ciudades de Pereira y Manizales

Autores: Tatiana Mejía Valencia¹, Adalucy Alvarez-Aldana², Maria Camila Isaza-Bedoya³, Anyi Aristizábal-Giraldo³, Robinson Pacheco López⁴, Yina Marcela Guaca-González⁵, Jorge Javier Santacruz-Ibarra⁵, José Ignacio Moncayo-Ortíz⁵, Brenda Lucia Arturo-Arias⁶, Luis Javier Castañeda-Chávez⁷, Daniel Arturo León-Rodríguez², Eleazar Vargas⁸, Lina Maria Gaviria Rodriguez³, Lilian Maryeri Delgado Correa³, Miguel Angel Charry Caballero³.

Resumen

H. pylori es un bacilo gram negativo capaz de colonizar el estómago humano, causando enfermedades como dispepsia, úlcera péptica, gastritis crónica, linfoma gástrico tipo MALT y cáncer gástrico; se estima que de cada diez personas infectadas, solo una sufre la enfermedad y nueva nunca la desarrollan. Es por esto que la OMS lo ha clasificado como un agente biológico carcinógeno para el hombre (categoría 1), donde la incidencia más alta se encuentra en países en vía de desarrollo y su infección parece estar relacionada con condiciones económicas e higiénico-sanitarias desfavorables. La prevalencia de la infección por *H. pylori* se debe a diversas causas;

una de estas es que la tasa de erradicación de la infección está por debajo del 80 %, lo cual explica su resistencia a diversos antimicrobianos. La expresión de diversas patologías en los individuos infectados se debe a la diversidad en la virulencia de las cepas, el origen étnico, la alimentación, el hacinamiento, la ubicación geográfica y la edad. En este estudio, se evaluó una población de 41 pacientes y se investigaron 11 variables socio-demográficas y su asociación con la infección por *H. pylori*, mediante un análisis de regresión lineal simple y un análisis de varianza (ANOVA). Según los resultados obtenidos, se encontró que variables como la edad, el índice de masa corporal y el estrato socioeconómico se encuentran asociadas fre-

- 1 Docente. Programa de Enfermería. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación Gerencia del Cuidado. Universidad Libre Pereira.
- 2 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP
- 3 Exintegrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira..
- 4 Docente. Programa de Maestría en Epidemiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación GRIEPIIS. Universidad Libre Cali.
- 5 Docente. Programa de Medicina. Facultad ciencias de la salud. Grupo investigación GRIENI. Universidad Tecnológica de Pereira.
- 6 Docente Investigadora. Grupo Investigación Médica. Universidad de Manizales. SES Hospital Universitario de Caldas.
- 7 Medico gastroenterólogo. Centro de especialistas de Risaralda.
- 8 Docente. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.

cuentemente a la infección. Adicionalmente, se identificó que los individuos que vivían con más de 3 cohabitantes, presentaron una frecuencia de infección de 41.4 %, siendo esta una relación significativa con respecto a la infección.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, prevalencia, infección, factores de riesgo, úlcera gástrica.

Abstract

Helicobacter pylori is a gram-negative bacillus capable of colonizing the human stomach, causing several gastrointestinal diseases such as dyspepsia, peptic ulcer, chronic gastritis, gastric MALT lymphoma and gastric cancer; it has been estimated that out of ten infected individuals, only one suffers the disease while nine of them never show or develop any symptoms. Therefore, the World Health Organization has classified this microorganism as a human biological carcinogen (group 1), where the highest incidence rate occurs in developing countries and the infection seems to be associated to poor economic and sanitary conditions. The prevalence of *H. pylori* infection is related to several causes; one of these is that the eradication rate is below 80 %, which explains its resistance to several antibiotics. The manifestation of different pathologies in infected individuals is due to the variety of virulence factors expressed by the different strains of *H. pylori*, the individual's ethnic and geographical origins, age, dietary habits and overcrowding. In this article, a total of 41 subjects were studied, 11 sociodemographic characteristics were analyzed and their association with the infection of *H. pylori*, by implementing two methods of analysis: linear regression and analysis of variance (ANOVA). According to the results, it can be concluded that variables such as age, body mass index and socio-economic

status are frequently associated with *H. pylori* infection. Additionally, the individuals that lived with more than 3 people in the same household, showed an infection frequency of 41.4 %, which can be identified as a significant relationship between this risk factor and rate of infection.

Keywords: *Helicobacter pylori*, prevalence, infection, risk factors, stomach ulcer.

Introducción

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo capaz de colonizar el estómago humano; responsable del 50 % de los casos de úlcera gástrica y gastritis crónica en la población mundial. En los estudios epidemiológicos y experimentales se demostró la relación entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo posterior de cáncer gástrico, razón por la cual la International Agency for Research on Cancer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la reconoció oficialmente como agente cancerígeno de grado 1 (1).

Actualmente la infección ocasionada por *H. pylori* se debe a diversos factores sociodemográficos, donde países en vía de desarrollo o países pobres donde se presentan viviendas y estilos de vidas más precarias con condiciones poco higiénicas muestran mayor tasa de morbilidad ocasionada por dicho microorganismo causando infecciones en el tracto gastrointestinal (2).

La expresión de las diferentes patologías en los individuos infectados, se asocia con la diversidad en la virulencia de las cepas, el origen étnico, la alimentación, el hacinamiento, la ubicación geográfica y la edad (3). Así mismo, se ha encontrado que este microorganismo es resistente a diferentes antimicrobianos puesto que se ha hallado bajas tasas

en la erradicación de la infección las cuales están por debajo del 80 %, debido al aumento en las tasas de resistencia de los diferentes antimicrobianos (Bacitracina, amoxicilina, levofloxacina y metronidazol) con los que se elimina la infección (4).

En los últimos años se ha evidenciado mayor incidencia de contraer la infección ocasionada por *H. pylori* en países socialmente deprimidos y poco desarrollados, lo cual permite establecer que el principal factor riesgo se debe a el bajo nivel económico-higiénico-sanitario. De igual forma estudios realizados han encontrados otros factores que se relacionan con la infección, tales como edad de la persona, enfermedades genéticas, forma de alimentación, zona de vivienda, entre otros (5,6).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio se centró en determinar cuáles características sociodemográficas presenta la población de estudio y si estas características podrían ser factores de riesgo para adquirir la infección por *H. pylori*.

Materiales y métodos

Muestra poblacional

Pacientes mayores de edad que asistieron a endoscopia digestiva alta en la ciudad de Pereira (Centro de Especialistas de Risaralda) y en la ciudad de Manizales (Clínica San Marcel y en los cuales el gastroenterólogo determino si ameritaban toma de biopsia gástrica. Además, los pacientes debían cumplir con criterios de inclusión (personas mayores de 18 años, 15 días antes del procedimiento no debían haber consumido ningún tipo de medicamento y la aceptación voluntaria por escrito de la firma del consentimiento informado) (ANEXO 1) y exclusión (embaraza-

das, lactantes y/o inmunosuprimidas).

Toma de muestra

De cada paciente, se tomaron tres biopsias (antro, cuerpo y fondo), o en algunos casos se tomó solo una biopsia o dos biopsias. Las muestras fueron tomadas por los gastroenterólogos y almacenadas en caldo BHI con glicerol al 20 % (medio de transporte), suplementado con antibióticos (vancomicina 10 mg/L, polimixina B 0,33 mg/L, bacitracina 1,07 mg/L y anfotericina B de 5 mg/L) y transportadas en forma refrigerada desde las unidades de endoscopia al Laboratorio de Microbiología para su posterior procesamiento (conservación a -80°C).

Determinación de la infección por *H. pylori*

Las biopsias se cultivaron, en agar Columbia, bajo condiciones microaerofílicas (5 % O₂, 10 % CO₂ y 85 % N₂) a 37°C de 7 a 14 días. Las muestras se consideraron positivas si las UFC (unidades formadoras de colonia) crecidas en el medio correspondían a bacilos Gram negativos en forma de espiral o curvo, y pruebas bioquímicas positivas de oxidasa y ureasa.

Encuesta para la determinación de las variables sociodemográficas

Consistió en una serie de preguntas (TABLA 1) realizadas a los pacientes participantes del estudio, de acuerdo con los lineamientos para la implementación de control de infecciones propuesto por la OMS.

Tabla 1. Datos a obtener en la encuesta.

Edad		
Sexo	Femenino	Masculino
	O+	O-
	A+	A-
Tipo de sangre	B+	B-
	A-	A+
	AB-	AB+
IMC		
Ocupación	Ama de casa	Obrero
	Trabajador de salud	Estudiante
	Primaria incompleta	Primaria completa
Nivel de educación	Secundaria incompleta	Secundaria completa
	Técnico incompleto	Técnico completo
	Universitario incompleto	Universitario completo
	Posgrados	Ninguno
Estrato socioeconómico	Alto	
	Bajo	
	Medio	
Consumo de sustancias	Drogas	
	Tabaquismo	
	Alcohol	
Zona de vivienda	Urbana	Rural
Servicios públicos básicos	Agua	
	Energía	
	Alcantarillado	
Procedencia de la alimentación	Elaborado en casa	Alimentación no perecedera
	Elaborado en restaurante	Alimentos crudos
	Otros	
	1	5
Número de personas que habitan el domicilio	2	6
	3	7
	4	8

Análisis estadístico

Los datos de variables sociodemográficas obtenidos en la encuesta y los resultados de los cultivos para establecer presencia o au-

sencia de la infección se tabularon en una hoja de Excel®. Los datos de frecuencia de la infección y de las variables se obtuvieron con las fórmulas de Excel®.

Para el análisis de la asociación entre la infección por *H. pylori* y las variables socio-demográficas, se implementó el análisis de regresión lineal simple (relación entre dos variables) y un análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico StatGraphics (Versión XV), en donde se evaluó y aceptó la hipótesis H0 o H1, dependiendo del valor-P.

Consideraciones bioéticas

La propuesta se acoge a los acuerdos internacionales de investigación en humanos como la declaración de Helsinki y el código de Nuremberg y la normativa nacional del artículo 11 de la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, por ser un

estudio sin intervención, se considera una investigación con riesgo mínimo. El proyecto macro con código 14010102 de la Universidad Libre Pereira ULP-07 y de la Universidad Tecnológica de Pereira UTP, cuenta con aval bioético del comité de bioética de la Universidad Tecnológica de Pereira UTP (ANEXO 2).

Resultados

Entre el periodo de febrero a mayo del 2018, participaron en el estudio un total de 41 pacientes, 30 (73,2 %) de la ciudad de Pereira y 11 de la ciudad de Manizales (26,8 %). En la tabla 2 se discrimina la zona y número de muestras tomadas en el total de pacientes.

Tabla 2. Biopsia por zona gástrica y número de biopsias en la población de estudio.

Variables	Nº Pacientes	%
A-C-F	38	92,7
A+C+F	2	4,9
A+C	1	2,4

A (Antro), C (Cuerpo), F (Fondo). A-C-F vial individual por zona de la mucosa gástrica;

A+C+F o A+C Un solo vial para todas las zonas de la mucosa gástrica.

Variables sociodemográficas:

Edad: La población estudiada presentó un

rango de edad en años entre los 18 a los 69, con una media de 48. El mayor número de pacientes estuvo en el rango de edad de los 29 a 59. En la tabla 3 se describen los datos.

Tabla 3. Variable edad

Variable	Rango de edad	Nº de pacientes	Frecuencia (%)
Edad	18-28	4	9,7
	29-59	35	85,3
	≥ 60	2	4,8
	Total	41	100

Sexo, tipo de sangre e IMC (Índice de Masa Corporal): Como se muestra en la tabla 4 la mayoría de los pacientes correspondieron al género femenino 85,4 %, siendo el 14,6 % restante masculino, en cuanto al grupo sanguíneo, el 90,2 % de la población se en-

cuentra entre los grupos sanguíneos O+ y A+, mientras que el índice de masa corporal (IMC) se clasificó en 4 rangos diferentes, siendo el más frecuente 25-29,9 con un 53,1 %, agrupando a la mayoría de la población en un rango de sobrepeso.

Tabla 4. Variables sexo, tipo de sangre e IMC

Variable		Nº de pacientes	Frecuencia (%)
Sexo	Femenino	35	85,4
	Masculino	6	14,6
	Total	41	100
Tipo de sangre	O+	27	65,9
	A+	10	24,4
	B+	4	9,8
	Total	41	100
	Rango de IMC		
IMC	(0-18,5)	1	3,1
	(18,6-24,9)	10	31,3
	(25-29,9)	17	53,1
	(30-50)	4	12,5
	Total	32	100

Estrato socioeconómico, zona de vivienda, servicios básicos, procedencia de la alimentación: En la tabla 5 se identificó que la mitad de la población estudiada vivía en un estrato socioeconómico bajo (51,2 %); en cuanto a la zona de vivienda, un 85,4 % de la población vivía en una zona urbana y el 100 %

contaba con todos los servicios básicos; para los hábitos alimenticios, se encontró que la mayoría de los pacientes (95,1 %) consumían alimentos elaborados en casa, mientras que solo un 4.9 % consumía alimentos elaborados en restaurantes.

Tabla 5. Variables estrato socioeconómico, zona de vivienda, servicios básicos, procedencia de la alimentación

Variable		Nº de pacientes	Frecuencia (%)
Estrato socioeconómico	Alto	1	2,4
	Medio	19	46,3
	Bajo	21	51,2
	Total	41	100
Zona de vivienda	Urbana	35	85,4
	Rural	6	14,6
	Total	41	100
Servicios públicos básicos	Agua		
	Energía	41	100
	Alcantarillado		
	Total	41	100
Procedencia de la Alimentación	Elaborado en casa	39	95,1
	Elaborado en restaurante	2	4,9
	Total	41	100

Ocupación, nivel de educación y consumo de sustancias: como se describe en la tabla 6, la variable “ocupación” se evaluó con 5 posibles opciones de respuesta y se determinó que el 90,2 % de la población se dedicaba a “otro” tipo de ocupación y “ama de casa”; de igual manera, la variable “nivel de educa-

ción” se presentó con 5 posibles opciones de respuesta; al analizar los resultados, se registró que un 46,3 % había dejado inconclusa la secundaria. Por otro lado, se determinó que el consumo de sustancias psicoactivas (5,4 %), tabaco (10,8 %) y alcohol (8,1 %) era mínimo, comparado con el no consumo.

Tabla 6. Variables ocupación, nivel de educación y consumo de sustancias

Variable		Nº de pacientes	Frecuencia (%)	
Ocupación	Ama de casa	21	51,2	
	Estudiante	2	4,8	
	Obrero	1	2,4	
	Trabajador de salud	1	2,4	
	Otro	16	39	
	Total	41	100	
Nivel de educación	Primaria	10	24,3	
	Secundaria	19	46,3	
	Técnico	4	9,7	
	Universidad	7	17	
	Posgrados	1	2,4	
	Total	41	100	
Consumo de sustancias	Drogas	SI	2	5,4
		NO	35	94,6
		Total	37	100
	Tabaquismo	SI	4	10,8
		NO	33	89,2
		Total	37	100
	Alcohol	SI	3	8,1
		NO	34	91,9
		Total	37	100

Número de personas que habitan en el domicilio: Esta variable se clasificó en 3 rangos diferentes, siendo la más frecuente de 4 a 7 con un 58,5 %, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 7. Variable cohabitantes

Variable	Rangos	Nº de pacientes	Frecuencia (%)
Número de personas que habitan el domicilio	(1-3)	15	36,6
	(4-7)	24	58,5
	(8-11)	2	4,9
	Total	41	100

Determinación de la infección por *H. pylori*

En la población estudiada, se encontró que un 68,2 % (28/41) de los pacientes dieron positivos para la infección por *H. pylori*, mientras que un 31,7 % (13/41) fueron ne-

gativos.

Variables sociodemográficas y frecuencia de la infección

En las siguientes tablas, se describen las frecuencias de presencia o ausencia de la infección por *H. pylori* según las variables.

Tabla 8. Número de pacientes según edad e infección

Variable	Rango de edad	Nº de pacientes	Frecuencia (%)	<i>H. pylori</i> +	Frecuencia (%)
Edad	18-28	4	9,7	3	7,3
	29-59	35	85,3	24	58,5
	≥ 60	2	4,8	1	2,4
Total		41	100	28	68,2

Tabla 9. Número de pacientes según sexo, tipo de sangre, IMC e infección

Variable	Nº de pacientes	Frecuencia (%)	<i>H. pylori</i> +	Frecuencia (%)	
Sexo	F	35	85,4	25	60,9
	M	6	14,6	3	7,3
	Total	41	100	29	70,6
Tipo de sangre	O+	27	65,9	20	48,7
	A+	10	24,4	7	17
	B+	4	9,8	1	2,4
Total		41	100	28	68,1
IMC	(0-18,5)	1	3,1	1	2,4
	(18,6-24,9)	10	31,3	7	17
	(25-25.9)	17	53,1	11	26,8
	(30-50)	4	12,5	3	7,3
	Total	32	100	22	53,5

IMC (índice de masa corporal).

Tabla 10. Número de pacientes según estrato socioeconómico, zona de vivienda, servicios básicos, procedencia de la alimentación e infección

Variable		Nº de pacientes	F (%)	<i>H. pylori</i> +	F (%)
Estrato socio-económico	Alto	1	2,4	0	0
	Medio	19	46,3	11	26,8
	Bajo	21	51,2	17	41,4
	Total	41	100	28	68,2
Zona de vivienda	Urbana	35	85,4	24	58,5
	Rural	6	14,6	4	9,7
	Total	41	100	28	58,5
Servicios públicos básicos	Agua				
	Energía	41	100	28	68,2
	Alcantarillado				
	Total	41	100	28	68,2
Procedencia de la alimentación	Elaborado en casa	39	95,1	27	65,8
	Elaborado en restaurante	2	4,9	1	2,4
	Total	41	100	28	68,2

Tabla 11. Número de pacientes según ocupación, nivel de educación, consumo de sustancias e infección

Variable		Nº de pacientes	Frecuencia (%)	<i>H. pylori</i> +	Frecuencia (%)		
Ocupación	Ama de casa	21	51,2	14	34,1		
	Estudiante	2	4,8	2	4,8		
	Obrero	1	2,4	1	2,4		
	Trabajador de salud	1	2,4	0	0		
	Otro	16	39	11	26,8		
	Total	41	100	28	68,1		
Nivel de educación	Primaria	10	24,3	7	17		
	Secundaria	19	46,3	15	36,5		
	Técnico	4	9,7	2	4,8		
	Universitario	7	17	4	9,7		
	Posgrados	1	2,4	0	0		
Consumo de sustancias	Total	41	100	28	68,1		
	Drogas	SI	2	5,4	2	5,4	
		NO	35	94,6	24	64,8	
		Total	37	100	26	70,2	
	Tabaquismo	SI	4	10,8	2	5,4	
		NO	33	89,2	23	62,1	
		Total	37	100	25	67,5	
		Alcohol	SI	3	8,1	2	5,4
			NO	34	91,9	23	62,1
			Total	37	100	25	67,5

Tabla 12. Número de pacientes según cohabitantes e infección

Variable	Rango	Nº de pacientes	Frecuencia (%)	<i>H. pylori</i> +	Frecuencia (%)
# de personas que habitan el domicilio	(1-3)	15	36,6	9	21,9
	(4-7)	24	58,5	17	41,4
	(8-11)	2	4,9	2	4,8
	Total	41	100	27	65,7

Asociación estadística entre las variables sociodemográficas e infección por *H. pylori*

Variable cohabitantes:

Regresión simple:

Variable dependiente: cultivo por macerado

Variable independiente: cohabitantes

Lineal: $Y = a + (b)(x)$ **Tabla 13.** Coeficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0,0936664	0,190022	0,492924	0,6250
Pendiente	0,11686	0,0434186	2,69147	0,0106

Tabla 14. Análisis de Varianza (ANOVA)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,57012	1	1,57012	7,24	0,0106
Residuo	8,01963	37	0,216747		
Total (Corr.)	9,58974	38			

Coeficiente de Correlación = 0,404634

R-cuadrada = 16,3729 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 14,1127 por ciento

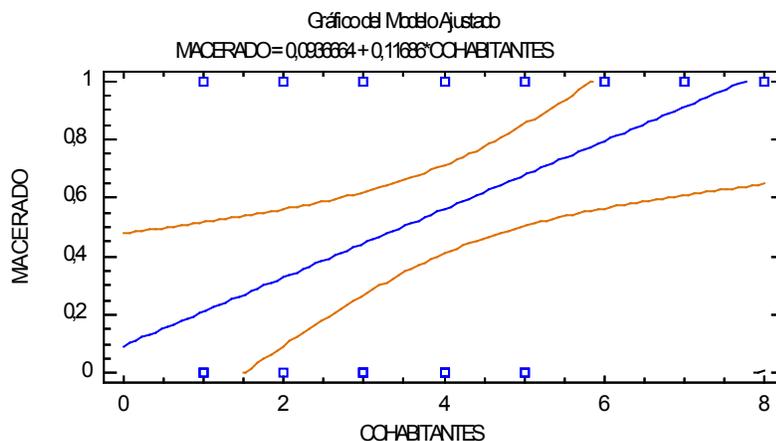
Error estándar del est. = 0,465561

Error absoluto medio = 0,414191

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, se puede inferir con 95 % de confianza que hay una relación estadísticamente significativa entre el número de habitantes de la casa y los hallazgos positivos de *H. pylori* cuando se empleó el método de cultivo por macerado.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 16,3729 % de la variabilidad en el cultivo por macerado. El coeficiente de correlación es igual a 0,404634, indicando una relación relativamente débil entre las variables, requiriendo de estudios posteriores con mayor número de muestras para determinar un grado de correlación que permita obtener modelos robustos.

Gráfico 1. Correlación entre número de habitantes y hallazgos de *H. pylori* por el método de cultivo por macerado



Discusión

Teniendo en cuenta la variable “Edad” resultados similares se encontraron en un estudio realizado por Piotrowicz *et al.*, en donde el rango de edad que presentaba mayor frecuencia de la infección por *H. pylori* se encontraba entre 46-60 años y determinaron que dentro de dicho rango de edad, las personas son más susceptibles a la infección (7)

Por otro lado, se determinó que la mayoría de los pacientes correspondieron al género femenino, en estudios semejantes conducidos por Abdallah *et al.*, participaron alrededor de 225 pacientes, en donde el mayor número de personas infectadas pertenecían al género femenino, mientras que Domínguez *et al.*, determinaron que, en una población total de 776 pacientes, el género masculino predominó con respecto a la presencia de infección. De este modo cabe concretar que el sexo no es una variable que esté ligada a la concurrencia de la infección (8,9).

En cuanto al grupo sanguíneo, el mayor número de pacientes infectados se encontraba en el grupo sanguíneo O+; en el 2011, un estudio realizado a 718 pacientes arrojó que un 92,5 % pertenecía al grupo O+ y el 60,5 eran

positivos para *H. pylori*, indicando una relación con la presencia de la infección (10); en comparación a otro estudio, en donde el grupo sanguíneo y factor Rh no presentaban ninguna asociación con la presencia del microorganismo (11).

En el índice de masa corporal (IMC), la mayoría de la población que presentaba la infección se encontraba en un rango de sobrepeso, algunos autores como Xu *et al.* y Zhang *et al.*, sugieren que el IMC podría ser un factor de riesgo para la infección por *H. pylori*, en contraste a otra investigación realizada en Grecia, en donde la frecuencia de infección no tenía una asociación significativa entre individuos con sobrepeso (12,13)

Por otro lado, la variable “ocupación” reveló que “ama de casa” representa el mayor número de la población infectada. De igual manera, en el “nivel de educación” la frecuencia de la infección era mayor en pacientes que tuvieron una secundaria inconclusa. Abebaw *et al.*, discuten que la mayor frecuencia de infección fue observada en los individuos que habían completado sus estudios primarios (14); por otro lado, un estudio hecho en México señaló una alta frecuencia

de infección se debida a bajos niveles de educación (15).

De igual manera, en el estrato socioeconómico bajo se evidenció un mayor número de personas con la infección; un estudio similar elaborado en Bolivia, resaltó que la infección fue más alta en el estrato socioeconómico bajo con un 65.4 %, asociando este resultado a otras variables socio-demográficas como los niveles de educación bajos, utilización de aguas no potables y preparación poco higiénica de los alimentos (8).

Con respecto a los hábitos alimenticios, se encontró que la mayoría de los pacientes infectados consumían alimentos elaborados en casa; en una investigación relacionada con los hábitos de dieta y la infección por *H. pylori*, se concluyó que el consumo de comida callejera, vegetales, granos y proteína animal no presentaba relevancia alguna en cuanto a la adquisición de la infección (16). De igual manera, en otra investigación similar, el consumo excesivo de comida callejera y poco consumo de frutas incrementaba la frecuencia de la infección (17).

Por otro lado, un estudio estableció que personas con consumo frecuente de tabaco y alcohol tienden a ser más susceptibles a la infección (18) sin embargo, en otros países como Alemania, Japón y Sudáfrica, el consumo constante de vino ha demostrado lo contrario (19–21).

La variable “cohabitantes” se ha encontrado relacionada a la frecuencia de infección por *Helicobacter pylori* en otros estudios; tomando como ejemplo una investigación realizada por Agumon *et al.*, describieron que el riesgo de la infección era mayor cuando los habitantes de la vivienda compartían la habitación con más de dos personas (12);

por otro lado, Herbarth *et al.*, menciona que el número de cohabitantes en una vivienda aumenta el riesgo de infección, específicamente, cuando hay más de 3 niños (19); Dorji *et al.*, y Ahmed *et al.*, afirman que la frecuencia incrementa en viviendas donde habitan un número mayor a 4 personas (20,21).

Conclusiones

El rango de edad que presentó mayor frecuencia de la infección fue de 29-59 años.

La mayoría de la población infectada estaba en una condición de sobrepeso, debido a que presentaban un IMC de 25-29.9.

El mayor de pacientes positivos para *H. pylori* pertenecían a estratos socioeconómicos bajos (41,4 %), siendo esta una variable anteriormente mencionada en diversos estudios como una característica sociodemográfica asociada frecuentemente a la infección.

Pese a que en el presente estudio la población estudiada consumía alimentos preparados en casa, la frecuencia de infección fue de 65.8 %, indicando que, en este caso, dicha variable no está ligada a la concurrencia de la infección.

En el análisis de la asociación estadística entre las variables sociodemográficas e infección por *H. pylori*, “cohabitantes” fue la única que presentó una relación significativa con respecto a la infección.

Investigaciones futuras

Se podría formular un estudio de cohorte haciendo seguimiento a la población estudiada, para ver cuáles variables sociodemográficas se asocian a recurrencia de la infección.

Se puede formular una investigación en donde se plantearía observar si la familia de los pacientes *H. pylori* positivos presentan infección por *H. pylori* y presentan la misma cepa.

Referencias bibliográficas

1. Mitchell H, Katelaris P. Epidemiology, clinical impacts and current clinical management of *Helicobacter pylori* infection. *Med J Aust.* 2016;2004(10):376–80.
2. Rojas B, Alonso M. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter Pylori*. *Rev Colomb Gastroenterología.* 2013;28(2).
3. Zhang W, Lu H, Graham D. An Update on *Helicobacter pylori* as the Cause of Gastric Cancer. *Gastrointest tumors.* 2014;1(3):155–65.
4. Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJ, Weaver LT. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;36(5):616–22.
5. De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C et al. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointest Liver Dis.* 2010;19(4):409–14.
6. Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, van Der EA et al. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis.* 2000;181(1):273–82.
7. Piotrowicz G, Stępień B, Rydzewska G. Socio-demographic characteristics of patients with diagnosed functional dyspepsia. *Prz Gastroenterol.* 2013;8(6):354–65.
8. Domínguez RR, Huanca Poma A. Prevalencia de infección por *H. pylori* en una población de nivel socioeconómico medio y alto. *Rev Médica La Paz.* 2013;19(1):35–9.
9. Abdallah TM, Mohammed HB, Mohammed MH, Ali AAA. Sero-prevalence and factors associated with *Helicobacter pylori* infection in Eastern Sudan. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2014 Apr;4(2):115–9.
10. Zhang Y, Du T, Chen X, Yu X, Tu L, Zhang C. Association between *Helicobacter pylori* infection and overweight or obesity in a Chinese population. *J Infect Dev Ctries.* 2015 Sep;9(9):945–53.
11. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis.* 1998 Oct;178(4):1089–94.
12. Aguemon BD, Struelens MJ, Masougbodji A, Ouendo EM. Prevalence and risk-factors for *Helicobacter pylori* infection in urban and rural Beninese populations. *Clin Microbiol Infect.* 2005 Aug;11(8):611–7.
13. Begue RE, Gonzales JL, Correa-Gracian H, Tang SC. Dietary risk factors associated with the transmission of *Helicobacter pylori* in Lima, Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Oct;59(4):637–40.
14. Abebaw W, Kibret M, Abera B. Prevalence and risk factors of *H. pylori* from dyspeptic patients in northwest Ethiopia: a hospital based cross-sectional study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(11):4459–63.
15. Sasidharan S, Lachumy SJT, Ravi-chandran M, Latha LY, Gegu SRS.

- Epidemiology of *Helicobacter pylori* among multiracial community in Northern Peninsular, Malaysia: effect of age across race and gender. *Asian Pac J Trop Med*. 2011 Jan;4(1):72–5.
16. Assaad S, Chaaban R, Tannous F, Costanian C. Dietary habits and *Helicobacter pylori* infection: a cross sectional study at a Lebanese hospital. *BMC Gastroenterol*. 2018 Apr;18(1):48.
 17. Ogihara A, Kikuchi S, Hasegawa A, Kurosawa M, Miki K, Kaneko E, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and smoking and drinking habits. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Mar;15(3):271–6.
 18. Brenner H, Berg G, Lappus N, Kliksch U, Bode G, Boeing H. Alcohol consumption and *Helicobacter pylori* infection: results from the German National Health and Nutrition Survey. *Epidemiology*. 1999 May;10(3):214–8.
 19. Herbarth O, Krumbiegel P, Fritz GJ, Richter M, Schlink U, Müller DM, et al. *Helicobacter pylori* prevalences and risk factors among school beginners in a German urban center and its rural county. *Environ Health Perspect*. 2001 Jun;109(6):573–7.
 20. Dorji D, Dendup T, Malaty HM, Wangchuk K, Yangzom D, Richter JM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Bhutan: the role of environment and Geographic location. *Helicobacter*. 2014 Feb;19(1):69–73.
 21. Ahmed KS, Khan AA, Ahmed I, Tiwari SK, Habeeb A, Ahi JD, et al. Impact of household hygiene and water source on the prevalence and transmission of *Helicobacter pylori*: a South Indian perspective. *Singapore Med J*. 2007 Jun;48(6):543–9.

CAPITULO V

Generalidades sobre la erradicación de la infección y métodos fenotípicos para la detección de la susceptibilidad en *Helicobacter pylori*

Adalucy Alvarez-Aldana¹, María Alejandra Buitrago Gómez²,
Laura Díaz Ramírez², Michelle Mejía Romero², Yina Marcela Guaca-González³,
José Ignacio Moncayo-Ortíz³, Jorge Javier Santacruz-Ibarra³, Lily Johana Blandon²,
Dannia Rojas Vasquez², Maria Camila Galeano².

Presentación

Helicobacter pylori es un patógeno humano común que durante 60.000 años ha infectado del 30 al 80 % de la población mundial. Debido a que generalmente la infección tiene lugar en la infancia y suele durar toda la vida se puede desencadenar la evolución a enfermedades gástricas graves, por lo tanto, el control del éxito del tratamiento es crucial. Una de las principales causas en cuanto al fallo de los tratamientos se debe a la resistencia a los antimicrobianos por lo que es de vital importancia determinar la sensibilidad antimicrobiana mediante pruebas fenotípicas de susceptibilidad como el E-test, difusión en disco y dilución en agar.

Los tratamientos de erradicación de la infección por *H. pylori* se han desarrollado durante los últimos 20 años, generalmente consiste en varias combinaciones de medicamentos (1,2). Más comúnmente, un supresor de ácido (generalmente un inhibidor de la bomba de protones) o un antagonista del

receptor de histamina (receptor H2) se prescribe en combinación con dos antibióticos, generalmente amoxicilina, metronidazol o claritromicina (2–6)

La combinación de dos antibióticos puede aumentar el éxito de la terapia de erradicación y disminuir la posibilidad de resistencia secundaria a los antibióticos (2).

La proporción de pacientes en quienes la infección se erradica después del tratamiento oscila entre 60 % y 95 % (7). Al igual que otras bacterias, la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos queda como resultado una falla en el tratamiento de primera línea, y varía entre 40 % y 70 % (3) El aumento de la resistencia de *H. pylori* a varias clases de agentes antimicrobianos en muchos países ha complicado aún más la búsqueda de un régimen de tratamiento óptimo y también ha enfocado una nueva atención hacia métodos confiables para determinar la susceptibilidad *in vitro* de esta especie bacteriana mediante las pruebas de susceptibilidad (2,4,5,7–13)

- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
- 2 Exintegrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.
- 3 Docente. Programa de Medicina. Facultad ciencias de la salud. Grupo investigación GRIENI. Universidad Tecnológica de Pereira.

El consenso de Maastricht V sugiere que una posible alternativa puede ser el tratamiento guiado por susceptibilidad (*SGT*), ajustando el programa de tratamiento a la susceptibilidad de los antibióticos para evitar la resistencia, aumentar las tasas de curación y garantizar un adecuado manejo de la infección (1,4,14–16). Las pruebas de susceptibilidad son costo-efectivas, previene la administración de antibióticos ineficaces y permite la adaptación de un tratamiento individual que sea exitoso en “70 % de los pacientes” (17). Varios factores tales como los regímenes inadecuados, cumplimiento deficiente del paciente, cargas bacterianas gástricas masivas, bacterias internalizadas, los antecedentes genéticos individuales (polimorfismos en el citocromo P450 2C19, IL-1B, CYP2C19), el grado de inflamación gástrica, la secreción de ácido gástrico, el lavado y dilución de antimicrobianos, y la formación de biopelículas pueden interferir con el éxito del tratamiento y explicar por qué los tratamientos guiados por susceptibilidad fallan en el 30 % de los pacientes (5,10,12,15,17).

Para el manejo correcto de la enfermedad de úlcera péptica y el linfoma MALT gástrico, así como la obtención de información sobre una amplia gama de enfermedades asociadas con la infección por *H. pylori*, son obligatorios los métodos de diagnóstico efectivos, incluidas las pruebas de susceptibilidad (18). Estas son cada vez más importantes para la búsqueda de combinaciones antimicrobianas eficientes que permitan la erradicación de esta bacteria del estómago (19).

La prueba de susceptibilidad *in vitro* para *H. pylori* puede realizarse por métodos fenotípicos o genotípicos (2). Las pruebas de susceptibilidad genotípica no solo son más rápidas y probablemente más rentables, sino que también son menos vulnerables a las

contaminaciones y más fáciles de estandarizar si se comparan con los métodos microbiológicos clásicos, incluidos el cultivo y las pruebas fenotípicas (10). Las pruebas fenotípicas son un desafío porque el organismo crece lentamente incluso en condiciones de cultivo óptimas. Debido a estas dificultades y debido a que la resistencia a los antibióticos en este microorganismo se debe en algunos casos a mutaciones puntuales (2) y en otros a múltiples mutaciones y como cualquier agente infeccioso, *H. pylori* puede adquirir resistencia a los agentes antimicrobianos usados para tratar la infección, las pruebas de susceptibilidad son importantes en el manejo de la infección (18). Las directrices internacionales recomiendan pruebas de susceptibilidad después de una segunda falla de los tratamientos empíricos (10).

El “Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio” (*CLSI* de las siglas en inglés *The Clinical & Laboratory Standards Institute*) ha aprobado solo el método de dilución de agar, pero requiere de mucho tiempo y trabajo intensivo para probar simultáneamente una gran cantidad de cepas. No es adaptable a un pequeño número de cepas, por lo que no es práctico realizarlo rutinariamente. Existen dos métodos alternativos, la prueba del Epsilómetro (E-test) y el método de difusión del disco (20). La prueba de difusión de disco se usa a menudo porque es simple, fácil de realizar y económica. Sin embargo, la prueba E-test ha demostrado ser un método preciso para analizar la susceptibilidad de los organismos exigentes, incluido *H. pylori*, a los antibióticos (2).

E-test: La prueba del épsilómetro es un método de prueba de susceptibilidad *in vitro* el cual tiene la ventaja de ser un método cuantitativo con una expresión directa de la concentración mínima inhibitoria (CMI), y

además, está adaptado a bacterias de crecimiento lento como *H. pylori* (1). Se ha encontrado una buena correlación entre este método y el método de dilución en agar, con la excepción del metronidazol (8, 9,18)

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 gradual graduada que cubre 15 diluciones dobles en el sitio opuesto (8,20). 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 (4).

Esta prueba tiene un patrón más 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 E-test en lugar del método de difusión del disco para *H. pylori* (2,20).

Difusión en disco: El método de difusión en disco es el más simple y económico para las pruebas de susceptibilidad de rutina. Sin embargo, generalmente no se recomienda para bacterias de crecimiento lento (9,18) El método de difusión del disco consiste en colocar un disco recubierto de antibiótico directamente en la placa de agar inoculada con *H. pylori* y determinar la zona de inhibición del crecimiento bacteriano (4). La difusión de disco ha sido validada en Francia para detectar resistencia a macrólidos. Debido a una brecha importante entre las CMI de cepas susceptibles y resistentes, es posible una separación clara con este método. Este método ha sido validado para claritromicina y no ha para otros antibióticos, pero generalmente se encuentra una buena correlación con los otros métodos (18).

Dilución en agar: El método de dilución en agar, generalmente considerado el método de referencia para comparar otras técnicas, ha sido propuesto por el “CLSI” como el método para ser utilizado para la prueba de susceptibilidad con *H. pylori*. La estandarización de esta prueba solo se ha hecho para claritromicina aún no se ha realizado el mismo trabajo para otros antibióticos. Aunque este método ahora se acepta como el estándar de oro “Gold standard”, no es adecuado para las pruebas individuales de cepas únicas de *H. pylori* en la práctica diaria (18).

