



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE
Helicobacter pylori EN MUESTRAS DE
AGUA DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NÉLIDA IRAÍS ORTEGA HERNÁNDEZ



MÉXICO, DF.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Prof. Rodolfo Pastelín Palacios
Vocal:	Prof. Adriana Guadalupe Mejía Chávez
Secretario:	Prof. Gonzalo Castillo Rojas
1er. Suplente:	Prof. Santiago Ávila Ríos
2do. Suplente:	Prof. Luis Manuel Perea Mejía

Sitio en donde se desarrolló el tema: Programa de Inmunología Molecular Microbiana, ubicado en el 4º piso del Edificio de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Gonzalo Castillo Rojas

Asesor

Dra. Yolanda López Vidal

Supervisor Técnico

Nélida Iraís Ortega Hernández

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por formarme en el área de Ciencias de la Salud, brindándome la oportunidad de desarrollarme en algo que me gusta y me permitirá ayudar a la sociedad.

Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por su asesoría para realizar mi tesis y su amistad incondicional.

A la Dra. Yolanda López Vidal por su apoyo para la realización de mi tesis y por darme la oportunidad de pertenecer al grupo del Programa de Inmunología Molecular Microbiana.

A la Dra. Marisa Mazari Hiriart por proveer las muestras de agua sin las cuales esta tesis no habría sido posible y por su asesoría.

A la QFB. Rosa Isabel Amieva Fernández por apoyarme con los cultivos de *H. pylori* para la realización de mi tesis, por sus consejos y su invaluable amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Karina, Adriana, Gustavo, Iliana, Jaqueline, Tere, Roxana, Patricia, Liz, Alex, Dra. Maritoña, Hugo, Mauricio, Martha, Arcelia, Luz, Sebastián, Sr. Ricardo y a René Hernández Arredondo.

El trabajo fue parcialmente financiado por los proyectos: DGAPA IN219206, CONACyT 47749-M y a la Partida Presupuestal del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

DEDICATORIAS

A mis padres por apoyar y respetar mis decisiones, por estar siempre a mi lado.

A mis hermanos (Lolita, Eder y Ashanty), por apoyarme y quererme tal y como soy, por comprenderme y estar presentes en todo momento.

Al resto de mi familia por su apoyo y cariño.

A Angie, Margel, Oscar, Mario, Luis, Ericka, Miguel, Gerardo, Ángel, Dalia, Karla, Omar, Armando, Rodrigo, Irving, David, Carmina, Jaqui, Liz, Alexandra, Gonzalo y Mari por todos los momentos lindos, divertidos, tristes que compartieron conmigo, cada segundo que he pasado con ustedes me ha enriquecido como persona.

A Carol, gracias por ser mi compañera y amiga en el laboratorio, por compartir tantas cosas y por tu invaluable e insustituible apoyo.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	v
ÍNDICE	vi
RESUMEN	viii
ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	1
Características microbiológicas	2
Formas cocoides	4
Factores de virulencia	6
Tratamiento antimicrobiano	10
Epidemiología	12
Seroprevalencia a nivel mundial	12
Factores de riesgo	13
Vías de transmisión	14
El agua como posible vehículo de transmisión de <i>Helicobacter pylori</i>	15
<i>Helicobacter pylori</i> en sistemas de agua en México	19
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
METODOLOGÍA	24

Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i>	24
Extracción de Ácidos Nucleicos	24
Detección de <i>H. pylori</i> mediante la amplificación por PCR	25
Confirmación de la presencia de <i>H. pylori</i> mediante hibridación	26
Concentración de las muestras de agua	27
Purificación de los anticuerpos anti- <i>H. pylori</i> para la Inmunoseparación Magnética (ISM) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	28
Recuperación de <i>H. pylori</i> por Inmunoseparación magnética	29
Inmunofluorescencia Indirecta	30
Cultivo en el medio HP para la recuperación de <i>H. pylori</i>	30
Cultivo en medio bifásico y líquido para la recuperación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua	31
Seguimiento de formas cocoides de <i>H. pylori</i>	32
Secuenciación del gen <i>16S RNAr</i> para la identificación de la cepa ambiental	32
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	50
APÉNDICE	56

RESUMEN

Helicobacter pylori es un bacilo gramnegativo, helicoidal o en forma de S, microaerófilo. Infecta a más de la mitad de la población mundial. La infección causa una inflamación de la mucosa gástrica e infiltración de polimorfonucleares. Sin embargo, la mayoría de los individuos infectados son asintomáticos, sólo del 10 al 15 % desarrollan úlcera péptica o gastritis crónica atrófica, esta última es un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma gástrico. Se ha propuesto que la vía de transmisión puede ser: oral-oral, oral-fecal y gastro-oral. Se cree que el vehículo de transmisión es el agua contaminada con este microorganismo. Se ha detectado la presencia del microorganismo en distintas fuentes de agua de la ciudad de México, así como, en distintos sistemas de agua en el mundo. El estudio fue dividido en dos fases: en la primera fase se implementaron y estandarizaron las técnicas de detección molecular, inmunofluorescencia indirecta, inmunoseparación magnética y cultivo microbiológico de *H. pylori* y en la segunda fase se llevo a cabo el muestreo de agua en los canales de Xochimilco y de Valle de Bravo. Se obtuvieron 8 muestras de agua provenientes de los canales de Xochimilco y tres de Valle de Bravo. Ninguna de las muestras fue positiva para la presencia de *H. pylori* por medios moleculares, sin embargo, en el cultivo microbiológico-ISM se aisló un bacilo gramnegativo, microaerófilo, que presenta características microscópicas y macroscópicas similares a las de *H. pylori*. Se recuperó en cultivo microbiológico un bacilo gramnegativo, oxidasa positivo con morfología macroscópica similar a la que presenta *H. pylori*.

ABREVIATURAS

° C	Grados Celsius
µL	microlitros
µm	micrómetros
µM	Micromolar
ATCC	American Type Culture Collection
BabA	Adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo de Lewis b
BHI	Infusión de Cerebro-Corazón
CagA	Proteína asociada a la citotoxina
<i>cag</i> -PAI	Isla de Patogenicidad <i>cag</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
Cols.	Colaboradores
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Inmunoensayo enzimático
GES	Tiocinato de guanidina-EDTA-n-lauril sarcosinato
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HTM	<i>Haemophilus</i> Test Medium
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IL-8	Interleucina 8
IMS	Inmunoseparación Magnética
kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
Min	minutos
mL	mililitros
mM	Milimolar
mm	milímetros
MPM	Marcador de peso molecular

nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBSED	Solución Amortiguadora de fosfatos estéril desgasificada
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pmol	picomol
pPCR	Productos de la primera amplificación por PCR
ppPCR	Productos de la segunda amplificación por PCR
RNA	Ácido Ribonucléico
S	segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SSC	Solución amortiguadora de citratos salina
SSI	Solución Salina Isotónica
SSIV	Sistema de Secreción Tipo IV
TBE	Solución amortiguadora Tris base-boratos-EDTA
TE	Solución amortiguadora de Tris-HCl-EDTA
UI	Unidades internacionales
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Luz ultravioleta
VacA	Citotoxina vacuolizante

INTRODUCCIÓN

Generalidades de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori fue aislado por primera vez en 1982 a partir de biopsias de tejido gástrico por dos investigadores australianos, Barry Marshall y Robin Warren [1], hallazgo que nos introdujo a una nueva era en la microbiología clínica, al descubrir que la úlcera péptica puede ser causada por una bacteria, acción por la cual les fue otorgado el premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 2005.

