

Póster científico

DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES *vacA* Y *cagA* DE *Helicobacter pylori* EN AISLADOS DE AGUA DE RIEGO Y AGUA POTABLE

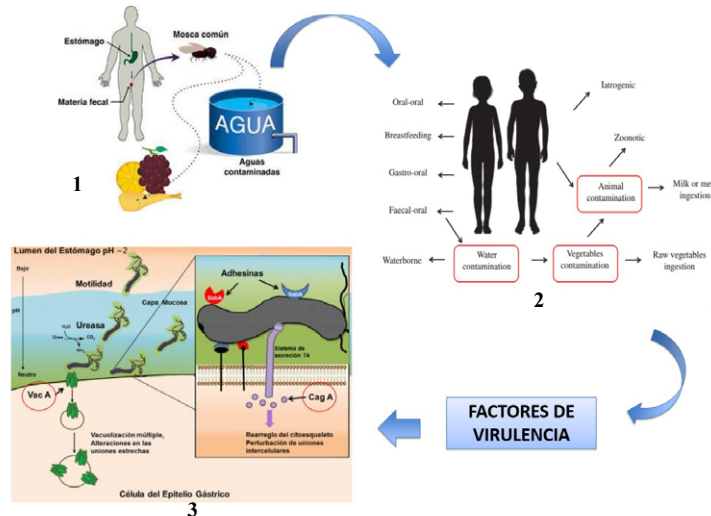
Emerson Pocasangre¹

Lorena Cardona²

Mario Romero³

La infección por *Helicobacter pylori* es uno de los problemas más comunes en el mundo. Está comprobado que la infección producida por esta bacteria gramnegativa microaerobia es uno de los factores causales en el desarrollo de enfermedad ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma primario de células B. La transmisión de la bacteria ocurre principalmente de persona a persona a través de vía fecal-oral y oral-oral, así como también al ingerir agua contaminada.

Figura 1. Ciclo de transmisión del *Helicobacter pylori*



Fuente:

1. Cristian J. *Helicobacter pylori*. Revista Lablogger Clínico. 2012. https://labloggerclinico.blogspot.com/2012_05_13_archive.html
2. Parreira P, Fátima Duarte M, Reis CA, Martins MC. *Helicobacter pylori* infection: A brief overview on alternative natural treatments to conventional therapy. Crit Rev Microbiol. 2016;42(1):94-105. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24606042/> DOI: 10.3109/1040841X.2014.892055
3. Espinosa Rivero J. A 30 años del descubrimiento de *Helicobacter pylori*. Uso de plantas medicinales como fuente de terapias. Mensaje Bioquímico. 2014;41:85-101. Disponible en: <http://biosensor.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2020/09/MENSAJE-BIOQUIMICO-VOL-XXXVIII-2014.pdf>

1 Laboratorio de Microbiología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Evangélica de El Salvador. emerson.pocasangre@uees.edu.sv, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7488-6241>

2 Maestría Microbiología e Inocuidad de Alimentos, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. investigaciones.ciss@uees.edu.sv, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4229-680X>

3 Laboratorio de Microbiología, Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. investigaciones.ciss@uees.edu.sv, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-0150>



Este estudio se llevó a cabo en el subcomité “El Astillero”, en el distrito de riego del valle de Zapotitán en ciudad Arce, departamento de La Libertad. El objetivo principal del estudio fue determinar molecularmente la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori* con genes *vacA* y *cagA* en agua potable y de riego con su respectivo perfil antibiótico.

METODOLOGÍA

El estudio se realizó en el periodo de septiembre 2019 a enero 2021. Se efectuaron 10 visitas en las que se recolectaron 50 muestra de agua (25 de agua potable y 25 de agua de riego). To-

das las muestras se analizaron en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Evangélica de El Salvador, donde cada muestra de agua se procesó por técnica de filtración por membrana; después de cada filtración la membrana se colocó en caldo Brucella y se incubó de 3 a 5 días en una atmósfera con CO₂ al 10 %. Los casos de muestras de agua potable que presentaron turbidez se colocaron en agar sangre Columbia enriquecido con 7 % de sangre desfibrinada de carnero más suplemento DENT. Esto se hizo con el objetivo de poder seleccionar específicamente aquellas colonias que fueran de *Helicobacter pylori*.