Referencias bibliográficas

1. Di Giulio M, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Cataldi V, Marzio L, Grossi L, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to nine antibiotics currently used in Central Italy. Scand J Gastroenterol [Internet]. 2016 Mar;51(3):263–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26554617>
2. Fathi MS, EL-Folly RF, Hassan RA, El-Arab ME. Genotypic and phenotypic patterns of antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains among Egyptian patients. Egypt
3. Pastukh N, Peretz A, Brodsky D, Isakov N, Azrad M, On A. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from children in Israel. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. 2018; 12:175–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29033302>
4. Smith SM, O’Morain C, McNamara D. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. World J Gastroenterol [Internet]. 2014 Aug 7;20(29):9912–21. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110421>
5. Ayala G, Escobedo-Hinojosa WI, de la Cruz-Herrera CF, Romero I. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014 Feb 14;20(6):1450–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587621>
 6. Chen D, Cunningham SA, Cole NC, Kohner PC, Mandrekar JN, Patel R. Phenotypic and Molecular Antimicrobial Susceptibility of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017;61(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28167563>
 7. McMahon BJ, Bruce MG, Koch A, Goodman KJ, Tsukanov V, Mulvad G, et al. The diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Arctic regions with a high prevalence of infection: Expert Commentary. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2016 Jan;144(2):225–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26094936>
 8. Glupczynski Y, Labbé M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1991 Sep;29(9):2072–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1774337>
 9. Mousavi S, Pourabbas B, Niknam R, others. Susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: Comparison of E-test and disk diffusion for metronidazole and mutations in rdxA gene sequences of *Helicobacter pylori* strains. *Trends Pharm Sci*. 2015;1(4):235–42.
 10. Glocker E-O. The Need for Resistance Surveillance and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* Digestion [Internet]. 2015;92(3):173–4. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/439216>
 11. Alarcón T, Vega AE, Domingo D, Martínez MJ, López-Brea M. Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated from children: prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Jan;41(1):486–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517902>
 12. Hu Y, Zhu Y, Lu N-H. Novel and Effective Therapeutic Regimens for *Helicobacter pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017; 7:168. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28529929>
 13. Wang Y-K, Kuo F-C, Liu C-J, Wu M-C, Shih H-Y, Wang SSW, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Oct 28;21(40):11221–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26523098>
 14. López-Góngora S, Puig I, Calvet X, Villoria A, Baylina M, Muñoz N, et al. Systematic review and meta-analysis: susceptibility-guided versus empirical antibiotic treatment for *Helicobacter pylori* infection. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2015 Sep;70(9):2447–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26078393>
 15. Arslan N, Yılmaz Ö, Demiray-Gürbüz E. Importance of antimicrobial susceptibility testing for the management of eradication in *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2017 Apr 28;23(16):2854–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- pubmed/28522904
16. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/ Florence Consensus Report. Gut [Internet]. 2017;66(1):6–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27707777>
 17. Draeger S, Wüppenhorst N, Kist M, Glocker E-O. Outcome of second- and third-line *Helicobacter pylori* eradication therapies based on antimicrobial susceptibility testing. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2015 Nov;70(11):3141–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26245638>
 18. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2007 Apr;20(2):280–322. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428887>
 19. Piccolomini R, Di Bonaventura G, Catamo G, Carbone F, Neri M. Comparative evaluation of the E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. J Clin Microbiol [Internet]. 1997 Jul;35(7):1842–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9196205>
 20. Ogata SK, Gales AC, Kawakami E. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. Braz J Microbiol [Internet]. 2014;45(4):1439–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25763052>

ARTÍCULO ORIGINAL

Comparación de la concordancia entre métodos para la detección de la resistencia a claritromicina y levofloxacin en aislamientos de *Helicobacter pylori*

Adalucy Alvarez-Aldana¹, María Alejandra Buitrago Gómez²,
Laura Díaz Ramírez², Michelle Mejía Romero², Yina Marcela Guaca-González³,
José Ignacio Moncayo-Ortiz³, Jorge Javier Santacruz-Ibarra³, Lily Johana Blandon²,
Dannia Rojas Vasquez², Maria Camila Galeano².

Resumen. *Helicobacter pylori* ha infectado del 30-80 % de la población, su persistencia causa inflamación gástrica crónica y daño tisular, considerándose un carcinógeno clase I. La infección es curable con terapia antimicrobiana, pero se ha presentado un fallo debido al aumento en las tasas de resistencia, esta investigación comparó la concordancia entre diferentes métodos fenotípicos para la detección de la resistencia a Claritromicina y Levofloxacin en aislamientos de *H. pylori*. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con una muestra de 51 aislamientos de pacientes dispepticos que asistieron a endoscopia digestiva alta. A partir de los aislamientos se ejecutaron las pruebas de susceptibilidad para determinar la resistencia antimicrobiana, se implementaron tres métodos fenotípicos: E-test, difusión en disco y dilución a agar. A pesar del buen acuerdo para discriminar aislamientos susceptibles y resistentes, la CMI puede presentar un amplio rango entre los diferentes métodos. No se observó concordancia con ninguno de los métodos realizados comparados con la

dilución en agar, excepto entre los métodos de difusión (difusión en disco y E-test). La combinación de dos métodos arroja resultados más confiables.

Palabras clave. *Helicobacter pylori*, farmacoresistencia microbiana, antibacterianos, bacteria.

Abstract. *Helicobacter pylori* has infected 30-80 % of the population, the persistence causes chronic gastric inflammation and tissue damage, and is considered a class I carcinogen. The infection is curable with antimicrobial therapy, but treatment failures have occurred due to increased resistance rates. This investigation compared the agreement between different phenotypic methods for detecting resistance to Clarithromycin and Levofloxacin in *H. pylori* isolates. A descriptive cross-sectional study was conducted with a sample of 51 isolates from dyspeptic patients attended to upper digestive endoscopy. With the *H. pylori* isolations, the susceptibility tests were carried out to deter-

- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
- 2 Exintegrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.
- 3 Docente. Programa de Medicina. Facultad ciencias de la salud. Grupo investigación GRIENI. Universidad Tecnológica de Pereira.

mine the antimicrobial resistance, three phenotypic methods were implemented: E-test, disk diffusion and agar dilution. Despite the good agreement to discriminate susceptible and resistant isolates, the MIC can have a wide range between the different methods. No concordance was observed with any of the methods performed compared to the agar dilution, except between the disk diffusion and the E-test. The combination of two methods yields more reliable results.

Key words. *Helicobacter pylori*, drug resistance microbial, anti-bacterial agents, bacteria.

Introducción

El tratamiento de la infección por *H. pylori* es difícil, y de los ensayos clínicos iniciales parece que la actividad *in vitro* no siempre se correlaciona con el éxito *in vitro* y que la recaída ocurre frecuentemente después de la eliminación aparentemente exitosa del organismo de la mucosa gástrica con diversos agentes antimicrobianos y/o sales de bismuto (1,2).

La infección con *H. pylori* es curable con terapia antimicrobiana, el tratamiento de las infecciones puede realizarse con la combinación de diferentes antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones, pero el uso indiscriminado de los mismos ha generado aumento en las tasas de resistencia (3, 4-8). El control del éxito del tratamiento es crucial para controlar la evolución a enfermedades gástricas graves.

Las variaciones en las tasas de resistencia entre y/o dentro de los países probablemente se puedan atribuir a las diferencias en los patrones de prescripción de antibióticos locales y su uso en la comunidad, y puede variar dentro de los grupos de pacientes según la

región geográfica, la edad y el sexo del paciente, el tipo de enfermedad, el lugar de nacimiento y la presencia de otras infecciones (4,9-13). Sin embargo, las variaciones metodológicas en las pruebas de susceptibilidad de *H. pylori* también puede explicar, en parte, tales diferencias (9). Si *H. pylori* aumenta el riesgo de desarrollar otras enfermedades, el costo de la morbilidad asociada a *H. pylori* podría ser mucho mayor (14).

Uno de los factores implicados en el fallo terapéutico es la resistencia a los antimicrobianos, por lo que es de vital importancia determinar los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana mediante pruebas fenotípicas como el E-test, difusión en disco y dilución en agar (1, 4, 6, 7,15–20). Este último establecido como método de referencia por la reproducibilidad de los resultados, pero entre sus desventajas se encuentran la compleja metodología requerida para su desarrollo y el alto costo por prueba, por lo cual el E-test es el método de elección para uso en laboratorios de rutina e investigación (4, 9, 21, 22). La reproducibilidad de las pruebas y su adecuada utilización es de gran importancia al momento de realizar diagnósticos ciertos sobre la resistencia del microorganismo hacia los antimicrobianos, por tanto es necesario establecer si las pruebas utilizadas para tal fin reúnen las condiciones necesarias para seleccionarla como prueba de rutina capaz de generar resultados confiables que ayuden a direccionar el tratamiento adecuado basado en el perfil de susceptibilidad o en los tratamientos empíricos de rutina según los datos epidemiológicos de las tasas de resistencia de una zona geográfica en particular (2-4, 9, 21). Cualquier terapia de una enfermedad infecciosa se basa en gran medida en los resultados de las pruebas de susceptibilidad, y los resultados de la erradicación de *H. pylori* se optimizan cuando hay disponibles resulta-

dos de susceptibilidad específicos de pacientes, regiones o poblaciones (19). Además, la amplia variación geográfica reconocida en los patrones de susceptibilidad frente a los antibióticos se subraya la necesidad de la vigilancia de los agentes antimicrobianos de *H. pylori* en diferentes países del mundo (3).

Por lo anterior el objetivo de la investigación fue comparar la concordancia entre los métodos fenotípicos E-test, difusión en disco y dilución en agar para la detección de la resistencia a claritromicina y levofloxacina en aislamientos de *H. pylori* de pacientes dispépticos de las ciudades de Pereira y Manizales.

Materiales y métodos

Tipo de estudio: Estudio descriptivo de corte transversal, llevado a cabo en las ciudades de Pereira y Manizales en un periodo de tiempo de enero a septiembre del 2018.

Muestra: La muestra consistió en 51 aislamientos de *H. pylori* provenientes de pacientes mayores de edad que asistieron a endoscopia digestiva alta en la ciudad de Pereira (Centro de Especialistas de Risaralda) y en la ciudad de Manizales (Clínica San Marcel), del proyecto marco “Terapia triple estándar como primera línea de tratamiento para la erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos del Eje cafetero” de la ULP y la UTP.

Pruebas de susceptibilidad: Los tres métodos fenotípicos para detectar la resistencia fueron: E-test, difusión en disco y dilución en agar. En primer lugar, se realizaron las pruebas de E-test y difusión en disco ya que son los más fáciles de ejecutar y de menor valor que el método de dilución en agar. Una vez se determinaron los aislamientos resistentes a claritromicina (CLA) y levofloxacina

(LEV) se procesaron por el método de dilución en agar que es más costoso y de difícil ejecución.

Los 51 aislamientos fueron sembrados de manera masiva en agar Columbia (MERCK) suplementado con Sangre, al 7 % IsoVitalleX al 1 % e incubados bajo condiciones microaerófilas (5 % O₂, 10 % CO₂ y 85 % N₂) bajo el sistema (THERMO SCIENTIFIC, CamyGen™ 2.5L) a 37°C durante 72 horas. Posterior a la incubación se realizó una recolección de las siembras masivas de cada aislamiento para almacenar en el banco de preservación en caldo BHI con glicerol (20 %) para posteriormente realizar el método de dilución en agar y además un patrón de McFarland 3 utilizando como inóculo el crecimiento masivo de los aislamientos de *H. pylori* en tubos de ensayo con caldo BHI enriquecido con Isovitalex al 0,5 %. Para la prueba de E-test y difusión en disco se emplearon siembras masivas, introduciendo un escobillón dentro de la suspensión del patrón y se retiraba rotándolo varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo y se sembró en la superficie del medio de cultivo.

E-test: En el caso del E-test por cada antimicrobiano se utilizó una siembra masiva, se posicionaba una tirilla de E-test la cual trae una serie de diferentes concentraciones, asegurándose que la tira contactara completamente con la superficie del agar. Si era necesario se eliminaron las burbujas de aire que pudieron encontrarse por debajo de la tira presionándola ligeramente con las pinzas. La incubación de las placas se realizó de forma invertida bajo condiciones microaerófilas a 37°C durante 48 horas. Posterior al tiempo establecido se realizó la lectura de la prueba evaluando en la línea que se presen-

tó la elipse, la CMI (Concentración mínima inhibitoria) en el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira de E-test. La clasificación como sensible o resistente de la prueba de E-test se estableció según CLSI “*Clinical And Laboratory Standards Institute*”, para claritromicina (CLA) $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ y para levofloxacin (LEV) la resistencia se determinó como un resultado resistente según los datos de EUCAST $\geq 1 \mu\text{g/mL}$.

Difusión en disco: En el caso del método de difusión en disco se utilizó una caja de Petri con el mismo medio de cultivo de la siembra masiva inicial por muestra de paciente y se realizó la siembra masiva a partir del patrón. En cada caja se colocaron los sensibilizadores para CLA de (15 μg , OXOID) y LEV (5 μg , OXOID), con pinzas estériles. Los discos se ubicaron en la superficie del agar distribuyendo espacios iguales entre ellos y se presionaron ligeramente. La incubación de las placas se realizó de forma invertida bajo condiciones microaerófilas a 37°C durante 72 horas. Pasado el tiempo se realizó la lectura a partir de la medición del diámetro del halo de inhibición para cada antibiótico. Se fijó la resistencia de CLA según Ogata et al. (22) como sensible si el halo de inhibición fue $> 21 \text{ mm}$ y resistente un halo $< 21 \text{ mm}$, y para LEV se definió a partir de Boyanova et al. (23) en el cual se consideró un diámetro $\leq 9 \text{ mm}$ como resistente y $\geq 15 \text{ mm}$ como sensible, los aislamientos que se encontraron entre el rango de >9 a $<15 \text{ mm}$ se definieron como resistencia intermedia.

Dilución en agar: En el caso del método de dilución en agar considerada “*Gold Standard*”, se implementó únicamente en los aislamientos en los cuales en alguno de los dos métodos anteriores se haya presentado resistencia a los antibióticos CLA y LEV. El método consistió en realizar siembras de los aislamientos resistentes a estos dos antibióticos conservados en el banco de preservación a -80°C . Las siembras a partir del banco en el medio de cultivo agar sangre con isovitallex al 1 % se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37 °C por 72 horas. A partir de estas se realizó una siembra masiva de cada aislamiento en las mismas condiciones de medio e incubación nuevamente por 72 horas. Para evaluar la susceptibilidad a las concentraciones de los dos antibióticos seleccionados: claritromicina y levofloxacin, se prepararon las cajas con las concentraciones elegidas dispuestas en la tabla 1. Al igual que en los métodos anteriores se realizó un patrón de McFarland 3 para cada muestra y se sembraron 3 μL de cada una en las determinadas cuadrículas en las diferentes cajas con cada concentración. La incubación de las placas se realizó de forma invertida bajo condiciones microaerófilas a 37°C durante 48 horas. Se realizó la revisión del crecimiento a las 48 horas y se determinó el CMI hasta la última concentración en donde haya habido crecimiento. Para este método se deja un protocolo operativo estandarizado (POE) para el laboratorio de microbiología de la Universidad Libre seccional Pereira.

Tabla 1. Concentraciones de antibióticos para dilución en agar

Antibiótico	Concentración mg/mL										
Claritromicina (CLA)	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0	125,0	-	
Levofloxacin (LEV)	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0	125,0	256,0	

Análisis de datos: Los resultados de resistencia a CLA y LEV de los tres diferentes métodos fenotípicos fueron consignados en una base de datos de Excel®. La concordancia entre los resultados de los tres diferentes métodos fue realizada por la prueba estadística

denominada *índice de concordancia kappa*, generando *tablas de contingencia de 2x2 entre la prueba "Gold Standart"* y los otros dos métodos. Para determinar el grado de concordancia la prueba establece los índices determinados en la tabla 2.

Tabla 2. Escala de valoración del índice de Kappa

Indicie de Kappa	Grado de acuerdo
< 0,00	Sin acuerdo
> 0,00 – 0,20	Insignificante
0,21 – 0,40	Discreto
> 0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Sustancial
0,81 – 1,00	Casi perfecto

Consideraciones bioéticas: Esta investigación hizo parte del proyecto marco "Terapia triple estándar como primera línea de tratamiento para la erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos del Eje cafetero" la cual cuenta con aval bioético del comité de Bioética de la UTP (Anexo 2).

Resultados

Pruebas de susceptibilidad: En la figura 1, se pueden observar cada una de las metodologías utilizadas para la detección de los perfiles de susceptibilidad de los aislamientos.

Figura 1. Pruebas de susceptibilidad.

De los 51 aislamientos positivos para *H. pylori*, se procesaron para pruebas de susceptibilidad un número menor a la inicial debido a la dificultad de mantener los cultivos libres de agentes contaminantes, o del paso hacia forma viable no cultivable que se presenta con *H. pylori* después de subcultivos consecutivos *in vitro*.

Para la prueba de E-test se procesaron 43 muestras para LEV y 42 para CLA, mientras que para difusión en disco se procesaron 30 pruebas las cuales presentaron resultados para ambos antimicrobianos; dos de las muestras se encontraron en el rango de

resistencia intermedia para difusión en disco. La última prueba realizada fue el “*Gold standar*”, dilución en agar, esta fue ejecutada para corroborar los resultados de las pruebas previas, para esta se seleccionaron 19 muestras que habían dado como resultado resistencia a CLA y/o LEV, pero al tratar de recuperarlas a partir del banco solo se pudieron obtener 15 aislamientos, los restantes no mostraron crecimiento debido a que no sobrevivieron al almacenamiento a -80°C o presentaban agentes contaminantes. Para LEV se obtuvieron resultados de los 15 aislamientos, mientras que para CLA solo 12 de ellos por pérdidas debido a contaminación.

Tabla 3. Resultados obtenidos en cada una de las tres pruebas de susceptibilidad empleadas.

Código	E-TEST		DIFUSIÓN EN DISCO		DILUCIÓN EN AGAR	
	LEV n=43	CLA n=42	LEV n=30	CLA n=30	LEV n=15	CLA n=12
2P	S	S				
3P	S	S	S	S		
6P	<u>R</u>	<u>S</u>			<u>S</u>	<u>R</u>
7P	S	S				
9P	S	S	S	S		
10P	S	S	S	S		
11P	S	S	S	S		
12M	S	S	S	S		
13P	S	S				
15M	R	S	S	S	R	
20P	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
22P	R	S	R	S	R	S
27M	S	R			R	R
32P	S	S				
35P	S	S				
37P	S	S	S	S		
38P	S	S				
39P	S	S	S	S		
41P	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>R</u>

44P	S	S				
45M	R	S			R	
47P	S	S	S	S		
5SP	S	S	S	S		
51P	S	S	S	S		
<u>56P</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
59P	S	S	S	S		
61P	S	S	S	S		
62P	S	S	S	S		
64P	S	R	S	R		
65P	S	S	S	S		
<u>66M</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
69M	S	S	S	S		
<u>72M</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
73P	R	S			S	
75M	S	R			S	R
<u>76P</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>R</u>
77P	S	S	S	S		
<u>81M</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>S</u>
85M	S	S				
87M	R	R	R	R	R	R
88M	S	S	RI	S		
89M	R	R	R	R		
90M	S	S	S	S		

En subrayado corresponde a aislamientos con discrepancias en los resultados con respecto a resistencia “R” o sensibilidad “S”.

agar para CLA fue de 0,000 lo que establece que no existe acuerdo entre las pruebas; de manera similar ocurrió para LEV dio un resultado de 0,118 por lo cual el grado de acuerdo fue insignificante (Tabla 4 y 5).

Concordancia de las pruebas: La evaluación de la concordancia entre E-test y Dilución en

Tabla 4. E-test / Dilución en agar CLA n= 12

		Dilución en agar	
		SI	NO
E-test	SI	5	1
	NO	5	1
<i>Índice de Kappa= 0,000</i>			

Tabla 5. E-test / Dilución en agar LEV n=15

E-test	Dilución en agar	
	SI	NO
SI	9	1
NO	4	1
<i>Índice de Kappa= 0,118</i>		

Para la evaluación de la concordancia entre la prueba E-test y Difusión en disco para CLA, presentó un resultado de 1,000 por lo cual es grado de acuerdo entre estas pruebas

para este antimicrobiano fue casi perfecto; mientras que para LEV, fue de 0,704 lo que indica un acuerdo sustancial (Tabla 6 y 7).

Tabla 6. E-test / Difusión en disco CLA n= 30

E-test	Difusión en disco	
	SI	NO
SI	6	0
NO	0	24
<i>Índice de Kappa= 1,000</i>		

Tabla 7. E-test / Difusión en disco LEV n=28

E-test	Difusión en disco	
	SI	NO
SI	5	0
NO	3	20
<i>Índice de Kappa= 0,704</i>		

La evaluación de la concordancia entre la prueba de Dilución en agar y Difusión en disco, para CLA, el resultado obtenido fue de 0,047 lo cual indica que no existe acuerdo

para estas pruebas; al igual que para LEV, fue de 0,000 indicando el mismo resultado para ambos antimicrobianos (Tabla 8 y 9).

Tabla 8. Dilución en agar / difusión en disco CLA n=9

Dilución en agar	Difusión en disco	
	SI	NO
SI	3	4
NO	1	1
<i>Índice de Kappa=0,047</i>		

Tabla 9. Dilución en agar / difusión en disco LEV n=9

Dilución en agar	Difusión en disco	
	SI	NO
SI	4	5
NO	0	0
<i>Índice de Kappa= 0,000</i>		

Relación de la detección de la concentración mínima inhibitoria entre e-test y dilución en agar: Para claritromicina se presentó un 25 % de las muestras con un CMI entre un rango de 1-32 $\mu\text{g/mL}$ y el 75 % con CMI > 32 $\mu\text{g/mL}$ mediante la prueba E-test, mientras que para dilución en agar el 90 % con CMI de 1-32 $\mu\text{g/mL}$ y solo un 10 % >32 $\mu\text{g/mL}$.

En el caso de levofloxacina con la prueba de E-test no se presentaron muestras con CMI entre 1-32 $\mu\text{g/mL}$, y el 100 % con CMI >32 $\mu\text{g/mL}$, todo lo contrario se obtuvo para el método dilución en agar presentando un 100 % de las muestras con CMI 1-32 $\mu\text{g/mL}$ y ningún caso > 32 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria de los antimicrobianos por método de E-test y Dilución en agar

CMI's $\mu\text{g/mL}$	Porcentaje y número de aislamientos resistentes			
	CLA		LEV	
	E-test	Dilución en Agar	E-test	Dilución en Agar
1-32	25 % (2/8)		0 % (0/12)	100 % (12/12)
>32	90 % (9/10)	10 % (1/10)	100 % (12/12)	0 % (0/12)

Discusión

La detección de *H. pylori* no es una tarea fácil, esto se debe principalmente a la complejidad para acceder a su nicho ecológico y a la naturaleza frágil de la bacteria por lo cual su detección ha sido un tema de gran interés desde el descubrimiento de la bacteria en 1.982 (21), de las muchas pruebas de diagnóstico disponibles para la detección de la infección por *H. pylori* existen ciertas ventajas y desventajas para cada una de ellas (23). Sus desventajas y complejidad hacen aún más difícil el procedimiento de llevar a cabo el desarrollo de las pruebas. A pesar de que el *CLSI* estandarizó y aprobó el método de dilución en agar como método de referencia como prueba de susceptibilidad de *H. pylori*, este no es adecuado para las pruebas individuales de cepas únicas en la práctica diaria debido a lo complejo de la preparación del material y los costos (9).

La prueba E-test es menos laboriosa y es más fácil de realizar que el método de dilución en agar, inicialmente se ha demostrado una excelente correlación entre estos dos métodos para la mayoría de los antibióticos y en la mayoría de estudios (2, 9,16). Existen algunas discrepancias entre el método de dilución en agar y E-test para la detección de la resistencia como se pudo observar en este estudio. Esa falta de reproducibilidad en ambos métodos y en el mismo laboratorio podría explicarse por la presencia de infecciones mixtas con aislamientos susceptibles y resistentes, fenómeno que ha sido descrito en el 10 % de los casos de los países desarrollados (16).

Algunos estudios consideran el método de difusión en disco como un método confiable y de bajo costo para la determinación de la re-

sistencia antimicrobiana de *H. pylori* a CLA y para LEV, pero otros no lo recomiendan debido a su alto porcentaje de error (16,21). Especialmente este método no se recomienda para especies bacterianas que crecen lentamente, por lo cual es considerado el E-test como el mejor y más simple método para la evaluación de susceptibilidad antibiótica de rutina para *H. pylori*, a pesar de que su costo es más elevado en comparación a las a la difusión en disco, pero menor que la dilución en agar cuando se hace de manera individual (16). Sin embargo, combinaciones de más de una prueba por lo general dan el diagnóstico bastante satisfactorio (23).

Glupczynsky et al., en un estudio evaluó la correlación entre los resultados de las pruebas por dilución en agar y los métodos de prueba E-test, para 12 agentes antimicrobianos, 86 % de los resultados estaban dentro de la dilución 1 log₂ y el 99.5 % estaban dentro de la dilución 2 log₂ (1). Piccolomini et al., determinaron la correlación de la prueba de E-test y dilución en agar para claritromicina la cual fue de 94,1 %. Van Horn et al., compararon la prueba E-test y el método de dilución de agar para evaluar las actividades de 5 agentes antimicrobianos contra *H. pylori*, encontrando una correlación del 86 %. Cederbrant et al., determinó las susceptibilidades de 20 aislamientos de *H. pylori* a seis agentes antimicrobianos, encontraron que el 81 % de las CMI determinadas por la prueba E-test se encontraban dentro de una dilución doble y el 93 % estaban dentro de dos diluciones dobles de las determinadas por el método de dilución del agar (2).

Glupczynsky et al., nuevamente realizó una validación de la prueba E-test en comparación con la dilución de agar para probar la susceptibilidad de los aislamientos de *H. pylori* y estandarizarlas en cuanto a las con-

diciones ambientales. En general, se encontraron que la variabilidad inter e intralaboratorio de los resultados de la dilución de agar fue para la claritromicina. Se encontró una estrecha correlación entre los dos métodos para claritromicina, el porcentaje de correlación entre dilución en agar y E-test fue de 85,0 % para una dilución 1 log₂ mientras que para la dilución 2 log₂ la correlación fue del 97,5 % (9).

Ogata et al, en un estudio evaluó la confiabilidad de la prueba E-test y la difusión en disco comparando con el método de dilución en agar para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de *H. pylori*. La claritromicina presentó una tasa de resistencia del 19,5 % mediante el método de dilución en agar y mediante la prueba E-test fue del 20,8 %, mientras que para difusión en disco mostró una resistencia del 38.9 %. Al evaluar el desacuerdo de la prueba E-test, la claritromicina presentó un resultado intermedio por la dilución en agar que fue resistente por la prueba E-test (1.3 %) pero la correlación fue moderada ($r = 0.6369$, $p < 0.0001$) y la discrepancia con la difusión en disco ocurrió en 11.7 %, 9 las cepas fueron susceptibles por dilución en agar y resistentes por difusión en disco, pero la correlación fue moderada ($r = -0.5656$, $p < 0.0001$). Estos resultados muestran que, a pesar del buen acuerdo para discriminar aislamientos susceptibles y resistentes, la CMI puede presentar un amplio rango entre los diferentes métodos (22). Fathi et al., evaluó la correlación entre la prueba de E-test y la difusión en disco, halló una alta tasa de resistencia a la claritromicina, del 100 % por el método de difusión del disco, sin embargo, solo el 50 % se confirmaron resistentes a la claritromicina mediante la prueba E-test (4).

La falta de concordancia entre los métodos y el gold estándar podría explicarse por el

pequeño número de muestras, para lo que se debe repetir en todos los aislamientos las tres pruebas y en el caso del “Gold estándar” por duplicado. La combinación de dos métodos arroja resultados más confiables, por lo que se puede sugerir que en estudios con E-test se confirmen al azar en un número pequeño de aislamientos R y S el resultado con el “*Gold estándar*” u otro método de detección.

En todo el mundo, la resistencia a los antimicrobianos de *H. pylori* es alta, y parece estar aumentando para al menos dos agentes, claritromicina y levofloxacina (15). Cualquier terapia de erradicación de un agente infeccioso se basa en gran medida en los resultados de las pruebas de susceptibilidad, por lo tanto, teniendo en cuenta la creciente tasa de resistencia en muchos países, el monitoreo de la susceptibilidad de *H. pylori* a los antibióticos parece ser necesario para elegir una terapia eficaz para erradicar las infecciones y para optimizar el régimen en caso de un fracaso del tratamiento (16–19). Las variaciones en las tasas de resistencia entre y/o dentro de los países probablemente se puedan atribuir a las diferencias en los patrones de prescripción de antibióticos locales y su uso en la comunidad (9). Por otro lado, la correlación entre la frecuencia de prescripción de los antimicrobianos y la aparición del aumento de la tasa de resistencia de las cepas de *H. pylori* está ahora ampliamente documentada. Esta consideración subraya que la colonización prolongada del microorganismo favorece la selección de cepas capaces de sobrevivir al uso de antibióticos durante la vida del huésped (3). En la mayoría de las regiones, incluidas las regiones desarrolladas, hay pocos laboratorios que tienen la capacidad de realizar cultivos y pruebas de susceptibilidad de aislados de *H. pylori*; por lo tanto, la información necesaria para selec-

cionar los mejores agentes para usar en base a las pruebas de sensibilidad a menudo no está disponible (24,25), en consecuencia, es necesario hacer uso de los datos de estudios epidemiológicos sobre tasas de resistencia.

Conclusiones

- No se observó concordancia con ninguno de los métodos realizados comparados con el Gold standard, excepto entre los métodos de difusión (E-test y difusión en disco). Esa concordancia entre E-test y difusión en disco, podría atribuirse al total del número de muestras procesadas. Para este caso, se pudieron analizar 30 muestras tanto para LEV como para CLA, mientras que para dilución en agar solo fueron 12 para CLA y 15 para LEV.
- Se presentaron diferentes concentraciones mínimas inhibitorias en los aislamientos resistentes para LEV y CLA en las pruebas de E-test y dilución en agar.
- La combinación de dos métodos arroja resultados más confiables en las tasas de resistencia, y de esta manera no se subestima la resistencia.

Investigaciones futuras

- Realizar el proceso de curación del banco de aislamientos de *H. pylori* y al mismo tiempo corroborar los datos obtenidos entre la concordancia del perfil de susceptibilidad entre E-test y dilución en agar por duplicado en todos los antibióticos evaluados para evitar subestimar la tasa de resistencia.
- Comparar mediante análisis moleculares los resultados obtenidos por métodos fenotípicos y evaluar la concordancia, además de poder determinar que mutaciones en *H. pylori* están involucradas en la resistencia a claritromicina, levofloxacina

y otros antimicrobianos como metronidazol y rifampicina en estas muestras, para comparar con los estudios previos del grupo de investigación.

Referencias Bibliográficas

1. Glupczynski Y, Labbé M, Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Evaluation of the E test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol [Internet]. 1991 Sep;29(9):2072–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1774337>
2. Piccolomini R, Di Bonaventura G, Catamo G, Carbone F, Neri M. Comparative evaluation of the E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. J Clin Microbiol [Internet]. 1997 Jul;35(7):1842–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9196205>
3. Di Giulio M, Di Campi E, Di Bartolomeo S, Cataldi V, Marzio L, Grossi L, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to nine antibiotics currently used in Central Italy. Scand J Gastroenterol [Internet]. 2016 Mar;51(3):263–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26554617>
4. Fathi MS, EL-Folly RF, Hassan RA, El-Arab ME. Genotypic and phenotypic patterns of antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains among Egyptian patients. Egypt J Med Hum Genet [Internet]. 2013 Jul;14(3):235–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S111086301300030X>
5. Pastukh N, Peretz A, Brodsky D, Isakov N, Azrad M, On A. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from children in Israel. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. 2018;12:175–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29033302>
6. Smith SM, O’Morain C, McNamara D. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. World J Gastroenterol [Internet]. 2014 Aug 7;20(29):9912–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110421>
7. Ayala G, Escobedo-Hinojosa WI, de la Cruz-Herrera CF, Romero I. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. World J Gastroenterol [Internet]. 2014 Feb 14;20(6):1450–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587621>
8. Chen D, Cunningham SA, Cole NC, Kohner PC, Mandrekar JN, Patel R. Phenotypic and Molecular Antimicrobial Susceptibility of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2017;61(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28111111>
9. Glupczynski Y, Broutet N, Cantagrel A, Andersen LP, Alarcon T, López-Brea M, et al. Comparison of the E test and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2002 Jul;21(7):549–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12172749>
10. López-Góngora S, Puig I, Calvet X, Villoria A, Baylina M, Muñoz N, et al. Systematic review and meta-analysis: susceptibility-guided versus empirical antibiotic treatment for *Helicobacter pylori* infection. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2015 Sep;70(9):2447–

55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26078393>
11. Arslan N, Yılmaz Ö, Demiray-Gürbüz E. Importance of antimicrobial susceptibility testing for the management of eradication in *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2017 Apr 28;23(16):2854–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28522904>
 12. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/ Florence Consensus Report. *Gut* [Internet]. 2017;66(1):6–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27707777>
 13. Draeger S, Wüppenhorst N, Kist M, Glocker E-O. Outcome of second- and third-line *Helicobacter pylori* eradication therapies based on antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2015 Nov;70(11):3141–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26245638>
 14. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014 Sep 28;20(36):12781–808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278678>
 15. McMahon BJ, Bruce MG, Koch A, Goodman KJ, Tsukanov V, Mulvad G, et al. The diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Arctic regions with a high prevalence of infection: Expert Commentary. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2016 Jan;144(2):225–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26094936>
 16. Mousavi S, Pourabbas B, Niknam R, others. Susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: Comparison of E-test and disk diffusion for metronidazole and mutations in rdxA gene sequences of *Helicobacter pylori* strains. *Trends Pharm Sci*. 2015;1(4):235–42.
 17. Glocker E-O. The Need for Resistance Surveillance and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori*. *Digestion* [Internet]. 2015;92(3):173–4. Available from: <https://www.karger.com/Article/Full-Text/439216>
 18. Alarcón T, Vega AE, Domingo D, Martínez MJ, López-Brea M. Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated from children: prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Jan;41(1):486–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517902>
 19. Hu Y, Zhu Y, Lu N-H. Novel and Effective Therapeutic Regimens for *Helicobacter pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017;7:168. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28529929>
 20. Wang Y-K, Kuo F-C, Liu C-J, Wu M-C, Shih H-Y, Wang SSW, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Oct 28;21(40):11221–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26523098>
 21. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2007 Apr;20(2):280–322. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428887>

22. Ogata SK, Gales AC, Kawakami E. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2014;45(4):1439–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25763052>
23. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gultati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014 Sep 28;20(36):12847–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278682>
24. Boyanova L, Gergova G, Markovska R, Kandilarov N, Davidkov L, Spassova Z, et al. Primary *Helicobacter pylori* resistance in elderly patients over 20 years: A Bulgarian study. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017 Jul;88(3):264–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28506722>
25. Vega AE, Alarcón T, Domingo D, Martínez MJ, López-Brea M. [Detection of resistance to clarithromycin in clinical isolates of *Helicobacter pylori* from children and adults]. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2003 Mar;16(1):53–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12750757>

CAPITULO VI

Efecto del campo magnético sobre el crecimiento microbiano

Adalucy Alvarez-Aldana¹, María José Castaño Villegas², Marcela Santa Gómez², Kerynd Barona-Duque², Juanita Salgado-Rivera², David M Guzmán-Jojoa², Eduard A Hincapié-Ladino³, Javier I Torres-Osorio⁴.

PRESENTACIÓN

El cultivo de Helicobacter pylori es fundamental para el desarrollo de nuevas investigaciones, por tanto, diferentes laboratoristas han buscado nuevas alternativas para potenciar su crecimiento in vitro, ya que H. pylori se clasifica por ser un microorganismo “fastidioso” en su crecimiento. Una alternativa postulada es acelerar su crecimiento a través de influencias externas, como lo es con el Campo Magnético, el cual ya se ha demostrado que posee efectos inhibitorios y estimulantes, siendo este último el factor buscado, de tal manera que, al exponerlo a diferentes densidades y tiempos, establecer la mejor densidad del flujo del Campo magnético para alcanzar el objetivo y lograr mejores resultados con respecto a su crecimiento.

La ciencia cada vez avanza más y consigo, nuevas investigaciones, una de éstas no muy conocida, pero si muy antigua es el campo magnético en un uso biológico. El descubrimiento del campo magnético como tal se

ubica en plena edad de hierro, definida como la fuerza ejercida a un objeto provocado por un flujo de electricidad, es decir, por el movimiento de cargas eléctricas, pero a medida que pasó el tiempo se involucraron nuevos investigadores y ya en la Edad Media el CM era usado para alivio del dolor, mejoría en la salud y que detenía los procesos de envejecimientos, entre otras (1) y fueron éstos los pilares para indagar mucho más (2).

Varias han sido las ciencias a parte de la física que se han fijado en el CM, entre éstas es la microbiología, la cual a causa de la existencia de tantas bacterias resistentes a medicamentos se vio a la necesidad de buscar una nueva alternativa para la eliminación de patógenos y fue donde gracias a esto, se descubrió que el CM influye en el crecimiento microbiano con efectos “no observables, inhibitorias y estimulantes” (3) *Listeria* sp. (2).

Existen 2 tipos de CM que han sido probados en microorganismos, el oscilatorio y el estático, los cuales difieren en el flujo de cargas, puesto que éste segundo tipo (estático) posee

-
- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
 - 2 Exintegrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.
 - 3 Docente. Grupo de investigación en campos electromagnéticos, medioambiente y salud pública. Universidad de Caldas.
 - 4 Docente. Universidad Tecnológica de Pereira.

un flujo constante, por tanto, ambos han sido evaluados y el CM estático posee un mejor efecto en los microorganismos ya que sus intensidades nunca variarán (4).

Los efectos producidos dependen de su densidad, frecuencia y del tiempo de exposición, en especial la intensidad, donde ésta magnitud es medida en Teslas(T) o en Gauss (G). Su importancia está en que a muy alta intensidad puede inhibir el crecimiento microbiano (3) *Listeria* sp. (2).

El crecimiento microbiano es el estudio más importante que posee la microbiología, la cual ha descrito que este crecimiento posee unas etapas: latencia, exponencial, estacionaria y de muerte. El CM afecta en la segunda etapa, donde el crecimiento es logarítmico, el cual lo puede afectar positivamente, alargando esta etapa y disminuyendo la fase estacionaria o negativamente, influyendo más rápidamente a la fase de muerte (3) *Listeria* sp. (2).

Este magnetismo ha sido probado tanto en medio de cultivo líquido como también sólido, alterando el ambiente de cada microorganismo, pero muchos de éstos poseen la capacidad de adaptarse al medio para su supervivencia donde se comienzan a presentar cambios metabólicos, ya que tales microorganismos inician a acelerar su propia producción de enzimas y ATP. El CM tiene tal efecto en ellos a causa de sus membranas anisotrópicas la cual es la responsable de las principales funciones del transporte de las membranas (5). La inhibición se da a altas intensidades ya que modifican el transporte de iones debido a que cambia la velocidad de reproducción celular, la variación del metabolismo lo que ocasiona en el medio de cultivo aumento del pH a básico, afectando el crecimiento y con ello, la desintegración

de la pared celular, produciendo liberación del material interno porque se modifica la estructura de la membrana formando poros que permiten la salida del mismo (6).