Este microorganismo fue llamado inicialmente *Campylobacter pyloridis* y, posteriormente, *Campylobacter pylori* ya que el epíteto *pyloridis* era gramáticamente incorrecto; en 1989 se estableció el nuevo género *Helicobacter*, este nuevo género posee las siguientes características principales: 1) Movilidad celular mediante flagelos polares envainados, 2) un glicocálix externo producido *in vitro* en medio líquido, 3) menaquinona-6 (MK-6) presente como la quinona isoprenoide en mayor proporción y 4) 35-44mol% de contenido de G+C de DNA cromosomal; integrando a esta bacteria a dicho género y dándole el nombre de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [2]. Actualmente es reconocido como el agente etiológico de gastritis crónica y de úlcera péptica, es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico y de linfoma tipo MALT [3, 4]. Además de ser clasificado como carcinógeno de clase I por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Características microbiológicas

El género *Helicobacter* pertenece a la subdivisión ϵ de *Proteobacteria*, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae*. Dentro de esta familia están incluidos los géneros *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira* y *Thiovulum*. El género *Helicobacter* incluye 20 especies reconocidas (Tabla 1), siendo *H. pylori* la especie más importante por su impacto en la salud humana [5, 6]. *H. pylori* es un bacilo gramnegativo, helicoidal o en forma de S, microaerofílico; mide de 0.5 a 0.9 μm de ancho y de 2 a 4 μm de largo. Su morfología microscópica puede variar *in vitro*, se han reportado formas en U, en V o cocoides. No forma esporas; posee de 4 a 6 flagelos polares en ramillete. Para el aislamiento de *H. pylori* se han utilizado distintos medios de cultivo debido a sus requerimientos nutricionales, es considerado un microorganismo fastidioso, además requiere del empleo de suplementos, tales como el suero de caballo, suero fetal bovino o sangre de caballo o carnero. Por ejemplo, agar Brucella suplementado con sangre de carnero envejecida, agar infusión de cerebro-corazón (BHI) suplementado con 5% de sangre de caballo y enriquecido con 1% de polienriquecimiento entre otros. Para su primoaislamiento los medios de cultivo son suplementados con antibióticos, tales como: Vancomicina, Trimetoprim, Cefsulodina, Polimixina B y Anfotericina B (suplemento de Dent); aunque se pueden usar los medios sin suplemento [5, 6]. Las condiciones óptimas para su crecimiento dependiendo de la cepa de *H. pylori* se incuba a 37° C, con atmósfera con 5% de Oxígeno (O_2), 85% de Nitrógeno y 5-10% de Dióxido de Carbono (CO_2), por un período de incubación de 3 a 5 días, el intervalo de pH al cual crece es de 5.5 a 8.5, con crecimiento óptimo a pH neutro [2]. En placas de Medio para prueba de *Haemophilus* (*Haemophilus* Test Medium, HTM) suplementado con 7% de suero

de caballo, el microorganismo presenta las siguientes características macroscópicas: son colonias de ≤ 1 mm, circulares de borde entero o definidos, grisáceas, translúcidas [7]. En agar sangre de carnero se aprecia alrededor de la colonia una ligera beta hemólisis [2].

Tabla 1. Principales especies de *Helicobacter*.

Especie	Hospedador	Ureasa	Catalasa
<i>H. pylori</i>	Humano	+	+
<i>H. acinonyx</i>	Guepardo	+	+
<i>H. mustelae</i>	Hurón	+	+
<i>H. nemestrinae</i>	Macaco	+	+
<i>H. suis</i>	Cerdo	+	NR
<i>H. helmanii</i>	Gato, perro	+	NR
<i>H. felis</i>	Gato, perro	+	+
<i>H. bizzozeronii</i>	Perro	+	+
<i>H. cinaedi</i>	Humano, hámster	-	+
<i>H. fennelliae</i>	Humano	-	+
<i>H. canis</i>	Perro	-	-
<i>H. pullorum</i>	Aves de corral	-	+
<i>H. pametensis</i>	Pájaros silvestres, cerdo	-	+
<i>H. cholecystus</i>	Hámster	-	+
<i>H. hepaticus</i>	Ratón	+	+
<i>H. muridarum</i>	Rata, ratón	+	+
<i>H. trogontum</i>	Rata	+	+
<i>H. bilis</i>	Ratón	+	+

+ = prueba positiva; - = prueba negativa; NR = No reportado.

Para la caracterización microscópica del microorganismo se emplea la tinción de Gram modificada, así como las pruebas metabólicas de producción de catalasa, oxidasa y ureasa [2, 6].



Figura 1. *Helicobacter pylori*, tinción de Gram, 100X

El tamaño del genoma de *H. pylori* es de aproximadamente 1.66 millones de pares de bases con un contenido de G+C de 35-40%. Este microorganismo es genéticamente polimórfico, lo cual es posiblemente el resultado de una adaptación a las condiciones del hospedero, es decir, a un solo nicho [5].

Formas Cocoides

La forma cocoide de *H. pylori* se presenta bajo varias condiciones ambientales, tales como aerobiosis, cambios de temperatura, incubación prolongada, cambios de pH o como consecuencia de tratamiento de antibióticos en pacientes. La forma bacilar de *H. pylori* predominante de la fase logarítmica se convierte con el tiempo en fase estacionaria en forma de “U” como fase intermediaria, antes de convertirse a cocoide [8].

Estas formas cocoides también han sido llamadas Formas Viabiles no Cultivables (FVC) [9], y también han sido clasificadas como formas intactas (IC) y formas degenerativas (DC) dependiendo del tamaño y la densidad del citoplasma, siendo más grande el cuerpo citoplasmático de las segundas [8]. Sin embargo, el papel biológico que desempeñan estas formas cocoides de *H. pylori* es un punto controversial, si bien se desconoce su función, se ha sugerido que pueden ser formas de persistencia en el ambiente [9, 10], y algunos investigadores sugieren que son formas degenerativas del microorganismo [8, 11].

El metabolismo oxidativo en formas cocoides de *H. pylori* se ha observado y la respiración en células cocoides se ha medido en medios de cultivo con pocos nutrientes hasta por 8 meses [12], lo cual podría indicar que aún después de 8 meses son viables. Benaïssa y cols. estudiaron los cambios en la ultraestructura y en la antigenicidad de *H. pylori* en su conversión de forma bacilar a cocoide, encontraron que las formas cocoides mantienen el metabolismo lo cual requiere de la preservación de estructuras compatibles con viabilidad, tales como citoplasma, membrana celular, flagelos y DNA; lo que sugiere que la forma cocoide podría representar uno de los estadios del ciclo biológico de *H. pylori*; además observaron que algunos de los antígenos (una fracción antigénica de 94 kDa, una de 30 kDa) que son expresados diferencialmente en la forma bacilar y la cocoide *in vitro*, son expresados *in vivo* [10]. Estas formas se ha sugerido que pudieran ser las formas que infectan al ser humano, puesto que retienen su actividad de ureasa, reducen sales de tetrazolio y sintetizan DNA [12, 13], por otro lado, Mizoguchi y cols. observaron que la exposición de *H. pylori* a pH ácido incrementa la expresión de proteínas de choque térmico en las formas cocoides de *H. pylori*, las cuales potencian la adherencia del microorganismo al epitelio gástrico [14].

She y cols. y Cellini y cols., al inocular ratones con formas cocoides y formas bacilares de *H. pylori* por vía oral, observaron que las formas cocoides fueron capaces de colonizar la mucosa gástrica de manera más eficiente que las formas bacilares; además, formas bacilares del microorganismo se recuperaron, a partir de la mucosa gástrica de los ratones infectados con las formas cocoides; lo que apoya la hipótesis de que hay una reversión de las formas cocoides a bacilares *in vivo* [13, 15].