Figura 1. Recolección de muestras



Figura 2. Filtración por membrana



Figura 3. A. Colonias características de *H. pylori* en agar Columbia suplementado con sangre. B. Bacilos curvos gramnegativos de *H. pylori*. Se comparó con la cepa de referencia NCTC 11637.

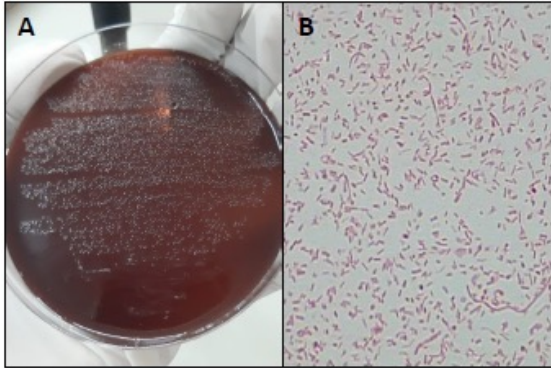
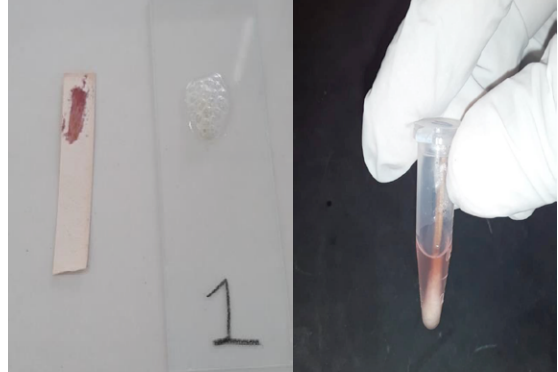


Figura 4. Prueba de oxidasa, catalasa y ureasa positiva de los aislados de *H. pylori*



RESULTADOS

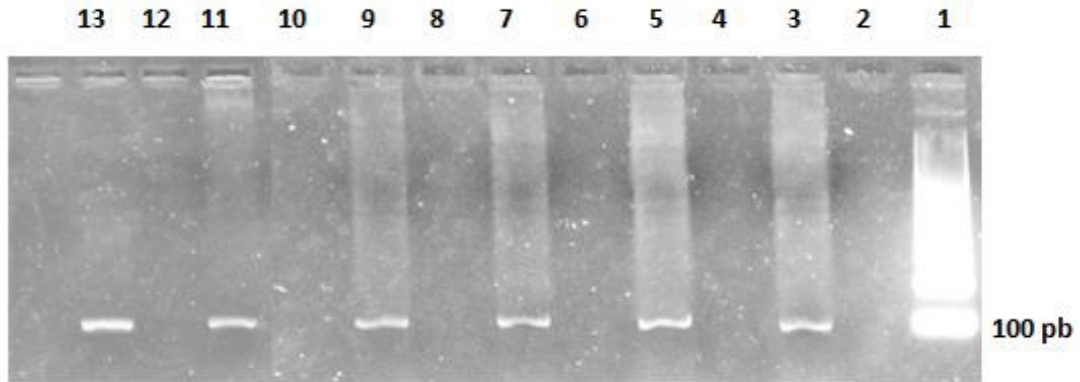
Para el caso del agua potable, cuando las muestras se trasladaron al agar sangre Columbia no hubo crecimiento alguno, por lo tanto, las 25 muestras de agua potable se consideraron negativas. En el caso de las muestras de agua de riego, las 25 muestras de caldo Brucella donde se colocaron las membranas que se utilizaron para filtrar las muestras de agua, las 25 presentaron turbidez, sin embargo, estas 25 se sembraron en agar sangre

Columbia, donde de todas estas solamente cinco presentaron colonias sugestivas de *Helicobacter pylori*, colonias puntiformes blanco-grisáceas. A estas se procedió después a hacer la confirmación macroscópica y la confirmación microscópica, donde se obtuvieron mediante la coloración de Gram, bacilos curvos gramnegativos. Posteriormente se procedió a la confirmación con pruebas bioquímicas, utilizando la prueba de catalasa, oxidasa y ureasa, siendo positiva para estas cinco muestras de agua de riego.