Por otro lado la estimulación se da en intensidades extremadamente bajas medidas en militeslas (mT) lo cual provoca cambios en la orientación y dirección de la migración y en la estructura de biomoléculas, en la síntesis de ADN provocando aumento en ella, cambios en las biomembranas, donde en la biomembrana plasmática altera el flujo de iones (7). Se sabe que la fase exponencial se da en presencia de nutrientes, por tal motivo para que la tasa de estimulación sea más efectiva debe haber presencia de fuente de carbono, ya que el CM incrementa la entrada de azúcares por la membrana y así acelerando sus rutas metabólicas (6).

Al acelerar tales procesos por ende se aceleran otros factores que poseen los microorganismos, como la producción de biomasa la cual es el peso anhidrido que producen, ya sea orgánico o inorgánico, tal producción depende de la composición y balance de las fuentes de nutrientes (8), y en éste caso, de la intensidad del campo magnético, pues éste también influye en la naturaleza de los nutrientes, de su medio de cultivo puesto que puede activar las partículas coloidales de éste, lo cual remueve parte de Ca unida a los fosfolípidos, provocando mayor permeabilidad de la membrana plasmática de los microorganismos (9)

Han sido varias las teorías que han respaldado tales efectos de los CM en los microorganismos, ya que aún no se comprende completamente las consecuencias bioquímicas de tal efecto, pero todos coinciden que la membrana plasmática es el eje principal para sus efectos y que la “resonancia del ci-

clotróon” es uno de los responsables de las alteraciones producidas por el magnetismo, puesto que provoca la aceleración de partículas cargadas (9)

Referencias Bibliográficas

1. Zayas Guillot JD. La magnetoterapia y su aplicación en la medicina. *Rev Cuba Med Gen Integr.* 2002;18(1):60–72.
2. Martínez Morán P del C, García Reyes B, Paniagua Muñoz JA. COMPARACIÓN ANTIMICROBIANA DE UN CAMPO PULSANTE E IMANES COMUNES SOBRE CEPAS BACTERIANAS. Mexico City; 2008.
3. Anaya M, Barbará E, Padrón J, Borrego SF, Valdés O, Molina A. Influencia del campo magnético sobre el crecimiento de microorganismos patógenos ambientales aislados en el Archivo Nacional de la República de Cuba. *Biomedica.* 2015;35(3):325–36.
4. GreenFacts Scientific Board. Campo magnético.
5. Bello Gutiérrez J. Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. 2000;
6. Hernández Jiménez SJ, Toro D, Lucero E, Gonzaga Gutiérrez L. Magnetic Field Influence in *E. coli* and *S. cerevisiae* Growth and the Ability of *Pseudomonas* sp and *Bacillus* sp to be Phosphorus Solubilizers for Industrial Usage. *Rev Ciencias.* 2015;19(1):109–21.
7. Zapata JE, Moreno G, Márquez EJ. EFECTOS DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*. 2002.
8. Espinoza-Bretado R, Návar J. Producción de biomasa, diversidad y ecología de especies en un gradiente de productividad en el matorral espinoso tamaulipeco del nordeste de México. *Rev Chapingo Ser Ciencias For y del Ambient.* 2005;11(1):25–31.
9. Nawrotek P, Fijałkowski K, Struk M, Kordas M, Rakoczy R. Effects of 50 Hz rotating magnetic field on the viability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Electromagn Biol Med.* 2014;33(1):29–34.

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto del campo magnético en el crecimiento de *Helicobacter pylori*

Autores: Adalucy Alvarez-Aldana¹, María José Castaño Villegas², Marcela Santa Gómez², Kerynd Barona-Duque², Juanita Salgado-Rivera², David M Guzmán-Jojoa², Eduard A Hincapié-Ladino³, Javier I Torres-Osorio⁴.

Resumen. *Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo capaz de colonizar el estómago humano; más del 50 % de la población mundial está infectada. *Helicobacter pylori* tiene un crecimiento lento y es complicado de cultivar debido a que requiere condiciones de microaerofilia y medios complejos y enriquecidos para su crecimiento. La utilidad e importancia del cultivo para *H. pylori* está relacionada con poder conocer sus características de crecimiento, su diversidad genética, su epidemiología y la posibilidad de determinar la resistencia bacteriana a los antimicrobianos comúnmente utilizados en el tratamiento, de allí surge la necesidad de buscar variables entre ellas las físicas como el campo magnético para favorecer su crecimiento. Por lo tanto, el objetivo del proyecto fue evaluar la influencia del campo magnético sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*, para esto se utilizó la siembra según Mossel para medir el índice de crecimiento absoluto (ICA) del microorganismo bajo la influencia del campo magnético. Además,

se compararon tres medios de cultivo diferentes y dos densidades magnéticas sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*. Concluyendo que este tiene un efecto positivo sobre la productividad de *Helicobacter pylori* in vitro observando el aumento del ICA, sin embargo, no se podría asegurar cual es el efecto del campo magnético para aumentar esta productividad.

Palabras claves. *Helicobacter pylori*, Medios de cultivo, Eficiencia, Terapia de campo magnético, Imanes

Abstract. *Helicobacter pylori* is a Gram-negative bacillus, capable of colonize human stomach; More than 50 % of world wild population its infected. *H. pylori* has a slow growth and culturing its difficult cause it requires microaerophilia and complex culture mediums. The utility of *H. pylori* culturing is to know all its growth characteristics, genetic diversity, epidemiology and the possibility of knowing the antibiotics resistance rate of the bacteria, considering those things some physical variable as magnetic field

- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
- 2 Exintegrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.
- 3 Docente. Grupo de investigación en campos electromagnéticos, medioambiente y salud pública. Universidad de Caldas.
- 4 Docente. Universidad Tecnológica de Pereira.

appear like and alternative for stimulate its growth. Therefore, the propose of this research was to evaluate the influence of magnetic field on the growth of *H. pylori*, for that we use Mossel sowing for measure the absolute growth rate (ICA) of the bacteria under the influence of magnetic field. Also, we compared three different culture media and two magnetic densities over the growth of *H. pylori*. We conclude that magnetic field have a positive effect over the productivity of *H. pylori in-vitro* note from the increase of ICA, however, it cannot be said which is the effect of the magnetic field to increase the productivity.

Key Word. *Helicobacter pylori*, Culture Media, Efficiency, Magnetic field therapy, Magnets

Introducción

Helicobacter pylori tiene un crecimiento lento y es complicado de cultivar debido a que requiere condiciones de microaerofilia y medios complejos, enriquecidos para su crecimiento. No se ha logrado obtener la formulación de un medio económico y de alta productividad para *H. pylori* (1). La utilidad e importancia del cultivo para *H. pylori* está relacionada con poder conocer sus características de crecimiento, su diversidad genética, su epidemiología y la posibilidad de determinar la resistencia bacteriana a los antimicrobianos comúnmente utilizados en el tratamiento. También el cultivo de *Helicobacter pylori* es fundamental para la recuperación y mantenimiento de bancos de cepas para investigaciones futuras.

El campo magnético ha mostrado ser capaz de aumentar la biomasa en cultivos de microalgas (2), la mayoría de estudios se han enfocado en organismos eucariotas como las microalgas y en algunos casos células huma-

nas (3)Es claro que las células tienen mecanismos de magneto recepción (4), razón por la cual todos los campos magnéticos afectan directamente todo tipo de células (5)Existen dos tipos de campos magnéticos, el estático y el pulsado u oscilatorio, en la búsqueda del mejor tipo para las terapias en microorganismo se han probado estos dos en diversos tiempos e intensidades, encontrando que estos pueden tener efectos positivos y negativos sobre el crecimiento microbiano (6,7)

La aplicación del campo magnético en microorganismos ha sido utilizada con diferentes propósitos, siendo el aumento de biomasa y la incentivación de generación de productos los más estudiados (8)Sin embargo, estudios emergentes han demostrado un efecto importante sobre los procesos de biorremediación propiciados por microorganismos (9,10).

A partir de lo anterior se considera si existe una combinación de variables químicas, como los medios de cultivo utilizados en una investigación previa, y físicas, como el campo magnético, para encontrar una que logre aumentar la productividad de los medios de cultivo y así facilitar el estudio de la bacteria *in-vitro*.

De esta manera se pretende evaluar la productividad de los diferentes medios de cultivo utilizados en la investigación de recuperación del banco de aislamientos de la UTP, y el efecto del campo magnético sobre la productividad de los mismos medios de cultivo, para determinar si el campo magnético influye en la promoción del crecimiento de *Helicobacter pylori* y comparar dos densidades magnéticas sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*.

Materiales y métodos

Se trabajó con las cepas NCTC 11637 y NCTC 12908 las cuales hace parte del banco de cepas y aislamientos de *H. pylori*.

- **Preparación de los medios de cultivo**

En la tabla 1 se describen los medios de cultivo utilizados.

Tabla 1. Medios de cultivo A, B y C

A	B	C
Agar Triptacasa Soya (ATS)	Agar Triptacasa Soya (ATS)	Agar Triptacasa Soya (ATS)
Sangre de cordero Completa 0,7 %	Sangre de cordero lisada 10 %	
	Suero fetal bovino 5 %	Suero fetal Bovino 5 %
IsoVitaleX 0,5 %		IsoVitaleX 0,5 %
	Extracto de levadura 0,25 %	Extracto de levadura 0,25 %
Vancomicina 10mg/L	Vancomicina 10mg/L	DENT
Anfotericina B 5 mg/L	Anfotericina B 5mg/L	cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio 40mg/L
Bacitracina 1,07mg/L	Trimetoprim 5mg/L	
Polimixina B 0,33mg/L		

Características Agar TSA: Digerido pancreático de caseína 14.5g, digerido papaico de harina de soja 5.0g, cloruro sódico 5.0g, agar 14.0g y factores de crecimiento 1.5g. (BD)

Los medios de cultivo fueron incubados a 37°C durante 7 días en condiciones de microaerofilia con el sistema comercial de sobres CampyGen Thermo scientific (atmósfera de O₂ de 6.2-13.2 % y de CO₂ de 2.5-9.5 %)

- **Condiciones de Incubación:**

- **Siembra:**

Tabla 2. Materiales usados para siembra

Asas estériles	embalo en bolsas plásticas con 2 sobres de microaerofilia para generar las condiciones adecuadas.	10
Micropipeta		10
Puntas amarillas		10
Inóculos del cepario		10

Para la siembra se tomaron 100 microlitros del inóculo en los 3 diferentes medios y se extendió en siembra masiva por toda la caja, posterior a esto se rotulaban las 3 cajas y se

Prueba de promoción de crecimiento (productividad) de tres diferentes medios de cultivo y efecto del campo magnético sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*:

- **Confirmación por pruebas bio-**

químicas: Se le realizó a las cajas que presentaban crecimiento las pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *Helicobacter pylori*, las cuales son coloración de Gram, catalasa a partir de medio C, Ureasa y Oxidasa las cajas que pasaron las pruebas bioquímicas se le realizaron patrón de McFarland 3 para realizar siembra según Mossel en medios con y sin antibióticos.

- **Tinción de Gram:** Se tomó una lámina y se le adiciono una gota de solución salina estéril luego con un asa se tomó una porción del crecimiento y se le adiciono a la solución salina, se fijó al mechero y se deja secar bien, posterior a esto se tomaron los reactivos cristal violeta, lugol, acetona y fucsina en una proporción de una gota durante 1 minuto el cristal violeta, lugol, fucsina y durante 10 segundos la acetona, se dejó secar y se observa al microscopio.
- **Catalasa:** Se tomó una lámina y se le agregaron 2 gotas de peróxido de hidrogeno y con un asa estéril se toma una porción del inóculo y se pone en el peróxido de hidrogeno si se producen burbujas en este es positivo si no se presentan es negativo el resultado.
- **Ureasa:** Se preparó 10 mL de una solución urea teniendo en cuenta la preparación para 1L: 0.1gr de extrac-

to de levadura, 9.1 gr de di-hidrogeno fosfato potásico, 9.5 gr de hidrogeno fosfato sódico, 20 gr de urea. Se tomó un tubo de Eppendorf y se agrega la ureasa previamente preparada, luego se toma con un asa estéril de punta redonda parte del inóculo y si la ureasa vira su color de transparente a fucsia es positivo si no lo hace es negativo su resultado.

- **Oxidasa:** Se tomó los medios y se les coloca una tirilla indicadora si esta cambia su coloración es positivo si no lo hace es negativo su resultado.

Siembra según Mossel + Tratamiento con Campo Magnético:

- **Patrón de McFarland:** Se tomaron tubos con 4ml de caldo BHI esterilizado previamente y se toma con un asa de punta redonda estéril parte del inóculo y se va adicionando al caldo fijándose que toma la misma turbidez a la muestra comercial.
- **Siembra de medios:** se prepararon los medios A, B y C y se inóculo por medio de estrías para la determinación del ICA.

Resultados y discusión

En la figura 1 se observa el crecimiento del microorganismo en los tres medios de cultivo. Las UFC compatibles con *H. pylori* se confirmaron con coloración de GRAM y Prueba de ureasa positiva, como se observa en la figura 2.

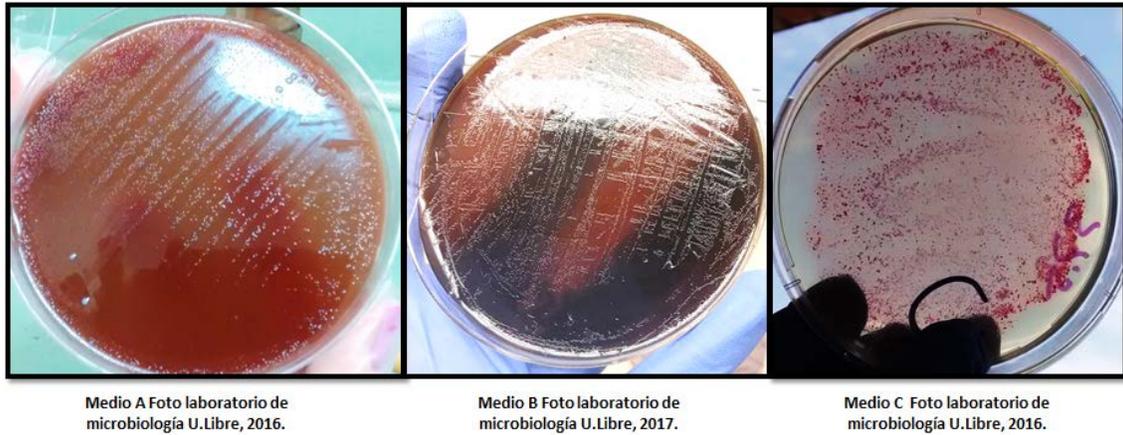


Figura 1. Evaluación y recuperación de los tres medios de cultivo incubados a 37°C por 7 días en condiciones de microaerofilia.

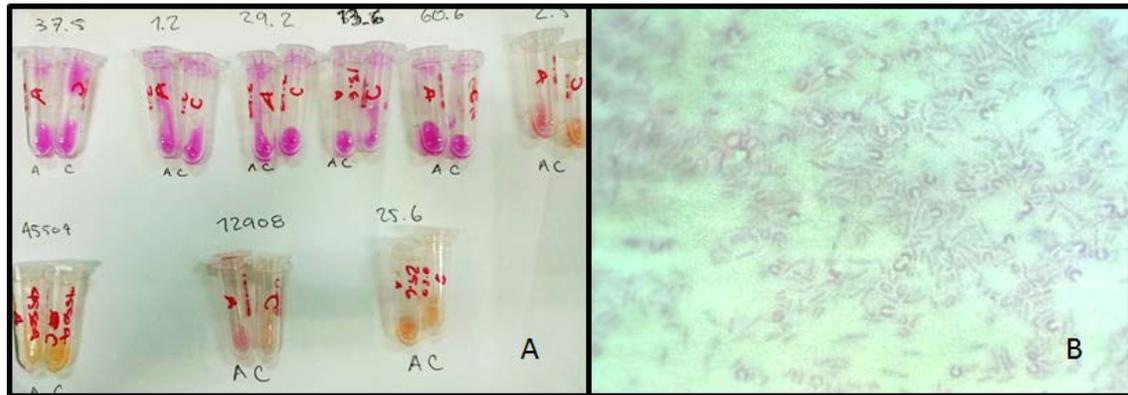


Figura 2. Pruebas Confirmatorias. A: Pruebas de ureasa. B: Tinción de Gram. En la tinción de Gram se observa bacilos curvados característicos de *H.pylori*.

Prueba de promoción de crecimiento (productividad) de tres diferentes medios de cultivo y efecto del campo magnético sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*:

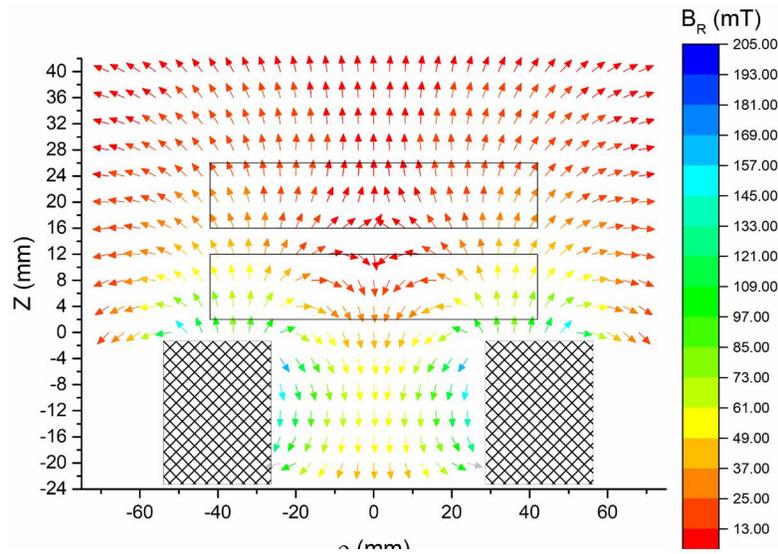


Figura 3. Distribución de la densidad de flujo magnético en imanes toroidales

Distribución de la densidad de flujo magnético en imanes toroidales [1]. Los recuadros representan las posiciones de los medios de

cultivo expuestos a campo magnético. Inferior (D1) y superior (D2).

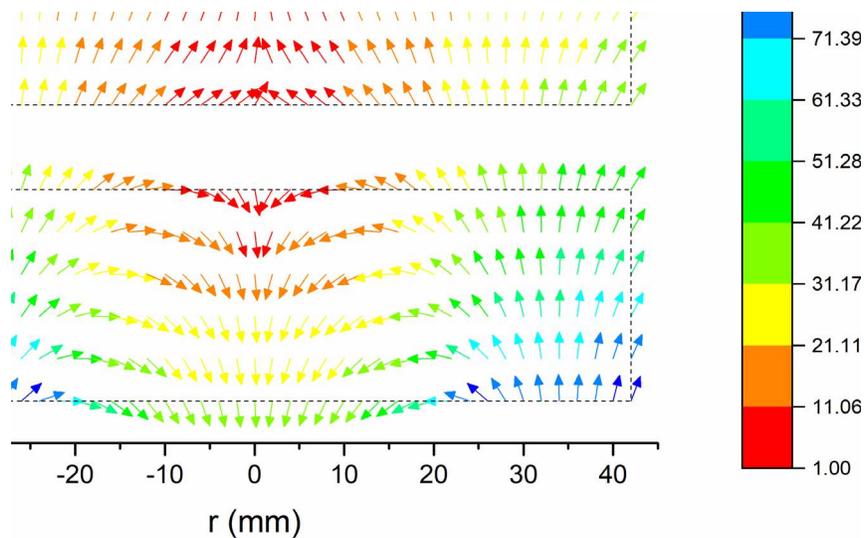


Figura 4. Dirección del flujo del campo magnético

La figura muestra la distribución de la densidad de flujo magnético dentro de los volúmenes expuestos; inferior (D1) y superior

(D2). Es un acercamiento de la figura anterior, para mostrar tanto la dirección del campo magnético como su magnitud ().

La siguiente tabla muestra las dosis que se aplicaron dependiendo de la altura a la cual se posicionaron las muestras. Las dosis utilizadas no se pueden representar solo con un valor debido a que espacialmente el campo

magnético presenta una gran variación, y para un reporte experimental correcto se deben de especificar todas sus características en cada uno de los volúmenes de exposición.

Tabla 3. Dosis del campo magnético

	(mT)	(mT)	(mT)		
D1	40,45	20,67	5,92	91,23	85,31
D2	18,49	8,02	1,49	36,69	35,20

B_{promedio} : Promedio de la densidad de flujo magnético resultante en el volumen especificado.

σ_B : Desviación estándar de los de los valores de densidad de flujo magnético resultante.

B_{min} , B_{max} : Valor **mínimo y máximo de la**

densidad de flujo magnético resultante en el volumen especificado.

ΔB_{max} : Variación máxima de la densidad de flujo magnético para cada una de los volúmenes.

Tabla 4. Se observan los ICAs según densidad magnética, medio de cultivo y cepa de referencia.

TRATAMIENTO	CEPA	MEDIO	DENSIDAD	ICA
T1	NCTC 11637	A	D1	1,0
T2	NCTC 12908	A	D1	4,0
T3	NCTC 11637	B	D1	1,0
T4	NCTC 12908	B	D1	5,0
T5	NCTC 11637	C	D1	0,2
T6	NCTC 12908	C	D1	0,6
T7	NCTC 11637	A	D2	4,0
T8	NCTC 12908	A	D2	1,2
T9	NCTC 11637	B	D2	4,0
T10	NCTC 12908	B	D2	1,6
T11	NCTC 11637	C	D2	5,0
T12	NCTC 12908	C	D2	0,2
T01	NCTC 11637	A	Control	1,8
T03	NCTC 11637	B	Control	1,8
T05	NCTC 11637	C	Control	2,0
T07	NCTC 12908	A	Control	2,2
T09	NCTC 12908	B	Control	1,6
T011	NCTC 12908	C	Control	1,0

Se tuvieron un total de dieciocho muestras en las cuales doce fueron tratadas con campo magnético (T1-T2-T3-T4-T5-T6-T7-T8-T9-T10-T11-T12) de estas doce muestras las primeras seis de ellas que estaban más cerca al imán recibían una densidad de 12mT estas

fueron marcadas con D1 y las seis siguientes se colocaron encima de las seis anteriormente mencionadas recibían una densidad de 30mT estas fueron marcadas con D2 y seis de ellas fueron incubadas sin tratamiento como controles negativos (T01-T03-T05-T07-T09-T011).

De estas doce muestras tratadas con densidades de flujo magnético se pudo observar que cinco de ellas es decir el 41,666 % presentaron un ICA superior a la contra muestra no tratada con CM.

Lo que evidencia la tabla es que, si se presentó un efecto positivo y que según los efectos investigados previamente sobre el campo magnético que a diferentes intensidades puede ser estimulante provocando cambios en la orientación y dirección de la migración y en la estructura de biomoléculas, en la síntesis de ADN provocando aumento en ella, cambios en las biomembranas, alterando el flujo de iones como lo demuestra Hernandez, S *et al* (11) , además, específicamente para *H.pylori* también pudo haber modificación a nivel genético, afectando el gen que expresa su forma coccoide, aumentando por tanto la expresión viable como lo demostró Poursina, F *et al* (12)H. pylori requires a stringent response which, encoded by the *spoT* gene, has a bifunctional enzyme possessing both (p. Para que la tasa de estimulación sea más efectiva debe haber presencia de fuente de carbono, ya que el CM incrementa la entrada de azúcares por la membrana y así acelerando sus rutas metabólicas según la cantidad de tiempo y de densidad usada, lo cual fue comprobado por Zapata, J *et al* (13)

Se observa que en el tratamiento utilizado D1 la cepa 12908 presentó mejor productividad independiente del medio usado y en el tratamiento utilizado D2 la cepa 11637 pre-

sento mejor productividad independiente del medio usado.

CONCLUSIONES

- Se puede concluir que el campo magnético tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori* observando el aumento del ICA, pero no se podría asegurar si tuvo un efecto negativo o neutro ya que no se le realizó pruebas especializadas para esta identificación.
- De doce muestras, se observó que cinco de ellas presentaron un efecto positivo sobre el índice de crecimiento absoluto (ICA) cuando fueron sometidas a los tratamientos con campo magnético.
- Observando los resultados se podría concluir que la cepa 11637 presenta una mejor sensibilidad ante el tratamiento con campo magnético, pero se debe realizar confirmación de esto con un número más representativo de muestras y/o realizando muestreo por triplicado.

Investigaciones futuras

- Realizar el experimento a una escala superior en la cual se tenga presupuesto propio para poder realizar las pruebas necesarias para identificación de las variaciones y realizar prueba por triplicado para realizar el análisis estadístico.
- Probar un medio no tan enriquecido por lo tanto más económico que influenciado positivamente por las densidades de flujo magnético sea igual o más productivo que los utilizados en el presente trabajo.
- Realizar la recuperación del banco

de cepas que ayudado con la influencia de las densidades de flujo magnético tenga una recuperación superior al 80 %.

Referencias Bibliográficas

1. Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJG, Weaver LT. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003 May;36(5):616–22.
2. Deamici KM, Santos LO, Costa JAV. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. *Bioresour Technol.* 2018;249(September 2017):168–74.
3. Santos LO, Deamici KM, Menestrino BC, Garda-Buffon J, Costa JAV. Magnetic treatment of microalgae for enhanced product formation. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017;33(9):0.
4. Monteil CL, Lefevre CT. Magneto-reception in Microorganisms. *Trends Microbiol.* 2020;28(4):266–75.
5. García-minguillán O, Prous R, Ramirez-castillejo MDC, Maestú C. CT2A cell viability modulated by electromagnetic fields at extremely low frequency under no thermal effects. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1).
6. Deamici KM, Cardias BB, Costa JAV, Santos LO. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. *Process Biochem.* 2016;51(7):912–6.
7. Konopacki M, Rakoczy R. The analysis of rotating magnetic field as a trigger of Gram-positive and Gram-negative bacteria growth. *Biochem Eng J.* 2019;141:259–67.
8. Fijałkowski K, Drozd R, Zywicka A, Junka AF, Kordas M, Rakoczy R. Biochemical and cellular properties of *Gluconacetobacter xylinus* cultures exposed to different modes of rotating magnetic field. *Polish J Chem Technol.* 2017;19(2):107–14.
9. Beretta G, Mastorgio AF, Pedrali L, Saponaro S, Sezenna E. The effects of electric, magnetic and electromagnetic fields on microorganisms in the perspective of bioremediation. Vol. 18, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology.* Springer Netherlands; 2019. 29–75 p.
10. Qu M, Chen J, Huang Q, Chen J, Xu Y, Luo J, et al. Bioremediation of hexavalent chromium contaminated soil by a bioleaching system with weak magnetic fields. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2018;128:41–7.
11. HERNANDEZ JIMENEZ, Sandra Johana; DOMINGUEZ TORO EL, GONZAGA GUTIERREZ L. Influencia de campos magnéticos en el crecimiento de *E. coli* y *S. cerevisiae* y la capacidad de solubilizar fósforo en *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp* de uso industrial. *Rev Ciencias.* 2015;19:109–21.
12. Poursina F, Fagril J, Mirzaei N, Safaei HG. Overexpression of *spoT* gene in coccoide forms of clinical *Helicobacter pylori* isolates. *Foila Microbiol (Praha).* 2018 Jul 1;63(4):459-65
13. Zapata JE, Moreno G, Márquez EJ. EFECTOS DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*. 2002.

CAPITULO VII

El agua como ruta de transmisión de *Helicobacter pylori*

Adalucy Alvarez-Aldana¹, Fernando Rafael Siller-López¹, Valeria Ceballos Toro²,
María Del Mar Álvarez Quintero², Fabiana M Lora Suarez³, Maria Alejandra Calle²,
Valentina Giraldo².

Presentación: *Muchos estudios han demostrado la presencia de Helicobacter pylori en diversas fuentes de agua; por lo que el agua como ruta de transmisión de la bacteria ha sido aceptada. Sin embargo, H. pylori es un microorganismo exigente en su cultivo, más aún cuando se pretende aislar de un ambiente diferente a su hábitat gástrico y se añade que en el agua adopta su forma viable no cultivable (VBNC) se convierte en un trabajo casi imposible el poder aislarla y cultivarla por los métodos tradicionales. Dada esta situación, se hace necesario el uso de metodologías moleculares para lograr su detección en el agua; además, la cantidad en la que puede estar presente H. pylori en agua se desconoce y este tipo de métodos permiten la detección de cantidades mínimas de la bacteria.*

Helicobacter pylori es una bacteria que infecta el epitelio gástrico de más de la mitad de la población humana y se asocia a enfermedades como dispepsia, gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma gástrico tipo MALT, y cáncer gástrico. Las rutas de transmisión de *H. pylori* aún son poco conocidas pero las más aceptadas son las vías iatrogénica, fecal-oral, gastro-oral y oral-oral; aunque

también se ha descrito que la bacteria puede ser transmitida a través de algunos alimentos, animales y agua (1).

Ruta iatrogénica: La transmisión iatrogénica constituye una ruta por la cual personas pueden ser infectadas por medio de elementos que han estado en contacto con heces, secreciones orales y jugos gástricos contaminados por *H. pylori* (2). Esta ruta se ve protagonizada principalmente por material médico utilizado en la detección del patógeno, como es el caso de los endoscopios, los cuales son puestos en contacto con la mucosa gástrica de una persona infectada para luego ser utilizado con otra (3).

Ruta fecal-oral: Esta ruta de transmisión hace referencia a las enfermedades adquiridas cuando las partículas fecales de un hospedero se introducen en la boca de un huésped, las principales causas son agua contaminada con heces y no tratada antes de consumir, alcantarillado deficiente, los alimentos manipulados con heces, o cualquier objeto que haya estado en contacto con estas. La evidencia acerca de la transmisión del patógeno por esta ruta se encuentra basada en estudios realizados donde se ha podido

-
- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
 - 2 Exintegrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.
 - 3 Docente. Grupo de investigación GEPAMOL. Universidad del Quindío.

cultivar *H. pylori* de heces humanas. Esta ha sido aislada a partir de heces de niños, en adultos su detección es menos frecuente (2).

Ruta gastro-oral: Esta ruta hace referencia a la incidencia de *H. pylori* en los jugos gástricos, los cuales por medio del vomito tienen contacto con otras personas las cuales pueden infectarse. Existen altas tasas de infección en niños, entre los cuales los vómitos y el reflujo gastro-esofágico son comunes y más frecuentes que en los adultos, además del contacto con otros objetos que son llevados a la boca (4). Esta es una ruta no posee mucha relevancia en comparación de las fecal- oral y oral- oral, sin embargo, el aislamiento de la bacteria en el jugo gástrico y vomito de personas infectadas, hace que la ruta gastro- oral sea una fuente posible de transmisión de *H. pylori* (5)

Ruta oral-oral: Muchos científicos tienen la hipótesis de que la ruta oral-oral de transmisión de *H. pylori* es la más probable, sobre todo en los países desarrollados. Esta se da a través del contacto con saliva infectada por el patógeno, se encuentra presencia de *H. pylori* en lesiones de la cavidad oral y en la placa dental. Esta transmisión se logra a través de contacto íntimo, al compartir alimentos y utensilios contaminados y contacto con la placa dental, la cual es un importante reservorio, perpetuando el ciclo infeccioso de la bacteria (6)

Hace algunos años pocas investigaciones implicaban el agua como vehículo de transmisión de *H. pylori*, pero hoy en día hay suficiente evidencia de la presencia de esta bacteria en el agua a nivel mundial, por lo que se puede implicar al agua tratada y no tratada como posible vehículo de transmisión (7).

La hipótesis de que el agua es una vía de transmisión de *H. pylori* está respaldada por dos tipos de estudios; los epidemiológicos que han demostrado una mayor prevalencia de la infección en países en vía de desarrollo que padecen problemas relacionados con la distribución sanitaria del agua a la población y los estudios que han detectado o aislado *H. pylori* de diversas fuentes de agua. Por este motivo, son varios los estudios que se han centrado en determinar el potencial del agua como fuente de transmisión de *H. pylori* y su capacidad de producir la infección clínica.

MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA EN EL AGUA:

Forma viable no cultivable: Muchas especies de bacterias entran en el estado viable no cultivable (VBNC) cuando están expuestas a condiciones estresantes como inanición, bajas temperaturas y en general condiciones ambientales desfavorables, siendo esta una estrategia de adaptación para la supervivencia a largo plazo. A diferencia de las células normales que son cultivables en medios adecuados y se convierten en colonias, las células VBNC son células a pesar de estar vivas que pierden su capacidad de crecer en medios de cultivo en los que normalmente crecen. A pesar de esto, las células VBNC no se consideran células muertas debido a que tienen su membrana intacta que contiene la información genética en perfecto estado, además de ser metabólicamente activas (8).

La capacidad de ingresar al estado VBNC puede ser ventajosa para la bacteria, pero poco favorable para la salud humana ya que bajo los métodos convencionales de cultivo no es posible su detección, por lo que si en una muestra todas o algunas bacterias se encuentran en estado VBNC, la cantidad total de bacterias viables será subestimada o no

se detectará (9) y tratándose de un patógeno humano, podrá infectar a la persona que consume el agua en la cual no pudo ser detectado.

Se ha demostrado la viabilidad y la capacidad de cultivo de *H. pylori* en agua hasta por 75 horas a 10°C. Así mismo, se determinó que el total de células no disminuía por períodos mucho más largos de tiempo en condiciones adecuadas (2 años a 4°C) (10).

Varios estudios han señalado que los cambios en la morfología de *H. pylori* están estrechamente relacionada a los genes implicados en la síntesis de peptidoglucano. En primer lugar, ocurre la división de los enlaces peptídicos por acción de Csd1, Csd2 y Csd3. Luego, los enlaces intrapéptidos también se escinden por acción secuencial de Csd3, de una DL-carboxipeptidasa desconocida y Csd4, que permite una relajación inicial del peptidoglucano en la zona de torsión, perdiendo la forma helicoidal. A continuación, los monómeros que han sido sometidos a la acción enzimática, son reconocidos por diferentes transglicosilasas líticas, como Slt y MltD, que se eliminan para la posterior inserción de nuevos monómeros. Finalmente, la inserción de nuevos monómeros en el peptidoglucano y la elongación, se realiza mediante PBP1, PBP2 y proteínas de membrana (MreC). Esto aumenta la longitud de las cadenas de glucanos y los enlaces cruzados (11).

La forma espiral se ha asociado con la capacidad de moverse en un medio viscoso, como el moco gástrico. Esto significa que la forma helicoidal puede ser innecesaria en ambientes acuáticos ya que puede implicar un costo energético innecesario para la bacteria (11), siendo este otro posible motivo que justifique el cambio de su morfología

Formación de biopelículas: La formación de biopelículas en el ambiente ha sido propuesto como una estrategia de *H. pylori* para sobrevivir en los sistemas de distribución de agua (10).

Las biopelículas son comunidades microbianas embebidas dentro de una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a superficies vivas o inertes, son sólidas y presentan canales por donde fluye el agua y los nutrientes a las zonas más profundas. Los primeros análisis de la producción de biofilms por parte de bacterias, como *H. pylori*, se llevaron, mediante estudios de microscopía electrónica, observándose la presencia de formas espirales, cocoides y degenerativas. La formación de la biopelícula conlleva un proceso de cinco fases: 1) Adsorción reversible de la bacteria a la superficie; 2) Unión irreversible a la superficie; 3) Fase inicial de maduración con crecimiento y desarrollo microbiano; 4) Producción del exopolímero y, 5) Desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras (12).

Cuando *H. pylori* se adhiere a una superficie, comienza la activación del *quorum sensing* así como los mecanismos de formación de los biofilms. Se ha trabajado con biofilms en sistemas de tuberías y tanques de almacenamiento y algunos autores creen que así es como *H. pylori* puede ser viable en el agua (13) debido a que, al ubicarse en la parte interna de estos tanques y tuberías, las hace inaccesibles y difícil de alcance por los desinfectantes (14).

En Colombia se evaluó la presencia de *H. pylori* en muestras de agua y biopelículas de los grifos de instituciones educativas oficiales de la ciudad de Medellín a través de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final, identificando

la bacteria por cultivo en 11.2 % y PCR en 2.1 % de las muestras (7). En este caso, el cultivo tuvo mejor rendimiento que la PCR probablemente porque los componentes de las biopelículas actuaron como inhibidores de la PCR (15), por los genes utilizados para la amplificación o por la técnica de procesamiento de muestras (7).

La capacidad de *H. pylori* para crecer y formar biopelículas *in vitro* e *in vivo* podría ser una ventaja para la especie para evitar lesiones causadas por factores estresantes químicos, como la terapia antimicrobiana *in vivo*, o el estrés inducido por la privación de nutrientes en el medio ambiente (10).

La presencia de las biopelículas de *H. pylori* en agua se ha verificado mediante PCR, sondas de ADN e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Así mismo, se ha presentado evidencia *in vitro* que sugiere que las interacciones con bacterias específicas (por ejemplo, *Mycobacterium chelonae*) dentro de una biopelícula de múltiples especies puede contribuir a la viabilidad de *H. pylori* (16).

Es necesario tener en cuenta que, aunque una población disponga de aguas municipales potables y de grifos adecuados, la calidad del agua de la potabilización no es la misma en todas partes, además el estado del acueducto como daños previos que exponen al agua potable a contaminación con materia fecal, la antigüedad del acueducto y la presencia de biopelículas en las tuberías, deben estudiarse como factores predictores de contaminación del agua (7).

Asociación con amebas de vida libre (FLA): Se ha demostrado previamente que las amebas de vida libre (FLA), como *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vermamoeba* o *Ba-*

lamuthia, pueden actuar como huéspedes de algunos patógenos bacterianos capaces de resistir la digestión amebiana. Dentro de ellas, las bacterias sobreviven y son más resistentes a las condiciones ambientales que normalmente las matarían. Por lo tanto, FLA actúa como “caballo de Troya” para ARB, permitiendo la supervivencia bacteriana y/o la transmisión a susceptibles hospedadores (17,18)

Recientemente, un estudio *in vitro* ha indicado que *H. pylori* puede sobrevivir dentro de *Acanthamoeba castellanii* después de resistir un tratamiento de desinfección por cloración. FLA proporciona refugio para *H. pylori*, lo que le permite sobrevivir bajo diferentes tratamientos y hacer posible su transmisión a humanos. El análisis de qPCR de las muestras mostró la presencia de ADN de *H. pylori* intracelular en 28 (50,9 %) de las muestras de aguas residuales y en 11 (91,7 %) de las muestras de agua potable. Así mismo, se indicó que no se pudieron recuperar colonias por cultivo de las muestras de FLA positivas, debido a que la bacteria podría haber adquirido su estado VBNC, ya que mediante DVC-FISH se observó su viabilidad después del tratamiento con hipoclorito (17,19).

Uno de los principales problemas para aceptar el agua como posible reservorio de *H. pylori* es la incapacidad de aislar y detectar la especie de las muestras de agua mediante técnicas convencionales. Por lo tanto, la aplicación de este tipo de métodos es vital para la detección rápida, sensible y específica de *H. pylori* en entornos acuáticos es de suma importancia.