Narikawa y cols. compararon el contenido y la integridad de los ácidos nucleicos de las formas cocoides y bacilares, encontraron que la cantidad de DNA y RNA de las formas cocoides es menor a comparación de la forma bacilar, además, encontraron que el DNA de las formas cocoides presentó varias bandas a comparación de la forma bacilar, que presentó una sola banda, lo que sugiere una forma de degeneración celular en las formas cocoides, indicando que estas formas no tienen suficiente contenido del genoma para la multiplicación; esta disminución en el contenido de ácidos nucleicos puede estar asociada a la pérdida de citoplasma por autólisis [11].

Factores de virulencia

H. pylori posee distintos factores de virulencia que le ayudan a evadir la actividad bactericida del estómago, atravesar la capa de moco, colonizar y sobrevivir, estos son: ureasa, flagelos, BabA, LPS, VacA, *cag*-PAI, CagA (Figura 2).

La ureasa es una enzima responsable de la hidrólisis de la urea presente en la mucosa gástrica, y como resultado de esta hidrólisis se obtiene dióxido de carbono y amonio, este

último crea un microambiente neutro alrededor de la bacteria. Esta enzima está formada por seis subunidades de UreA y seis de UreB, organizadas en un anillo doble de 13 nm de diámetro y de 550 kDa. La biosíntesis de la ureasa está controlada por un grupo de 7 genes continuos (*ureABIEFGH*), en donde están incluidos los genes que codifican la ureasa (*ureAB*), y 5 genes accesorios que son responsables de la recepción e inserción de iones de níquel en el sitio activo de la enzima. Puede contribuir a la toxicidad celular con la producción de iones amonio como subproducto, convirtiéndola a la vez en un factor quimiotáctico, ya que mediante la presencia de neutrófilos, responsables de una respuesta inflamatoria, provoca daño al tejido epitelial gástrico [16].

Los flagelos lofótricos de este microorganismo le permiten moverse rápidamente para desplazarse del medio ácido del lumen gástrico penetrando la capa de moco gástrico para llegar a un medio neutro.

El lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* expresa carbohidratos Lewis “x” y/o Lewis “y” en su antígeno “O”. La estructura del LPS de la cepa NCTC 11637 de *H. pylori* es similar al antígeno Lewis “X” que se encuentra en grupo sanguíneo tipo “O” y en las células epiteliales gástricas. El antígeno Lewis de *H. pylori* muestra una participación dual en la patogénesis: 1) mimetismo molecular, lo que le permite al microorganismo evadir la respuesta inmune que sigue a la colonización de la mucosa gástrica, favoreciendo la permanencia de *H. pylori* en el nicho gástrico por períodos que van desde décadas hasta de por vida; y 2) la inducción de una respuesta autoinmune a los antígenos de Lewis expresados en *H. pylori* y que son compartidos por el hospedero [16].

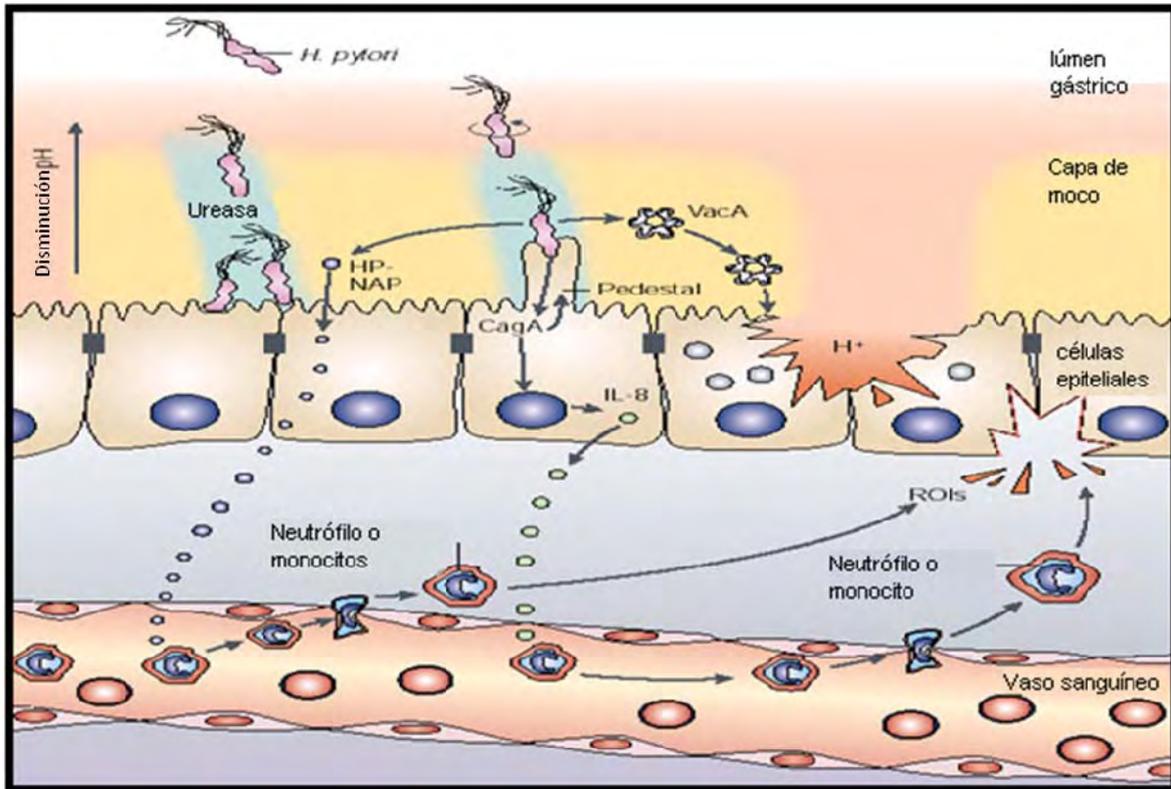


Figura 2. Factores de Virulencia de *Helicobacter pylori* involucrados en colonización y enfermedad [17].

La adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo Lewis b (BabA), es una proteína de membrana externa de 78 kDa que se une al antígeno de Lewis b fucosilado presente en las células epiteliales gástricas. Esta adhesina BabA facilita la colonización de *H. pylori* e incrementa la secreción de IL-8 de las células epiteliales, la cual tiene como resultado una respuesta inflamatoria. La expresión de BabA está significativamente asociada con úlcera duodenal y adenocarcinoma gástrico en pacientes infectados con *H. pylori* en países occidentales. Dos alelos de *babA* se han descrito: *babA1* y *babA2*, pero solo *babA2* codifica para la adhesina completa y activa [18].