Tabla 1. Partidores utilizados en la genotipificación de la detección del gen ARNr 16S, *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori*

Gen	Fragmento amplificado	Secuencia partidores	Tamaño amplicón
ARNr	16S	F: 5' - CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC - 3'	110 pb
		R: 3' - ATT ACT GAC GCT GAT TGT GC - 5'	
<i>vacA</i>	m1A	F: 5' - GGTCAAATGCGGTCATGG - 3'	290 pb
		R: 3' - CCATTGGTACTGTAGAAAC - 5'	
<i>cagA</i>	-----	F: 5' - GATAACAGCCAAGCTTTTGAGG - 3'	300 pb
		R: 3' - CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA - 5'	

Figura 5. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RTA-04; carril 7: RTA-05; carril 9: RRT-03; carril 11: RRT-04; carril 13: RRT-05. Banda correspondiente al gen ARN 16S de 110 pb



Se realizó la extracción de ADN por medio de la técnica de columnas de gel de sílice y posteriormente se corrieron estas muestras por PCR de punto final o PCR convencional, donde se les amplificó los genes ARN 16S como marcador filogenético y posteriormente se les amplificó el gen *vacA* y *cagA* a las cinco muestras; a estas

cinco muestras a las cuales se les amplificaron los tres genes se les hizo un antibiograma con la técnica de Kirby-Bauer, en la cual las muestras exhibieron una sensibilidad del 100 % a claritromicina, una sensibilidad intermedia a levofloxacina, una resistencia del 80 % a amoxicilina y una resistencia del 100 % a metronidazol.

Figura 6. Resultado de la PCR punto final. A. Gen amplificado *vacA* m1A. B. Gel de electroforesis de la amplificación del gen *cagA*

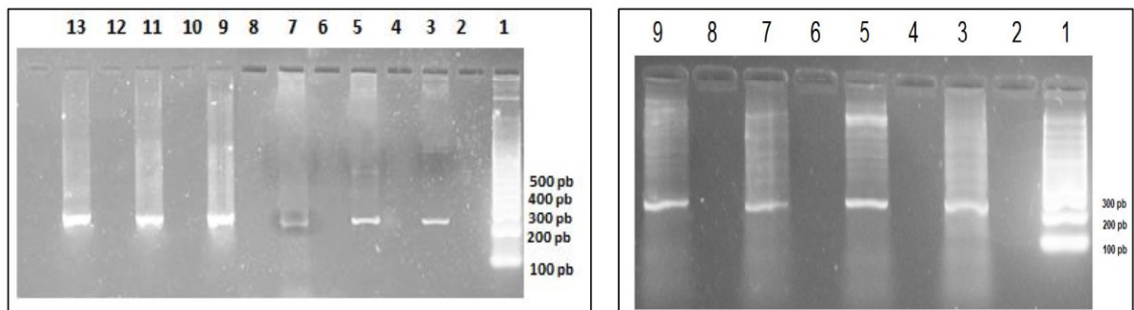


Tabla 2. Halos de inhibición con los antibióticos de prueba sobre *Helicobacter pylori*

Antibiótico de prueba	Halo de inhibición promedio (mm)				
	RTA-04	RTA-05	RRT-03	RRT-04	RRT-05
Amoxicilina	26.59	20.79	21.03	21.93	18.54
Claritromicina	34.83	36.14	37.17	35.81	35.05
Metronidazol	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Sin halo
Levofloxacin	33.66	33.36	33.74	32.78	32.37

Figura 7. Halos de inhibición obtenidos con los antibióticos de prueba



CONCLUSIONES

Dentro de los resultados se obtienen dos conclusiones: una es que el agua de riego puede contaminar los cultivos, puesto que se confirmó la presencia de *Helicobacter pylori* en este tipo de aguas, y tampoco se puede descartar el agua potable como vía de trasmisión y reservorio a pesar de no aislar la bacteria. La segunda es que el *Helicobacter pylori* es resistente a ciertos antibióticos tradicionales —todas las cepas aisladas mostraron sensibilidad a claritromicina, sensibilidad intermedia a levofloxacin y resistencia a

amoxicilina en la mayoría de aislados; en cuanto a metronidazol, fue para el único que mostró 100 % de resistencia— por lo que se debe hacer uso racional y medido de estos antibióticos.

FUENTES CONSULTADAS

1. 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*. 2016 Dic;21(6):586-595. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hel.12316>
2. 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*. 2016 Abr 4;6(5):433-41. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12054>
3. 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*. 2016 Aug;14(4):692-8. Disponible en: <https://doi.org/10.2166/wh.2016.259>