El principal desafío cuando se realiza un muestreo ambiental es la incapacidad de demostrar la existencia de *H. pylori* viable en

el agua, que potencialmente puede colonizar el estómago o el duodeno porque los métodos moleculares utilizados para detectar las bacterias en el medio ambiente son incapaces de distinguir entre bacterias muertas; sin embargo, han surgido técnicas como la DVC-FISH (Hibridación fluorescente in situ en combinación con la incubación de conteo viable directo) la cual que permite la detección específica de células viables y tiene la ventaja de no ser inactivado por inhibidores de muestras (20).

Ensayos de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA) utilizan anticuerpos específicos que permiten la enumeración de células tanto cultivables como no cultivables y las formas espiral y cocoide, pero no puede detectar genes marcadores de virulencia como *cagA* lo cual no lo hace muy útil al momento de querer confirmar la presencia de *H. pylori* a través de estos genes de virulencia (21). Además de las anteriores técnicas, existen otras como la amplificación isotérmica medida por bucle (LAMP por sus siglas en inglés) que es un mecanismo más rápido y fácil. Esta técnica es una reacción de amplificación de una etapa, que puede producir una gran cantidad de copias en menos de una hora en condiciones isoterma. La ventaja más importante de este método es que no necesita desnaturalización del ADN (22). Además, se puede realizar sin un termociclador y los resultados pueden observarse a simple vista. También se utiliza la citometría de flujo, la cual es una técnica analítica que tiene el potencial de hacer una distinción entre los cuatro estados fisiológicos de las bacterias: reproductivamente viable, metabólicamente activa, intacta y permeabilizada. Puede determinar las proporciones de los estados VBNC y VC y las células muertas, en función de la integridad de la membrana de la bacteria (23).

La PCR es una técnica simple para copiar un fragmento de ADN en el laboratorio con reactivos fácilmente disponibles. Debido a que el número de copias aumenta exponencialmente, se pueden hacer más de 100 millones en unas cuantas horas. Se trata de un proceso cíclico donde, con cada ciclo, el número de fragmentos de ADN se duplica (24).

Esta PCR de punto final clásica es una reacción de ausencia/presencia porque mide la formación de productos de ADN después de un número de ciclos determinado, lo que arroja información cualitativa sobre la presencia o ausencia de un determinado gen, pero no revela información sobre la cantidad existente de ADN. Esta técnica de PCR se ha convertido en una de las herramientas más influyentes en las ciencias biológicas y médicas (25).

Para poder evidenciar el resultado de la PCR de punto final es necesario realizar un corrido electroforético, mediante el cual es posible separar fragmentos de ADN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción y determinar así el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Pudiendo confirmar así que el amplicón sea del tamaño esperado (26).

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, debido a que la emisión de fluorescencia en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar

a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia, el cual puede ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos

Entre las ventajas de la PCR en tiempo real está el uso de la fluorescencia para detectar los productos de la PCR; para diferenciar no solo un resultado positivo de uno negativo, sino también para poder cuantificar los organismos durante la curva de crecimiento. Además de esto; una ventaja revolucionaria es que el tubo con los productos de PCR no tiene que abrirse para realizar un corrido electroforético y observar el amplicón ya que el análisis se realiza en el instrumento durante la PCR (27).

Referencias Bibliográficas

1. Breckan RK, Paulssen EJ, Asfeldt AM, Kvamme J-M, Straume B, Florholmen J. The All-Age Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection and Potential Transmission Routes. A Population-Based Study. *Helicobacter* [Internet]. 2016 Dec;21(6):586–95. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/hel.12316>
2. Palomino Camargo C, Tomé Boschian E. *Helicobacter pylori*: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. In: *Anales Venezolanos de Nutrición* [Internet]. 2012;25(2):85–93. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-07522012000200005
3. Cava F, Cobas G. Dos décadas de *Helicobacter pylori*. *VacciMonitor* [Internet]. 2003;12(1):1-10. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/2034/203414596001.pdf>
4. Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomédica*. [Internet]. 2000;11(3):187–205. Available from: <http://www.cirbiomedicas.uady.mx/revbiomed/pdf/rb001136.pdf>
5. Ramírez Ramos A, Mendoza Requena D, Leey Casella J, Guerra Valencia J. Estudio del *Helicobacter pylori* en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. [Internet]. 2002;19(4):209–14. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342002000400009&script=sci_abstract
6. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1997 Oct;10(4):720–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336670>
7. Cuervo CM, Gaviria ÁM. Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua y biopelícula de los grifos de las instituciones educativas oficiales en la ciudad de Medellín. *Acta Médica Colomb* [Internet]. 2017;42(2):121–8. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v42n2/0120-2448-amc-42-02-00121.pdf>
8. Laam L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* [Internet]. 2014 Jun 2;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00258/abstract>
9. Mali S, Vrushi L, Hila N. The impact of drinking water on the prevalence of *H. Pylori* in humans in Elbasan, Albania. *Eur Water*. [Internet]. 2017;58:263-266. Available from: https://www.researchgate.net/publication/321184977_The_impact_of_drinking_water_on_the_

- prevalence_of_H_Pylori_in_humans_in_Elbasan_Albania
10. García A. Biofilm and *Helicobacter pylori* : From environment to human host. World J Gastroenterol [Internet]. 2014;20(19):5632. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i19/5632.htm>
 11. Fernandes RM, Silva H, Oliveira R, Almeida C, Azevedo NF, Vieira MJ. Morphological transition of *Helicobacter pylori* adapted to water. Future Microbiol [Internet]. 2017 Oct;12(13):1167–79. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2016-0174>
 12. Bayona Rojas MA, Gutiérrez Escobar AJ, others. Biopelícula: un mecanismo de supervivencia de *Helicobacter pylori*. Rev U.D.C.A. Act & Div Cient. [Internet] 2013; 16(2):335-342. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262013000200007&lng
 13. Montero Campos V, Hernández Soto A, Camacho Sandoval J. Culture and Molecular Identification of *Helicobacter pylori* in Drinking Water from Areas of High and Low Incidence of Gastric Cancer in Costa Rica. Op J Med Microbiol [Internet] 2014; 4(4): 261-269. Available from: <https://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=52896>
 14. Bahrami AR, Rahimi E, Ghasemian Safaei H. Detection of *Helicobacter pylori* in city water, dental units' water, and bottled mineral water in Isfahan, Iran. ScientificWorldJournal [Internet]. 2013;2013:280510. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23606812>
 15. Otero R, others. *Helicobacter pylori* en agua potable ¿Es la ruta de la infección? Acta Médica Colomb. [Internet]. 2017;42(2):87–9. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482017000200087&lng=en
 16. Hathroubi S, Servetas SL, Windham I, Merrell DS, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2018 May 9;82(2). Available from: <http://mmbbr.asm.org/lookup/doi/10.1128/MMBR.00001-18>
 17. Moreno-Mesonero L, Moreno Y, Alonso JL, Ferrús MA. Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain. Environ Microbiol [Internet]. 2017 Oct;19(10):4103–12. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.13856>
 18. Amirhooshang A, Ramin A, Ehsan A, Mansour R, Shahram B. High frequency of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Kermanshah, Iran, during June-November 2012. J Water Health [Internet]. 2014 Sep;12(3):504–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25252354>
 19. Bai X, Xi C, Wu J. Survival of *Helicobacter pylori* in the wastewater treatment process and the receiving river in Michigan, USA. J Water Health [Internet]. 2016 Aug;14(4):692–8. Available from: <https://iwaponline.com/jwh/article/14/4/692/28124/Survival-of-Helicobacter-pylori-in-the-wastewater>
 20. Santiago P, Moreno Y, Ferrús MA. Identification of Viable *Helicobacter pylori* in Drinking Water Supplies

- by Cultural and Molecular Techniques. *Helicobacter* [Internet]. 2015 Aug;20(4):252–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/hel.12205>
21. Chomvarin C, Wongboot W, Tirapat-tanun A, Kanthawong S, Wongwajana S, Tongpim S, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in aquatic environments and drinking waters in north-eastern Thailand. *Chiang Mai J Sci*. [Internet]. 2017;44:731–41. Available from: https://www.researchgate.net/publication/318786035_Detection_of_Helicobacter_pylori_in_aquat-ic_environments_and_drinking_wa-ters_in_northeastern_Thailand
 22. Chamanrokh P, Shahhosseiny MH, Mazaheri Assadi M, Nejadstattari T, Esmaili D. Three Tests Used to Identify Non-Culturable Form of *Helicobacter pylori* in Water Samples. *Jundishapur J Microbiol* [Internet]. 2015 Apr 18;8(4). Available from: <http://jjmicrobiol.com/en/arti-cles/18868.html>
 23. Mazaheri Assadi M, Chamanrokh P, Whitehouse CA, Huq A. Methods for Detecting the Environmental Coc-coid Form of *Helicobacter pylori*. *Front Public Heal* [Internet]. 2015 May 28;3. Available from: http://www.frontiersin.org/Environmental_Health/10.3389/fpubh.2015.00147/abstract
 24. Mullis KB. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am* [Internet]. 1990 Apr;262(4):56–65. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientifi-camerican0490-56>
 25. Overbergh L, Vig S, Coun F, Mathieu C. Quantitative Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Diagnos-tics* [Internet]. Elsevier; 2017. p. 41–58. Available from: <https://link-inkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029718000043>
 26. Fierro FF. Electroforesis de ADN. *Herramientas Mol Apl en Ecol Asp teó-ricos y prácticos*. [Internet]. 2014;27. Available from: <https://micrositios.in-ecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/electroforesis.pdf>
 27. Rogers BB. The evolution of the poly-merase chain reaction to diagnose childhood infections. *Pediatr Dev Pathol*. [Internet]. 2015;18(6):495–503. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26701384>

ARTÍCULO ORIGINAL

DetECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* COMO PROSPECTIVA PARA SU IDENTIFICACIÓN A PARTIR DE CUERPOS DE AGUA

Adalucy Alvarez-Aldana¹, Fernando Rafael Siller-López¹, Valeria Ceballos Toro², María Del Mar Álvarez Quintero², Fabiana M Lora Suarez³, Maria Alejandra Calle², Valentina Giraldo².

Resumen. *Helicobacter pylori* es una bacteria microaerofílica gramnegativa que infecta el epitelio gástrico de más de la mitad de la población humana. Es considerado el agente causal de la gastritis crónica y un factor de riesgo importante en la etiología multifactorial de úlceras pépticas, carcinoma gástrico y linfoma MALT. Su vía de transmisión no es bien conocida pero la evidencia favorece una ruta fecal-oral, donde el agua juega un papel importante actuando como reservorio natural y fuente de infección. El propósito de esta investigación fue detectar el gen ureasa de *H. pylori* por métodos moleculares como prospectiva para su identificación en agua. Las metodologías utilizadas fueron PCR de punto final y PCR en tiempo real, utilizando ADN de la cepa de referencia NTCC 12908, a una concentración de 16 ng/μl y un ADN control de la cepa de referencia ATCC 26695 a una concentración de 18.000 copias/μl, a partir de las cuales se realizaron diluciones para determinar los límites de detección en número de copias y en nanogramos de ADN por μl. Los límites de detección fueron mejores para PCR en tiempo real que para PCR de punto final debido a que es poco sensible

y no amplifica valores tan pequeños. Por este motivo, se recomiendan la PCR en tiempo real como la técnica más adecuada, sensible y específica para determinar pequeñas concentraciones de ADN. Además, deben realizarse más ensayos que permitan mejorar la sensibilidad y discriminar ADN de células viables de las no viables.

Palabras Clave: *Helicobacter pylori*, PCR, agua, transmisión.

Abstract: *Helicobacter pylori* is a gram-negative microaerophilic bacterium that infects the gastric epithelium of more than half of the human population. It is considered the causal agent of chronic gastritis and an important risk factor in the multifactorial etiology of peptic ulcers, gastric carcinoma, and MALT lymphoma. Its transmission route is not well known, but the evidence favors a fecal-oral route, where water plays an important role, acting as a natural reservoir and source of infection. The purpose of this investigation was to detect the *H. pylori* urease gene by molecular methods as prospective for its identification in water. The method-

-
- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
 - 2 Exintegrante del semillero OBVIO MICROBIO. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Pereira.
 - 3 Docente. Grupo de investigación GEPAMOL. Universidad del Quindío.

ologies used were endpoint PCR and real-time PCR, using DNA from the reference strain NTCC 12908, at a concentration of 16 ng / μ l and a control DNA from the reference strain ATCC 26695 at a concentration of 18,000 copies / μ l; dilutions were made from them to determine detection limits in copy number and nanograms of DNA per μ l. The detection limits were better for real-time PCR than for endpoint PCR because it is not very sensitive and does not amplify such small values. For this reason, real-time PCR is recommended as the most appropriate, sensitive and specific technique to determine small concentrations of DNA. In addition, more assays should be performed to improve sensitivity and discriminate DNA from viable cells from non-viable ones.

Key words: *Helicobacter pylori*, PCR, water, transmission

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un bacilo móvil Gram negativo, microaerófilo, su morfología típica es en espiral de aproximadamente 3.5 x 0.5 μ m. Bioquímicamente se caracteriza por ser ureasa (1), oxidasa y catalasa positivo; se encuentra principalmente colonizando el estómago de aproximadamente la mitad de la población mundial y es el causante principal de la mayoría de los casos de gastritis, úlceras pépticas, cáncer gástrico y linfoma de células B (2). Se reconoce a *H. pylori* como la primera especie bacteriana causante de cáncer gástrico y está clasificado como un carcinógeno del grupo I por el Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) (3).

Esta bacteria presenta una distribución mundial cuya prevalencia varía de acuerdo con la distribución geográfica, etnia, raza, factores socioeconómicos, de higiene y saneamiento.

Sin embargo, las rutas de transmisión de *H. pylori* aún son poco conocidas, pero las vías más aceptadas y que se han podido comprobar son las vías oral-oral, gastro-oral y fecal-oral; aunque también se ha descrito que este microorganismo puede ser transmitido a través de alimentos, animales y agua (4).

Hace algunos años, pocas investigaciones implicaban el agua como vehículo de transmisión de *H. pylori*, aunque no tenían pruebas suficientes para demostrarlo; sin embargo, hoy en día hay suficiente evidencia de la presencia de esta bacteria en el agua a nivel mundial, por lo que se puede implicar al agua tratada y no tratada como posible vehículo de transmisión y ser uno de los factores causantes de infección a nivel mundial. (5).

En los últimos años se ha evidenciado un alto interés por parte de la comunidad científica en la identificación y análisis de *H. pylori* a través de muestras distintas a su hábitat gástrico normal, sin embargo, la elevada sensibilidad de *H. pylori* a las condiciones ambientales y de cultivo hacen difícil su recuperación a partir de muestras no gástricas, como es el caso del agua. Todo esto genera una gran incertidumbre en científicos e investigadores ya que el limitado conocimiento sobre el agua como ruta de transmisión de la bacteria y su dosis infectiva en esa matriz hacen que no pueda haber una difusión cierta de la información respecto a este tema, lo cual resulta determinante en el consiguiente desarrollo de la enfermedad, ya que si estos hallazgos no son transmitidos a la comunidad no se adoptarán medidas de precaución al respecto. Siendo así, es necesario la realización de más estudios al respecto.

La hipótesis de que el agua es una vía de transmisión de *H. pylori* está respaldada por dos tipos de estudios; los epidemiológicos

cos los cuales han demostrado que hay una mayor prevalencia de la infección en países en vía de desarrollo que padecen problemas relacionados con la distribución sanitaria del agua a la población y los estudios que han detectado o aislado *H. pylori* de diversas fuentes de agua (6, 7). Por este motivo, varios investigadores y estudios se han centrado en determinar el potencial del agua como fuente de transmisión de *H. pylori* y su capacidad de producir la infección clínica (8). Resultados basados en dichos estudios e investigaciones demuestran que aún no se conoce la cantidad real en que *H. pylori* esté presente en el agua; lo cual es preocupante teniendo en cuenta que suspendido en este medio adopta su forma viable no cultivable (VBNC). Motivo por el cual, el uso de técnicas moleculares es de vital importancia, permitiendo detectar la presencia del ADN de la bacteria sin importar su viabilidad y concentración. Por lo anterior, el objetivo de

esta investigación fue detectar *Helicobacter pylori* por métodos moleculares como prospectiva para su identificación a partir de cuerpos de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de los cebadores usados para la detección molecular de *H. pylori*: Para la detección molecular de *H. pylori* se utilizaron los cebadores ureA-F y ureA-R debido a que estos presentan una homología del 100 % con el gen ureA específico de *H. pylori*. Por tal motivo y mediante el Software GeneRunner versión 6.5.51., se buscó confirmar la especificidad de los cebadores para amplificar el gen ureA y verificar tanto el tamaño del amplicón a obtener como la homología señalada anteriormente. En la tabla 1 se describen los cebadores, sus secuencias respectivas y la fuente bibliográfica de los mismos.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección molecular de *H. pylori* mediante PCR.

Gen	Cebador	Secuencia	Artículo
ureA	ureA- F	5'- CGTGGCAAGCATGATCCAT -3'	Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kova'ch Z, et al. Novel Real-Time PCR Assay for Detection of <i>Helicobacter pylori</i> Infection and Simultaneous Clarithromycin Susceptibility Testing of Stool and Biopsy Specimens. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(10): 4512–4518.
	ureA-R	5'- GGGTATGCACGGTTAC- GAGTTT -3'	

Detección del gen ureA de *H. pylori* por PCR en tiempo real: La mezcla de reacción de 15 µl se preparó usando el ADN de la cepa de referencia NTCC 12908; así: Luna®

Universal Probe qPCR Master Mix (Biolabs. Inc, New England) 2X (7,5 µl); Cebador ureA-F 10 µM (0,375 µl); Cebador ureA-R 10 µM (0,375 µl); Sonda ureA-S 10 µM (0,3

μl); AND (1 μl) y se completó el volumen con agua. La reacción de amplificación se realizó con una desnaturalización preliminar a 95°C durante 15 min, seguida de 60 ciclos de amplificación a 95°C durante 5s con una temperatura transitoria de 20°C/s; la alineación se realizó de 60°C a 57°C durante 15 ciclos con una temperatura transitoria de 0,2°C y la extensión final ocurrió a 72°C durante 6s, con un solo paso de adquisición de fluorescencia al final de la extensión. Esto se realizó en un equipo Rotor-Gene Q de Qiagen. Los datos se analizaron utilizando el programa Rotor Gene Q Series Software.

Detección del gen ureA de *H. pylori* por PCR de punto final: La mezcla de reacción de 25 μl se preparó usando el ADN de la cepa de referencia NTCC 12908, así: PCR Buffer II (sin MgCl₂) (Applied Biosystems, Austin, TX) 10X (2,5 μl); dNTPs (BioLabs Inc, New England) 10 Mm (0, 5 μl); Cebador ureA-F 10 μM (0,63 μl); Cebador ureA-R 10 μM (0,63 μl); Solución de MgCl₂ (Applied Biosystems, Austin, TX) 25mM (2 μl); Taq Polimerasa (Thermo Fisher Scientific) 5U/μl (0,04 μl); ADN (1 μl) y se completó el volumen con agua. La reacción de amplificación se realizó con una desnaturalización preliminar a 95°C durante 4 min, seguida de 30 ciclos de amplificación a 95°C durante 30s, alineación a 55°C durante 30 s y elongación a 72° durante 30 s. Se realizó una extensión final a 70°C durante 7 min y una etapa extra de enfriamiento a 4°C durante 59 min. Esto se realizó en un Termociclador convencional Swift™ MiniPro, ESCO.

Luego se realizó separación electroforética de los productos amplificados a 100 voltios por 120 minutos, en un gel de agarosa al 3 % en buffer de corrido TAE 1X. El marcador de peso molecular usado fue Hyperladder™ 50 pb (Bioline). El gel fue teñido con SYBR

safe y las bandas se evidenciaron en transiluminador bajo luz ultravioleta.

Preparación de diluciones a partir de ADN de cepas de referencia: Se utilizó un ADN control: AMPLIRUN® *Helicobacter pylori* DNA CONTROL (Vircell, 14MBC049001) obtenido a partir de la cepa de referencia es la ATCC 26695, el cual tenía una concentración de 18.000 copias/μl. A partir del ADN control se realizaron diluciones 1:10 hasta alcanzar una concentración teórica de 1.8 copias/μl. Por otro lado, se utilizó ADN de la cepa de referencia NTCC 12908, el cual se encontraba a una concentración de 16 ng/μl. A partir de este ADN se realizaron diluciones hasta alcanzar una concentración teórica de 1 ng/μl.

Determinación de la concentración de las diluciones: Las diluciones realizadas a partir de las dos cepas de referencia (ATCC 26695 y NTCC 12908) fueron cuantificadas mediante dos metodologías: espectrofotometría y fluorometría.

Para la cuantificación mediante espectrofotometría, se utilizó un Espectrofotómetro Multiskan Go, usando la placa μDrop™ (Thermo Scientific™) y se analizó mediante Soft Skant Software 5.0 for microplate readers. El procedimiento consistió en colocar 2 μl de cada dilución por duplicado en la placa μDrop y un blanco, que podía ser TE 1X o agua; una vez depositadas todas las muestras, se introdujo la placa en el espectrofotómetro, el cual realizó la lectura y arrojó los datos obtenidos.

Para la cuantificación mediante fluorometría, se utilizó el Fluorómetro Qubit™ 4 Fluorometer de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Singapore, 739256). En este caso se inició preparando la solución de trabajo,

para la cual se diluyó 1:200 el reactivo Qubit™ dsDNA BR Reagent concentrado en DMSO (Life Technologies Corporation, Eugene, 97402) en el Buffer Qubit™ dsDNA BR Buffer (Life Technologies Corporation, Eugene, 97402). Igualmente se prepararon las dos soluciones estándar Qubit™ dsDNA BR Standard #1 (Life Technologies Corporation, Eugene, 97402) y Qubit™ dsDNA BR Standard #2, (Life Technologies Corporation, Eugene, 97402). Estas soluciones al igual que las muestras se prepararon a un volumen final de 200 µl, agregando, para el caso de los estándares 10 µl de cada uno y 190 µl de la solución de trabajo y para el caso de las muestras, 2 µl de cada una y 198 µl de la solución de trabajo. Luego cada tubo fue insertado de manera individual (primero los estándares), se tomó la lectura y se registraron los datos obtenidos.

Límite de detección de ADN de *H. pylori*:

El límite de detección se abordó por ambas metodologías moleculares (PCR en tiempo real y PCR de punto final); así mismo, se

abordó mediante dos estrategias, las cuales fueron el límite de detección de copias de ADN/µl y de nanogramos de ADN/µl de *H. pylori*. Para abordar estas dos estrategias se utilizaron las diluciones realizadas a partir de las dos cepas de referencia (ATCC 26695 y NTCC 12908).

Una vez confirmadas mediante cuantificación las concentraciones de las anteriores diluciones, se procedió a realizar las reacciones en cadena de la polimerasa, utilizando para ambas los cebadores ureA-F/ureA-R bajo las condiciones descritas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, para los dos métodos moleculares y para las dos unidades de medición utilizadas. Posterior a esto se utilizó la siguiente fórmula (9) mediante la cual fue posible obtener tanto el número de copias de ADN a partir de la cantidad de ADN en nanogramos, como la cantidad de nanogramos de ADN a partir del número de copias; esto último al despejar la fórmula como se muestra a continuación:

$$\text{Número de copias de ADN} = \frac{\text{cantidad de ADN (ng)} * 6.022 \times 10^{23}}{\text{longitud del ADN} * 1 \times 10^9 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} * 650 \text{ Daltons}}$$

Despeje de la fórmula de tal manera que el valor a obtener sea la cantidad de ADN en nanogramos, así:

$$\begin{aligned} &\text{Cantidad de ADN (ng)} \\ &= \frac{\text{Número de copias de ADN} * \text{longitud del ADN} * 1 \times 10^9 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} * 650 \text{ Daltons}}{6.022 \times 10^{23}} \end{aligned}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de los cebadores usados para la detección molecular de *H. pylori*: GeneRunner mostró un alineamiento específico

de los cebadores ureA-F/ureA-R con la secuencia del gen Ureasa (Figura 1) de *H. pylori*, así mismo arrojó el tamaño en pares de bases (pb) del amplicón, corroborando la longitud de 77pb.



Figura 1. Fragmento de la secuencia del gen ureA de *H. pylori* con la secuencia de los cebadores ureA-F/ureA-R resaltada. En la parte inferior derecha se muestra en un recuadro el tamaño del fragmento a amplificar. Fuente: GeneRunner.exe

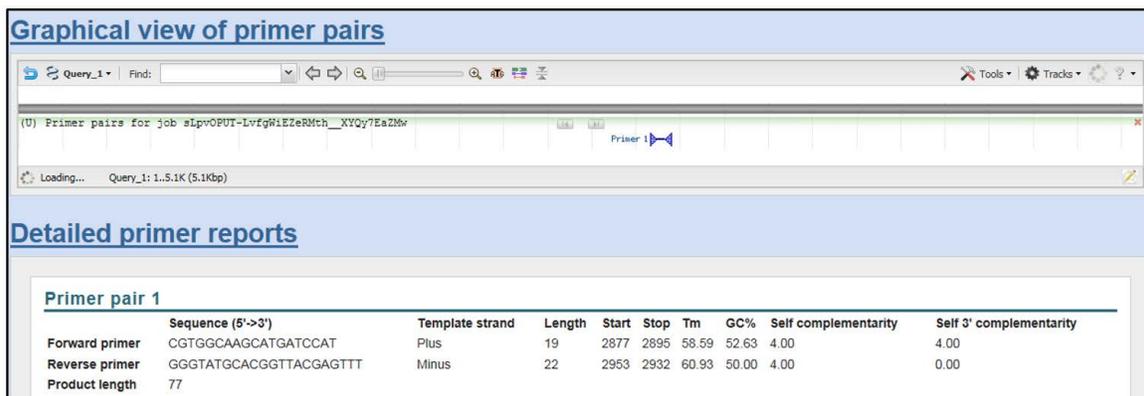


Figura 2. Características de los cebadores ureA-F/ureA-R específicos para el gen ureA de *H. pylori*. Fuente: GeneRunner.exe

Mediante el mismo software fue posible analizar los cebadores directamente en Primer-BLAST, donde estos hicieron BLAST con el genoma de la cepa de referencia 26695 de *H. pylori* presentado una homología del 100 % con el gen *ureA* específico de la misma. Igualmente se confirmó la información obtenida en GeneRunner como la longitud del amplicón y las posiciones de inicio y fin de cada uno de ellos; además arrojó información adicional como la temperatura de melting (T_m), el porcentaje Guanina/Citosina (GC %) y la complementariedad. En la Figura 1 se muestran en detalle los cebadores *ureA-F/ureA-R*.

La PCR es una herramienta de suma importancia utilizada en muchas investigaciones. Es necesario conocer la reacción y adecuar sus condiciones antes de hacer uso extensivo de ella; uno de los pasos fundamentales es contar con los cebadores o primers y con las características específicas de cada uno de ellos. Esto permitirá sortear exitosamente uno de los pasos primordiales para obtener la mejor calidad y cantidad del producto a amplificar. El diseño cuidadoso de cebadores es uno de los aspectos más importantes

para obtener los resultados esperados; cebadores mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de ADN distintos a los buscados (amplificación inespecífica). Por este motivo, el uso de GeneRunner, un programa de utilidad en genética molecular que permite introducir una secuencia de ADN, observar su cadena complementaria, encontrar una subsecuencia dentro de esa secuencia, ver las enzimas de restricción y más (10), fue de gran ayuda para verificar la homología, la especificidad en el alineamiento y la longitud del fragmento obtenido usando los primers *ureA-F/ureA-R* como se puede observar en la Figura 2.

Comparación de dos metodologías moleculares para la detección de *H. pylori*:

Al observar los resultados obtenidos para la PCR de punto final (figura 3) y PCR tiempo real (figura 4) se demostró que fue posible amplificar la cepa de referencia NTCC 12908 bajo estas dos metodologías. El resultado obtenido para PCR en tiempo real se evidenció igualmente mediante corrida electroforética para confirmar el tamaño del amplicón. Como se puede observar en la figura 5.

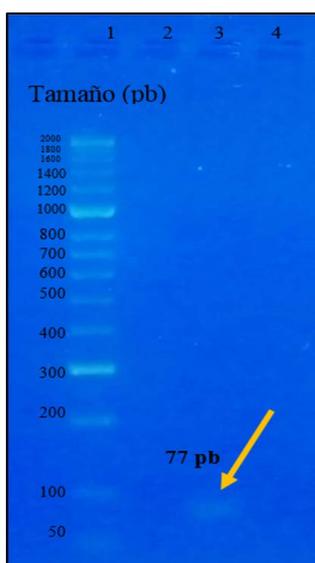


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 3 % y el producto amplificado por PCR de punto final de 77 pares de bases. El carril 1 representa el marcador de peso molecular de 50 pb (Hyperladder 50 pb), el carril 2 es el control del mix, el carril 3 es el producto de la PCR de punto final de la muestra 12908 y el carril 4 es el control negativo adicionando agua.

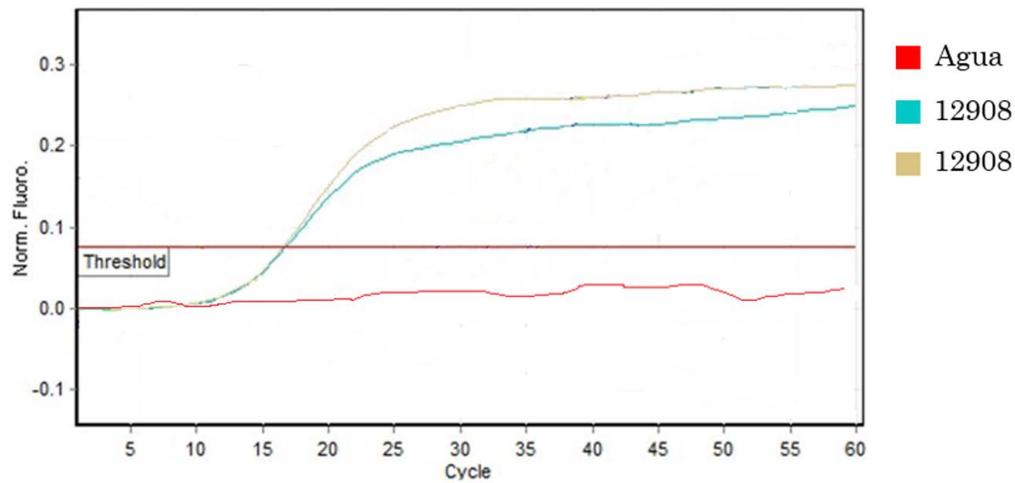


Figura 4. Resultado PCR en tiempo real para detección de cepa de referencia 12908 y el límite de detección en copias/ μ l. Fuente: Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49) Copyright 2013 QIAGEN GmbH

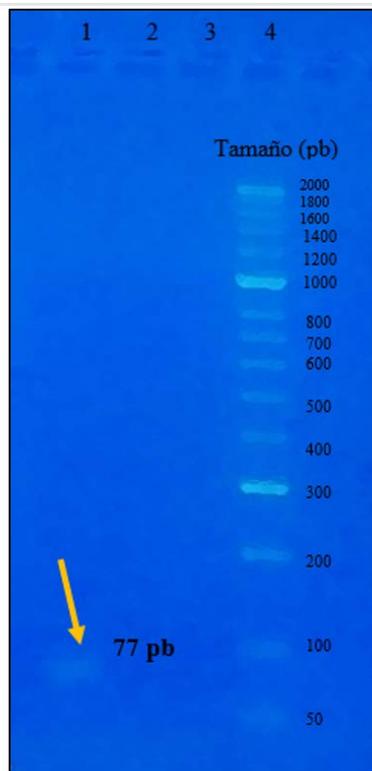


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 3 % y el producto amplificado por PCR en tiempo real de 77 pares de bases. El carril 1 representa el producto de la PCR en tiempo real de la muestra 12908, el carril 2 es el control del Mater Mix, el carril 3 es el control negativo adicionando agua y el carril 4 es el marcador de peso molecular de 50 pb (Hyperladder 50 pb).

El diagnóstico por PCR de *H. pylori* tiene una sensibilidad y especificidad de 95 % y su principal ventaja es que se puede detectar el microorganismo sin importar la

viabilidad de la bacteria en las muestras. La especificidad de esta técnica viene dada por el uso de oligonucleótidos sintéticos, específicos para determinado gen y que

facilitan la amplificación de una secuencia nucleotídica, que a su vez es específica para *H. pylori*; es por esta razón que en los últimos años se ha diseñado una variedad de pruebas diagnósticas para esta bacteria por medio de PCR, basándose en: oligonucleótidos provenientes de diferentes genes, entre ellos el gen de la ureasa A (*ureA*) (11).

Al utilizar los primers ureA-F y ureA-R para amplificar un fragmento específico del gen *ureA* se obtuvieron resultados óptimos como se puede ver en las figuras 4 y 5, ya que, si fue posible amplificar el ADN la cepa de referencia NTCC 12908 por las dos técnicas, confirmando que se trataba del amplicón de 77pb en el gel de agarosa al 3 %. Aunque los resultados fueron los esperados para las dos metodologías es importante realizar una comparación que permita identificar los pros y contra de cada técnica para elegir la más adecuada; la PCR de punto final mide el producto de PCR acumulado al final de los ciclos; sin embargo, esta no cuantifica, pero la comparación de la intensidad de la banda amplificada en un gel con los estándares de una concentración conocida puede proporcionarle resultados semicuantitativos. Por otro lado, la PCR en tiempo real mide el producto amplificado a medida que se produce; esta técnica cuantifica al recopilar los datos obtenidos durante la fase de crecimiento exponencial (log) cuando la cantidad del producto de la PCR es directamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico de la plantilla (12).

Entre las desventajas de la PCR de punto final se encuentran su baja precisión, baja sensibilidad, baja resolución, no es automatizada, solo discrimina basándose en el tamaño, los resultados no se expresan como números y se debe realizar un tratamiento post-PCR. Entre las ventajas de la PCR en tiempo real se encuentra un aumento en el rango de detección, no se necesita un procesamiento

posterior a la PCR, recopila datos en la fase de crecimiento exponencial, un aumento en la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de amplicones generados. Por lo anterior, la PCR de punto final es recomendada para amplificación de ADN en secuenciación, genotipado y clonación y la PCR en tiempo real se recomienda para cuantificación de la expresión génica, verificación de micromatrices, control de calidad y validación de ensayos, detección de patógenos, genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), variación del número de copias, análisis de microARN, cuantificación viral, experimentos de ARN de interferencia (12).

Diluciones obtenidas a partir de ADN de cepas de referencia: A partir de la cepa de ATCC 26695 que se encontraba a una concentración 18.000 copias/ μ l, se obtuvieron las siguientes diluciones: 1.800 copias/ μ l, 180 copias/ μ l, 18 copias/ μ l y 1.8 copias/ μ l.

Por otro lado, usando ADN de la cepa de referencia NTCC 12908, la cual se encontraba a una concentración de 16 ng/ μ l se obtuvieron las siguientes diluciones 16 ng/ μ l, 13 ng/ μ l, 10 ng/ μ l, 7 ng/ μ l, 4 ng/ μ l y 1 ng/ μ l.

Determinación de la concentración de las diluciones: La cuantificación del ADN usando el método de fluorimetría no permitió detectar la concentración de las copias/ μ l ya que el kit con el que se prepararon los estándares de detección permitía una cuantificación entre 2 y 1000 ng y las copias/ μ l se encontraban en un rango no detectable. Por el contrario, para el caso de las diluciones realizadas a partir del ADN de la cepa patrón 12908, se pudo medir la concentración y así compararla con la concentración teórica a la que se pretendía llegar en nanogramos/ μ l. Estos resultados se muestran en la tabla 6. Por otro lado, la cuantificación del ADN usando el método de espectrofotometría

arrojó unos resultados muy inconsistentes, ya que las muestras con mayor concentración de ADN arrojaban un resultado negativo e inferior a aquellas muestras de menor concentración.

Tabla 2. Concentración esperada de las diluciones realizadas a partir del ADN de la cepa de referencia 12908 frente a las concentraciones obtenidas mediante fluorómetro.

Concentración esperada	Concentración calculada
16 ng/μl	15.3 ng/μl
13 ng/μl	13.0 ng/μl
10 ng/μl	9.8 ng/μl
7 ng/μl	7.6 ng/μl
4 ng/μl	5.3 ng/μl
1 ng/μl	2.2 ng/μl

Existen diversos métodos para estimar la concentración de ácidos nucleicos en una preparación. Si la muestra es pura (no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol, agarosa o incluso otros ácidos nucleicos), su medición mediante espectrofotometría es la más adecuada. Por el contrario, si la cantidad de ADN o ARN es muy pequeña, o si la muestra contiene grandes cantidades de impurezas, la cuantificación puede llevar a cabo por la intensidad de fluorescencia. Debido a su rapidez, simplicidad y ausencia de daño, la cuantificación de ADN por espectrofotometría ha sido ampliamente utilizada. Sin embargo, esta técnica es poco sensible, y para la mayoría de los espectrofotómetros se requiere una concentración de ADN de al menos 1 μg/mL (13). El método de cuantificación por fluorometría se basa en tintes de base de fluorescencia que se unen específicamente al ADN, ARN o proteína y el método de cuantificación por espectrofotometría se basa en mediciones de absorbancia UV

(mide la absorbancia a 260 nm y la relación 260nm/280nm. Un aspecto importante es que la fluorometría mide con precisión tanto el ADN como el ARN de una misma muestra, en cambio la espectrofotometría no es capaz de distinguir una de la otra (14).

Las diferencias entre la técnica de fluorometría y espectrofotometría se basan en que el fluorómetro cuantifica con precisión el ADN en muestras con concentraciones tan bajas como 10 picogramos/μl; claro está que esto depende del equipo utilizado, ya que el utilizado en esta investigación media en un rango entre 2 y 1.000 ng/μl. Por el contrario, el espectrofotómetro no se recomienda para concentraciones por debajo de 2 nanogramos/μl, ya que cuando se miden concentraciones inferiores, presenta una alta variación en los resultados (14).

Límite de detección de copias de ADN por μl de *H. pylori* por PCR en tiempo real: El límite de detección de copias de ADN por μl de *H. pylori* obtenido mediante PCR en tiempo real fue de 11.3 copias/μl como se señala en la figura 6 y se describe en la tabla 3. Se esperaba que el límite de detección fuera de 18 copias/μl en base a las diluciones hechas; sin embargo, como ya se sabe que la PCR en tiempo real cuantifica, esta arrojó el valor real de la concentración mínima que se detectó el cual fue de 11.3 copia/μl como se mencionó anteriormente. En la tabla 3 se presenta el nombre de cada muestra y el color al que corresponde en la gráfica, el ciclo en el que empezó a emitir fluorescencia la concentración teórica y la concentración real o calculada por el equipo. En este límite de detección de copias de ADN por μl de *H. pylori* obtenido mediante PCR en tiempo real, el valor de Cp (ciclo del proceso de amplificación en el que se supera un umbral establecido de fluorescencia o valor “threshold”) (15) fue de 40.97 para la muestra correspondiente a la concentración de 11.3

copia/μl como se observa en la figura 6 señalado con una flecha. Este valor concuerda con los valor de Cp obtenidos en otro estu-

dio que detectó el gen ureA para *H. pylori*, los cuales variaron entre 40.0 y 44.4 (16).