La citotoxina vacuolizante (VacA) es una exotoxina de 95 kDa; las cepas que expresan la forma activa de esta toxina, aproximadamente el 50%, están asociadas con mayor frecuencia a enfermedad. El nivel de expresión de VacA depende de variaciones en la secuencia señal (s1a, s1b, s1c o s2) y en la región media (m1 o m2). Las cepas que tienen una mayor actividad vacuolizante son aquellas que presentan el genotipo s1/m1. VacA se une a la porción apical de las células y forma un canal hexamérico ión-selectivo, dependiente de voltaje, a través del cual se liberan bicarbonato e iones orgánicos del citosol de la célula, para darle a la bacteria los nutrientes necesarios. También se asocia con la degradación de las células parietales, dando como resultado es una disminución en la secreción de ácido; la unión de la citotoxina vacuolizante a la membrana mitocondrial produce la liberación del citocromo c, que induce la apoptosis, lo anterior predispone al huésped al desarrollo de cáncer gástrico, esto debido a la alteración entre el balance apoptosis-proliferación celular, el cual se encarga de mantener la integridad de la mucosa gástrica en condiciones normales [19]. VacA participa en la persistencia del microorganismo por la capacidad de suprimir la respuesta inmune: i) inhibiendo la maduración del fagosoma en macrófagos, ii) ausencia selectiva de la presentación de antígenos en células T, iii) ausencia de la proliferación de células T y iv) regulando de forma negativa los efectos Th1 mediante la interacción con calcineurina, para bloquear la señalización [16, 18, 20].

La isla de Patogenicidad *cag* (*cag*-PAI) es un fragmento de DNA de 37 kb que contiene 29 genes y está presente en un 50% a 70% de los aislamientos de *H. pylori*. Dieciocho genes dentro de la *cag*-PAI son esenciales para la producción de un sistema de secreción tipo IV (SSIV), el cual transloca macromoléculas [proteína asociada a la citotoxina (CagA) y

peptidoglicano] al citosol de la célula huésped, e inicia varias cascadas de respuesta en la célula epitelial, tales como: rearrreglos en el citoesqueleto (formación de pedestal) y secreción de interleucina 8 (IL-8) [18].

CagA es una proteína de 120 a 128 kDa, que al ser translocada a la célula epitelial, esta se fosforila por la cinasa SRC-c, a este complejo se le une la tirosinfosfatasa SHP-2, lo cual provoca una respuesta celular parecida a la inducida por un factor de crecimiento. La colonización de los pacientes con aislamientos de *H. pylori* que poseen el gen asociado a la citotoxina (*cagA*) causa un incremento en el riesgo de gastritis severa, úlcera péptica y adenocarcinoma en el estómago distal, comparado con pacientes infectados con aislamientos de *H. pylori cagA* negativos [16, 18].

Tratamiento antimicrobiano

In vitro *H. pylori* es sensible a un gran número de agentes antimicrobianos; sin embargo, no hay correlación con los resultados terapéuticos obtenidos. La inactivación del antibiótico por efecto del pH ácido del estómago, el desarrollo de resistencias durante el tratamiento y la pobre penetración de los antimicrobianos en zonas profundas de la mucosa gástrica son tres posibles razones que explican esta diferencia [21, 22].

En la tabla 2 se mencionan los antimicrobianos que han sido utilizados en los diferentes esquemas de tratamiento para la erradicación de *H. pylori*. Estos antibióticos han sido usados en combinación con medicamentos que restauran el equilibrio entre la secreción de

ácido y los factores protectores de la mucosa gástrica (agentes antsecretorios o antiulcerosos) [21].

El tratamiento de las infecciones ocasionadas por *H. pylori in vivo* con un solo antibiótico ha resultado poco eficaz y ha ocasionado la aparición de cepas resistentes, en especial a Metronidazol y Tinidazol. Debido a la resistencia generada por el microorganismo a los antibióticos utilizados para su erradicación, se requiere tratamiento múltiple (con 2 o más antibióticos e inhibidor de secreción ácida, Tabla 2) [20, 22-24].

Tabla 2. Terapias triples y cuádruples para la erradicación de *H. pylori*.

Terapia	Medicamentos	Duración (semanas) / Erradicación (%)
Terapia triple	Subsalicilato de bismuto (525 mg, c/12 h) + Metronidazol (250 mg, c/6 h) + Amoxicilina o Tetraciclina (500 mg, c/12 h)	2 / 50-90
	Ranitidina (400 mg, c/12 h) + Amoxicilina (500 mg, c/6 h) + Metronidazol (250 mg, c/6 h)	2 / 89
	Omeprazol (40 mg, c/24 h) + Claritromicina (500 mg, c/8 h) + Tinidazol o Metronidazol (250 mg, c/6 h)	1 / >90
	Omeprazol (20 mg, c/12 h) + Amoxicilina (1 g, c/12 h) + Claritomicina (500 mg, c/12 h)	1 / 98
Terapia cuádruple	Omeprazol (40mg, c/24 h) + Subsalicilato de Bismuto (525 mg, c/12 h) + Metronidazol (250 mg, c/6 h) + Tetraciclina (500 mg, c/6 h)	1/ 95

Tomado de Misiewicz G *et al.* [23] y de Suerbaum S y Michetti P [20].

Si la terapia triple fracasa, entonces se recomienda el esquema de tratamiento cuádruple [20, 22, 23]. Los efectos secundarios asociados a los esquemas de tratamiento, han ocasionado que los pacientes abandonen el tratamiento, lo que da como resultado el incremento en la resistencia a los antibióticos comúnmente usados [3].

Epidemiología

Seroprevalencia a nivel mundial

Mediante estudios serológicos se ha encontrado que más del 50% de la población mundial ha estado expuesta a *H. pylori* [25, 26]. Después de que el microorganismo coloniza la mucosa gástrica, la infección persiste en la inmensa mayoría de los individuos por años, décadas y posiblemente de por vida [27].

Esta infección trae como resultado una inflamación de la mucosa gástrica caracterizada por la infiltración de neutrófilos. Aunque, la mayoría de los individuos infectados son asintomáticos, sólo algunas personas desarrollan úlcera péptica y algunas otras pueden desarrollar gastritis crónica atrófica, factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma gástrico. Se estima que cada año hay seis millones de casos de úlcera duodenal y 900,000 casos de carcinoma gástrico a escala mundial [28].

Torres y cols., en un estudio seroepidemiológico realizado en México, encontró que el 66% de la población había estado en contacto con el microorganismo; al año de edad el 20% de los sujetos estudiados presentaban anticuerpos contra *H. pylori*, a los 10 años el porcentaje de

sujetos con anticuerpos se incrementó hasta 50%, lo cual indica que a esta edad 50% de la población ha estado expuesta con *H. pylori*, ya que la presencia de anticuerpos contra la bacteria no es una prueba diagnóstica de infección activa [29].

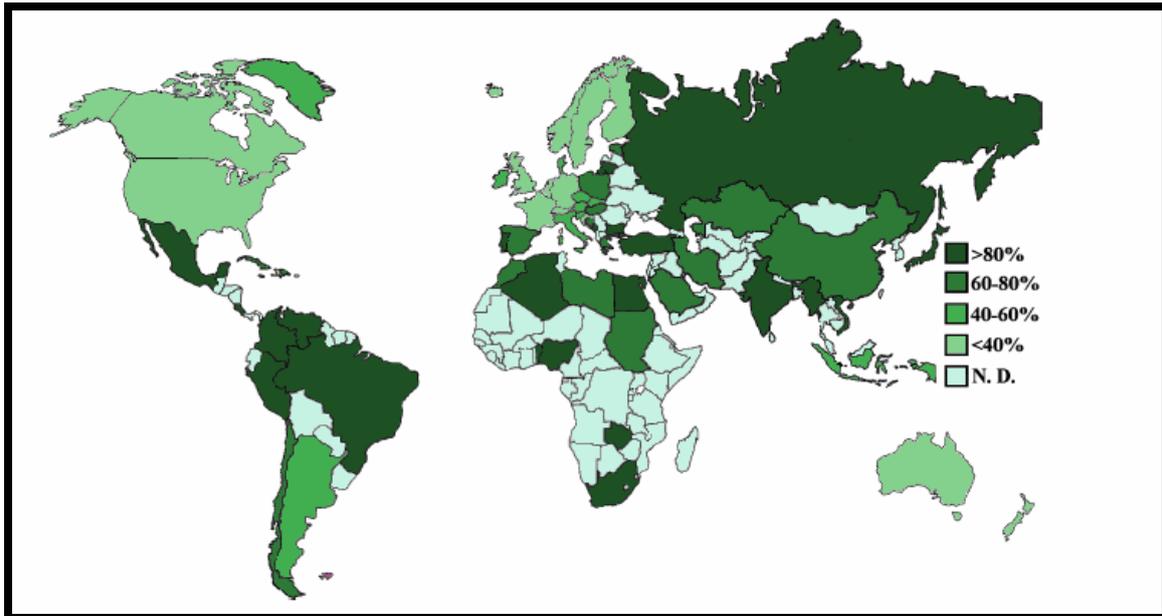


Figura 3. Mapa de seroprevalencia de *H. pylori* en humanos a nivel mundial. N.D. indica los países donde no se ha hecho un estudio consistente sobre la prevalencia de *H. pylori* [30].

