

Nombre participante: Sebastián Rojas Lara (sebastianrojaslara@hotmail.es)
Estudiante de Medicina de IX Semestre (Quinto Año) - Andrés Julián Gutiérrez Escobar (andresgutierrez@colombia.com) Tutor (Biólogo Molecular) Profesor facultad de Medicina U.D.C.A

Programa: Genoma de *Helicobacter Pylori*, G.I.B.G.A. (Grupo de Investigación Biomédica y Genética Aplicada)

Título de la propuesta: Desarrollo de cepario y cinética de crecimiento de *Helicobacter pylori* aislado a partir de biopsias gástricas de pacientes diagnosticados con gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico y persona asintomática infectada en dos instituciones de salud en Bogotá-Colombia 2012 – 2013. (PONENCIA ORAL)

Tipo de proyecto: Proyecto de investigación- Investigación en curso

Área: Ciencias Humanas **Subárea:** Medicina Humana

Universidad: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A.)
Bogotá-Colombia Semillero: ORIATROS de la U.D.C.A. del G.I.B.G.A. (Grupo de Investigación Biomédica y Genética Aplicada)

I. Introducción:

Se calcula que *Helicobacter pylori* infecta entre el 50 y el 75% de la población mundial, En población adulta la prevalencia de la infección oscila entre el 20 y el 40% en países desarrollados en contraste con el 60 al 80%, en los países en vía de desarrollo. [1] De cada 10 personas infectadas, sólo 1 sufre enfermedad y 9 nunca la desarrollan. La infección por este patógeno se ha asociado con el desarrollo de gastritis (92% relacionado con la bacteria)[3], úlcera péptica (gástrica o duodenal),cáncer gástrico(3.008 muertes/3.959 casos)[2] y con el desarrollo de

un tipo especial de linfoma. La Organización Mundial de la Salud, ha clasificado a dicho patógeno como agente biológico carcinógeno para el hombre (categoría1).

Planteamiento del problema y justificación:

Basados en estos datos se han realizado en el país diversas investigaciones en el área microbiológica respecto *Helicobacter pylori* que han logrado un adecuado aislamiento y crecimiento de la bacteria, actualmente pocas universidades en Bogotá cuentan con un cepario de *H. pylori* debidamente cultivado y caracterizado microbiológicamente. La ausencia de este recurso impide el desarrollo de investigaciones que impliquen la extracción de su genoma, su utilización en diversas investigaciones de resistencia o la elaboración de modelos metabólicos entre otros.

Por tanto dentro de este proyecto desarrollaremos un cepario de *Helicobacter pylori* y describiremos la cinética de crecimiento de la bacteria obtenida a partir de biopsias gástricas de pacientes diagnosticados con gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico y persona asintomática infectada en la Clínica Vascular Navarra (Institución número uno) y Hospital de Engativa II nivel E.S.E. (Institución número dos) Bogotá-Colombia 2012 –2013.

Este trabajo de grado en desarrollo se enmarca dentro del proyecto “Reconstrucción de un modelo metabólico computacional a partir del genoma de cepas nativas bogotanas de *Helicobacter pylori*: identificación de genes esenciales.” Aprobado con fecha 1 de agosto de 2012 por parte de la universidad de ciencias aplicadas y ambientales U.D.C.A

Objetivo general:

Desarrollar un cepario de *Helicobacter pylori* a partir de aislamientos obtenidos de biopsias gástricas de casos clínicos puntuales.

Objetivos específicos:

- Describir la casuística y frecuencia de los diagnósticos encontrados durante endoscopia de obtención de la biopsia gástrica.
- Describir mediante gráficas la cinética de crecimiento de las cepas de *Helicobacter pylori* que se logren aislar en dos medios de cultivos estándar.
- Desarrollar una base de datos del cepario.

Referente teórico:

HELICOBACTER PYLORI

Hace más de 20 años que Barry Marshall y Robín Warren médicos australianos en 1983 descubrieron y cultivaron en mucosa gástrica humana una bacteria Gram negativa y curvo conocida actualmente como *Helicobacter pylori* que se encuentra en la mucosa gástrica del humano y que se ha asociado con diferentes enfermedades digestivas.[4][5] Es conocida la implicación fisiopatológica de esta bacteria en la gastritis crónica activa, además es uno de los factores que intervienen en la etiología multifactorial de la úlcera péptica, el Adenocarcinoma gástrico y el linfoma tipo MALT (Mucosa Linfoide Asociada a Tejido) de bajo grado de malignidad.[4][5] En 1994 la Organización Mundial de la Salud(OMS) lo identificó entre los agentes carcinógenos tipo 1[6]