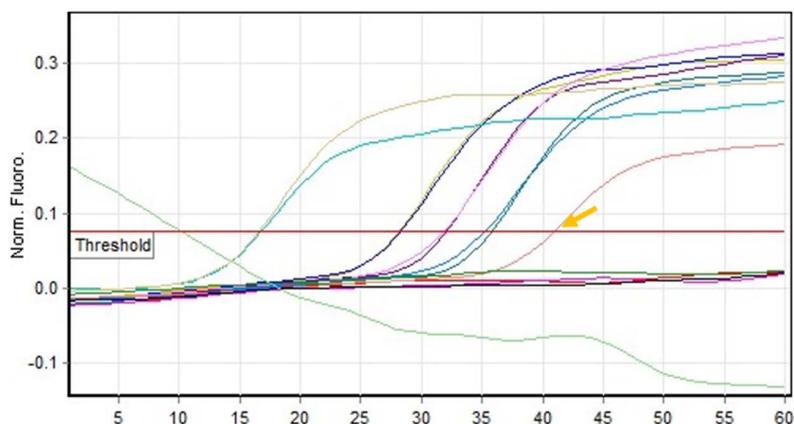


Figura 6. Resultado PCR en tiempo real para detección de cepa de referencia 12908 y el límite de detección en copias/μl. Los colores de las muestras se detallan en la tabla 6. Fuente: Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49) Copyright ©2013 QIAGEN GmbH

Tabla 3. Resultado cuantificación de la PCR en tiempo real para detectar el número límite de copias de ADN por μl de *H. pylori*. Fuente: Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49) Copyright ©2013 QIAGEN GmbH.

No.	Color	Nombre	Tipo	Cp	Concentración Teórica (copias/μl)	Concentración Real (copias/μl)
1	Red	H2O	NTC			
2	Yellow	18.000 cp/ul	Standard	28.19	18,000.0	16,149.7
3	Blue	18.000 cp/ul	Standard	28.30	18,000.0	15,122.4
4	Purple	1.800 cp/ul	Standard	32.07	1,800.0	1,780.3
5	Pink	1.800 cp/ul	Standard	31.85	1,800.0	2,017.4
6	Light Blue	180 cp/ul	Standard	35.26	180.0	290.5
7	Teal	180 cp/ul	Standard	35.81	180.0	211.9
8	Light Red	18 cp/ul	Standard	40.97	18.0	11.3
9	Green	18 cp/ul	Standard		18.0	
10	Magenta	1,8 cp/ul	Standard		1.8	
11	Black	1,8 cp/ul	Standard		1.8	
12	Cyan	12908	Unknown	16.79		10,495,006.3
13	Tan	12908	Unknown	16.60		11,679,004.3
14	Light Green	H2O	NTC	10.17		448,871,718.2

En los últimos años se han realizado estudios que determinan el límite de detección de *H. pylori* en agua bajo la concentración de UFC/ml, observándose en uno de los casos que los cebadores usados lograron detectar desde 3.0×10^3 UFC en un litro de agua (17) sin embargo, las UFC se limitan a unidades de mayor tamaño, lo cual puede ser perjudicial al momento de detectar la bacteria en agua, ya que esta puede encontrarse en concentraciones muy pequeñas, inferiores incluso a una célula, por lo cual la detección de la bacteria mediante copias de ADN amplía el rango de detección y así evita pasar por alto las concentraciones mínimas de la bacteria en agua, lo cual podría evitar problemas de salud pública a los que conlleva la infección por *H. pylori*.

Barrera et al., obtuvieron en su investigación que el límite de detección de la técnica de PCR en tiempo real para *Granulovirus* en muestras de larva, suelo y en un bioplaguicida fue de $1,25 \times 10^5$ copias del gen (125.000 copias del gen), lo que equivale a $6,4 \times 10^{-4}$ ng (0,00064 nanogramos) de ADN (18), siendo este un valor superior al límite de detección obtenido en el presente proyecto.

Por otro lado, en un estudio basado en la detección molecular de *Legionella* spp a partir de muestras ambientales mediante qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real), se obtuvo que el límite de detección fue de 25 copias por 10 μ l de la muestra, lo que equivale a 2,5 copias/ μ l (0,0000094 ng) (19), siendo este valor un poco más similar, pero sin embargo inferior al límite de detección que obtuvimos para *H. pylori* mediante la misma metodología.

Límite de detección de copias de ADN por μ l de *H. pylori* por PCR de punto final: La PCR de punto final no pudo detectar ninguna de las muestras estándar de copias por μ l debido a que esta técnica es poco sensible y no amplifica valores tan pequeños. Por este motivo, otros estudios han implementado y recomiendan la PCR en tiempo real como la técnica más adecuada, sensible y específica para determinar concentraciones dadas en cantidad de copias de ADN. Aunque se dice que la PCR de punto final o convencional presenta un límite de detección más alto de lo deseable, como se pudo comprobar en este estudio; el estudio realizado por Moreno y Agudelo, presentan unos resultados que divergen por completo, ya que mediante una PCR convencional simple obtuvieron un límite de detección para *Leptospira interrogans* de 0,012 ng, lo que equivale a 2.38×10^3 copias (2.380 copias de ADN) (20), siendo estos valores mucho menores a los que se obtuvieron mediante esta técnica.

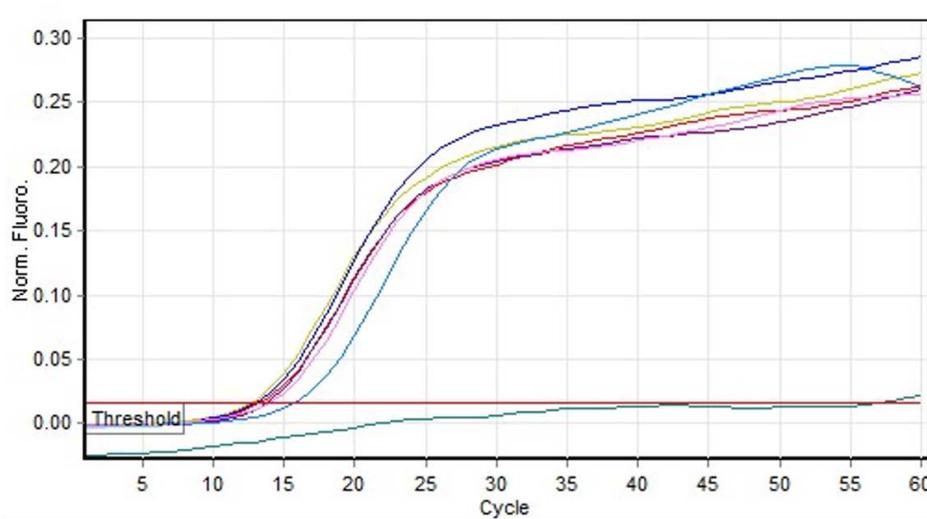


Figura 7. Resultado PCR en tiempo real para detectar el límite de nanogramos de ADN por μl de *H. pylori*. Los colores de las muestras se detallan en la tabla 8. Fuente: Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49) Copyright ©2013 QIAGEN GmbH.

Por otra parte, en la figura 7 es posible observar que todas las muestras correspondientes a las diluciones dadas en nanogramos de la cepa patrón 12908 fueron amplificadas por la PCR en tiempo real, razón por la cual no es posible establecer un límite de detección mínimo utilizando las diluciones que son descritas en la tabla 4. Al no poder establecer el límite de detección de nanogramos de ADN por μl de *H. pylori* usando las dilucio-

nes de ADN de la cepa de referencia se aplicó la fórmula descrita en la metodología utilizando los valores de las copias de la tabla 3 para obtener el CAPITUL equivalente en nanogramos de las 11,3 copias/ μl ya que este fue el valor mínimo detectable. Al realizar la conversión, se determinó que el límite de detección de nanogramos de ADN por μl de *H. pylori* obtenido mediante PCR en tiempo real fue de 0,000020 ng/ μl .

Tabla 4. Resultado cuantificación de la PCR en tiempo real para detectar el número límite de nanogramos de ADN por μl de *H. pylori*. Fuente: Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49) Copyright ©2013 QIAGEN GmbH.

No.	Color	Nombre	Tipo	Cp	Concentración Teórica (copias/ μl)	Concentración Real (copias/ μl)
1	Red	12908-16ng/ μl	Standard	13.35	16	9
2	Yellow	12908-13ng/ μl	Standard	12.71	13	18
3	Blue	12908-10ng/ μl	Standard	13.02	10	13
4	Purple	12908-7ng/ μl	Standard	13.76	7	6
5	Pink	12908-4ng/ μl	Standard	14.00	4	5
6	Light Blue	12908-1ng/ μl	Standard	15.74	1	1
7	Green	MMix	NTC	56.73		

Límite de detección de nanogramos de ADN por μl de *H. pylori* por PCR de punto final: Como se puede ver en la figura 8 el límite de detección de nanogramos de ADN por μl de *H. pylori* obtenido mediante PCR de punto final fue de 5 ng/ μl , debido a que fue la cantidad más baja de ADN que se logró amplificar mediante la mencionada metodología. Se esperaría que el límite de detección fuera de 4 ng/ μl en base a las diluciones hechas; sin embargo, cuando se realizó la PCR en tiempo real utilizando las dilu-

ciones en nanogramos/ μl , este arrojó el valor real de las concentraciones, obteniendo que la concentración mínima que se detectó fue de 5 ng/ μl (tabla 3). En esta figura también se evidencian los tamaños de los amplicones obtenidos mediante PCR en tiempo real (Figura 7) los cuales se encuentran ubicados al lado derecho después del marcador de peso molecular. Aunque para esta metodología no es necesario realiza corrido electroforético, se realizó para verificar el tamaño de los amplicones.

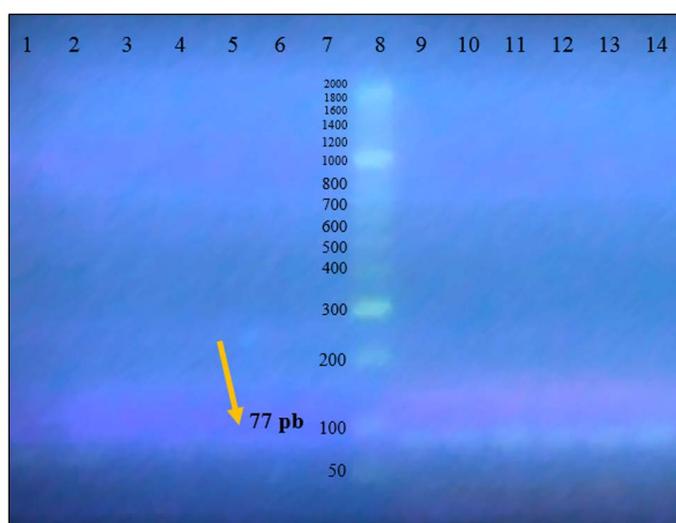


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 3 % y los productos amplificado por PCR de punto final y PCR en tiempo real de 77 pares de bases. Los carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 representan los productos de la PCR de punto final, los cuales equivalen a 16 ng/ μl , 13 ng/ μl , 10 ng/ μl , 7 ng/ μl , 4 ng/ μl y 1 ng/ μl respectivamente, el carril 7 es el control negativo adicionando agua y el carril 8 es el marcador de peso molecular de 50 pb (Hyperladder 50 pb). Los carriles 9, 10, 11, 12, 13 y 14 representan los productos de la PCR en tiempo real, los cuales equivalen a 16 ng/ μl , 13 ng/ μl , 10 ng/ μl , 7 ng/ μl , 4 ng/ μl y 1 ng/ μl respectivamente.

Se puede notar que en la figura 8 es difícil visualizar las bandas amplificadas; sin embargo, al momento de observar directamente el gel en el transiluminador, fue posible visualizar las 5 bandas, donde la última indicaba la mínima cantidad que se detectó y se señala con una flecha.

Este fenómeno de que las bandas de ADN no se ven nítidamente en el gel puede ser causado porque el ADN se ha degradado, porque la cantidad o la concentración de ADN en las muestras cargadas al gel eran insuficientes; porque las moléculas de ADN al ser de un tamaño pequeño se difundieron durante la tinción o debido a un gel de agarosa muy

grueso, por lo cual se recomienda evitar la contaminación con nucleasas, aumentar la cantidad de ADN, y preparar geles más delgados (21).

Por otra parte, la PCR de punto final no amplificó ninguna de las muestras estándar de copias por μl , por lo cual se calculó a través de la página scienceprimer.com, el equivalente en copias de los 5 nanogramos (concentración real), debido a que esa fue la cantidad mínima detectable mediante PCR de punto final como puede confirmarse a través de la electroforesis en la figura 6. Fue así como se determinó que el límite de detección de copias de DNA por μl de *H. pylori* obtenido mediante PCR de punto final fue de $2,7 \times 10^6$ lo que corresponde 2.700.000 copias/ μl .

Finalmente se puede decir que, aunque las técnicas de PCR en tiempo real y PCR de punto final tienen una alta sensibilidad (mayor en el caso de la PCR en tiempo real), presentan la desventaja de no poder discriminar entre células viables y no viables. Por este motivo y para lograr la detección de células viables mediante estas dos metodologías, se han desarrollado diferentes alternativas, como el uso del agente intercalante de ADN fluoróforo propano monoazida (PMA), el cual es un colorante fluoróforo de alta afinidad que se une preferentemente a dsDNA. Es impermeable a las membranas celulares intactas y, por lo tanto, penetra solo a través de las membranas dañadas de las células muertas para intercalarse en el ADN, evitando su amplificación (22). El uso de este agente intercalante le confiere un valor agregado a la técnica, en especial cuando se trata de detectar *H. pylori* en agua, debido a que, además de buscar detectar la presencia de la bacteria, lo ideal sería detectar la presencia de células viables, ya que al estar metabólicamente activas y con todos sus factores de

virulencia, son capaces de causar enfermedad en las personas que consuman el agua. Al poder confirmar la presencia de células viables en una cantidad tal que sea infecciosa para el humano, se podría confirmar definitivamente el agua como mecanismo de transmisión para *H. pylori*.

Conclusiones

- Se establecieron las condiciones de la PCR en tiempo real y de punto final para la detección del gen *ureA* utilizando los cebadores ureA-F y ureA-R de *Helicobacter pylori* y se comprobó su especificidad.
- Se logró determinar el límite de detección en nanogramos de ADN por μl de *H. pylori* para PCR en tiempo real y para PCR de punto final.
- Se logró determinar el límite de detección en copias de ADN por μl de *H. pylori* para PCR en tiempo real y para PCR de punto final.
- Se determinaron las diferencias entre cuantificación por método espectrofotométrico y fluorométrico.
- Se determinaron las diferencias entre PCR en tiempo real y PCR de punto final.

Investigaciones futuras

- En esta investigación se abordó una primera fase que consistió en la evaluación del método molecular de reacción en cadena de la polimerasa y el límite de detección; se propone una segunda fase mediante la cual se contamine agua con la bacteria bajo condiciones controladas de laboratorio y una tercera fase para investigar directamente en cuerpos de agua la detección de *H. pylori*.

- Probar nuevas condiciones para la PCR con el fin de optimizar el límite de detección para poder hallar concentraciones más pequeñas de la bacteria y ejecutar repeticiones de los hallazgos que garanticen la reproducibilidad de los hallazgos.
 - Estandarizar una metodología molecular que pueda ser utilizada por entidades públicas que suministren agua potable a la población para la detección de *H. pylori* con el fin de disminuir los casos de incidencia de la enfermedad que puedan ser adquiridos a través del agua.
4. Breckan RK, Paulssen EJ, Asfeldt AM, Kvamme JM, Straume B, Florholmen J. The All-Age Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection and Potential Transmission Routes. A Population-Based Study. *Helicobacter* [Internet]. 2016 Dec; 21(6):586-595. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27172105>
 5. Cuervo CM, Gaviria AM. Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua y biopelícula de los grifos de las instituciones educativas oficiales en la ciudad de Medellín. *Acta Med Colomb* [Internet]. 2017 June; 42(2):121-128. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v42n2/0120-2448-amc-42-02-00121.pdf>

Referencias bibliográficas

1. Matsumoto H, Shiotani A, Nishibayashi H, Kamada T, Kimura T, Fujimura Y, et al. Molecular Detection of *H. pylori* Using Adherent Gastric Mucous to Biopsy Forceps. *Helicobacter* [Internet]. 2016 Dec; 21(6):548-553. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27061611>
2. Chamanrokh P, Shahhosseiny MH, Assadi MM, Nejadstarrati T, Esmaili D. Three Tests Used to Identify Non-Culturable Form of *Helicobacter pylori* in Water Sample. *Jundishapur J Microbiol* [Internet]. 2015 April; 8(4):e16811. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4449853/>
3. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014 Sep; 20(36):12781-12808. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4177463/>
6. Ranjbar R, Khamesipour F, Jonaidi-Jafari N, Rahimi E. *Helicobacter pylori* isolated from Iranian drinking water: *vacA*, *cagA*, *iceA*, *oipA* and *babA2* genotype status and antimicrobial resistance properties. *FEBS Open Bio* [Internet]. 2016 Apr; 6(5):433-41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27419049>
7. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J Adv Res* [Internet]. 2015 Jul; 6(4):539-547. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000970>
8. Santiago P, Moreno Y, Ferrús MA. Identification of Viable *Helicobacter pylori* in Drinking Water Supplies by Cultural and Molecular Techniques. *Helicobacter* [Internet]. 2015 Aug; 20(4):252-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25655472>
9. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Trouble-

- shooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp* [Internet]. 2012 May 22;(63). Available from: <http://www.jove.com/video/3998/>
10. Jimenez Escrig A. Manual de neurogenética. Ediciones Díaz de Santos. [Internet]. 2003. Available from: <https://es.scribd.com/document/312077394/A-Jimenez-Scrig-Manual-de-Neurogenetica>
 11. Premoli G, González A, Millán-Mendoza B, Percoco T, Vielma A. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Med Trop*. [Internet]. 2004;56(2):85–90. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602004000200001&lng=es
 12. Scientific T. Real-Time vs. Digital PCR vs. Traditional PCR [Internet]. Available from: <https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>
 13. Guevara P, Morillo RC, Clark R, Guariglia V, Moronta F, Rizzolo K. Manual de Laboratorio. Venezuela: Universidad Central de Venezuela. [Internet]. 2009. Available from: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/geneticamolecular/archivos/Manual%20Lab%20Fund%20Gen%20Mol%20Vers%2020%20mayo%202009.pdf>
 14. Whittaker J. Nanodrop vs Qubit? Personalized genes. [Internet]. 2015. Available from: <http://www.personalizedgenes.com/nanodrop-or-qubit/>
 15. Cuenca VC. La técnica de PCR: ¿en qué fase de desarrollo técnico se encuentra? *Rev salud Ambient*. [Internet]. 2006;6(1–2):85–8. Available from: <http://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/viewFile/301/260>
 16. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovách Z, et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004 Oct;42(10):4512–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472302>
 17. Valverde Osorio CA. Estandarización de un método de detección molecular de *Helicobacter pylori* a partir de agua. [Tesis de pregrado]. Universidad del Quindío; 2010.
 18. Barrera G, Murcia J, Cerón J, Cuartas P, Guzmán C, Villamizar L. Real Time PCR: a useful methodology for detection and quantitation of granulovirus. *Rev Colomb Biotecnol*. [Internet]. 2016;18(2):24–31. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v18n2/v18n2a04.pdf>
 19. Ferrando Monllor N. Desarrollo y validación de un nuevo sistema de detección molecular basado en qPCR de *Legionella* spp. en muestras ambientales. [Tesis de maestría]. Instituto Universitario del Agua y de las Ciencias Ambientales [Internet]. 2013. Available from: <https://iuaca.ua.es/es/master-agua/documentos/-gestadm/trabajos-fin-de-master/tfm-2013-nuria-ferrando.pdf>
 20. Moreno N, Agudelo-Flórez P. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. [Inter-

- ternet]. 2010; 27:548–56. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v27n4/a09v27n4.pdf>
21. Yábar C. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Minist Salud, Inst Nac Salud Perú Norma técnica. [Internet]. 2008; 38:59–60. Available from: [http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual %20Electroforesis %2038.pdf](http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf)
22. Moreno Y, Ferrús MA. Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter* [Internet]. 2012 Oct;17(5):327–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22967115>

CAPITULO VIII

Caracterización epidemiológica y microbiológica de las bacteriemias y su perfil de resistencia durante el periodo junio 2011 a junio 2015

Olga Maria Henao Trujillo¹, Erica Vanessa Henao Franco², Felipe Antonio Gallego López³
Luisa Fernanda Duque Quintero⁴, Maria Eugenia Posada Trujillo⁵

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS), anteriormente llamadas nosocomiales o intrahospitalarias, son aquellas infecciones que el paciente adquiere mientras recibe tratamiento para alguna condición médica o quirúrgica y en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del ingreso a la institución, se asocian con varias causas, incluyendo pero no limitándose al uso de dispositivos médicos, complicaciones postquirúrgicas, transmisión entre pacientes y trabajadores de la salud o como resultado de un consumo frecuente de antibióticos (1). Entre los agentes infecciosos causantes de estas se incluye bacterias, hongos y virus.

Las IAAS son consideradas actualmente un problema en salud pública y a la vez un evento adverso, como se evidencio en el estudio IBEAS en el cual las IAAS representaban el 35,99 % de los eventos adversos, producto

de una atención en salud que de manera no intencional produce algún daño al paciente, pudiéndose catalogar como prevenible o no prevenible (2)(3). El riesgo de adquirir IAAS es universal y trasciende a todos los establecimientos de salud de todo el mundo. Según un informe realizado a nivel mundial la prevalencia de pacientes hospitalizados que adquieren al menos una IAAS es: en países desarrollados: 3,5 % - 12 %, mientras que en los países en vía de desarrollo: 5,7 % - 19,1 %. Claramente se puede evidenciar que en los países subdesarrollados la tasa de adquirir infecciones asociadas a la atención en salud es mayor y de ahí a que actualmente se considere un problema en salud pública que pone de manifiesta la necesidad de actuar en pro de esta problemática. En las investigaciones sobre prevalencia diaria llevadas a cabo recientemente en hospitales individuales en Albania, Marruecos, Túnez y la República Unida de Tanzania, los índices de prevalencia de IAAS oscilaron entre 19,1 % y 14,8 % (5)(6).

-
- 1 Docente investigador. Programa de Microbiología. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigación MICROBIOTECH. Universidad Libre Pereira. Integrante Grupo de investigación GRIENI – UTP.
 - 2 Enfermera asistencial. Unidad de Cuidados intensivos. Hospital Universitario San Jorge. Grupo de investigación GRIENI. Universidad Católica de Manizales
 - 3 Matemático, magister en matemática aplicada. Profesor Auxiliar de la Universidad Nacional. Profesor Asociado de la Universidad de Caldas.
 - 4 Bacterióloga. Oncólogos de Occidente Manizales.
 - 5 Enfermera. Especialista en Epidemiología. Lider en Vigilancia epidemiológica. Clinica la Presentación Manizales.



Gráfico 1: prevalencia de Infecciones Asociadas a la atención en salud a nivel internacional.

fuelle: http://www.med.unlp.edu.ar/archivos/noticias/guia_lavado_de_manos.pdf

En cuanto a las tasas de mortalidad asociada a IAAS podemos encontrar que en Estados Unidos de América (USA) las IAAS son consideradas una de las principales causas de **muerte dando lugar a 99.000 muertes al año, en Europa da lugar a 110.000 muertes al año. Y en cuanto a Colombia encontramos que, en la Ciudad de Bogotá, la tasa de Mortalidad tiene un promedio de 6.4 % por cada 13.668 casos de infecciones asociadas en la atención en salud**, esta tasa fue tomada de esta ciudad por ser uno de los pioneros en vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud (7) (8)(9).

Por otra parte las infecciones asociadas a la atención en salud representan un gran impacto a nivel económico para las instituciones hospitalarias, ya que el hecho de que un paciente presente estas implica: aumento en la estancia hospitalaria, medicamentos, insumos, discapacidad a largo plazo, mayor resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos entre otras, que se ven reflejados directamente en la parte económica, de ahí a que a través de búsqueda de índices de costos

encontramos que a nivel internacional hacia el año 2007 los costos anuales de las IAAS en USA fueron entre \$35.7 y \$45 millones de dólares (10) mientras que en un estudio realizado a nivel de Latino América entre el año 2005-2006 los costos anuales de UCI en 8 hospitales por concepto de día cama atribuible a IAAS fue de : \$ 123.3751 y \$ 1.741.872 en Argentina \$ 40.500, \$ 51.678 y \$ 147.600 en Ecuador \$ 1.090.255 en Guatemala \$ 443.300 en Paraguay \$ 607.200 en Uruguay (11). Además de afectar a la institución también lo hace en el factor económico de las familias que afecta a su parte emocional y a su estrés por este tipo de situaciones (12).

Al mismo tiempo que esta problemática de forma directa afecta a los índices de calidad entre los que se encuentran: Tasa de incidencia de infección del tracto urinario asociada a catéter (ISTU-AC), Tasa de incidencia de infección del torrente sanguíneo asociada a catéter (ITS- AC), Tasa de reingreso de pacientes hospitalizados en menos de 15 días, Tasa de mortalidad, Proporción de satisfacción global de los usuarios en la IPS y Pro-

porción de usuarios que recomendaría su IPS a familiares y amigos. Cuando estos se ven afectados la calidad de la atención de la institución se ve disminuida en su conjunto (13).

El riesgo de adquirir IAAS depende de tres factores que se relacionan entre sí como son el agente infeccioso (virulencia, capacidad para sobrevivir en el medio ambiente, resistencia antimicrobiana), el huésped (edad avanzada, comorbilidades, estado inmunosupresión, desnutrición) y el medio ambiente (ingreso a una UTI, hospitalización prolongada, procedimientos y dispositivos invasivos, terapia antimicrobiana) (12). Y es precisamente en esta cadena en la que interviene el profesional de la salud cuando realiza procedimientos al paciente y no tiene una adecuada técnica del lavado de manos. Numerosos estudios han documentado que los Profesionales de la Salud pueden contaminar las manos o los guantes con patógenos tales como bacilos Gram-negativo, *Staphylococcus aureus*, enterococos que se encuentran en el ambiente que los rodea y que fácilmente pueden ser transmitidos mediante “procedimientos limpios” o al tocar áreas intactas de la piel de los pacientes hospitalizados, dando lugar a la translocación de microorganismos y por ende a la producir una infección en los pacientes (14).

El lavado de manos es la principal medida cuya eficacia para prevenir la IAAS y prevenir la resistencia antimicrobiana ha sido confirmada. Sin embargo, se ha demostrado que el personal de la Salud tiene dificultades para cumplir con las indicaciones sobre la higiene de manos a diferentes niveles. Tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo se tienen índices de cumplimiento insuficientes o muy bajos, cuya base media oscilan entre 5 % y 89 % y un promedio total

de 38,7 % (15). El desempeño relacionado con la higiene de manos varía según la intensidad del trabajo y otros factores varios; en estudios de observación llevados a cabo en hospitales, los trabajadores de la salud se lavaron las manos entre 5 y 42 veces promedio por turno y 1,7-15,2 veces por hora. Además, la duración de los episodios de limpieza de manos osciló entre un promedio de 6,6 segundos como mínimo y 30 segundos como máximo (16). Los factores principales que pueden determinar una higiene de manos deficiente incluyen factores de riesgo por el incumplimiento observado en estudios epidemiológicos, así como también los motivos brindados por los propios trabajadores de la salud por el incumplimiento de las recomendaciones sobre higiene de manos.

Este problema evidenciado a nivel mundial, se ve incrementado por la ‘resistencia a los antibióticos’, que es aquella que se desarrolla en las bacterias, comunes causantes de infecciones, hacia los antibióticos; y la ‘resistencia a los antimicrobianos’ que se caracteriza porque es más amplio y comprende la resistencia a los fármacos utilizados para tratar infecciones causadas por otros microorganismos, estos pueden ser resistentes a la mayoría de los antimicrobianos y se conocen como multiresistentes; siendo este un fenómeno preocupante ya que pueden generar infecciones que aumenten las tasas de mortalidad y morbilidad, así como secuelas y aumento en los costos del tratamiento al igual que el incremento de estancia hospitalaria (17).

La Organización mundial de la Salud en marzo del 2011 publicó que las principales causas de las resistencias se ven facilitadas por el uso inadecuado de los medicamentos (toman dosis insuficientes no finalización de los tratamientos prescritos), fármacos de

mala calidad, prescripciones erróneas, deficiencias de la prevención y el control de las infecciones, así como la vigilancia y la reducción de exámenes diagnósticos, terapéuticos y preventivos en el control de la fármaco resistencia (18).

Es por lo anteriormente mencionado que frente a esta situación queremos abordar el tema de las IAAS especialmente el de las bacteriemias, debido a las implicaciones que estas traen consigo en cuanto a la mortalidad y morbilidad, costos y secuelas en los pacientes, entre otras. Ya que en la institución en la que se va a desarrollar la investigación ha sido pionera en cuanto al control de infecciones por medio de la consolidación de un equipo operativo interdisciplinario altamente entrenado para la vigilancia, prevención y manejo de este evento. Así mismo con el desarrollo de estrategias de fomento de la cultura de la seguridad, como lo son las rondas de seguridad por parte de la epidemióloga y la experta en enfermedades infecciosas, los cronogramas de capacitación a los trabajadores de salud incluyendo los médicos especialistas, entre otras. Ya que este estudio permitirá conocer como ha sido el patrón de ocurrencia de los microorganismos más prevalentes de la clínica, permitiendo de esta forma tener bases científicas para llevar a cabo planes de acción en pro del mejoramiento y fortalecimiento de la seguridad del paciente.

Por otra parte, la motivación científica de los estudiantes a realizar esta investigación es aportar a la institución información sustentada en bases científicas que permitan crear planes de acción en casos de ser necesarios e impulsar la constancia y continuación de las actividades en pro de la reducción de las tasas de infecciones a nivel hospitalario. Además, es un estudio que tiene la finalidad

de publicar un artículo cuyo fin es aportar información que ayude a complementar ese vacío que hay en cuanto a la investigación de IAAS en Caldas.

Es por lo previamente expuesto que a través de esta investigación se podrá resolver la siguiente pregunta:

¿Cómo es la caracterización epidemiológica y microbiológica de las bacteriemias y el perfil de resistencia desde junio de 2011 hasta junio del 2015 en una institución de mediana complejidad de atención en salud en la ciudad de Manizales?

JUSTIFICACIÓN

Alcanzar el propósito de establecer una atención segura, va más allá del establecimiento y conocimiento de las normas y los diferentes saberes de la profesión, pues estas son solamente el marco de referencia. Es necesario el compromiso y la cooperación de los diferentes integrantes del grupo de trabajo para sensibilizar, promover, concertar, y coordinar acciones que realmente alcancen logros efectivos.

Actualmente en Colombia se impulsa una Política de Seguridad del Paciente, liderada por el Sistema Obligatorio de Garantía de Calidad de la Atención en Salud, del Ministerio de Protección Social, cuyo objetivo es prevenir la ocurrencia de situaciones que afecten la seguridad del paciente, reducir y de ser posible eliminar la ocurrencia de eventos adversos para contar con instituciones seguras y competitivas internacionalmente (19).

Para poder llevar a cabo estas acciones el Ministerio brinda una serie de herramientas a

través de paquetes instruccionales, que ayudan a los profesionales de la salud, a detectar las fallas más comunes, que dan lugar a la producción de eventos y las pautas para intervenirlas. Frente a estas herramientas ofrecidas por el Ministerio de Protección Social es necesario que el personal de salud vaya más allá y no se limite solo a las ayudas que son ofrecidas, sino que se preocupe por que las cosas sean demostradas con evidencias científicas y con datos reales, que permitan conocer las causas y las características reales que están originando un problema.

En primer lugar, es una investigación que se va a realizar partiendo de una metodología validada mediante los criterios establecidos por el CDC de Atlanta para las bacteriemias, con estos se realizará una búsqueda activa en las respectivas historias clínicas de los pacientes que permitirá el análisis caso a caso. En segundo lugar, se analizará los perfiles de resistencia de los microorganismos utilizando WHONET 5.6, el cual es un programa utilizado a nivel internacional para el reporte de datos con fines científicos, que nos servirá para extraer el perfil de resistencia. En tercer lugar, se permitirá realizar una caracterización epidemiológica a través de las diferentes variables a estudiar, por lo tanto, esta investigación se realizará a través de criterios y programas validados que permitirán obtener datos confiables.

Al realizar esta investigación se consolidará la información existente sobre bacteriemias y resistencia microbiológica, fortaleciendo bases para que el comité de infecciones tome medidas para la disminución de los factores de riesgo y la realización de planes de acción, en caso de ser necesarios. Aportará información sobre microorganismo más prevalentes y sus perfiles de resistencia, favoreciendo la toma de decisiones en caso

de que se requieran tratamientos empíricos; además ayudará a disminuir los costos por las prolongaciones de las estancias hospitalarias y lo que ello implica, como se demostró en un estudio realizado en el año 2009 los beneficios económicos de prevenir las IAAS fueron: si se prevenían el 20 % de IAAS se ahorrarían de 5.7 a 6.8 billones en las IPS y si se prevenían el 70 % de IAAS los costos ahorrados serían de 25 a 31.5 billones (11). Así mismo se reducirán los daños y secuelas de los pacientes que cursan por una bacteriemia y por tanto los índices de calidad estarán en óptimos niveles y permitirán que la institución llegue a la acreditación de alta calidad. También aportará a la generación de conocimiento científico, ya que sería uno de los primeros estudios sobre bacteriemias realizados en Caldas.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Describir las características epidemiológicas y microbiológicas de los microorganismos identificados en casos de bacteriemia, presentados en una clínica de la ciudad de Manizales, en el periodo de junio 2011 a junio 2015.

Objetivos específicos.

- Identificar las características sociodemográficas en los pacientes con episodios de bacteriemia.
- Establecer el patrón de ocurrencia de los microorganismos patógenos.
- Analizar el perfil de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos.

ANTECEDENTES

Las infecciones han sido tema de interés a lo largo de la historia, especialmente toman importancia a partir del en el siglo XIX, en el que las guerras eran el pan de cada día para la población, y es precisamente este hecho histórico que hace que en aquel contexto a través de una mujer llamada Florence Nightingale, enfermera, que se dedicaba a curar a los soldados que llegaban de la guerra, se descubre de cierta manera las causas de las infecciones, pues a través de ella se dan cuenta que los soldados morirán no por las heridas ocasionadas por los enfrentamientos, sino por las condiciones en que eran atendidos, pues estaban rodeados de ambientes insalubres que ofrecían condiciones no idóneas para las curaciones de sus heridas, las cuales resultaban infectadas y posteriormente se diseminaban al resto de su organismo, vía sanguínea, produciendo una enfermedad a nivel general (sepsis), a este tipo de afección las conocemos hoy como “Bacteriemias”, que desencadenaba en la muerte de los pacientes.

Es a partir de este momento hasta nuestros días que los diferentes organismos en salud han hecho especial énfasis en investigaciones acerca de los microorganismos que agravan las condiciones de los pacientes y como está siendo el comportamiento de estos en nuestro medio, pues a pesar de los múltiples avances científicos y tecnológico no hemos sido capaces de abordar este tipo de eventos adversos en los pacientes, que día a día aumentan las tasas de mortalidad y morbilidad.

En Colombia el sistema de vigilancia se implementó desde el 2012 mediante la circular 045 de 2012 del Ministerio de Salud y Protección Social se dio inicio la vigilancia de las IAAS en el país priorizando la mo-

nitorización de las infecciones asociadas a dispositivos (20). Medellín fue una de las primeras ciudades donde se elaboraron estos estudios, para el 2011 el grupo GERMEN y la Secretaria de Salud de Medellín realizó el seguimiento a las entidades hospitalarias encontrándose que todas contaban con comité de infecciones, conocían de las definiciones de IAAS, poseían protocolos de higiene de manos, ejercían precauciones de aislamiento y el 62,5 % tenían protocolo para el estudio de brotes. En el Distrito de Bogotá el subsistema de vigilancia epidemiológica monitoriza las IAAS desde el año 1998, se reporta para el periodo 2012-2013 que hay un aumento de los casos predominando las infecciones del sitio quirúrgico, seguida de la ISTU asociada y no asociada al catéter. También se resalta que para el 2013 las principales infecciones asociadas a dispositivos fueron la infección sintomática del tracto urinario asociada a catéter con 16,1 % la infección del torrente sanguíneo asociada al catéter con un 13,7 % y la neumonía asociada a ventilador con un 3,3 %, con unas tasas que están para infecciones del torrente sanguíneo asociada a catéter en 5,1 casos por 1000 días dispositivo, infecciones urinarias asociadas a catéter con 3,9 casos por 1000 días dispositivo y por último la neumonía asociada a ventilador en 3,6 casos por 1000 días dispositivo (21).

Es por lo anteriormente dicho que como personal de la salud seguimos en la búsqueda constante de las causas de las infecciones, sobre todo las asociadas al cuidado de la salud (IAAS), que nos permitan tomar medidas y llevar a cabo planes de acción, de ahí a que se hiciera una búsqueda bibliográfica acerca de investigaciones que se hayan hecho referente a bacteriemias desde el año 2006 hasta el año 2016, que nos permita conocer más acerca de ellas y por otra parte conocer el

comportamiento que están teniendo los microorganismos en la actualidad

Entre los diferentes estudios e investigaciones realizadas acerca de este tema encontramos:

Ministerio de sanidad y política social (España). Estudio IBEAS Prevalencia de efectos adversos en hospitales de Latinoamérica es el primer estudio realizado América del Sur que tuvo como uno de sus objetivos mejorar el conocimiento en relación con la seguridad del paciente, por medio de la aproximación a la magnitud, trascendencia e impacto de los Efectos Adversos (EA) y al análisis de las características de los pacientes y de la asistencia que se asocian a la aparición de EA evitables. Tras la realización de este se evidenció que los eventos adversos detectados estaban relacionados con los cuidados en un 13,27 %, con el uso de la medicación en un 8,23 %, con la infección nosocomial en un 37,14 %, con algún procedimiento en un 28,69 % y con el diagnóstico en un 6,15 %. Así como que los 5 eventos adversos más frecuentes fueron las neumonías nosocomiales (9,4 %), las infecciones de herida quirúrgica (8,2 %), úlceras por presión (7,2 %), otras complicaciones relacionadas con intervención quirúrgica o procedimiento (6,4 %) y sepsis o bacteriemia (5 %), acumulando un total del 36,2 % de los EA identificados. Como una de las conclusiones se obtuvo la necesidad de establecer estrategias dirigidas a la minimización de la infección nosocomial, que constituye el conjunto de EA más prevalente identificado en el estudio (22).