Factores de riesgo

La forma de adquirir la enfermedad es distinta dependiendo del grado de desarrollo del país en donde se encuentre el paciente; en los países en vías de desarrollo la mayoría de las personas son infectadas en la infancia o pubertad y permanecen infectados el resto de sus vidas, mientras que en los países desarrollados la infección es adquirida gradualmente con la edad [31]. Bajo nivel socioeconómico, bajo nivel de educación, higiene deficiente, hacinamiento y

edad, son los factores de riesgo que han sido asociados a la infección por *H. pylori* [29, 32-36].

Vías de transmisión

Las rutas primarias de transmisión de *H. pylori* quedan aún como un área de investigación no resuelta [3, 37]. Se sugiere que la transmisión es de persona a persona puesto que no se conoce reservorio no humano alguno. Tres vías de transmisión se han propuesto, la oral-oral, la gastro-oral y la fecal-oral. Los estudios realizados para apoyar la hipótesis de la vía oral-oral abarcan detección de DNA mediante PCR y el aislamiento del microorganismo a partir de placa dental y saliva en pacientes infectados [38-40]; las razones que le dan soporte a esta vía son las siguientes: 1) Hay un recambio constante de la mucosa gástrica; 2) *H. pylori* puede encontrarse en el jugo gástrico, 3) el reflujo de jugo gástrico puede alcanzar la cavidad oral y *H. pylori* colonizarla, en particular la placa dental y 4) la saliva puede ser el vehículo de transmisión [41]. La vía gastro-oral se sustenta en los argumentos de la vía oral-oral, además del hecho de que el reflujo y el vómito podrían ser los mecanismos por los cuales *H. pylori* sale del estómago, de estos fluidos corporales se aisló al microorganismo, para aceptar la vía gastro-oral como la vía de transmisión del microorganismo [42].

El aislamiento de *H. pylori* se ha reportado a partir de heces en el Reino Unido y en Gambia [43-45], además de la detección del microorganismo en heces por PCR [46, 47]; los argumentos que apoyan esta vía de transmisión son los siguientes: 1) *H. pylori* se encuentra ocasionalmente en jugo gástrico; 2) el jugo gástrico es eliminado constantemente

en el intestino, y por consiguiente, *H. pylori*; 3) *H. pylori* puede sobrevivir en heces y ser eliminado al ambiente; y 4) Heces o agua y alimentos contaminados con estas podrían ser el vehículo de transmisión, siguiendo el modelo de *Shigella* o *Salmonella typhi* [41].

El agua como posible vehículo de transmisión de *Helicobacter pylori*. Presencia en sistemas de agua en distintas partes del mundo

Los microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales transmitidos por agua son predominantemente de origen fecal. Desde que en 1850 el médico inglés John Snow estableció que el cólera era transmitido por agua, patrón que se observa para otros patógenos que causan diarrea y otras enfermedades, tales como hepatitis, tifoidea, disentería, leptospirosis, giardiasis y gastroenteritis. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en un reporte emitido en el 2004, estima que cerca de 1.1 billón de personas beben agua contaminada con *Salmonella typhi*, *Shigella spp.* y virus de hepatitis A o E, por ejemplo [48].

En diferentes países se han llevado a cabo algunos estudios en ríos, pozos, sistemas de distribución de agua, agua de riego y agua de deshecho, enfocándose a posibles vías de transmisión hídrica de *H. pylori*. La correlación entre fuentes de agua y la prevalencia de *H. pylori* que se describió en Perú, señalan a las fuentes de abastecimiento municipales como fuentes importantes en la transmisión de este microorganismo asociado con familias de bajo nivel socioeconómico [49, 50]. El consumo de agua sin filtrar o sin hervir ha sido asociado a la infección por *H. pylori* en población del Sur de la India [51]. En Colombia se ha mencionado además de agua, verdura y hortalizas crudas, especialmente lechuga regada

con agua residual y se postuló como ruta de transmisión potencial [52]. *H. pylori* también ha sido detectado en agua de pozo, agua municipal y agua residual tratada en Suecia, resultados no esperados dados los modernos sistemas de tratamiento de ese país [53]. También fue encontrada en agua superficial y agua subterránea de muestras tomadas de Pensilvania y Ohio en Estados Unidos, en sitios relativamente contaminados y al ser comparada con bacterias indicadoras de contaminación fecal, no se encontró relación alguna [37]. En Japón se hizo un estudio en cuatro ríos ubicados en la región de Tohoku y se examinó la prevalencia de la bacteria en niños que asistían a jardín de niños y guarderías ubicados en las cercanías de los ríos estudiados, encontrando que la presencia de *H. pylori* en estos ríos estuvo estrechamente relacionada a los asentamientos humanos, sin embargo, no se encontró una relación entre la prevalencia en los niños y la presencia del microorganismo en los ríos, tal vez debido a la falta de sensibilidad en las técnicas empleadas en el estudio, concluyendo que el agua de río puede ser un factor de riesgo para la transmisión de la bacteria [54].

Otro factor importante que pudiera participar en la transmisión del microorganismo a través del agua, es que es capaz de formar biopelículas, de hecho, se ha sugerido que *H. pylori* podría existir en el ambiente en forma de biopelícula y que al ser ingerido y al encontrarse en la mucosa gástrica, este prolifera como bacteria libre en el estómago [55], en estudios *in vitro* se ha demostrado que *H. pylori* puede formar biopelículas en el ambiente, en la interfase aire-líquido adhiriéndose a vidrio y acero inoxidable [55]; se ha detectado DNA de *H. pylori* en biopelículas formadas por distintas bacterias, cabe aclarar que encontrar DNA de la bacteria no implica que esta se encontrara viable [56-60]. Degnan y cols., diseñaron un medio de cultivo selectivo (medio HP) para el aislamiento de la bacteria de

muestras de agua, esto surge como una respuesta al problema que representa el aislamiento del microorganismo a partir de muestras de agua [61].

La inmunoseparación magnética (ISM) es una técnica que ha demostrado ser eficiente en el aislamiento de células eucariotas a partir de fluidos tales como la sangre, por lo cual se han encontrado varias aplicaciones, por ejemplo: la detección de bacterias y virus [62].