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo que ha colonizado en forma natural a los seres humanos desde hace al más o menos 10.000 años. No es invasor, con forma de espiral y sus flagelos proporcionan movilidad en el entorno de la mucosa, este microorganismo tiene diversos mecanismos de resistencia como es la del ácido como es la expresión de ureasa encargada la hidrólisis de urea para producir amoniaco que amortigua la acidez gástrica. [7]

En Colombia se han desarrollado múltiples estudios de genotipificación se sabe que la prevalencia de cepas de *Helicobacter pylori* aisladas a partir de biopsias estomacales fue de 69.1%, siendo regiones representativas del país Tunja 99.1%,

Manizales 85.5%, costa atlántica con 65.4% y zona andina con 69.5%. Adicionalmente, en este estudio se identificó una correlación positiva entre edad y el tipo de lesión ya que con el envejecimiento disminuye el diagnóstico para gastritis no atrófica y mucosa gástrica normal. Mientras que para pacientes con diagnóstico de gastritis atrófica multifocal, cáncer y úlcera gástrica la prevalencia aumentó de manera proporcional a la edad. Para la ciudad de Bogotá se reporta que el 70% de la población está infectado con el microorganismo. [8]

II. Metodología:

UNIDADES DE ESTUDIO

- Todas las cepas de la bacteria que puedan ser aisladas a partir de biopsias de pacientes a quienes se realizó endoscopia de vías digestivas altas y recibieron diagnóstico de gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico y persona asintomática infectada durante el periodo de 2012 a 2013 en la Clínica Vascular Navarra y el Hospital Occidente Kennedy III nivel E.S.E.

Tipo de Estudio

- El presente trabajo aplica un componente de investigación básica que será realizado en el laboratorio de biología molecular de la U.D.C.A buscando describir la cinética de crecimiento de las diferentes cepas de *Helicobacter pylori* aisladas a partir de biopsias gástricas de casos específicos de: gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico y persona asintomática infectada. Y un segundo componente descriptivo de serie de casos sobre las patologías puntuales.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN:

Casos clínicos

Criterios de inclusión:

- Edad entre 18 y 70 años
- Realización de endoscopia de vías digestiva altas (esofagogastroduodenoscopia)

- No haber recibido tratamiento previo para erradicación de *Helicobacter pylori*, ni medicamentos anti-secretorios durante las 24 horas antes de la toma de biopsia.
- Diagnóstico positivo de cáncer gástrico, úlcera o gastritis establecido por gastroenterólogo de novo o realizado anteriormente sin haber recibido tratamiento para su patología
- Toma de biopsia de lesión.
- Crecimiento de *Helicobacter pylori* en muestra procesada
- Haber firmado consentimiento informado y autorizaciones de toma de muestra
- Presentar patologías adicionales a las evaluadas a nivel de esófago, estómago o duodeno
- Presentar patologías como Inmunosupresión (VIH/Sida, quimioterapia)
- Recibir terapia de anticoagulación o presentar hemorragia gastrointestinal activa o sangre en la cavidad gástrica
- No aceptar participar en el estudio.

Casos asintomáticos

Criterios de inclusión:

Criterios exclusión:

- Presentar enfermedades sistémicas severas (insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardiaca descompensada, insuficiencia respiratoria, tumores, enfermedades malignas)
- Presentar enfermedades sistémicas severas (insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardiaca descompensada, insuficiencia respiratoria, tumores, enfermedades malignas)
- No presentar ninguna patología a nivel de esófago,

estómago o duodeno ni
sintomatología asociada

- No haber recibido tratamiento previo para erradicación de *Helicobacter pylori*, ni medicamentos anti-secretorios durante las 24 horas antes de la toma de biopsia.
- Toma de biopsia gástrica.
- Crecimiento de *Helicobacter pylori* en muestra obtenida.
- Haber firmado consentimiento informado y autorizaciones de toma de muestra

- Tener diagnóstico de enfermedades psiquiátricas
- Presentar adicciones a drogas o alcohol.

Criterios de exclusión:

- Presentar enfermedades concomitantes serias (insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardiaca descompensada, insuficiencia respiratoria, tumores, enfermedades malignas)
- Haber recibido cirugía gástrica previa
- Mujeres en embarazo o lactantes



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

PLAN ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar el efecto de los cultivo en cada cepa se empleará las pruebas de Kruskal–Wallis y la prueba de Friedman. Adicionalmente para comparar la distribución de toda variables fue utilizada la prueba de Wilcoxon y se considerará un valor p 0.05 como estadísticamente significativo [6]

Para las variables: cepa y frecuencia diagnóstica se utilizara un análisis de frecuencia para cada una de los posibles valores los cuales serán presentadas en tablas.