Hernández J., García E., Hernández A., Canteras M., J Herrero., Cascales E., et al realizaron un estudio observacional retrospectivo denominado Bacteriemias en un hospital de segundo nivel: Estudio epidemiológico, análisis de factores pronósticos asociados a

mortalidad y estimación de su coste económico, Murcia, España, 2013 cuyo objetivo fue analizar una cohorte de pacientes con bacteriemia ingresados en un hospital de segundo nivel: determinar las características epidemiológicas y los factores asociados a mortalidad y estimar su coste, en el que se concluyó que la gravedad de la enfermedad de base, el tratamiento antibiótico empírico inadecuado y la necesidad de hemodiálisis durante el proceso clínico son los principales factores pronósticos de mortalidad en nuestra cohorte de pacientes con bacteriemia (23).

Lizaso D., Aguilera K., Correa M, Yantorno M. L., Cuitiño M, Pérez L., et al realizaron una investigación descriptiva, prospectiva y longitudinal llamada Epidemiología y factores de riesgo de mortalidad de las bacteriemias intrahospitalarias por bacilos gramnegativos, La Plata, Argentina, 2008, que tuvo como objetivo describir la epidemiología del hospital, identificar los factores predictores de mortalidad y analizar la relación entre un aumento de esta letalidad y una terapia antimicrobiana empírica inadecuada en pacientes hospitalizados con bacteriemia por BGN, se pudo concluir que la elevada mortalidad de los pacientes internados con bacteriemias por BGN se asoció con foco de alta mortalidad e internación en UCI (24).

Molina F.J., Díaz C.A., Barrera L., De La Rosa G., Dennise R., Dueñas C., Granados G. M., et llevaron a cabo un subestudio de una cohorte prospectiva recolectada en 10 hospitales el cual denominaron Perfil microbiológico de la Infecciones en Unidades de Cuidados Intensivos de Colombia (EPISEPSIS Colombia), Colombia, 2011, siendo el objetivo de este determinar la prevalencia de los microorganismos en las principales infecciones tratadas en las unidades de cui-

datos intensivos (UCI) del país; en el que se concluyó que la neumonía fue la infección más frecuente independientemente del sitio de adquisición. *E. coli* fue el patógeno más prevalente, excepto en las infecciones pulmonares adquiridas en UCI, donde lo fue *S. aureus* (25).

Londoño JR, Macías ICO, Ochoa FLJ, realizaron una investigación en la ciudad de Medellín que tiene por título Factores de riesgo asociados a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014, este estudio de tipo retrospectivo tuvo por objetivo establecer los factores de riesgo clínicos relacionados con infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) por bacterias multirresistentes (GMR) y pudo concluir que los factores de riesgo encontrados son similares a los de la literatura internacional, excepto la edad, también que permitió identificar los factores de riesgo para las principales IAAS en general y no discriminadas por tipo de infección o germen (26).

Martínez E. B, Hernández C, Pallaresa C, Pacheco R, Hurtado K, Recaldee M. realizaron un estudio descriptivo en la ciudad de Cali que denominaron “Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali – Colombia” (27), el objetivo fue presentar el comportamiento de la microbiología y perfiles de resistencia a los antimicrobianos, de las principales bacterias gram-negativas y gram-positivas de interés intrahospitalario, de este se pudo concluir que existen altas prevalencias de resistencia a los antimicrobianos en la región; se requiere fortalecer estrategias de vigilancia, prevención y control de la resistencia bacteriana en ambientes hospitalarios y de la comunidad.

En Manizales no se han realizado estudios específicos que describan los hallazgos en bacteriemias. Existe un antecedente en el cual participó una institución de salud de la ciudad en un estudio multicéntrico internacional donde se encontró que la tasa de bacteriemia asociada a catéter fue 4,8 por 1000 días de catéter central (28).

En la clínica de mediana complejidad en la que se realiza la presente investigación es una institución de salud que ha realizado avances en su política de seguridad del paciente y, sobre todo la relacionada con la prevención y el control de infecciones por medio de la consolidación de un equipo operativo interdisciplinario altamente entrenado para la vigilancia, prevención y manejo de este evento. Así mismo con el desarrollo de estrategias de fomento de la cultura de la seguridad, como lo son las rondas de seguridad por parte de la epidemióloga y la experta en enfermedades infecciosas, los cronogramas de capacitación a los trabajadores de salud incluyendo los médicos especialistas.

Igualmente, por medio de la adquisición de tecnología que les permite reducir tiempos y movimientos para el cuidado de los pacientes. En este caso, la adquisición de los apósitos transparentes de poliuretano, la introducción de los antisépticos con base en Clorhexidina y clorhexidina alcohólica, que han demostrado científicamente las ventajas sobre otros antisépticos, lo que permitió cambiar en los protocolos la indicación de la asepsia, también la introducción del paquete de ropa específico para la instalación de los catéteres centrales y el material propio de los catéteres intravenosos.

La Clínica desarrolla las estrategias de vigilancia validadas internacionalmente, dirigidas a las IAAS, el consumo de antibióticos y la resistencia bacteriana.

Prueba de lo anterior son los archivos de antecedentes, los boletines epidemiológicos, los análisis de la resistencia bacteriana, entre otros muchos. El impacto es la reducción de las tasas de resistencia en hospitalización, la reducción del número de bacteriemias asociadas al uso de catéter central y de las neumonías asociadas a la ventilación mecánica.

MARCO TEÓRICO

La seguridad del paciente es un reto a nivel mundial que ha llevado a que numerosos países se reúnan en pro de esta. En el 2004 se realizó la creación de una alianza internacional enfocada a mejorar la seguridad del paciente con el programa “Una Atención Limpia es una Atención Más Segura” que abarca aspectos relacionados con higiene de las manos, seguridad de las inyecciones, de las intervenciones quirúrgicas, el uso de la sangre en las transfusiones y el entorno asistencial. Su tema principal es el de las infecciones relacionadas con la atención en salud producida a nivel mundial, que se encuentran entre las principales causas de muerte e incremento de la morbilidad en pacientes hospitalizados.

El programa busca contribuir en la reducción de estas infecciones y lograr el reconocimiento universal de que su control es una base indispensable para la seguridad del paciente. Apoyando a este programa se inauguró una campaña llamada “Salve Vidas: Límpiese las Manos” que se ha enfocado en sensibilizar a los trabajadores de la salud, acerca de la necesidad e importancia de que mejoren y mantengan las prácticas de higiene de las manos de una manera correcta. Sin embargo y a pesar de las numerosas campañas que se han hecho seguimos teniendo falencias y es por ello que en el año 2013 se

celebró la Conferencia Mundial de Promoción de la Salud en Helsinki, Finlandia, de esta se llegó a la conclusión de la necesidad de poner la salud en todas las políticas con el fin de que se cumplan por parte del personal de salud y de los diferentes entes que competan.

En Colombia el Ministerio de Protección Social y Salud creó como herramientas paquetes instrucciones que facilitan al personal de salud llevar a cabo la seguridad del paciente. Estos están basados en el modelo pedagógico del aprendizaje basado en problemas (ABP) que consiste en empezar con el problema como punto de partida del estudio, pero no con el objetivo de dar una respuesta sino con la finalidad de generar conocimiento y soluciones permanentemente, para ello se utiliza el protocolo de Londres, el cual permite hacer un análisis completo del problema mediante el análisis de las fallas latentes, fallas activas y prácticas seguras, permitiendo identificar las falencias en ese proceso de atención y llevar a cabo planes de acción que propicien un mejoramiento continuo (4).

BACTERIEMIAS

Según el CDC de Atlanta se define bacteriemia como la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo, esta conforma un síndrome clínico complejo y en constante transformación que ocasiona una importante y creciente morbimortalidad, por lo cual es un evento de interés en salud pública, ya que impacta de manera significativa en diferentes tasas de incidencia (29).

Se pueden clasificar en:

Según su origen:

- Bacteriemias primarias o de origen

desconocido: son aquellas en las que no se determina la infección de origen causante de la misma (29).

- Bacteriemias secundarias: se caracterizan por que su desarrollo es secundario a una infección localizada y documentada microbiológicamente con el mismo microorganismo aislado en el hemocultivo (30).

Por otra parte, podemos clasificar las bacteriemias según el lugar de adquisición que permiten tener una orientación en cuanto a la etiología, en esta podemos encontrar:

1. **La bacteriemia adquirida en la comunidad (BAC):** Se define como aquella que se adquiere en la comunidad y es detectada en las primeras 48 horas de hospitalización. El origen más frecuente es la infección del tracto urinario seguido de la neumonía y de la infección intra-abdominal (31).
2. **La bacteriemia asociada a la atención en salud (BAAS):** se define como aquella que se adquiere en la institución hospitalaria, es decir, no estaba presente, ni en incubación, antes del ingreso del paciente. En general, se manifiestan a partir de 48 horas tras el ingreso (31) (32).
3. **La bacteriemia relacionada con los cuidados de salud extrahospitalarios:** tiene lugar en aquellos pacientes que no estando hospitalizados han tenido un contacto reciente con el sistema de salud en tratamientos ambulatorios, portadores de sonda vesical, pacientes en hemodiálisis, entre otros (31).

Para la adecuada identificación del pacien-

te con bacteriemia se precisa de realizar una adecuada toma de muestra por parte del personal de salud y conocer la definición y los criterios dados por el CDC de Atlanta, los cuales son:

Bacteriemia primaria confirmada por el laboratorio (33)

Debe cumplir al menos uno de los siguientes criterios:

Criterio 1: En el hemocultivo se ha aislado un microorganismo sin relación con cualquier otro foco infeccioso.

Criterio 2: El paciente tiene al menos uno de los siguientes síntomas o signos: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), escalofríos o hipotensión y al menos uno de los siguientes:

- a) En dos hemocultivos que no se han practicado simultáneamente se ha aislado el mismo contaminante habitual de la piel (p. Ej. diphteroides, Bacillus sp., Propionibacterium sp., estafilococos coagulasa negativo o micrococos) sin relación con ningún otro foco infeccioso.
- b) En un hemocultivo practicado a un paciente portador de una cánula intravasculare se ha aislado un contaminante habitual de la piel (diphteroides, Bacillus sp., Propionibacterium sp., estafilococos coagulasa negativo o micrococos) y el médico ha prescrito el tratamiento antibiótico pertinente.
- c) Resultado positivo de una prueba para la detección de antígenos en sangre (p. Ej. Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Neisseria me-

ningitidis o Streptococcus grupo B) y los signos y síntomas y resultados de laboratorio positivos no se relacionan con otro foco infeccioso (33).

SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA BACTERIANA

Se puede definir como sensibilidad la propiedad de una cepa bacteriana de ser inhibida en su crecimiento o destruida por la acción de un antibiótico. Según la OMS La resistencia a los antimicrobianos es la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable (34).

Tipos de Resistencia

- Natural: La resistencia natural es la resistencia propia de determinada bacteria, es decir siempre ha tenido esto codificado en su información genética.
- Primaria: Locus del DNA que aparece al azar (Mutación).
- Secundaria: Se da por mutaciones espontáneas y selección natural.
- Transferible: Es debido a bacteriófagos, plásmidos de resistencia o a la presencia de material genético en el medio (transducción, conjugación y transformación).

Según el tipo de resistencia podemos encontrar bacterias con:

- Multirresistencia: Resistencia adquirida por diferentes clases de microorganismos patógenos debido a mutaciones al azar o adquirida por medio de plásmidos, fagos o integrones. Las

bacterias multirresistentes son capaces de sobrevivir a la acción de diferentes antimicrobianos, es decir, no hace ningún efecto contra ellas siendo muchos tratamientos antibióticos poco eficaces para controlar infecciones (35).

- Panresistencia: Según el Doctor John Conly es un nuevo tipo de resistencia que se ha comprobado en diferentes tipos de bacterias, estas producen una enzima denominada NDM1 (New Delhi metallo-beta-lactamase) cuya fabricación está codificada por un gen denominado NDM-1 que les confiere una resistencia a todos los antibióticos por lo cual en la actualidad no hay ninguna terapia capaz de tratar las infecciones causadas por estos microorganismos (35).

MECANISMOS DE RESISTENCIA

- Inactivación enzimática: La enzima destruye o neutraliza el medicamento, es la más importante desde el punto de vista clínico ya que media la resistencia antibiótica a los antibióticos de mayor uso incluyendo los betalactámicos, los aminoglucósidos y los macrólidos. Puede ser constitutiva, es decir, que la bacteria ha heredado la capacidad de producir la enzima por si sola; o inducible que se produce cuando hay antibióticos en el medio en el que se encuentra (36).
- Alteración de la permeabilidad: En la membrana celular las bacterias tienen porinas, la bacteria cierra estas porinas alterando la entrada y salida de sustancias, por lo que el antibiótico no puede llegar y causar efecto en la misma (36).

- Eflujo activo: Las bacterias que tienen este mecanismo de resistencia expulsan activamente los antibióticos fuera de la célula (36).
- Alteración del sitio de ligación: Todo antibiótico tiene un sitio específico para causar un efecto, al ser alterado este sitio no se puede efectuar la ligación por lo cual se torna ineficiente, se genera una alteración fisicoquímica ya que también hay pérdida de la actividad antimicrobiana (36).
- Mutación de enzima blanco: Se alteran genes *gyrA* y *gyrB* que codifican la girasa blanco esto se observa principalmente en Gram negativos, y mutan genes *parC* y *parE* que codifican topoisomerasa IV blanco en Gram positivos (36).
- Alteraciones en los precursores de la pared celular: Se produce un engrosamiento de la pared celular y disminución del entrecruzamiento del peptidoglicano, lo cual genera falsos blancos (36).

ANTIMICROBIANOS

Dentro de este grupo podemos encontrar:
Bacteriostáticos: Son capaces de detener el crecimiento, en ellos encontramos:

- Sulfamidas
- Clindamicina
- Macrólidos
- Tetraciclinas
- Cloramfenicol: Para la *Neisserias meningitidis* y *H. influenzae* es bactericida.

Bactericidas: Tienen la capacidad de destruir una población microbiana, dentro de este grupo podemos encontrar:

β -lactámicos

- Penicilinas
- Cefalosporinas
- Carbapénicos
- Monobactámicos
- Aminoglucósidos

Glicopéptidos:

- Vancomicina
- Teicoplanina
- Quinolonas
- Fosfocina.

METODOLOGÍA PROPUESTA

Tipo Estudio: estudio de cohorte prospectiva.

Población: total de hemocultivos positivos durante el periodo junio 2011 hasta junio 2015

Muestra: 118 casos con reportes de hemocultivos positivos.

Criterios Inclusión:

- Información del paciente completa y registrada en la base de datos.
- Diagnósticos de bacteriemia que cumplieron con los criterios propuestos por el CDC de Atlanta, para bacteriemia.

Criterios Exclusión:

- Casos con reportes de hemocultivos positivos que no se encuentren dentro de las fechas establecidas.
- Hemocultivos con reporte positivo de germen comensal de la piel que fueran contaminantes.

- Casos clínicos que tuvieran información incompleta

Variables:

- Edad
- Sexo
- Comorbilidad asociada
- Hospitalización previa (< a 3 meses)
- Infecciones remotas
- Microorganismo
- Servicio

- Resistencia sensibilidad
- Dispositivos intravasculares (centrales o periféricos)
- Tipo de bacteriemia (primaria o secundaria)
- Origen bacteremia o localización (Comunitaria/ asociada a la atención en salud)
- Condición de egreso (vivo-muerto)
- Días exceso de estancia
- Antibioticoterapia previa.

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Nivel de medición	Valores posibles	Método de Recolección
Sexo	Sexo del paciente	Cualitativa	Nominal	Masculino =1 Femenino =2	Historia clínica
Edad	Edad del paciente en años cumplidos	Cuantitativa	Escala	Ninguno	Historia clínica
Grupos de Edad	Edad del paciente en años cumplidos	Cuantitativa	Ordinal	15-20 años adolescentes =1 21-34 años adulto joven =2 35-59 años adulto maduro =3 >60 años adulto mayo =4	Historia clínica
Servicio	Servicio de estancia del paciente durante el periodo de hospitalización	Cualitativa	Nominal	B1=1 B2=2 B3=3 B4=4 UCI=5 URG=6 Qx=7	Historia clínica
Presencia de comorbilidades	Presencia de Enfermedades de base que presenta el paciente en el momento del ingreso a hospitalización	Cualitativa	Nominal	Si=1 No=2	Historia Clínica

Tipo de comorbilidades	Tipo de Enfermedades de base que presenta el paciente en el momento del ingreso a hospitalización	Cualitativa	Nominal	Diabetes Mellitus, Hipertensión Arterial, insuficiencia renal crónica, insuficiencia renal aguda, hipotiroidismos, enfermedad coronaria, inmunosupresión (por Cáncer, Virus de Inmunodeficiencia Humana, esteroides)	Historia clínica
Hospitalizaciones previas	Hospitalizaciones anteriores al ingreso menores a 3 meses	Cualitativa	Nominal	Si=1 No=2	Historia clínica
Antibiótico terapia previa	Antecedentes de terapia antibiótica previa a la hospitalización	Cualitativa	Nominal	Si=1 No=2	Historia clínica
Rango días de exceso en la estancia hospitalaria	Periodo de estancia en el hospital posterior a bacteriemia intrahospitalaria	Cuantitativa	Ordinal	<7 días =1 7-10 días = 2 10-15 días =3 >15 días =4 0 días = 5	Historia clínica
Días de exceso en la estancia Hospitalaria	Días adicionales de estancia en el hospital posterior a diagnóstico de bacteriemia intrahospitalaria	Cuantitativa	Escala	Ninguno	Historia clínica
Presencia de dispositivos invasivos	Presencia de dispositivos durante la estancia hospitalaria	Cualitativa	Nominal	Si=1 No=2	Historia clínica
Tipo de Dispositivos invasivos	Tipo de Dispositivos que se le ponen al paciente al ingreso o durante la hospitalización	Cualitativa	Nominal	Catéter Venoso Central (CVC) =1 Sonda Vesical (SV)=2 Catéter Venoso Periférico (CVP)=3	Historia Clínica

Recolección de la Información:

- Se realizó recolección de datos retrospectivamente, tomando la base de datos del laboratorio, vinculada al software WHONET 5.6.
- Consulta de las historias clínicas de los casos con hemocultivos positivos. Durante la recolección de la información se tuvo en cuenta los siguientes criterios:
 - La bacteriemia se determinó de acuerdo a los criterios propuestos por el CDC de Atlanta.
 - En cuanto a las comorbilidades se tuvo en cuenta aquellas más prevalentes, las cuales se han recolectado de los antecedentes sobre bacteriemia a nivel internacional, nacional y local, entre ellas se va tener en cuenta: Diabetes mellitus e inmunosupresión (inmunosupresión debida a: tratamientos con corticoesteroides, terapia biológica, pacientes oncológicos, con VIH, trasplantes, asplenia).

Análisis de la Información:

Datos procesados en programa de SPSS versión 18. En el que se realizó análisis a través de estadística descriptiva frecuencial con gráficos de barras y de Pareto. Se realizó análisis multivariado a través de escalamiento óptimo, mediante análisis de correspondencias múltiples y razones de probabilidad (OR).

MARCO ETICO

Esta investigación se acoge a la Resolución 8430 de 1993 (37), norma científica, técnica y administrativa para la investigación en salud en Colombia; por la cual se establece el desarrollo de la actividad investigativa y las

acciones que contribuyan al conocimiento de los procesos biológicos, así como la protección de la privacidad del individuo o sujeto de la investigación. Además, estaremos sujetos a los principios de bioética y la ley 911 de 2004 (38), ya que a lo largo de este proceso se respetará la dignidad de las personas, se protegerá la privacidad, sus derechos y bienestar, también se soporta en la ley 841 de 2003 puesto que es en beneficio de los seres humanos y sin detrimento de los ecosistemas, además mejora los procedimientos diagnósticos y terapéuticos, también la comprensión de la etiología y patogenia de las enfermedades. Estará clasificada como una investigación de riesgo mínimo, ya que para la recolección de datos se utilizará una base de datos de la institución donde se realizará la investigación (39).

Para garantizar los principios bioéticos de la autonomía, beneficencia y no maleficencia se guardará el secreto profesional y no se divulgarán los datos privados de los pacientes fuera del ámbito de la investigación.

RESULTADOS

Caracterización sociodemográfica de los pacientes con bacteriemia

El número total de paciente que presentaron bacteriemia y que cumplieron con los criterios de inclusión fueron 80 pacientes (68 %) de los 118 casos en total, de estos pacientes con bacteriemia el 44 % fueron hombres y el 56 % mujeres. Tabla 1- figura 1.

Tabla 1: Distribución por género y presencia de bacteriemia

Sexo del paciente Con bacteriemia	Presencia de bacteriemia		Total	
	Sin bacteriemia			
Hombre	Recuento	35	24	59
	%	44 %	63 %	50 %
Mujer	Recuento	45	14	59
	%	56 %	37 %	50 %
Total	Recuento	80	38	118
	%	100 %	100 %	100 %

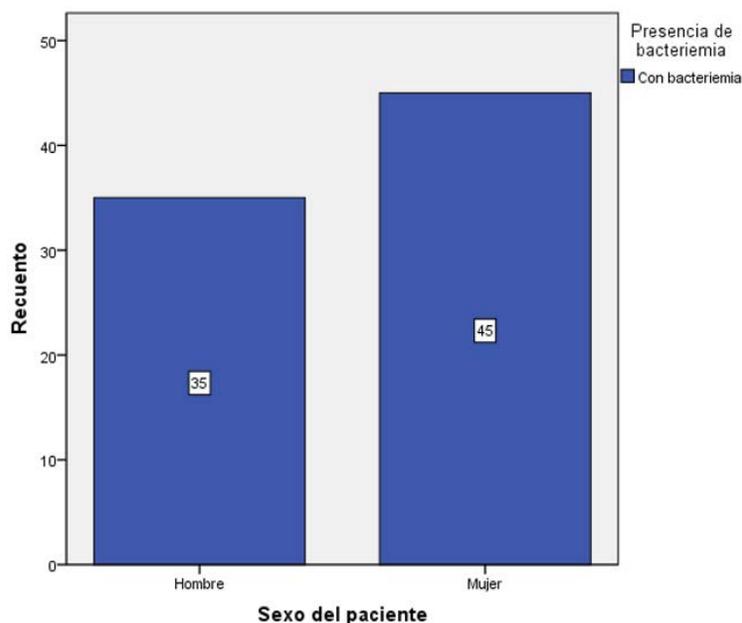


Figura 1: Hombres y mujeres con bacteriemia

Al realizar el recuento total de hombres y mujeres con bacteriemia positiva se observa que el 43,75 % son hombres con una media de edad de 55 años y el 56,25 % mujeres con una media de edad de 63 años (tabla 2,3). Por otra parte, en el servicio de hospitalización bloque 1, se encontró que de los pacientes con bacteriemias positivas el 50 % eran hombres con una media de edad de 50 años y el 50 % mujeres con una media de edad de 63 años. En el servicio de hospitaliza-

ción bloque 2, los hombres representan el 36,36 % con una media de edad de 46 años mientras las mujeres forman parte del 63,63 % con una media de edad de 52 años. En el servicio de hospitalización bloque 3, el 50 % son hombres con una media de edad de 90 años y las mujeres un 50 % con media de 75 años. En el servicio de hospitalización bloque 4 se encuentra que 28,57 % con hombres con una media de edad de 71 años y las mujeres el 71,52 % con media de edad de 66

años. En la UTI el servicio con más muestras positivas para bacteriemia, se evidencia que el 55.88 % son hombres con una media de edad de 53 años mientras el 44,12 % son mujeres con una media de edad de 67 años.

En el servicio de URG se muestra que los hombres representan 25 % con una media de Edad de 64 años, mientras las mujeres representan el 75 % con una media de edad de 62 años (tabla 3).

Tabla 2: Edad media de Hombres y mujeres con presencia de bacteriemia.

Sexo del paciente	Edad Media	
Hombre	55	61
Mujer	63	65

Tabla 3: Edad media de Hombres y mujeres con presencia de bacteriemia por servicios.

Servicio donde realizaron toma de muestras		Sexo del paciente					
		Hombre			Mujer		
		Media	Desviación típica	Recuento	Media	Desviación típica	Recuento
B1	Edad	50	17	5	63	19	5
B2	Edad	46	18	4	52	15	7
B3	Edad	90	.	1	75	.	1
B4	Edad	71	7	2	66	12	5
UCI	Edad	53	21	19	67	15	15
URG	Edad	64	5	4	62	14	12
Qx	Edad	.	.	0	.	.	0
Subtotal	Edad	55	19	35	63	15	45

De los pacientes que presentaron bacteriemia sin hacer la discriminación por lugar de adquisición de la bacteriemia encontramos que de los 80 pacientes con bacteriemia positiva el 75 % de ellos presentaron una o varias de las siguientes comorbilidades. En primer lugar se encuentra la hipertensión arterial presentada en el 50 % de los pacientes positivos para bacteriemia, seguida del hipo-

tiroidismos en un 21 % de los pacientes, la Diabetes Mellitus en el 20 %, insuficiencia renal crónica con un 19 %, inmunosupresión por CA con un 16 %, pacientes con enfermedad coronaria que representan el 13 %, pacientes con enfermedad obstructiva crónica 5 %, inmunosupresión por esteroides 4 %, pacientes con VIH que representan el 1 % (Figura 2).

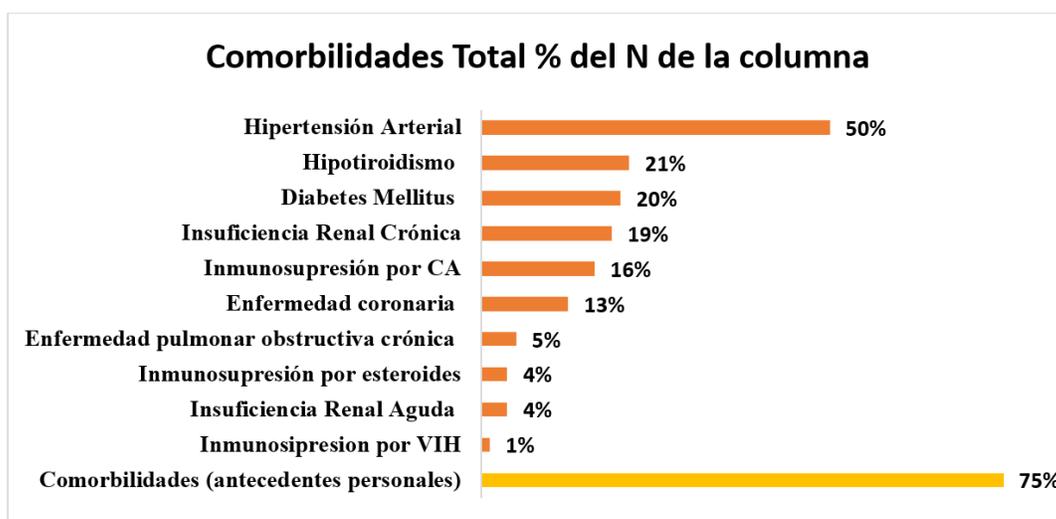


Figura 2: Comorbilidades de los pacientes con bacteriemias.

En la siguiente tabla de contingencia encontramos los pacientes con bacteriemia positiva discriminada por lugar de adquisición: bacteriemia adquirida en la comunidad, Infección asociada a la atención en salud (IAAS) y extra-hospitalaria (en otra institu-

ción) que presentaron una o más comorbilidades, se observa que de los pacientes que adquirieron la bacteriemia en la comunidad el 73 % de ellos presentaron comorbilidades, en los pacientes que adquirieron la infección asociada a la atención en salud (IAAS) el 78 % tenían una o más comorbilidades de base y el los pacientes que adquirieron la bacte-

riemia de manera extra-hospitalaria el 71 % presentaba comorbilidades (tabla4).

Tabla 4: Comorbilidades en los pacientes con bacteriemia según lugar de Adquisición.

Comorbilidades		Lugar de adquisición de la bacteriemia (Comunitaria, IAAS o Extra-hospitalaria)							
		Total		Adquirida en la comunidad		Infección asociada a la atención en salud (IAAS)		Extra-hospitalaria (en otra institución)	
		Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
Comorbilidades (antecedentes personales)	Si	60	75 %	27	73 %	28	78 %	5	71 %
	No	20	25 %	10	27 %	8	22 %	2	29 %
Diabetes Mellitus	Si	16	20 %	7	19 %	5	14 %	4	57 %
Hipertensión Arterial	Si	40	50 %	17	46 %	20	56 %	3	43 %
	No	40	50 %	20	54 %	16	44 %	4	57 %

Insuficiencia Renal Crónica	Si	15	19 %	7	19 %	7	19 %	1	14 %
	No	65	81 %	30	81 %	29	81 %	6	86 %
Insuficiencia Renal Aguda	Si	3	4 %	2	5 %	1	3 %	0	0 %
	No	77	96 %	35	95 %	35	97 %	7	100 %
Hipotiroidismo	Si	17	21 %	7	19 %	7	19 %	3	43 %
	No	63	79 %	30	81 %	29	81 %	4	57 %
Enfermedad coronaria	Si	10	13 %	6	16 %	2	6 %	2	29 %
	No	70	88 %	31	84 %	34	94 %	5	71 %
Inmunosupresión por CA	Si	13	16 %	7	19 %	6	17 %	0	0 %
	No	67	84 %	30	81 %	30	83 %	7	100 %
Inmunosupresión por esteroides	Si	3	4 %	1	3 %	2	6 %	0	0 %
	No	77	96 %	36	97 %	34	94 %	7	100 %
Inmunosupresión por VIH	Si	1	1 %	0	0 %	1	3 %	0	0 %
	No	79	99 %	37	100 %	35	97 %	7	100 %
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	Si	4	5 %	3	8 %	1	3 %	0	0 %
	No	76	95 %	34	92 %	35	97 %	7,00	100 %

Tras la identificación de los pacientes con bacteriemia se realizó un cruce de las variables entre el servicio donde se realizaron las tomas de muestras con los pacientes que presentaban bacteriemias y los que no la presentaron información ilustrada en la tabla 5. Se puede observar que el servicio donde más se realizaron tomas de muestra fue el servicio de la UTI con 52 muestras, de las cuales el 65 % son pacientes con cultivos positivos para bacteriemia que además cumplen con los requisitos de bacteriemia positiva.

Seguida de esta se encuentra el servicio de urgencias del cual se realizaron 21 toma de cultivos de los cuales el 76 % fueron positivos para paciente con bacteriemia. En tercer lugar, se encuentra el servicio de hospitalización Bloque 2 en el cuales realizaron en total 16 tomas de muestras de las cuales el 69 % resultaron positivos para pacientes con bacteriemia. Se observa un total de 118 muestras tomadas de las cuales 80 que representan el 68 % resultaron positivas en pacientes con bacteriemia.

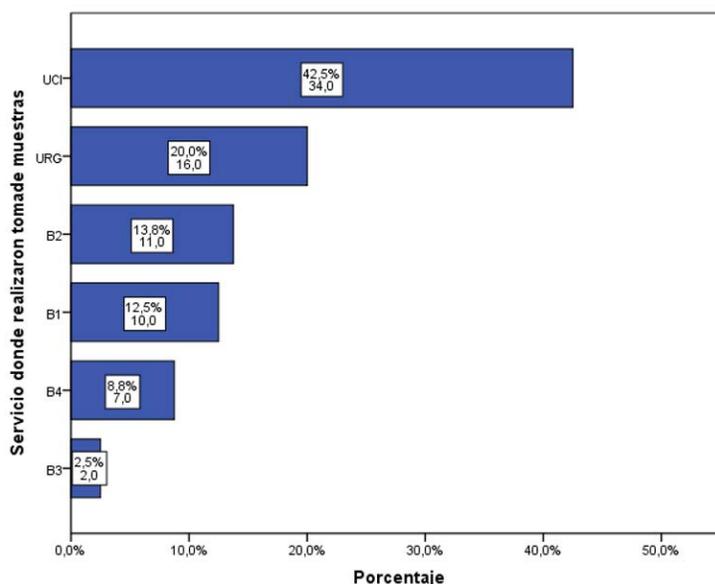
Servicio donde realizaron toma de muestras Con bacteriemia		Presencia de bacteriemia		Total
		Con bacteriemia	Sin bacteriemia	
B1	Recuento	10	3	13
	% dentro de Servicio donde realizaron tomad e muestras	77 %	23 %	100 %
B2	Recuento	11	5	16
	% dentro de Servicio donde realizaron toma de muestras	69 %	31 %	100 %

B3	Recuento	2	2	4
	% dentro de Servicio donde realizaron toma de muestras	50 %	50 %	100 %
B4	Recuento	7	3	10
	% dentro de Servicio donde realizaron toma de muestras	70 %	30 %	100 %
UCI	Recuento	34	18	52
	% dentro de Servicio donde realizaron toma de muestras	65 %	35 %	100 %
URG	Recuento	16	5	21
	% dentro de Servicio donde realizaron toma de muestras	76 %	24 %	100 %
Qx	Recuento	0	2	2
	% dentro de Servicio donde realizaron toma de muestras	0 %	100 %	100 %
Total	Recuento	80	38	118
	% dentro de Servicio donde realizaron toma de muestras	68 %	32 %	100 %

Tabla 5: Toma de muestra por servicios / Presencia de bacteriemia.

De las 80 muestras positivas para bacteriemia se encuentra que la UCI representa el 42.5 % (34 muestras), urgencias el 20 % (16 muestras), servicios de hospitalización Bloque 2 con 13.8 % (11 muestras), Bloque 1 con 7 % muestras (10 muestras), Bloque 4 con el 8.8 % (7 muestras) y Bloque 3 con 2,5 %

Figura 3: Porcentaje de muestras por servicios.



Se hace importante además conocer en los pacientes si presentaron hospitalizaciones previas (< 3 meses) pues ayudará a determinar si la bacteriemia fue adquirida en la comunidad, asociada a la atención en salud o de manera extra hospitalaria (en otra institución) y antibioticoterapia previas pues permitirá determinar posibles resistencias antibióticas o la efectividad de los tratamientos empíricos. En esta tabla de contingencia se realizó un cruce entre las siguientes variables: lugar de adquisición de la bacteriemia, tipo de bacteriemia (primaria/secundaria), hospitalización previa (<3 meses), antibioticoterapia previa. Se evidencia que de los pacientes con bacteriemia positiva presentaron hospitalización previa el 46 % de los pacientes que la adquirieron en la comunidad, el 34 % de los que la presentaron Asociada a la Atención en salud y el 20 % de los que la adquirieron de manera Extra- hospitalaria.

Tabla 6: lugar de adquisición de la bacteriemia vs hospitalización (< 3 meses) y Antibioticoterapia previa.

Cruces		Hospitalización previa (< 3 meses)				Antibioticoterapia previa			
		Si		No		Si		No	
		Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
Lugar de adquisición de la bacteriemia (Comunitaria, IAAS o extrahospitalaria)	Adquirida en la comunidad	16	46%	21	47%	27	42%	10	67%
	Infección asociada a la atención en salud	12	34%	24	53%	31	48%	5	33%
	Extrahospitalaria (en otra institución)	7	20%	0	0%	7	11%	0	0%
	Sin criterio	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Tipo de bacteriemia	Primaria	19	54%	28	62%	39	60%	8	53%
	Secundaria	16	46%	17	38%	26	40%	7	47%

Por otra parte, se encontró que en los pacientes que presentaron uno o más dispositivos invasivos que el 55 % tenía Catéter Venoso Central (CVC), el 43 % Sonda Vesical (SV) y el 34 % catéter Venoso periférico) y en me-

Por otra parte, de los pacientes que presentaron bacteriemia primaria el 54 % de ellos tuvieron hospitalización previa, y los pacientes con bacteriemia secundaria el 46 % presentaron hospitalización previa (tabla 6).

Otra variable importante a evaluar fue la antibioticoterapia previa en la que se evidenciaron los siguientes hallazgos: de los pacientes con bacteriemia positiva recibieron antibioticoterapia previa el 42 % de los pacientes que la Adquirieron en la Comunidad, el 48 % de los pacientes con infección asociada a la atención en salud y el 11 % de los pacientes que la adquirieron de forma Extra-hospitalaria. Y según el tipo de bacteriemia el 60 % con bacteriemia primaria recibió antibioticoterapia previa, así como el 40 % de los pacientes con bacteriemia Secundaria (tabla 6).

Por otra parte, se encontró que en los pacientes que presentaron uno o más dispositivos invasivos que el 55 % tenía Catéter Venoso Central (CVC), el 43 % Sonda Vesical (SV) y el 34 % catéter Venoso periférico) y en menor porcentaje encontramos el Catéter peritoneal en el 3 %, catéter JJ el 1 %, Catéter peridural 1 % y dispositivos extra-hospitalarios como fue la sonda vesical el 1 %.

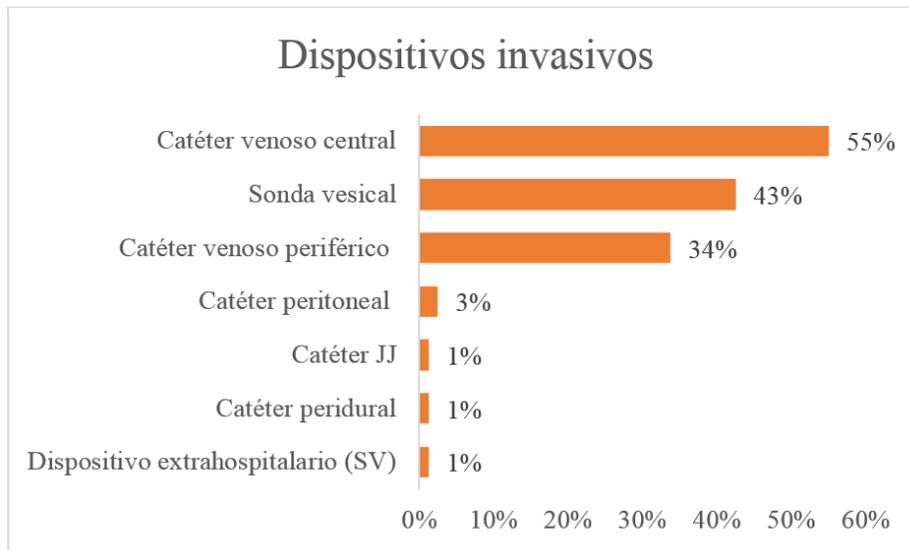


Figura 4: Dispositivos invasivos en pacientes con bacteriemia.