El aislamiento de bacterias unidas a partículas magnéticas mediante la reacción antígeno-anticuerpo se ha logrado inoculando las partículas magnéticas a medios de cultivos líquidos o sobre el agar de medios selectivos y posteriormente, la identificación se realiza por métodos convencionales o rutinarios. La técnica está sustentada en el hecho de que las bacterias unidas inmunológicamente a las partículas magnéticas permanecen viables y continúan multiplicándose si se les provee con los nutrientes necesarios. La fracción aislada por ISM puede ser lavada para eliminar organismos unidos inespecíficamente. Se han utilizado anticuerpos monoclonales y policlonales en la ISM. Estos anticuerpos pueden estar unidos a las partículas directa o indirectamente, utilizando partículas precubiertas con anticuerpos anti-ratón o anti-conejo (Figura 4). Las ventajas que ISM presenta, son: recuperación y concentración del microorganismo, remoción de agentes inhibidores de la muestra; la desventaja de la técnica radica en la disponibilidad limitada de anticuerpos específicos contra el microorganismo de interés [62].

Con respecto a *H. pylori*, esta técnica se ha utilizado como tratamiento previo a la detección del microorganismo por microscopia, cultivo bacteriológico y enriquecimiento, inmunoensayos, hibridación y amplificación por PCR [62]; Enroth y cols., utilizaron la

ISM como una herramienta para descontaminar la muestra con la que se hizo una amplificación por PCR para la identificación de *H. pylori* [63]. Lu y cols., también emplearon esta técnica, como un proceso previo al cultivo microbiológico de muestras de agua [64]; en otros estudios solo se ha detectado la presencia de *H. pylori* en agua utilizando la PCR [65, 66], es preciso recordar que la correlación de la viabilidad celular con la detección de DNA es pobre; además el DNA persiste en una forma detectable por PCR en cultivos negativos de muestras clínicas y ambientales; así que detectar la presencia de un organismo mediante PCR no necesariamente garantiza que dicho organismo este viable, solo indica que está presente el DNA de la especie en cuestión [67].

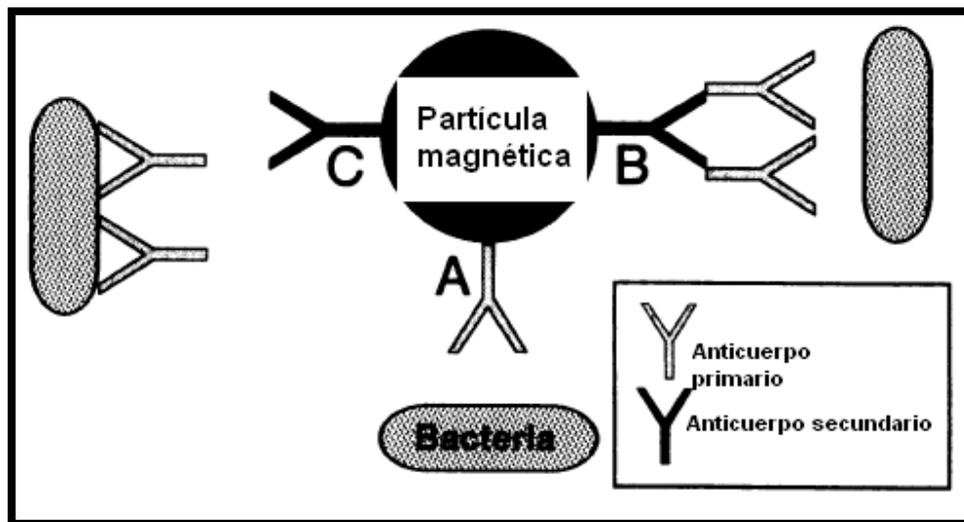


Figura 4. Inmunoseparación Magnética de microorganismos. El anticuerpo específico puede ser adherido directamente a la partícula magnética (A) o a través de un anticuerpo secundario (B). El anticuerpo específico puede ser puesto en contacto con el microorganismo y después ser unido a la partícula magnética (C).

***Helicobacter pylori* en sistemas de agua en México**

En la República Mexicana se ha realizado la detección del microorganismo, así como de la presencia del gen asociado a la citotoxina (*cagA*) de *H. pylori* en muestras de agua, con una frecuencia de positividad del 42% la cual es similar a la observada en humanos, con lo cual se refuerza la hipótesis de que la vía de transmisión del microorganismo puede ser de origen hídrico [68, 69], sin embargo, aún no es del todo aceptada. Ya que se requiere que cumpla los siguientes requisitos 1) su aislamiento en cultivo microbiológico o determinar que son formas viables e infectivas, 2) que se encuentre en una dosis potencialmente infectiva (aproximadamente 10^4 bacterias) [30].

Por otro lado, es importante entender la relación entre las cepas ambientales y las clínicas de *H. pylori*, para conocer si las cepas clínicas están circulando en el ambiente y si el agua actúa como el vehículo de transmisión, que permita su permanencia. También se observó una asociación de *H. pylori* con los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Vibrio* (no *cholerae*) y *Aeromonas* [69]. En un estudio representativo de los pozos de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) se encontró, en al menos el 20% de las muestras de agua subterránea estudiadas, la presencia de *H. pylori*. En dicho estudio se observaron deficiencias importantes en los sistemas de desinfección del agua, lo que implica un serio riesgo a la salud de la población [70, 71].

JUSTIFICACIÓN

La presencia de *H. pylori* en distintas fuentes de agua (para uso y consumo humano, de riego, superficiales) se ha determinado por métodos moleculares y el agua se ha sugerido como posible vehículo de transmisión del microorganismo; por lo cual resulta de interés recuperar en cultivo microbiológico a *H. pylori* a partir de muestras de agua para uso y consumo humano.

HIPÓTESIS

Si se detecta la presencia de *H. pylori* por métodos moleculares en agua, entonces se puede recuperar en cultivo microbiológico al microorganismo usando la Inmunoseparación Magnética.

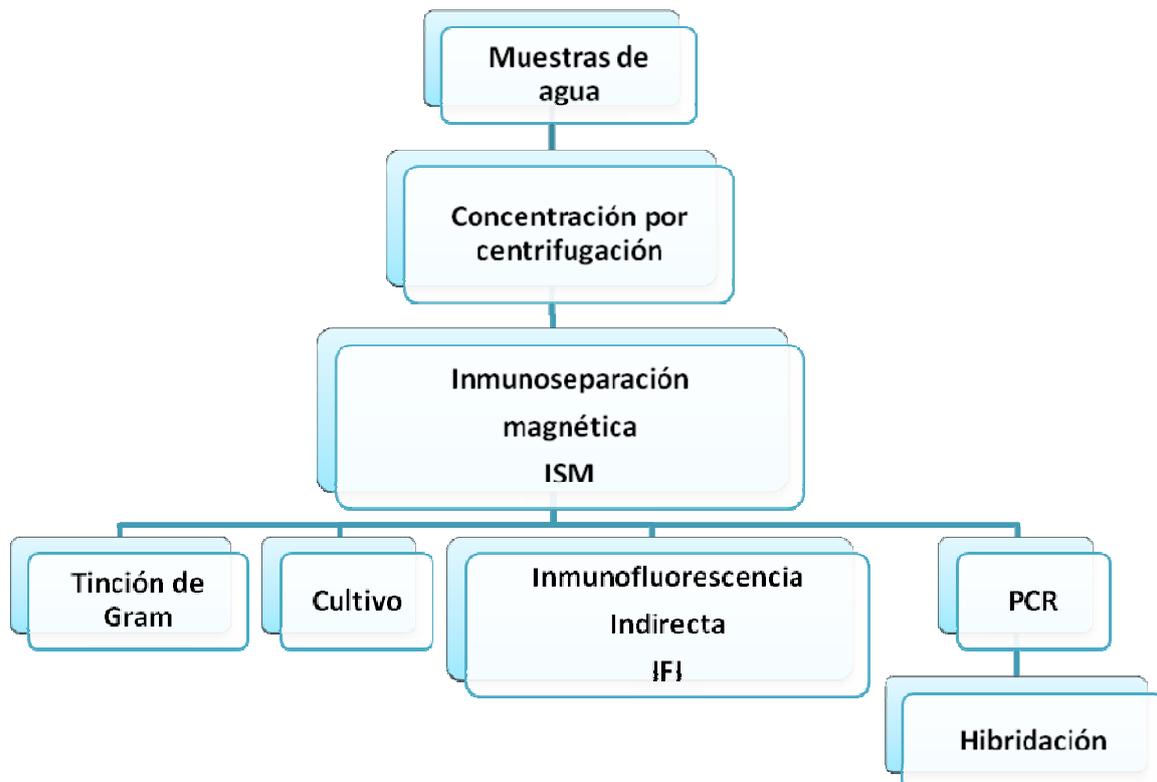
OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Helicobacter pylori* en muestras de agua para uso y consumo humano.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la presencia de *H. pylori* en agua mediante PCR-Hibridación.
2. Determinar la morfología de *H. pylori* presente en agua mediante inmunofluorescencia indirecta.
3. Aislar en cultivo microbiológico a *H. pylori* de muestras de agua utilizando inmunoseparación magnética.