ASPECTOS ÉTICOS

Dando cumplimiento a los aspectos éticos del macroproyecto y en razón que el presente trabajo se origina del mismo, se toma textualmente las consideraciones éticas: “Siguiendo el artículo 11 la presente investigación se clasifica como una investigación con riesgo mínimo ya que se necesita una biopsia gástrica extraída de los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión de la presente propuesta de investigación (Ver metodología). En resumen, esta muestra será tomada del paciente que haya sido remitido a especialista gastroenterólogo y para el cual la endoscopia sea un procedimiento medico necesario para diagnosticar una enfermedad gástrica puntual. Ningún procedimiento medico se llevará a cabo por los investigadores de la propuesta y solo se desarrollarán en la entidad medica que decida participar de la investigación. Se reitera que en los laboratorios de la Universidad de Ciencias Ambientales y Aplicadas solo trabajaremos con la muestra (Biopsia) del paciente y en ningún momento se harán procedimientos médicos diagnósticos especializados.”



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

III. Resultados:

Resultados metodológicos:

Toma y transporte de muestras: Se realizará endoscopia de vías digestivas alta en consulta privada del especialista. Se empleará un equipo GIF Olympus Tips ES/S45 y pinzas Olympus FB-21K. Los endoscopios y las pinzas fueron desinfectados desde el día anterior a la toma de muestra con glutaraldehído al 3% y fueron enjuagados posteriormente con agua destilada estéril.

Después de cumplir criterios de inclusión se procederá a la toma de biopsias según el protocolo de Sidney del 2009 a saber: 2 muestras antrales: A)2-3cm Píloro con Curvatura Mayor , B)2-3 cm del Píloro con Curvatura Menor; 2 muestras corpus: C)Desde 8 cm distales del cardias con Curvatura Mayor, D)Desde 8 cm distales del cardias con Curvatura Menor; E)1 Muestra del Incisura Angular; y F)1 muestras adicional en la región adyacente a la localización de la lesión. [9]

Las biopsias serán colocadas en caldo Campylobacter o Tioglucanato o Brucella o Campylobacter con sangre al 7% y antibióticos selectivos en un tubo falcón de 15ml y serán transportados a 8°C en una nevera de Icopor portable. Y llevadas a las instalaciones de la U.D.C.A dentro de las primeras 6 horas.

Criterios endoscópicos para la obtención de muestras: Mucosa Enrojecida con imágenes endoscópicas eritematosas compatible con gastritis, lesión tipo ulcera peptica compatible con Ulcera, lesión tipo tumoral, coliflor o lisa, herniación de la mucosa sangrante o no sangrante compatible con cáncer gástrico o mucosa sana compatible con condiciones normales de la mucosa gástrica en el caso del infectado asintomático. Cada caso tendrá un registro del diagnóstico clínico del especialista con firma y sello, adjunto lista de criterios anteriormente mencionada



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

donde se evidencia que cumple con ellos y por último consentimiento informado y autorización firmada por el posible donante.

Procedimientos microbiológicos: Una vez las muestras estén en laboratorio serán sometida a test de ureasa rápida (Corpogen) y posteriormente serán cultivadas en sistema de crecimiento anaeróbico (Gaspak pouch BBL) y cultivadas durante 3 a 5 días a 37°C.

Cultivo: Después de 3 a 5 días se tomará una muestra directamente de los caldos primarios con asa bacteriológica estéril y se realizaran pases en Agar Brucella y/o Columbia suplementado con Isovitalax, sangre de caballo o cordero al 7% y antibióticos selectivos. Posteriormente, las muestras se llevarán a condiciones anaeróbicas ya mencionadas.

Pruebas bioquímicas: Se realizaran prueba de Ureasa (Corpogen), Oxidasa (Oxoid) y la catalasa con peróxido de hidrógeno. Los aislamientos compatibles con la especie *Helicobacter pylori* deben ser positivos para estas tres bioquímicas. Estas pruebas se realizarán tanto desde colonia como desde una suspensión precipitada del caldo Campylobacter durante tres repiques sucesivos. (Un repique cada 3-5 días según crecimiento y formación de colonias y precipitados).

Identificación de *Helicobacter pylori* y Coloración de Gram: Al cabo de 3-5 días del tercer repique cumpliendo las condiciones de incubación microaerófilas y a una temperatura de 37°C se observarán las colonias pequeñas, blanquecinas y puntiformes. La tinción Gram determinará si son Gram negativos y con formas cocoides o bacilares típicas de la bacteria.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Biología molecular: Dentro de las pruebas de caracterización de las cepas del se realizará la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de un fragmento del gen 16S de *Helicobacter pylori* para posteriores análisis.