Los pacientes que son diagnosticados con bacteriemia generan el aumento en los días de estancia hospitalaria; en el presente estudio se cuantificó desde que el paciente fue diagnosticado con bacteriemia hasta su alta hospitalaria. Se identificó que el 38,8 % de los pacientes tuvieron menos de 7 días exceso en su estancia hospitalaria, el 26,3 % presentaron una

rango de días de exceso mayor a 15 días de estancia hospitalaria, el 12,5 % tuvieron un exceso de estancia hospitalaria >10-15 días, el 11,3 % un rango de exceso de estancia entre 7- 10 días y el 16 % no tuvieron ningún

día de exceso de estancia hospitalaria ya sea porque fueron dados de alta o por posible mortalidad (Figura 5).

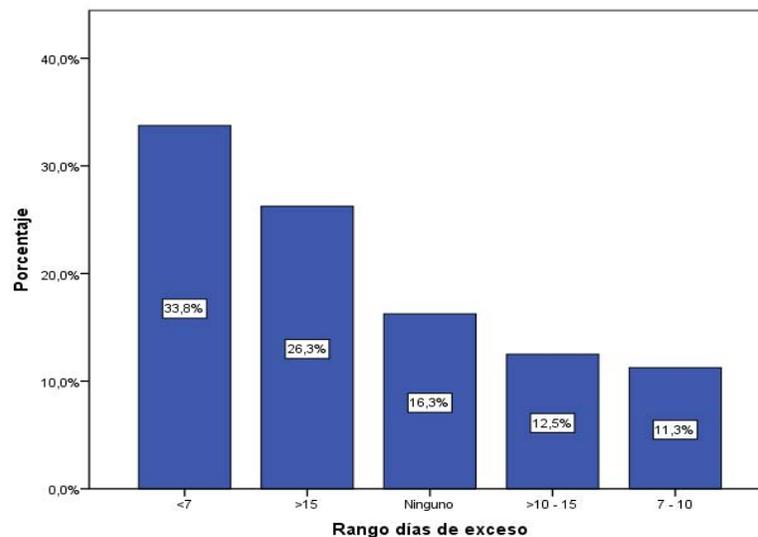


Figura 5: Rango días de exceso

En cuanto a la mortalidad cabe aclarar que podría estar asociada a la bacteriemia misma o debido a las condiciones hemodinámicas del paciente que desencadenaron en la muerte, a través de la figura se puede observar que el 80 % (64 pacientes) de los pacientes egresaron en condición de vivos, mientras que el 20 % (16 pacientes) fallecieron antes de su egreso hospitalario. El servicio que más mortalidad presentó fue el servicio de UTI con 69 % de muertes y a la vez con el número más alto de egresos vivos del 36 % del total de la población con bacteriemia por servicios (figura 6, tabla 7).

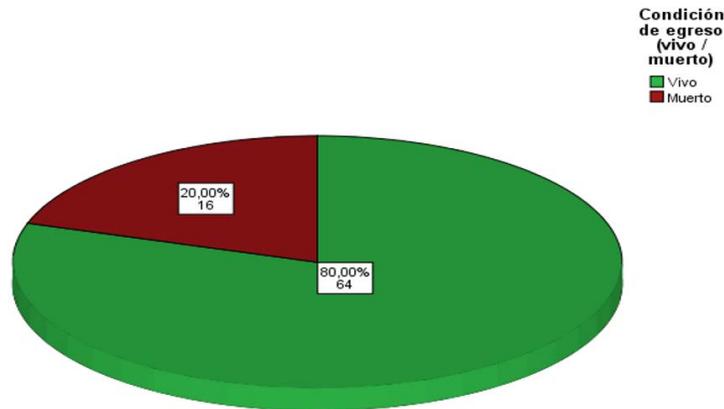


Figura 6: mortalidad en el total de pacientes identificados con bacteriemia

Tabla 7: Condición de egreso según el servicio de hospitalización.

Servicio donde se realizaron toma de muestras	Condición de egreso (vivo / muerto)			
	Vivo		Muerto	
	Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
B1	10	16 %	0	0 %
B2	11	17 %	0	0 %
B3	1	2 %	1	6 %
B4	6	9 %	1	6 %
UCI	23	36 %	11	69 %
URG	13	20 %	3	19 %
Qx	0	0 %	0	0 %

Así mismo se hace importante ilustrar las condiciones de egreso de los pacientes en función del servicio donde se encontraban y el lugar de adquisición de la bacteriemia.

Se observó que el servicio que más mortalidad presenta es la UCI, tanto en aquellos pacientes que adquirieron la bacteriemia en la comunidad como aquellos que presentaron

infección asociada a la atención en salud. En total se presentaron en este servicio 11 muertes, de las cuales 6 fueron asociadas a la atención en salud y 5 bacteriemias adquiridas en la comunidad, cabe aclarar que estas pueden ser asociadas a las bacteriemias o a las condiciones hemodinámicas que presentaba el paciente. (Tabla 8).

Servicio donde realizaron toma de muestras				B1	B2	B3	B4	UCI	URG	Qx	
Lugar de adquisición de la bacteriemia (Comunitaria, IAAS o Extra-hospitalaria)	Adquirida en la comunidad	Condición de egreso (vivo / muerto)	Vivo	Recuento	6	5	0	2	5	11	0
			% de la fila	100 %	100 %	0 %	67 %	50 %	92 %	0 %	
		Muerto	Recuento	0	0	1	1	5	1	0	
			% de la fila	0 %	0 %	100 %	33 %	50 %	8 %	0 %	
	Infección asociada a la atención en salud	Condición de egreso (vivo / muerto)	Vivo	Recuento	3	5	0	3	16	1	0
			% de la fila	100 %	100 %	0 %	100 %	73 %	33 %	0 %	
		Muerto	Recuento	0	0	0	0	6	2	0	
			% de la fila	0 %	0 %	0 %	0 %	27 %	67 %	0 %	
	Extra-hospitalaria (en otra institución)	Condición de egreso (vivo / muerto)	Vivo	Recuento	1	1	1	1	2	1	0
			% de la fila	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	0 %	
		Muerto	Recuento	0	0	0	0	0	0	0	
			% de la fila	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	

Tabla 8: mortalidad por servicios y lugar de adquisición de la bacteriemia.

Razones de Posibilidad (OR)

Unidad de Atención	OR	IC (95 %)
UCI	1,75	1,01-3,04
B1	1,06	0,0-2,0
B2	1,06	0,0-2,0
B3	0,00	0,0-1,0
B4	1,06	0,0-2,0
URG	0,60	0,0-1,0

Tabla 9: Razones de Posibilidad (OR) según unidades de atención

Se estimaron los valores de los OR (Odds Ratio) para establecer el comparativo entre Unidades de Atención Hospitalaria de forma retrospectiva, frente a la posibilidad de adquirir Bacteriemia por exposición a alguno

de estos. Se encontró un valor significativo entorno en la UCI (OR=1,75), a diferencia de los otros servicios, indicando que la posibilidad de adquisición de Bacteriemia por un paciente expuesto en dicho servicio es 1,75

veces más probable que para los que no están expuestos al mismo. Cabe aclarar que no existieron OR significativos para los demás servicios, indicando la posibilidad de factores protectores frente a la adquisición de la Bacteriemia.

M1 Análisis de Correspondencias Múltiples

Para el siguiente análisis se procedió a aplicar la técnica multivariada de escalamiento óptimo llamada análisis de correspondencias múltiples (HOMALS - Homogeneity Analysis) que tiene como objetivo ilustrar las correspondencias o posibles asociaciones en términos descriptivos mediante puntuaciones por categorías haciendo reducción de dimensiones. Esta técnica pretende visualizar en síntesis los comportamientos de las variables frente a las cercanías de puntuaciones por cada nivel (solo Variables nominales y ordinales) y en conjunto, frente a un gráfico de discriminación que ilustra la posible co-

rrelación o correspondencia entre las variables en conjunto. No obstante, en el presente trabajo se encontró un modelo fiable para la reducción de las variables (Ver tabla M1-5).

En la tabla siguiente (**Tabla M1.1**), representa las puntuaciones por categorías dentro de las coordenadas del centro de las dos dimensiones reducidas. La respectiva descripción es con base en a la correspondencia de los puntajes las coordenadas de la variable Presencia de bacteriemia en el nivel Con bacteriemia ($\text{dim 1} = -0,676$; $\text{dim 2} = -0,041$). Se encontró correspondencia con la variable Lugar de adquisición de la bacteriemia en la primera dimensión en los niveles: Infección asociada a la atención en salud ($-0,623$), y en Adquirida en la comunidad ($-0,740$). Adicionalmente se ubicó una correspondencia en la segunda dimensión en Servicio donde realizaron toma de muestras, en B2 ($-0,029$). En la figura M1-2 se aprecian las cercanías de dichas coordenadas.

Tabla: M1.1

Preguntas		Frecuencia	Coordenadas de centroide		Distancias respecto presencia Bacteriemia	
			Dimensión		Dist. dim1	Dist. dim2
			1	2		
Servicio donde realizaron toma de muestras	B1	13	-0,361	0,650	0,315	0,691
	B2	16	-0,036	-0,029	0,640	0,012
	B3	4	0,682	1,331	1,358	1,372
	B4	10	-0,081	0,031	0,594	0,072
	UCI	52	0,104	-0,780	0,780	0,739
	URG	21	-0,345	1,230	0,331	1,271
	Qx	2	2,596	0,546	3,272	0,587
Lugar de adquisición de la bacteriemia (Comunitaria, IAAS o Extra-hospitalaria)	Adquirida en la comunidad	37	-0,740	0,902	0,064	0,943
	Infección asociada a la atención en salud	36	-0,623	-1,131	0,053	1,090
	Extra-hospitalaria (en otra institución)	7	-0,608	0,582	0,068	0,623
	Sin criterio	38	1,423	0,086	2,098	0,127
Presencia de bacteriemia	Con bacteriemia	80	-0,676	-0,041	0,000	0,000
	Sin bacteriemia	38	1,423	0,086	2,098	0,127

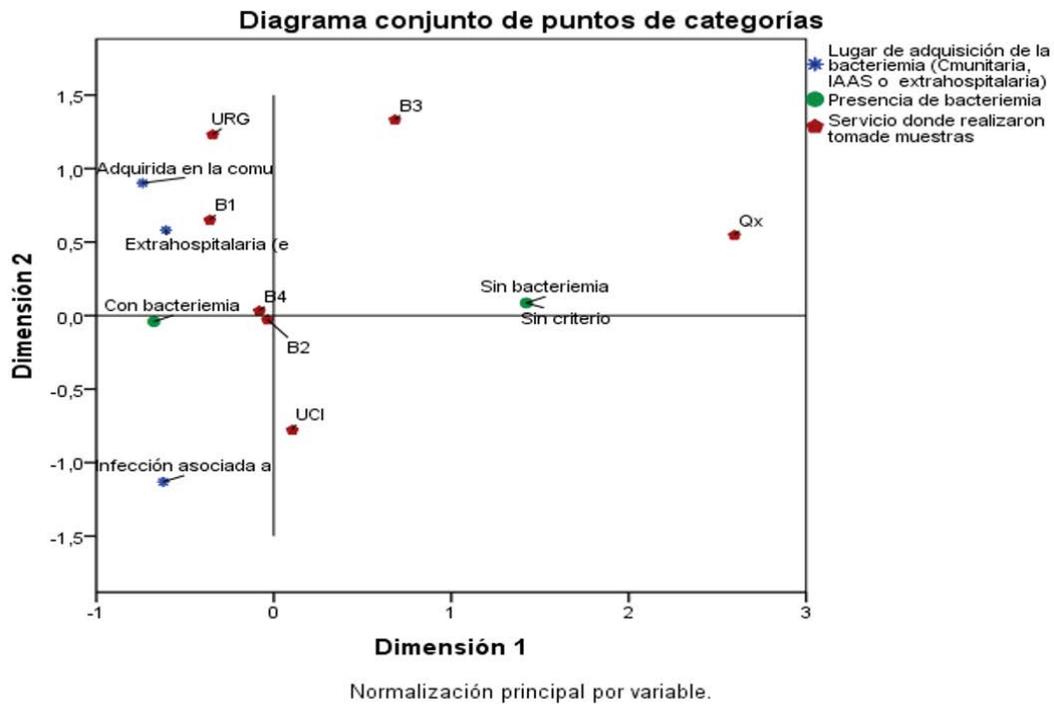


Figura 7: Diagrama conjunto de puntos por categorías.

Para la tabla M1-3 se aprecian las medidas de discriminación. Dichas medidas pretenden visualizar correspondencias en torno a las variables, pero no dentro de sus niveles. Lo que se pretende es mediante un gráfico verificar posibles asociaciones en torno a un conjunto de variables. Entre más lejos se encuentre del origen del plano normalizado los puntos que representan variables dentro del diagrama de discriminación, indica mayor poder dentro de la reducción de dimen-

siones. De acuerdo a eso, la variable Lugar de adquisición, es la que posee mayor poder discriminador (0,82), y analizando las coordenadas alrededor de las demás variables, se aprecia que en la dimensión 1 Presencia de bacteriemia corresponde al Lugar de adquisición (dim1=0,96), no obstante, se ilustra que Presencia de bacteriemia no corresponde ni se asocia en ninguna dimensión con Servicio donde realizaron toma de muestras (puntajes distintos)

Medidas de discriminación

Preguntas	Dimensión		Media
	1	2	
Servicio donde realizaron toma de muestras	0,17	0,65	0,41
Lugar de adquisición de la bacteriemia (Comunitaria, IAAS o extra-hospitalaria)	0,96	0,67	0,82
Presencia de bacteriemia	0,96	0,00	0,48
Total activo	2,10	1,32	1,71
% de la varianza	69,87	44,00	56,94

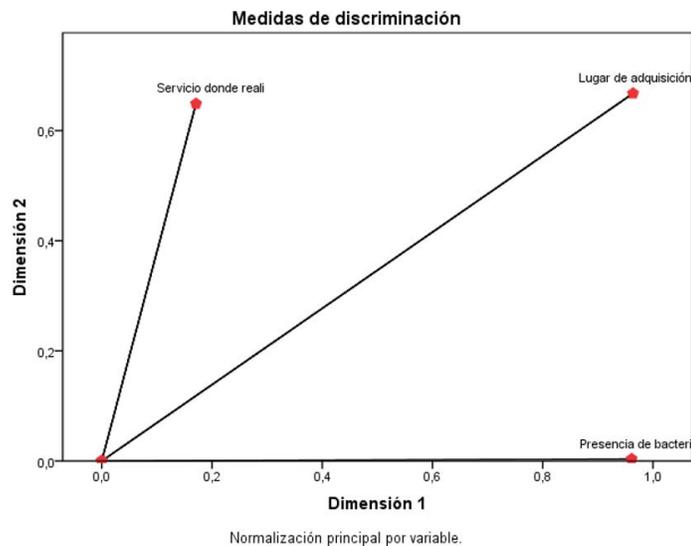


Figura: M1-4

Tabla: M1-5

Dimensión	Alfa de Cronbach	Varianza explicada		
		Total (Autovalores)	Inercia	% de la varianza
1	0,78	2,10	0,70	69,87
2	0,36	1,32	0,44	44,00
Total		3,42	1,14	
Media	0,62	1,71	0,57	56,94

Patrón de ocurrencia

Los microorganismos más prevalentes en los pacientes con bacteriemia con cultivos positivos se evidencia claramente que la Escherechia coli es uno de ms microorganismos más prevalentes representando en el

17.50 % de los casos, seguido de la Pseudomonas aeruginosa que representa el 11,25 %, el Staphylococcus aureus en el 8.75 % de las muestras positivas y la Klembsiella pneumonie 8,75 %, Serratia Marcescens 7.5 %, Klembsiella pneumonie ESBL 7,50 % de los casos, Enterobacter cloacae en el 5 %.

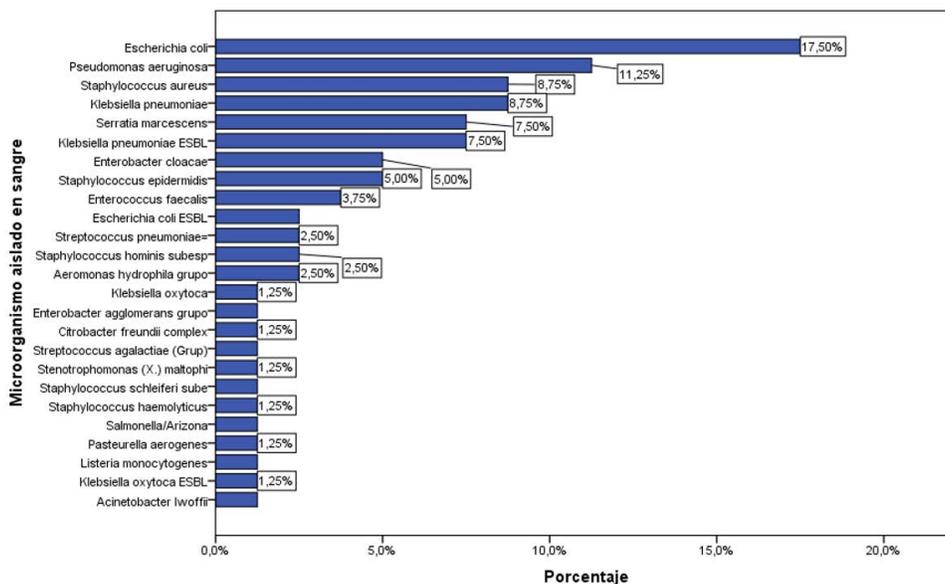


Figura 8: porcentajes de microorganismos en los pacientes con bacteriemia.

Microorganismo aislado en sangre	Recuento	% del N de la columna
<i>Escherichia coli</i>	14	18 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	11 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	9 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	9 %
<i>Klebsiella pneumoniae ESBL</i>	6	8 %
<i>Serratia marcescens</i>	6	8 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	5 %
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	5 %
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	4 %
<i>Aeromonas hydrophila</i> grupo	2	3 %
<i>Escherichia coli ESBL</i>	2	3 %
<i>Staphylococcus hominis subesp</i>	2	3 %
<i>Streptococcus pneumoniae</i> =	2	3 %
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	1 %
<i>Citrobacter freundii</i> complex	1	1 %
<i>Enterobacter agglomerans</i> grupo	1	1 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1 %
<i>Klebsiella oxytoca ESBL</i>	1	1 %
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	1 %
<i>Pasteurella aerogenes</i>	1	1 %
<i>Salmonella/Arizona</i>	1	1 %
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	1 %
<i>Staphylococcus schleiferi sube</i>	1	1 %
<i>Stenotrophomonas (X.) maltophilia</i>	1	1 %
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Grup)	1	1 %

Tabla 10: Microorganismos en los pacientes con bacteriemias.

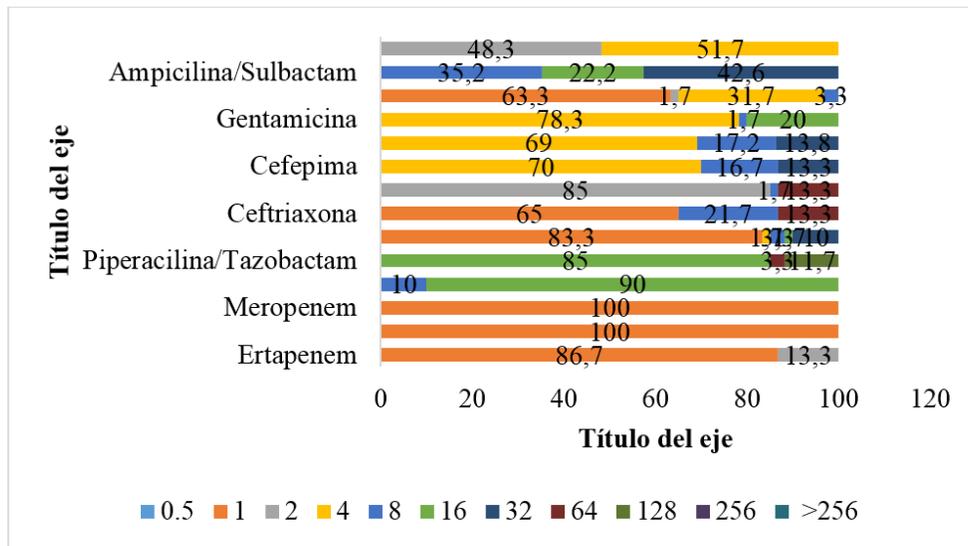


Figura 10: MIC (mcg/mL)

Según los datos obtenidos se encuentra una alta resistencia a Trimetroprima/Sulfametoxazol 51,7 %, seguido por Ampicilina/Sulbactam y Cirprofloxacina; estas dos también nos muestran una sensibilidad intermedia siendo mayor en Ampicilina/Sulbactam, también se demuestra que hay una sensibilidad del 100 % a carbapenemicos de amplio espectro, en cuanto a la concentración inhibitoria mínima de Trimetroprima /Sulfametoxazol tiene una sensibilidad a concen-

traciones de 2 mcg/mL (48.3 %) y 4 mcg/mL (51.7 %); es importante resaltar que la concentración inhibitoria mínima para carbapenemicos de amplio espectro es 1 mcg/mL, excepto para Ertapenem donde un pequeño porcentaje (13,3 %) muestra que es sensible a concentraciones de 2 mcg/mL. En general encontramos una sensibilidad a la mayoría de antibióticos a bajas concentraciones (figura 9, 10).

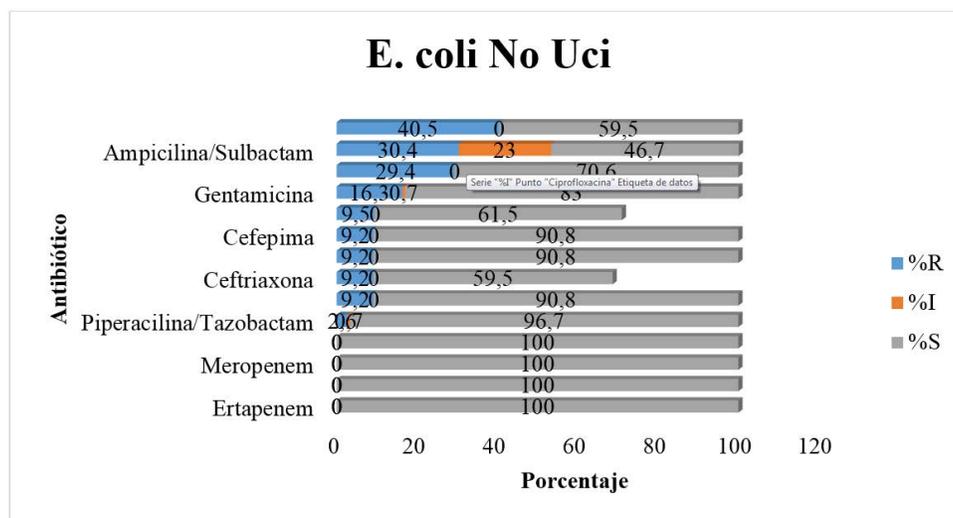


Figura 11: Perfil de resistencia E. coli No UCI

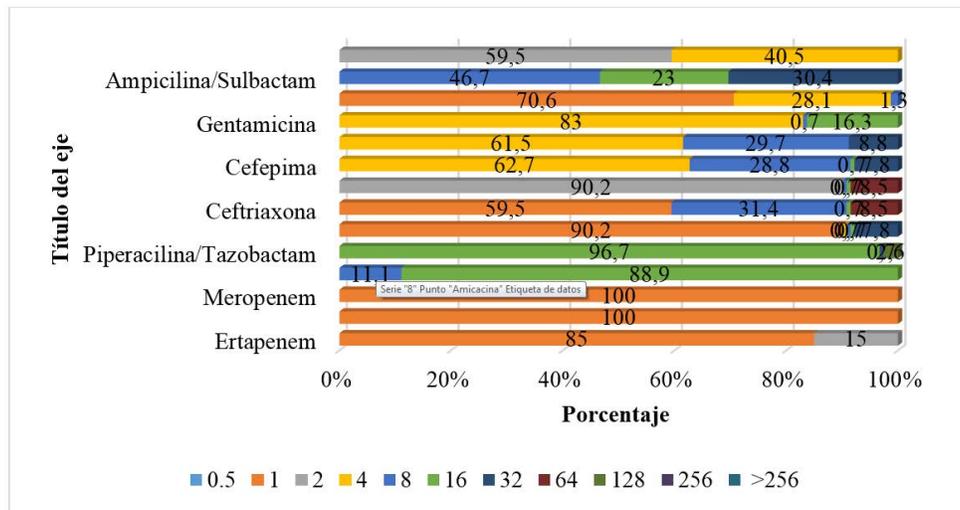


Figura 12: MIC (mcg/mL)

Se encontró resistencia a Trimetoprima/Sulfametoxazol (40,5 %), Ampicilina/Sulbactam (30,4 %), Ciprofloxacina (29,4 %) y Gentamicina (16,3 %), en mayor proporción que Aztreonam, Cefepima, Cefotaxima (9,2 %) y Cefalosporinas de tercera generación en los servicios no UCI de la institución, también se registra una sensibilidad intermedia de un porcentaje significativo (23 %) a Ampicilina/Sulbactam, se evidencia que Trimetoprima/Sulfametoxazol tiene una sensibilidad a

concentraciones de 2 mcg/mL (59,5 %) y 4 mcg/mL (40,5 %); mientras que Ampicilina/Sulbactam registra sensibilidad a mayores concentraciones, es de importancia resaltar que únicamente un pequeño porcentaje (8,5 %) registran sensibilidad a concentraciones de 64 mcg/mL Cefotaxima y Ceftriaxona ya que estos antibióticos son de la familia de las cefalosporinas los cuales llegan a ser más estables ante muchas β -lactamasas bacterianas (figura 11, 12).

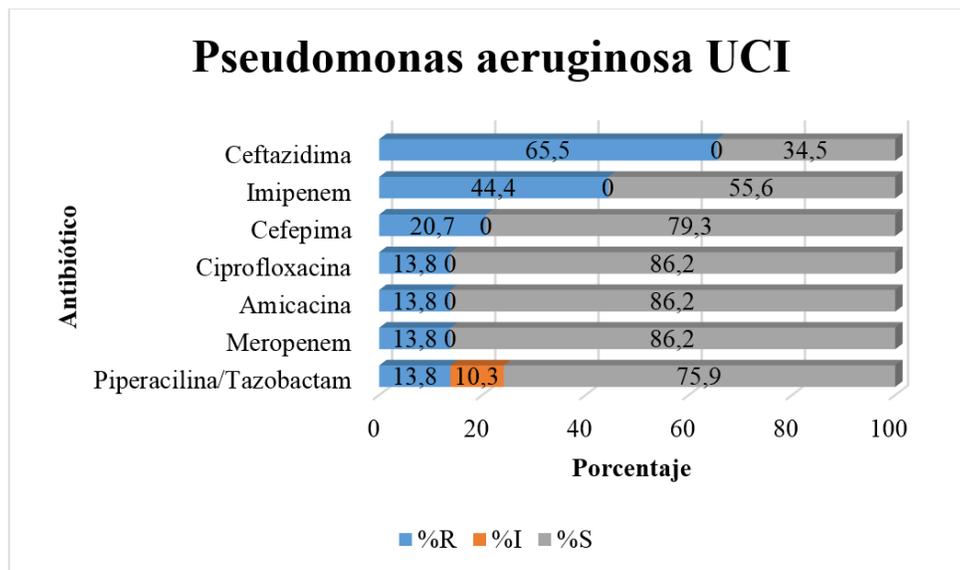


Figura 13: Perfil de resistencia Pseudomonas aeruginosa UCI

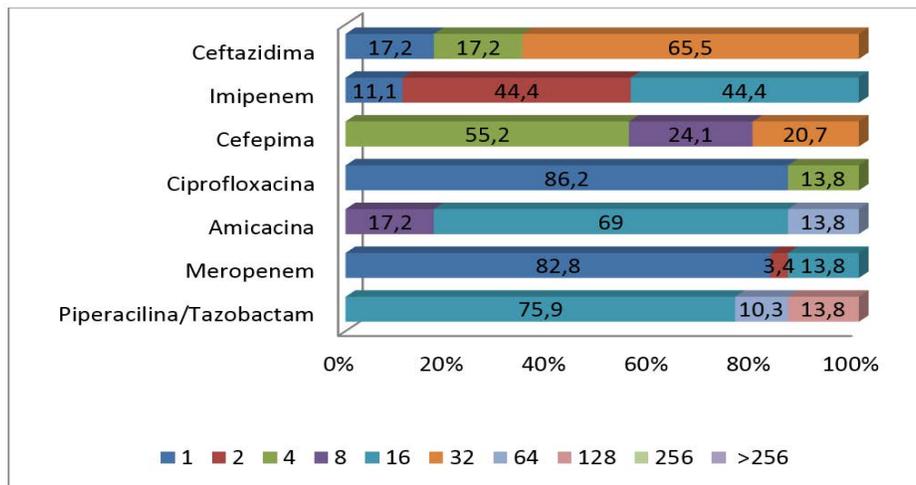


Figura 14: MIC (mcg/mL)

Según los datos obtenidos se encuentra una resistencia del 65,5 % a Ceftazidima y del 44,4 % a Imipenem, valores que nos pone a reflexionar sobre el uso de antibióticos de amplio espectro, que en el caso de Ceftazidima es uno de los últimos antibióticos a usar en el tratamiento de una infección; por otro lado se evidencia una sensibilidad intermedia para Piperacilina/Tazobactam (10,3 %) y abordando la concentración mínima inhibitoria los hallazgos muestran que un alto por-

centaje (65,5 %) es sensible a Ceftazidima a una concentración de 32 mcg/mL, al igual que el 20,7 % a Cefepima en la misma concentración exponiendo una resistencia a cefalosporinas, sin embargo se encuentra una sensibilidad alta (86,2 %) a concentraciones bajas (1 mcg/mL) de Ciprofloxacina; es de importancia resaltar que hay un pequeño porcentaje que también es sensible a bajas concentraciones de Ceftazidima e Imipenem (figura 13, 14).

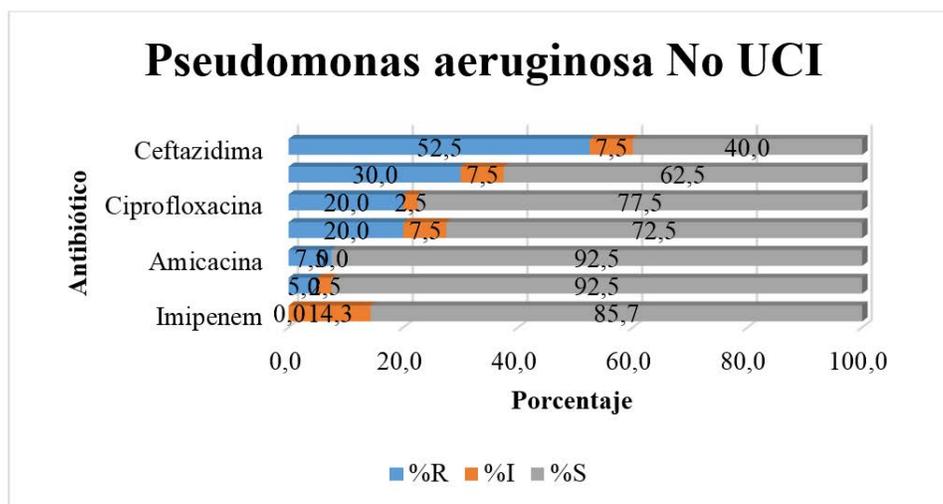


Figura 15: Perfil de resistencia Pseudomonas aeruginosa No UCI

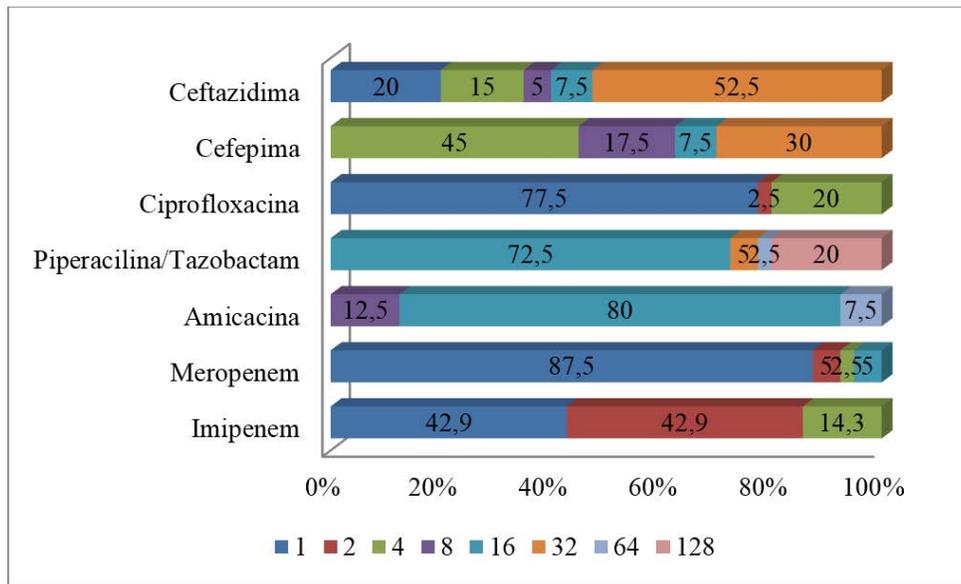


Figura 16: MIC (mcg/mL)

Se encontró una sensibilidad intermedia en todos los antibióticos analizados excepto a Amikacina, una resistencia significativa a Ceftazidima (52,5 %) y Cefepima (30,0 %), no se registra una resistencia a Imipenem sin embargo se encontró que en este hay una mayor sensibilidad intermedia (14,3 %); se encuentra también una sensibilidad elevada

a fluoroquinolonas y carbapenemasas como Meropenem. Cabe resaltar que se registra una concentración mínima inhibitoria elevada (32 mcg/mL) en Ceftazidima (52,5 %), Cefepima (30,0 %) y en un pequeño porcentaje (5,0 %) Piperacilina/Tazobactam, en el cual el 20 % fue sensible a una concentración de 128 mcg/mL (figuras 15,16).

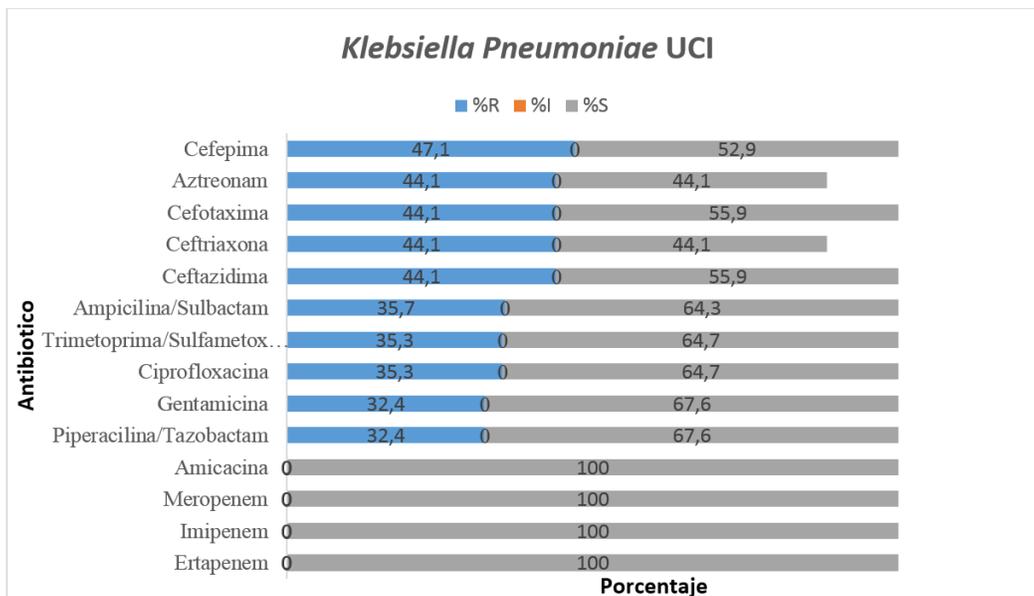


Figura 17: Perfil de resistencia Klebsiella Pneumoniae UCI

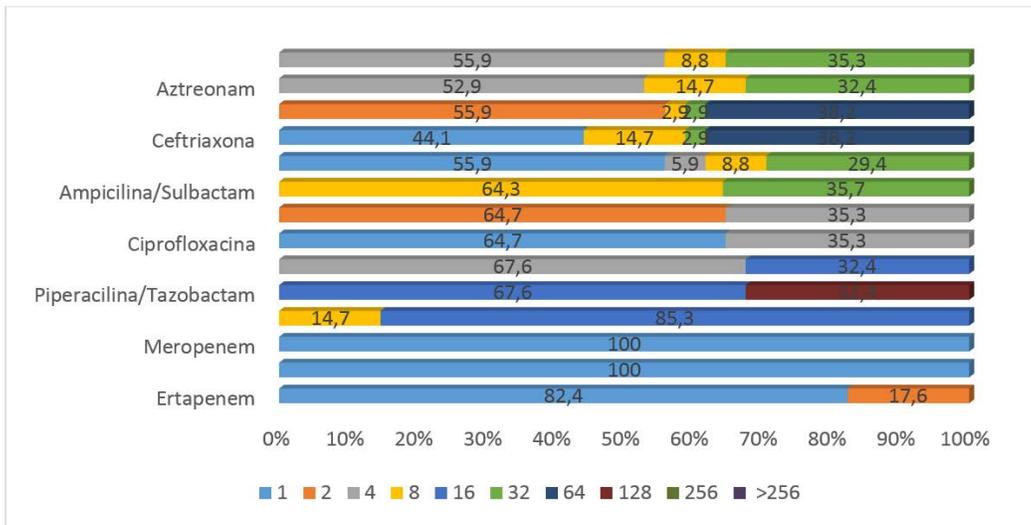


Figura 18: MIC (mcg/mL)

Según los datos analizados se observa una resistencia a Cefepima (47,1 %) seguido por Aztreonam y cefalosporinas como Cefotaxima y Ceftriaxona, también se encuentra resistencia a fluoroquinolonas, se evidencia una sensibilidad del 100 % a carbapenemasas; la MIC de Cefepima fluctua entre 4mcg/mL (55,9 %), 8 mcg/mL (8,8 %) y 32 mcg/mL (35,3 %) siendo estos datos similares a

la MIC para Aztreonam excepto a una concentración de 8 mcg/mL en donde se registra casi el doble (14,7 %). En el caso de las carbapenemasas la concentración mínima inhibitoria es 1 mcg/mL excepto para Ertapenem en donde se halló que el 17,6 % es sensible a una concentración de 2 mcg/mL (figura 17, 18).