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



METODOLOGÍA

Cultivo de Helicobacter pylori ATCC 700392, ATCC 700824 y 7C (aislamiento clínico).

Una alícuota de 40 µL de una suspensión bacteriana de las cepas de *H. pylori* conservada en Caldo Brucella suplementado con 10% Suero Fetal Bovino, fue utilizada para inocular una placa de agar *Haemophilus* Test Medium (HTM) suplementado con 7% de suero de caballo, se incubó 72 h a 37° C en condiciones de microaerofilia (10% de CO₂); transcurrido este tiempo se tomó una asada y se realizó la resiembra de dos cajas de agar HTM que fueron incubadas bajo las condiciones antes descritas durante 48 h. Estos cultivos se mantuvieron a lo largo de la estandarización de los ensayos y de estos cultivos se tomó paquete bacteriano para los mismos. La identificación de los microorganismos se realizó mediante tinción de Gram, catalasa, oxidasa, ureasa y por métodos moleculares, mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 109 pb del gen *16S RNAr* [2, 6].

Extracción de Ácidos Nucleicos. Para la extracción del DNA de las cepas tipo de *H. pylori* y de las muestras de agua (antes y después de la inmunoseparación magnética), se empleó el método Tiocianato de Guanidina-EDTA-Sarcocinato (GES) [72]. Brevemente; 500 µL de la suspensión bacteriana o 1 mL del concentrado de las muestras de agua, se centrifugan a 14,000 rpm durante 10 min., se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 100 µL de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8.0 – EDTA 1 mM (TE), luego se le agregaron 500 µL de la solución de GES, se agitaron suavemente por inversión 10 veces, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se adicionaron 250 µL de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló por inversión, se incubó a temperatura ambiente,

durante 10 min. Se adicionaron 550 μL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión durante 5 min y se centrifugó a 14,000 rpm, durante 10 min. La fase acuosa fue recuperada en un tubo nuevo y se adicionó un volumen de isopropanol frío y se incubaron a -20°C , durante toda la noche, posteriormente, se centrifugaron a 14,000 rpm, durante 5 min, se lavó el paquete de DNA con 500 μL de etanol al 70%, se centrifugó a 14,000 rpm, durante 2 min, se dejó secar el paquete de DNA, se resuspendió en agua grado biología molecular y se almacenaron a -70°C , hasta su uso.

Detección de H. pylori mediante la amplificación por PCR. Esta se hizo empleando un PCR-semianidado del gen *16S RNA ribosomal* [73]. La primera amplificación se realizó de la siguiente manera: 5 μL del templado de DNA se adicionaron a 20 μL de una mezcla de reacción para PCR que contenía: Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl_2 1.0 mM, 200 μM de cada uno de los deoxinucleótidos (Roche, Manheim, Alemania), 10 pmol de cada uno de los iniciadores Hp1 y Hp3 (Tabla 3) y 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogene). La segunda amplificación se realizó de manera similar a la primera amplificación, sólo que para la segunda amplificación se utilizaron 24 μL de la mezcla de reacción para PCR, anteriormente descrita; y en este ensayo se emplearon los iniciadores Hp1 y Hp2 (Tabla 3), y 1 μL del producto de PCR (pPCR) obtenido en la primera amplificación. Para cada ensayo de amplificación por PCR, se incluyó DNA de *H. pylori* ATCC 700392 como control positivo de amplificación, DNA de linfocitos humanos y DNA de *Escherichia coli* ATCC 25922, como controles negativos de amplificación y agua como control negativo de contaminación de reactivos. La amplificación por PCR se realizó en un Termociclador GeneAmp 9700 (PE, Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: $94^{\circ}\text{C}/45\text{s}$, $60^{\circ}\text{C}/45\text{s}$ y $72^{\circ}\text{C}/45\text{s}$; 30 ciclos en la primera amplificación y 25 ciclos en la

segunda. Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio a través de un transiluminador con luz ultravioleta.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *16S RNAr* por PCR.

<i>Iniciador</i>	<i>Secuencia</i> 5'→3'	<i>Tamaño</i> <i>del</i> <i>producto</i> <i>(pb)</i>	<i>Temperatura</i> <i>de</i> <i>amplificación</i> <i>(°C)</i>	<i>Posición</i> 5'→3' <i>(pb)</i>	<i>Referencias</i>
Hp1	CTGGAGAGACTAAGCCCTCC			834-853	
Hp2	ATTACTGACGCTGATTGTGC	109	60	744-763	Ho SA, y
Hp3	AGGATGAAGGTTTAAGGATT			407-426	cols. [73]
pHp	CATCCATCGTTTATAGGGCGTG	-	42	806-825	

Confirmación de la presencia de H. pylori mediante hibridación. Para la confirmación de los ppPCR, estos fueron hibridados con la sonda pHp marcada con digoxigenina en su extremo terminal 3' de acuerdo a las instrucciones del fabricante (DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling kit, Boehringer Mannheim Biochemical). Los ppPCR fueron electrotransferidos a 50 volts durante una hora a membranas de nitrocelulosa (Hybond N+, Amersham), a partir de un gel de poliacrilamida al 12%, en TBE 0.5X (Tris base 44 mM - Ácido bórico 44 mM - EDTA 1mM, pH 8.0) [74], posteriormente, el DNA se fijó a la membrana usando un Crosslinker (UVP) a 12,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$. La membrana se incubó 1 hora con solución de prehibridación [Solución amortiguadora de citrato salino 5X (SSC, 750 mM NaCl, 75 mM de citrato de sodio, pH 7.0), Reactivo de bloqueo 2% (Boehringer

Mannheim), N-laurilsarcosina 0.1%, Dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.02% y reactivo de Denhart (Albúmina sérica bovina, fracción V 0.5 g; Ficol (tipo 400) 0.5 g y Polivinilpirrolidona 0.5 g)], luego de este tiempo, se agregó la sonda pHp marcada (3.3 pmol/mL) (se calienta previamente a ebullición 5 minutos y se enfría en hielo 2 minutos) en 15 mL de solución fresca de prehibridación y se dejó incubando toda la noche a 42° C. Posteriormente, se realizó un lavado con SSC 2X-SDS 0.1%, a temperatura ambiente, durante 15 min, se realizó un segundo lavado con SSC 0.5X-SDS 0.1%. Posteriormente, la membrana se lavó por 5 min en una solución de malatos (Ácido maléico 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM), luego se adicionó una solución de bloqueo al 2%, durante 30 min a temperatura ambiente, se desechó la solución de bloqueo y se adicionó solución de bloqueo fresca con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:5,000) (Boehringer Mannheim), Luego, se realizaron dos lavados de 15 min con la solución de malatos, posteriormente, se realizó un lavado de 5 min con una solución de revelado (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5). El revelado de la membrana se realizó empleando 10 mL de la solución de revelado y 70 µL de una solución de NBT-X fosfato (nitroazul de tetrazolio y 5-bromo, 4-cloro, 3-indoil-fosfato) (Boehringer Mannheim), se guardó en oscuridad durante 2 horas, la membrana se lava con agua corriente.