Resultados descriptivos:

Hasta la fecha se han logrado asistir a 92 procedimientos endoscópicos, durante los cuales se obtuvieron 43 muestras de la institución número uno y 17 muestras de la institución número dos, 2 muestras se obtuvieron de otras IPS donde se donaron directamente por los participantes, con la extracción de 3 a 7 biopsias por participante. Los 30 pacientes restantes no autorizaron su participación o presentaron criterios de exclusión (Paciente ansioso – no colaborador, gastrectomía total, gastrostomía, colocación de sonda naso gástrica, dilatación de esófago, paciente anti coagulado, esofagitis, tumor esófago, úlcera sangrante, síndrome de Mallory Weiss, insuficiencia renal, hernia hiatal, antecedente de quimioterapia en el último mes). Los diagnósticos instaurados son de gastritis 43 pacientes, de las cuales 22 son gastritis eritematosa antral, 7 son gastritis erosiva aguda y crónica Antral, 11 son gastritis crónica Antral, 1 es gastritis alcalina, 1 es gastritis crónica micro nodular y otra es gastritis folicular, desde el punto de vista endoscópico, por otro lado de ulcera péptica 3 pacientes, de cáncer gástrico 7 pacientes de los cuales 2 son Adenocarcinoma, 2 es cáncer gastro-esofágico (Adenoescamoso) y 3 son cáncer linfoma gástrico(Linfoma no Hodgkin Difuso células B Grandes), y 9 casos son infectados asintomáticos con mucosa sana. En las caracterizaciones hechas hasta el momento y que se encuentran en proceso de los 62 muestras obtenidas existe alrededor de un 58.06% que son positivas es decir 36 muestras son microbiológicamente y molecularmente con 16S por PCR positivas para *Helicobacter pylori*.

IV. Conclusiones:



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Cualitativamente el *Helicobacter pylori* aislado de las muestras ha crecido en todos los medios de cultivos sin una diferencia marcada, la gastritis hasta el momento es el diagnóstico más común durante la realización de EVDA. Dentro de las conclusiones es importante mencionar los resultados que se esperan obtener cuando se finalicé el proyecto como son; desarrollar un cepario que se caracterice por criterios de calidad y rigurosa caracterización microbiológica y molecular, una vez terminado el muestreo y caracterización del cepario se procederá a determinar las curvas de cinética de crecimiento de cada cepa caracterizada.

V. Bibliografía:

[1] Cisneros Moreno S., Mecanismos de resistencia de *Helicobacter Pylori* a los antibióticos amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol. Bogotá D.C: Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana;2009

[2] Terregrosa M, Guarnizo C. Enfoque terapéutico del cáncer gástrico. Revisión de la literatura. Revista Colombiana de Cancerología 2011;15(1):30-39

[3] Li Z, Zou D, Ma X, Chen J, Shi X, He J, et al. Epidemiology of peptic ulcer disease: endoscopic results of the systematic investigation of gastrointestinal disease in China. The American Journal of Gastroenterology [serial on the Internet]. (2010, Dec), [cited August 20, 2012];105(12):2570-2577. Available from: MEDLINE Complete.

[4] Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984;1:1311-5.

[5] Ishihara S, Fukuda R, Fukumoto S. Cytokine gene expression in gastric mucosa: its role in chronic gastritis. J Gastroenterol. 1996;31:485-90.

[6] WHO, International Agency for research on cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. In: WHO, International Agency for research on cancer. Infection with *Helicobacter pylori*. Lyon: International Agency for Research on cancer;1994.p.177-241.

[7] Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo Principios de medicina interna de Harrison, 18ª edición, 2012, McGraw-Hill.

[8] Fernández M.H. Más sobre el *Helicobacter pylori* en Colombia: Gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y costumbres de tratamiento. Rev.Col Gastro. 2007; 4-6.

[9] Yantiss RK, Odze RD. Optimal Approach to Obtaining Mucosal Biopsies for Assessment of Inflammatory Disorders of the Gastrointestinal Tract. Am J Gastroenterol 2009;Vol 14:104:774-783.

[10] Li Z, Zou D, Ma X, Chen J, Shi X, He J, et al. Epidemiology of peptic ulcer disease: endoscopic results of the systematic investigation of gastrointestinal disease in China. The American Journal of Gastroenterology [serial on the Internet]. (2010, Dec), [cited August 20, 2012];105(12): 2570-2577. Available from: MEDLINE Complete.