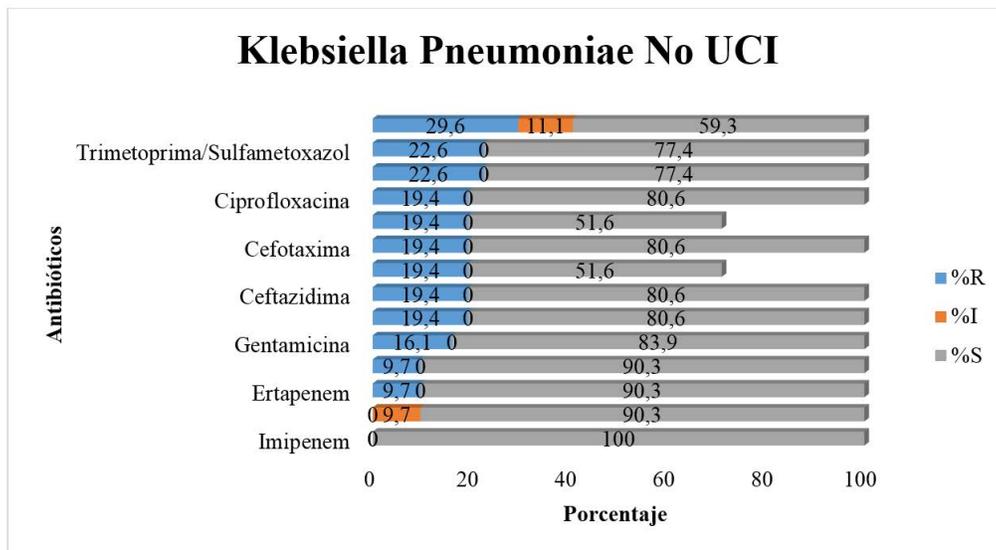
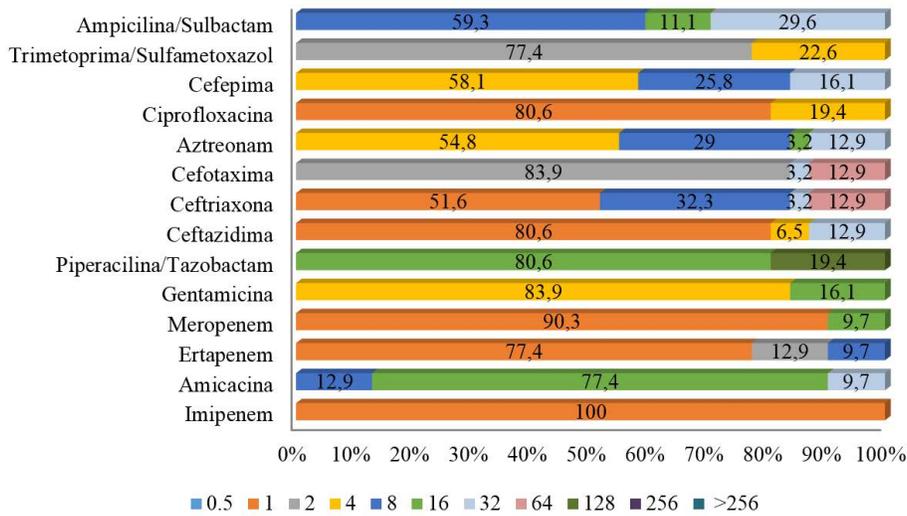


Figura 19: Perfil de resistencia Klebsiella Pneumoniae No UCI



Fuente 20: MIC (mcg/mL)

De acuerdo al análisis realizado se obtuvo una mayor resistencia a Ampicilina/Sulbactam seguida por Trimetoprima/Sulfametoxazol y Cefepima, encontrando en la primera un sensibilidad intermedia del 11,1 %, se registra también una resistencia baja (19,4 %) a cefalosporinas y betalactámicos, también se evidencia una mínima resistencia (9,7 %) a algunas carbapenemasas, es de importan-

cia resaltar que se observa una sensibilidad intermedia (9,7 %) a Amikacina. Se evidencia un MIC para Ampicilina/Sulbactam de 8 mcg/mL (59,3 %) y para Trimetoprima/Sulfametoxazol de 128 mcg/mL siendo este un MIC elevado comparado con el resto de antibióticos analizados que reportan MIC bajos entre 1 mcg/mL y 6 mcg/mL (figura 19, 20).

Staphylococcus aureus UCI

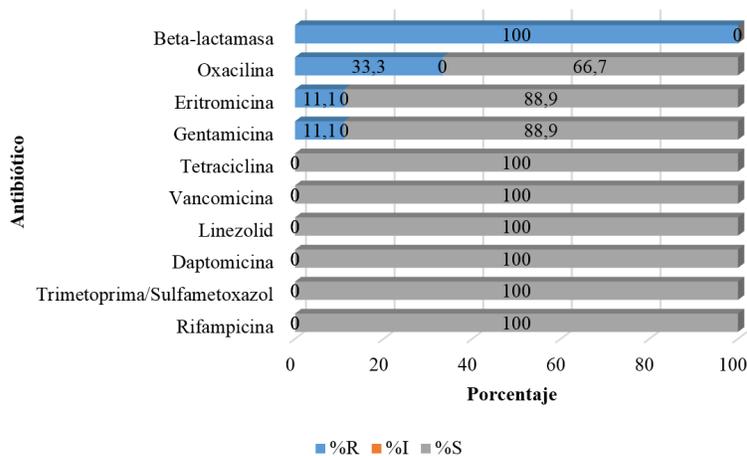


Figura 21: Perfil de resistencia Staphylococcus aureus UCI

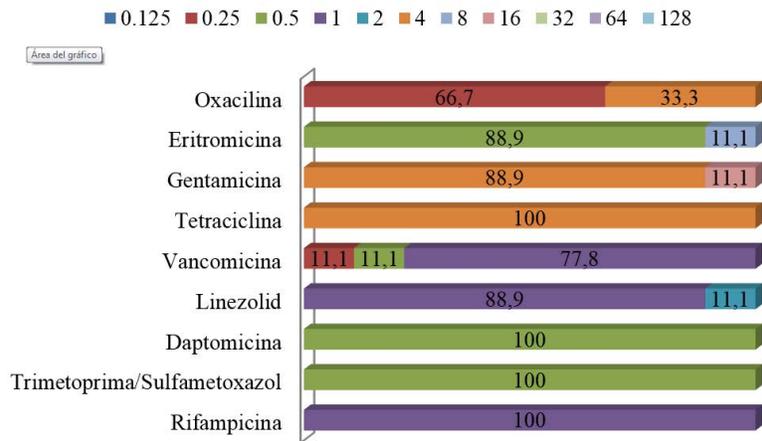


Figura 22: MIC (mcg/mL)

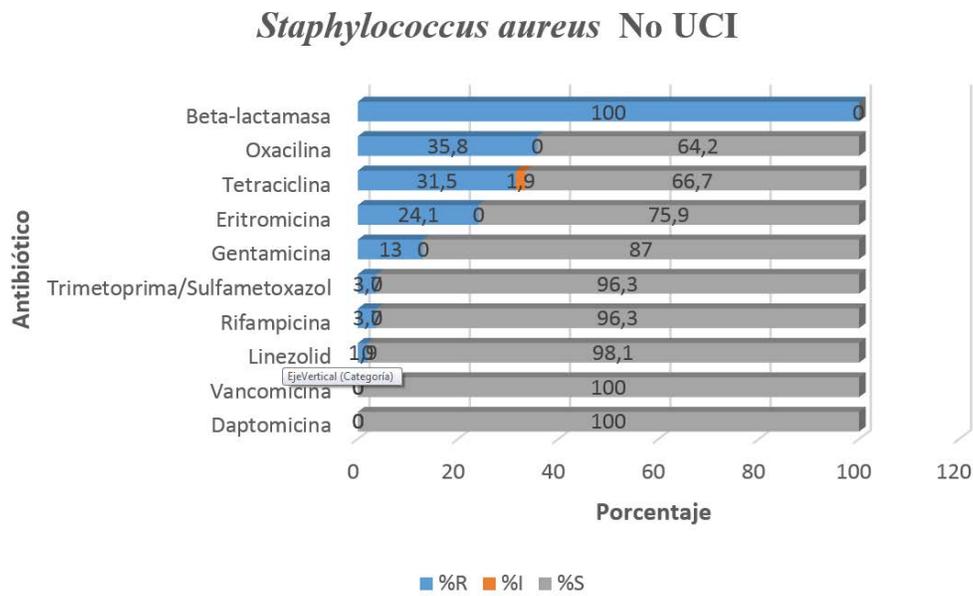


Figura 23: Perfil de resistencia Staphylococcus aureus NO UCI

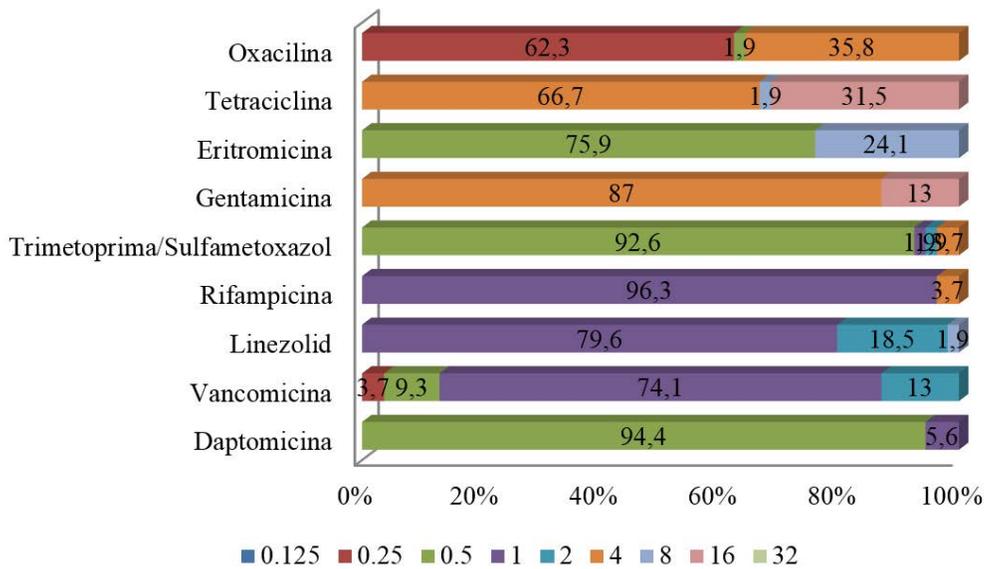


Figura 24: MIC (mcg/ml)

De acuerdo al estudio realizado los antibióticos que registraron mayor resistencia fueron oxacilina (35,8 %) y tetraciclina (31,5 %), este también tiene una sensibilidad intermedia de 1,9 % y se evidencia una sensibilidad total a vancomicina y daptomicina. En cuanto a la concentración mínima inhibitoria el 62 % oxacilina registra una concentración de 0,25 mcg/ml, al igual que el 3 % a vancomicina, antibióticos con gentamicina y tetraciclina evidencian altos porcentajes que son sensibles a una concentración de 4mcg/ml, también se observa una sensibilidad a la eritromicina, trimetoprima/ sulfametoxazol y daptomicina pero en altas concentraciones (Figura 23,24).

DISCUSIÓN

Los estudios investigativos realizados en Colombia sobre las bacteriemias y las infecciones asociadas a la atención en salud han sido pocos, lo que genera la necesidad y

pertinencia de la generación de estudios que permitan analizar las situaciones en Salud, en las diferentes complejidades, que puedan aportar con base en los resultados y la evidencia científica a la proyección de acciones de mejora que potencien la calidad y la seguridad en la atención a los pacientes.

A nivel de latino América el primer estudio que se ha realizado ha sido el estudio IBEAS Prevalencia de efectos adversos en hospitales de Latinoamérica, este estudio que se realizó en 5 países latino americanos permitió identificar los diez principales causas de eventos adversos dentro de los cuales se encontró que las infecciones asociadas a la atención en salud ocupan el principal lugar representando el 37,14 % , dentro de este porcentaje se observó que el 5 % fueron bacteriemias, de las cuales el 2,23 % fueron asociadas a la atención en salud (22). En el presente estudio de los 118 casos con hemocultivos positivos el 67,79 % fueron pacientes que cumplieron los criterios para bacte-

riemia, teniendo a la población utilizada para el estudio se evidencia un alto porcentaje de adquisición de bacteriemia.

En un estudio realizado en España la incidencia a nivel global de las bacteriemias fue de 0,85 % por cada 1000 habitantes/año y de 31,15 % episodios por cada 1000 ingresos/años. Por otra parte, la media de edad fue de 69 años, dentro de los cuales los hombres representaron el 59 % de la población de estudio (23). Mientras que en la presente investigación al realizar el recuento total entre hombres y mujeres con bacteriemia positiva se observó que el 43,75 % eran hombres con una media de edad de 55 años y el 56,25 % mujeres con una media de edad de 63 años. Los pacientes del estudio realizado a nivel internacional se caracterizaron por presentar Hipertensión Arterial 50 %, dislipidemia 49,3 %, obesidad 36,6 %, Diabetes Mellitus 32 % y el hábito tabáquico 20,3 %, mientras que en la presente investigación se observó que la Hipertensión Arterial se presentó en el 50 % de los pacientes, seguida del hipotiroidismo 21 %, Diabetes Mellitus 20 %, insuficiencia Renal Crónica 19 %, inmunosupresión por CA en el 16 % de los pacientes. Se puede observar que la hipertensión y la diabetes Mellitus es prevalente en pacientes que han adquirido bacteriemia.

Por otra parte, según el lugar de adquisición de la bacteriemia se encuentra a nivel internacional, en la investigación realizada en España, que el 55 % fueron bacteriemias comunitarias, 16 % asociadas a los cuidados sanitarios y 29 % nosocomiales (23). En el estudio que se realizó en la clínica de mediana complejidad de Manizales se encontró que de los 80 pacientes positivos para bacteriemia en cuanto al lugar de adquisición se encontró que el 46,25 % fueron bacteriemias adquirida en la comunidad, 45 % bacterie-

mias como Infección asociada a la atención en salud y en menor medida la extra hospitalaria 8,75 % (adquirida en otra institución).

En cuanto a la mortalidad de los pacientes en un estudio se evidencio que la mortalidad global fue del 24,3 %, de los pacientes con bacteriemia de origen nosocomial fue del 48,7 %, de las asociadas a los cuidados sanitarios del 29,4 % y de las comunitarias del 16,4 % (23). Mientras que la presente investigación se dio una mortalidad global del 20 % de las cuales el 50 % fueron pacientes con bacteriemias asociadas a la atención en salud, mientras el otro 50 % eran pacientes que adquirieron la bacteriemia en la comunidad. Se puede evidenciar que la mortalidad global y la mortalidad asociada a pacientes con bacteriemia en los dos estudios se encuentran con valores similares.

Por otra parte, a través de la técnica multivariada de escalamiento óptimo llamada Análisis de correspondencias múltiples (HOMALS - Homogeneity Analysis), mediante la Razón de probabilidad (OR) permite afirmar que los pacientes que ingresan al servicio de UCI tienen 1,75 más probabilidades de adquirir una bacteriemia que aquellos pacientes que se encuentran en otros servicios. Así mismo mediante esta técnica se evidenció que el adquirir la bacteriemia depende más del lugar de adquisición de la misma que del servicio donde estuvo el paciente, ya que este según su estado hemodinámico puede estar en varios servicios durante la hospitalización, esta afirmación puede ser evidenciada mediante las figuras 7 y figura M1-4.

Frente a la caracterización microbiológica de la institución se encontró que los microorganismos aislados con frecuencia en hemocultivos fueron *Escherichia coli* (17,50 %), *Pseudomonas aeruginosa* (11,25 %), *Kleb-*

siella pneumoniae (8,75 %) y Staphylococcus aureus (8,75 %) y en una menor proporción Pasteurella aerogenes, (1,25 %) Listeria monocytogenes (1,25%), Klebsiella oxytoca ESBL (1,25 %), Acinetobacter Iwofffe (1,25 %). igual que en el estudio Bacteriemias en un hospital de segundo nivel: Estudio epidemiológico, análisis de factores pronósticos asociados a mortalidad y estimación de su coste económico y la investigación realizada en Colombia Perfil microbiológico de la Infecciones en Unidades de Cuidados Intensivos de Colombia (EPISEPSIS Colombia)” E. coli es la bacteria más prevalente en esta institución (25).

Teniendo en cuenta la importancia de conocer la resistencia de cada microorganismo, encontramos que E. coli tanto en UCI como en los demás servicios es resistente sobre todo a antibióticos como Trimetoprima/Sulfametoxazol, Ampicilina/Sulbactam, Ciprofloxacina y Gentamicina; mostrando una resistencia intermedia para Ampicilina/Sulbactam en todos los servicios; en el estudio Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali – Colombia (27) se reporta resistencia para ampicilina/sulbactam en promedio 35 %, siendo ligeramente mayor (36 %) en UCI, sin embargo en este no se tienen datos de una resistencia intermedia. Respecto a Pseudomonas aeruginosa encontramos una resistencia del 65,5 % a Ceftazidima en UCI y en el resto de servicios una resistencia menor (52,5 %), es de importancia resaltar que en el servicio de UCI se registra una resistencia del 44,4 % a Imipenem, mientras que en el restante de servicios se registra una sensibilidad intermedia del 14,3 %; en este mismo servicio se encontró una sensibilidad intermedia a Meropenem, Piperacilina/Tazobactam, Ciprofloxacina, Cefepima y

Ceftazidima, únicamente Amicacina no tiene una resistencia intermedia; la investigación realizada por Martínez EB, Hernández C, Pallaresa C, Pacheco R, Hurtado K, Recaldee M. Pseudomonas aeruginosa mostró una resistencia promedio a carbapenémicos en UCI, hospitalización y urgencias de 22 % que en nuestro caso solo el servicio de UCI supera por mucho este promedio.

En el caso de Klebsiella pneumoniae no se registra sensibilidad intermedia en el servicio de UCI, mientras que en otros servicios se tiene una sensibilidad intermedia a Ampicilina/Sulbactam y Amicacina, también se evidencia una resistencia de 47,1 % a Cefepima y del 44,4 % a Aztreonam, Cefotaxima, Ceftriaxona y Ceftazidima en el servicio de UCI, en el resto de servicios quien reporta mayor resistencia es Ampicilina/Sulbactam seguido por Trimetoprima/Sulfametoxazol y Cefepima, estos datos comparados con los registrados por otros estudios muestran una mayor resistencia a cefalosporinas de tercera generación (27).

En otros estudios realizados sobre las Bacteriemias en un hospital de segundo nivel: Estudio epidemiológico, análisis de factores pronósticos asociados a mortalidad y estimación de su coste económico encontramos una resistencia de S. aureus a meticilina del 23 %, mientras que la investigación hecha en Colombia mostró un promedio de resistencia del 38 % para oxacilina en UCI, siendo el promedio de esta resistencia menor en nuestro caso 33,3 % en UCI y 35,8 % en el resto de servicios (23, 27). Los resultados obtenidos en nuestro estudio son coherentes con otros encontrados al realizar la revisión bibliográfica, sin embargo, podemos evidenciar un incremento en el porcentaje de resistencia de diferentes antibióticos, por lo cual es importante revisar y analizar los tra-

tamientos brindados a los pacientes ya que estos influyen de manera directa en la variación en sensibilidad o resistencia de determinados microorganismos.

CONCLUSIONES

- Los datos obtenidos permitieron establecer un panorama epidemiológico de las bacteriemias, determinando que la población de mayor riesgo para adquirir una bacteriemia son las del sexo femenino con una media de edad de 63 años, mientras en el masculino la media de edad es de 55 años de edad. Sumado a ello se evidencia que dentro de las tres principales comorbilidades (Hipertensión arterial, Diabetes Mellitus e hipotiroidismo), en las mujeres hay más prevalencia de enfermedades de base en comparación, de los hombres que las presentaron en menor medida.
- A partir de esta investigación se concluye que el servicio de UCI continúa siendo el de mayor incidencia para este tipo de IAAS, frente a los demás servicios; esta afirmación parte del cálculo de la Razón de probabilidad (OR). Por otra parte, mediante las medidas de discriminación realizadas a las diferentes variables, se evidenció que las bacteriemias dependen más del lugar de adquisición de la misma, que del servicio donde se tomó la muestra, ya que el paciente según su estado hemodinámico puede estar en varios servicios durante la hospitalización.
- De acuerdo a los hallazgos se pudo concluir que el microorganismo más prevalente es E. coli tanto en el ser-

vicio de UCI como en los demás. Así mismo el perfil microbiológico de la institución es similar al de otros estudios realizados; sin embargo, se encontró resistencia a múltiples antibióticos dentro de estos algunos de amplio espectro como las cefalosporinas y los carbapenémicos, por lo cual se debe analizar su uso, pues estos deben ser la última opción terapéutica en casos de tratamientos específicos y no es aconsejable que sean utilizados en tratamientos empíricos, ya que pueden estar aumentando la resistencia a los mismos.

RECOMENDACIONES

- Fortalecer las técnicas de asepsia, las normas de bioseguridad y de buenas prácticas frente a la seguridad del paciente entre los profesionales de la salud, con el fin no solo de reducir posibles riesgos sino además con el fin de brindar una calidad de vida a los pacientes durante la estancia hospitalaria.
- Continuar con el seguimiento al perfil de resistencia y las IAAS, que generen trazabilidad para intervención posterior.
- Establecer planes educativos con jornadas de capacitación y actualización sobre uso de antibióticos y microbiología.

Referencias Bibliográficas

1. ins.gov.co [Internet]. Bogotá (Colombia). [consultado el 16 de Marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/iaas/paginas/que-son-las-iaas.aspx>
2. Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud. Organización Mundial de la Salud. [Citado el 17 de Marzo de 2016]. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22315&Itemid
3. Ministerio de sanidad y política social. Estudio IBEAS Prevalencia de efectos adversos en hospitales de Latinoamérica [internet]. 2009 [citado el 7 de marzo del 2016]. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/RESULTADOS_%20ESTUDIO_%20IBEAS.pdf
4. Ministerio de Salud y Protección Social [Internet]. Paquetes instruccionales: detectar, prevenir y reducir infecciones asociados con la atención en salud. 2016 [citado el 17 de Marzo]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/Detectar-Infecciones.pdf>
5. Gosling R. Prevalence of hospital-acquired infections in a tertiary referral hospital in northern Tanzania. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* [Internet]. 2003 [Citado el 18 de marzo del 2016]; 97:69-73. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12662424>
6. Jroundi I, Khoudri I, Azzouzi A, et al. Prevalence of hospital-acquired infection in a Moroccan university hospital. *Am J Infect Control* [Internet]. 2007 [Citado el 18 de marzo del 2016]; 35 (6):412-6. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Redouane_Abouqal/publication/6179035_Prevalence_of_hospital-acquired_infection_in_a_Moroccan_university_hospital/links/54b6881a0cf2e68eb27e9b2e.pdf?origin=publication_list
7. Klevens RM, Edwards JR, Horan T, Gaynes R, Pollock D. Estimating healthcare-associated infections in U.S. hospitals 2002. *Public Health Rep* [Internet]. 2007 [Citado el 17 de marzo del 2016]; 122:160-166. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1820440/#>
8. World Health Organization. Patient Safety Programme. Geneva, Switzerland. Report on the Burden of Endemic Health Care Associated Infection Worldwide. World health [internet]. 2011 Organization [citado el 15 abril del 2016]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507_eng.pdf
9. Secretaria Distrital de Salud de Bogotá. Vigilancia en Salud Pública. Seguridad del Paciente. Boletín Epidemiológico Distrital de infecciones asociadas al cuidado de la salud 2010. Disponible en: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Paginas/IIIH.aspx>
10. Scott Rd. The Direct Medical Costs of Healthcare-Associated Infections in U.S. Hospitals and the Benefits of Prevention. CDC [Internet]. 2009 [citado el 15 de abril 2016]. Disponible en: https://www.cdc.gov/HAI/pdfs/hai/Scott_CostPaper.pdf
11. Schmunis GA, et al. Costo de la infección nosocomial en unidades de

- cuidados intensivos de cinco países de América Latina: llamada de atención para el personal de salud. *Rev Panam Infectol* [Internet]. 2008 [Citada el 15 de abril del 2016];10 (4): S70-77. Disponible en: <http://www.revistaaapi.com/2008-volume-10/suplemento-1-2008/>
12. World Health Organization. Guía de la OMS sobre higiene de manos. [consultado el 15 de abril del 2016]. Disponible en: http://www.med.unlp.edu.ar/archivos/noticias/guia_lavado_de_manos.pdf
 13. Ministerio de Salud y Protección Social [Internet]. Indicadores de calidad. Bogotá 2016 [actualización 15 de abril de 2016, Citado 15 de abril de 2016]. Disponible en: <http://calidadensalud.minsalud.gov.co/IndicadoresdeCalidad/Indicadores.aspx>
 14. World Health Organization. Guía de la OMS sobre higiene de manos. [consultado el 15 de abril del 2016]. Disponible en: http://www.med.unlp.edu.ar/archivos/noticias/guia_lavado_de_manos.pdf
 15. Fuller C e Savage J, Besser S, Hayward A, Barry Cookson B, et al. Multicenter intervention program to increase adherence to hand hygiene recommendations and glove use and to reduce the incidence of antimicrobial resistance. *Infection Control and Hospital Epidemiology* [Internet]. 2007 [Citado el 15 de abril del 2016], 28:42- 49. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/10.1086/662619>
 16. Gordin FM et al. Reduction in nosocomial transmission of drug-resistant bacteria after introduction of an alcohol-based handrub. *Infection Control and Hospital Epidemiology* [Internet]. 2005 [Citado el 16 abril del 2016]; 26:650-653. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16092747>
 17. Instituto Nacional de Salud [Internet]. Bogotá (Colombia): [Actualizado 17 de marzo de 2016; Citado el 17 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/iaas/paginas/que-son-las-iaas.aspx>
 18. Organización Mundial de la Salud [Internet]. [Actualizado 17 de marzo de 2016; Citado el 17 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
 19. Ministerio de Salud y Protección Social. Bogotá 2016 [Actualizado 17 de marzo de 2016, Citado el 17 el marzo de 2016] Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/Detectar-Infecciones.pdf>
 20. Circular 045 del 2012: Implementación de las estrategias e vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, Resistencia y Consumo de Antibióticos. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/normatividad/Normatividad/Forms/DispForm.aspx?ID=47>
 21. Boletín Epidemiológico de Resistencia Bacteriana. [Fecha de consulta 16 de mayo del 2016] Disponible en: [http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Resistencia %20Bacteriana/Boletines/Bolet %C 3 %ADn %20IAAS %20 2014.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Resistencia%20Bacteriana/Boletines/Bolet%203%20ADn%20IAAS%202014.pdf)
 22. Ministerio de sanidad y política social. Estudio IBEAS Prevalencia de efectos adversos en hospitales de Latinoamérica [internet]. 2009 [citado el 7 de marzo del 2016]. Disponible en: [tps://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/ RESULTADOS %20ESTUDIO %20 IBEAS.pdf](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/RESULTADOS%20ESTUDIO%20IBEAS.pdf)

23. Hernández JJR, García EV, Hernández A, Canteras M, Herrero JA, Cascales E, Mene EF, et al. Bacteriemias en un hospital de segundo nivel: Estudio epidemiológico, análisis de factores pronósticos asociados a mortalidad y estimación de su coste económico. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2013 [Citado 11 de marzo 2016]; 26(2):119-12. Disponible en: <http://seq.es/seq/0214-3429/26/2/hernandez.pdf>
24. Lizaso D., Aguilera K., Correa M, Yantorno M. L., Cuitiño M, Pérez L., et al, et al. Epidemiología y factores de riesgo de mortalidad de las Bacteriemias intrahospitalarias por bacilos gramnegativos. *Rev Chil Infect* 2008; 25 (5): 368-373. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000500010
25. Molina F.J, Díaz C.A, Barrera L, De La Rosa G, Dennis R Dueñas C, et al. Perfil microbiológico de la Infecciones en Unidades de Cuidados Intensivos de Colombia. *Scielo* [Internet]. 2011 [Citado el 7 de marzo 2016];35(2):75-83 Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/medinte/v35n2/original2.pdf>
26. Londoño JR, Macias ICO, Ochoa FLJ. Factores de riesgo asociados a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014 [Internet]. 2016[Citado 11 de marzo 2016]; 20(2):7-83. Disponible en: http://ac.els-cdn.com/S0123939215000922/1-s2.0-S0123939215000922-main.pdf?_tid=cdfe918e-e7f5-11e5-92a4-00000aabb0f27&acdnat=1457748041_9c4d8ea525dd6c9f01c187a2d28931d7
27. Martínez EB, Hernández C, Pallaresa C, Pacheco R, Hurtado K, Recaldee M. Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali – Colombia [Internet]. ELSEVIER. 2014 [citado el 19 de marzo del 2016]; 18(1):3–11. Disponible en: http://www.scielo.co/scielo.php?script=sci_issue-toc&pid=0123-939220140001&lng=es&nrm=iss
28. Rosenthal VD, Maki DG, Mehta Y, Leblebicioglu H, Memish ZA, et al. International Nosocomial Infection Control Consortiu (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. *American Journal of Infection Control* [Internet]. 2014 [Citado el 12 de mayo del 2016] 42(9):942-56.
29. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) José Miguel Cisneros-Herrerosa, Javier Cobo-Reinosob, Miquel Pujol-Rojoc, Jesús Rodríguez-Bañod y Miguel Salavert-Lletíe *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25(2):111-30
30. C. Sabatier, R. Peredo y J. Valles .Bacteriemia en el paciente crítico. *Med Intensiva*. 2009(citado 16 de abr 2016);33(7):336–345. Disponible en:
31. Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 25(2):111-30.
31. Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con

- bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25(2):111-30.
32. Wenzel RP. Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2007 [Citado el 19 de mayo del 2016]; 45 (1):S85-8. Disponible en: http://cid.oxfordjournals.org/content/45/Supplement_1/S85.full.pdf.
 33. Horan TC, Gaynes RP. Surveillance of nosocomial infections. In: *Epidemiology and Infection Control*. 3rd ed. Mayhall CG, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 1659-1702. http://www.indicadores-clinicos.com/definitiva/documentacion/CRITERIOS_CDC_2005.pdf
 34. Álvaro Quintana. Antibióticos bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. [Consultado 17 de abr 2016]. Disponible en: http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap_%2028.pdf
 35. Who.int [internet]. Resistencia a los antimicrobianos: el drama del abuso. [Citado el 17 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/88/11/10-031110/es/>
 36. Álvaro Quintana. Antibióticos bases microbiológicas del uso de antimicrobianos. [Consultado 19 de mayo 2016]. Disponible en: http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap_%2028.pdf
 37. República de Colombia Ministerio de Salud [Internet]. Resolución No 008430 DE 1993 [Consultado el 17 de marzo 2016] Disponible en: <https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpb-nxiaW9ldGljYXJlc2lkZW50ZXN-1ZGN8Z3g6MWNlMjMyYWI0Nm-MyZmYyOA>
 38. Ministerio de Salud y Protección Social [Internet]. Ley 911 de 1993 [Consultado el 17 de marzo 2016] Disponible en: http://www.mineduacion.gov.co/1621/articles-105034_archivo_pdf.pdf
 39. Mineduacion.gov [internet]. LEY 841 DE 2003. [Consultado 25 de mayo 2016]. Disponible en: http://www.mineduacion.gov.co/1621/articles-105030_archivo_pdf.pdf

ANEXOS

ANEXO 1

Consentimiento informado

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
“TERAPIA TRIPLE ESTANDAR COMO PRIMERA LÍNEA DE
TRATAMIENTO PARA LA ERRADICACIÓN DE HELICOBACTER PYLORI EN
PACIENTES DISPÉPTICOS DEL EJE CAFETERO”

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS PACIENTES

FECHA: _____
YO _____ he sido informado que:

La Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Libre de Pereira adelanta un proyecto de investigación denominado: “Terapia triple estandar como primera línea de tratamiento para la erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos del Eje cafetero”

Helicobacter pylori es un microorganismo que puede causar diferentes enfermedades gastroduodenales; la infección por este microorganismo es muy frecuente en la población en general y para saber si un individuo presenta o no la infección por este microorganismo se hace necesario realizar diferentes exámenes clínicos y de laboratorio. El examen clínico es realizado por médicos especialistas en Gastroenterología (Gastroenterólogo) y consiste en el estudio de los signos y síntomas gástricos complementado con endoscopia lo cual permite observar el estado en que se encuentra el estómago y a la vez permite extraer pequeñas muestras de 2 a 3 mm de tejido (biopsia).

El presente estudio tiene como objetivo cultivar la bacteria *H. pylori* de la biopsia gástrica que tomará el gastroenterólogo y con el resultado del cultivo poder clasificarlo como *H. pylori* positivo y el médico tratante decidirá su tratamiento.

Por sus características, se cataloga como una investigación de riesgo mínimo, donde se emplea toma de muestras clínicas que se practican de rutina en los centros de endoscopia. (Resolución No. 008430 de 1993). En todo momento se procurará el bienestar de la población objeto, por lo tanto, se tendrá en cuenta las siguientes consideraciones éticas:

Respeto por la autonomía: Cada paciente por su estado de dispepsia, rutinariamente se le

toma biopsia, lo hará el gastroenterólogo de la unidad de endoscopia quien informara del procedimiento a los pacientes, quienes quedarán con pleno conocimiento de las implicaciones, posibles riesgos o molestias y de los beneficios que pueden traer los resultados de dicha investigación y de la posibilidad de decidir no participar en el estudio. Anexo consentimiento informado. Justicia o igualdad de trato a toda la población.

Secreto profesional: la información que se obtendrá durante el desarrollo de la investigación solo será conocida con fines estrictamente académicos y científicos, presentando los resultados de manera global.

Reserva sobre la identidad los pacientes participantes: Se mantendrá en el anonimato la identidad de los pacientes que participen en el estudio. En ningún caso se publicará la identidad de los participantes. La información será confidencial, con claro conocimiento de ello por parte de los participantes.

El personal que participará en esta investigación es: médicos especialistas en gastroenterología quienes realizarán la toma de biopsias. Los gastroenterólogos participantes en el estudio tomarán dos biopsias una de antro y otra de cuerpo, que serán utilizadas para el cultivo y la extracción del ADN de la bacteria. Además, del análisis de resultados en el tratamiento y erradicación de la infección que será el objetivo del proyecto macro de investigación será hará con el paciente una caracterización sociodemográfica a través del seguimiento a los factores asociados a su infección por *H. pylori* en la etapa inicial, durante el tratamiento y con el resultado histopatológico de la entidad promotora de salud. Si por alguna circunstancia se presentará alguna complicación en la realización del procedimiento endoscópico, los gastroenterólogos se harán responsables por el manejo y tratamiento de las complicaciones.

Dos microbiólogos y dos bacteriólogas serán quienes procesen las biopsias para su cultivo, pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y pruebas moleculares.

El equipo de investigación no se hace responsable de enfermedades o accidentes ajenos al procedimiento de la toma de las biopsias que se hayan presentado antes, durante o después que se termine la investigación.

Los beneficios obtenidos de esta investigación ampliarán el conocimiento epidemiológico y de tratamiento de la enfermedad gastroduodenal asociada a la infección por *H. pylori*, los cuales serán aplicables a la población del Eje cafetero. Los pacientes se beneficiarán al tener un diagnóstico definitivo por cultivo, si resultaran *H. pylori* positivos recibirán tratamiento anti-*Helicobacter* gratuito consistente en terapia triple estándar (TTE) suministrado y supervisado por los gastroenterólogos participantes en la investigación. Se hará un seguimiento del paciente para establecer si la bacteria fue erradicada o no, condición que será demostrada por métodos que no se realizan de rutina en el diagnóstico de la infección por *H. pylori* (Antígenos de *H. pylori* en heces). Si persiste la infección se retratará con una segunda o tercera línea de tratamiento suministrado en forma gratuita por el grupo investigador. Es deber del paciente cumplir con el tratamiento instaurado por el gastroenterólogo y llevar un muestra

de materia fecal después de 30 días de terminado el tratamiento, en ningún momento en esta investigación se volverá a realizar la endoscopia. Si el gastroenterólogo la sugiere deberá ser responsabilidad de la entidad de salud a la cual está afiliado el paciente y que autorizó la primera endoscopia.

Durante el desarrollo de esta investigación se darán reportes parciales del avance de la investigación, garantizando la privacidad de los resultados lo cual se hace extensivo a futuras publicaciones.

Los participantes de esta investigación lo hacen libremente, sin ninguna coacción, podrán expresar su voluntad de retiro en el momento que así lo deseen y su condición de voluntario terminará al concluir la demostración del éxito o fracaso de la erradicación de *H. pylori*. No tendrán remuneración económica a cargo del equipo de investigación y los costos del procedimiento endoscópico serán por la entidad de salud que solicita el servicio. Los costos del cultivo, tratamiento anti-Helicobacter, antibiograma, demostración del éxito o fracaso de la erradicación de *H. pylori* serán asumidos por financiación del proyecto de investigación.

El paciente o su representante legal tendrán la posibilidad durante este estudio y después del mismo de formular todas las preguntas que crean convenientes sobre el tema y que estas serán contestadas satisfactoriamente por el gastroenterólogo cuando sus inquietudes sean relacionadas con la parte clínica y del procedimiento endoscópico; cuando las inquietudes sean acerca de los procedimientos de laboratorio podrá comunicarse con los investigadores principales de cada institución Adalucy Alvarez Aldana al teléfono 3148141454 docente de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad libre seccional Pereira y Jorge Javier Santacruz Ibarra al teléfono 3162455397 docente de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira”.

Durante el desarrollo de la investigación habrá una supervisión del Comité de Bioética de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Por todo lo anterior he quedado informado y acepto participar en el proyecto de investigación: “Terapia triple estandar como primera línea de tratamiento para la erradicación de Helicobacter pylori en pacientes dispépticos del Eje cafetero” que adelanta la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad libre seccional Pereira y la la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Tendré la posibilidad, durante este estudio y después de éste, de formular todas las preguntas que crean convenientes sobre el tema y que estas sean contestadas satisfactoriamente.

Tendré total garantía de confidencialidad sobre la información comunicada a los investigadores y entendí de manera satisfactoria las explicaciones que me dieron.

FIRMA Y CÉDULA DEL PACIENTE

DIRECCIÓN Y TELÉFONO

FIRMA Y CÉDULA DEL TESTIGO

DIRECCIÓN TELÉFONO

ANEXO 2

Aval del comité de bioética



Sello: ORIGINAL

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
COMITÉ DE BIOÉTICA

Código: CBE-SYR-232016



Página: 1 de 1

Pereira, 13 de Octubre de 2017

Señor
Jorge Javier Santa Cruz
Investigador Principal

El Comité de Bioética de la UTP (CBE-UTP) considera que no es necesario modificar el aval dado al proyecto "**Terapia triple estándar como primera línea de tratamiento para la erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos del Eje cafetero**", según acta No.16, punto 03, numeral 27 del 12 de septiembre de 2016, con código CBE-SYR-162016, porque no se hace ningún cambio sustancial al proyecto, sino que simplemente se incrementa el tamaño de la muestra, lo cual fortalece la investigación.

Carlos Alberto Isaza Mejía
Presidente del CBE-UTP