Concentración de las muestras de agua. Esta se realizó por centrifugación de la muestras de agua a 10,000 x g, durante 20 minutos, a 4° C, reduciendo el volumen inicial de 1L a un volumen de aproximadamente 15 mL.

Purificación de los anticuerpos anti-H. pylori para la Inmunoseparación Magnética (ISM) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Se purificaron los anticuerpos anti-*H. pylori* a partir de 9 sueros hiperinmunes de conejo (Tabla 4) contra células completas de *H. pylori* (Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Facultad de Medicina), de acuerdo al protocolo descrito en Current protocols in immunology [75]. Brevemente, Los anticuerpos de los sueros hiperinmunes se precipitaron con sulfato de amonio a una saturación del 45%, en agitación suave, a temperatura ambiente, durante 2 horas; posteriormente, se centrifugaron una hora a 20,000 x g, a 4° C. El precipitado fue resuspendido en 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS; Cloruro de sodio 140 mM, Fosfato ácido de sodio 20 mM, Fosfato diácido de potasio 1.4 mM, Cloruro de potasio 2.6 mM), pH 8.0, estéril, y se purificaron en una columna de Affi-Gel Proteína A (BioRad), se lavó la columna con 2.5 volúmenes de PBS, la columna fue eluida con 10 mL de una solución de ácido cítrico 0.1 M, pH 3.0; se colectaron fracciones del eluido y se leyó la absorbancia de cada fracción a 280 nm; las fracciones del pico de proteína fueron dializadas en PBS con azida de sodio (SIGMA) al 0.01% [75], posteriormente, los anticuerpos fueron concentrados utilizando el sistema Centriprep-30 (Amicon). De este concentrado se hicieron alícuotas, las cuales se almacenaron a -20° C.

El seguimiento de la purificación de anticuerpos anti-*H. pylori*, la determinación del título y la especificidad se realizó por ELISA, para lo cual, se emplearon células completas de *H. pylori* 26695 (ATCC 700392), *Aeromonas sp*, *Enterococcus sp*, *Enterococcus cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* formalinizadas (aisladas de agua) [76].

Tabla 4. Cepas de *H. pylori* empleadas para la inmunización de conejos.

Suero	Cepa de <i>H. pylori</i>	Procedencia
I	52A3N	Úlcera péptica
II	ATCC 49503	Úlcera péptica
III	64C10	Úlcera péptica hemorrágica
IV	ATCC 51932	Gastritis
V	60A6	Úlcera péptica hemorrágica
VI	ATCC 53726	Úlcera péptica
VII	1C3	Úlcera péptica hemorrágica
VIII	62A9	Úlcera péptica hemorrágica
IX	46A5	Úlcera péptica

Recuperación de H. pylori por Inmunoseparación magnética. Para este procedimiento se empleó una mezcla de los anticuerpos purificados II y V, con una concentración total de 42.39 µg de proteína total en 100 µL; de esta mezcla se tomaron 8 µL, se mezclaron con 100 µL de anticuerpos anti-conejo obtenidos en cabra adheridos a microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec), acorde al protocolo descrito por Enroth y cols [63], esta mezcla de anticuerpos se incubó 24 h a 4° C con agitación suave. El tubo conteniendo la mezcla de anticuerpos se colocó en un campo magnético (separador MACS; Miltenyi Biotec), y se decantó el sobrenadante; se lavaron en 1 mL de PBS estéril desgasificado (PBS-ED; Cloruro de sodio 140 mM, Fosfato ácido de sodio 20 mM, Fosfato diácido de potasio 1.4 mM, Cloruro de potasio 2.6 mM) y se resuspendieron en 1mL de PBS-ED. A 1 mL de la muestra de agua concentrada se le adicionaron 20 µL de la solución que contiene el anticuerpo acoplado a la esfera magnética y el anticuerpo anti-*H.pylori*, se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se colocó la columna de selección positiva (LS; Miltenyi Biotec) en el separador MACS se lavó la columna con 3 mL de PBS-ED, posteriormente se pasó la muestra previamente incubada con los anticuerpos por la columna y se lavó tres veces con

3 mL de PBS-ED cada una. Se removió la columna del campo magnético y se eluyó con 5mL de PBS-ED y se colectó el eluido en un tubo nuevo y estéril; la muestra fue alicuotada en cinco fracciones de 1 mL cada una, las cuales fueron utilizadas para la detección de *H. pylori*, por técnicas moleculares, por inmunofluorescencia indirecta y cultivo microbiológico.

Inmunofluorescencia Indirecta. Se realizaron frotos de las muestras de agua concentrada pre y post ISM, se fijaron durante 5 minutos en acetona en una Jarra de Coplin; las laminillas fueron bloqueadas con una solución de PBS (Cloruro de sodio 140 mM, Fosfato ácido de sodio 20 mM, Fosfato diácido de potasio 1.4 mM, Cloruro de potasio 2.6 mM)-albúmina al 1% y se incubaron 1h a 37° C, en cámara húmeda; posteriormente, se eliminó la solución de PBS-albúmina y se adicionó una solución de PBS y la mezcla de anticuerpos anti-*H. pylori* II y V (1:500 y 1:1000, respectivamente); se incubaron una hora a 37° C, en cámara húmeda. Se lavaron y se adicionó el anticuerpo anti-conejo conjugado con fluoresceína (Invitrogen) a una dilución 1:1000, se incubaron una hora a 37° C, en oscuridad. Posteriormente, las laminillas se lavaron con PBS y se colocó una gota de colorante de contraste (Azul de Evans), y se observaron en el microscopio de fluorescencia.

Cultivo en el medio HP para la recuperación de H. pylori. Para la recuperación del microorganismo a partir de las muestras de agua se empleó el medio diseñado para tal fin por Degnan y cols; el cual está compuesto por bacto peptona (15g/L), extracto de carne (5g/L), extracto de levadura (5g/L), NaCl (5g/L), agar bacteriológico (15g/L), rojo de fenol (100mg/L), suero fetal bovino, anfotericina B (7.5mg/L), vancomicina (10mg/L), trimetoprim (5mg/L), polimixina B (3500UI/L), urea (600mg/L), HCl 1N (0.08%) [61]. Las muestras de agua

provenientes de la planta de tratamiento de cerro de la Estrella fueron concentradas por centrifugación, se realizó una dilución 1:10 y se sembró el medio por estría cruzada. Por otro lado, se colocaron membranas de 0.65 μm en las cuales se colocaron 100 μL de muestra antes de concentrarla, se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, se retiró la membrana y las placas fueron incubadas en un incubador con CO_2 a 37° C durante 48 h.

*Cultivo en medio bifásico y líquido para la recuperación de **H. pylori** a partir de muestras de agua.* La fase sólida del medio bifásico esta constituida de agar Infusión-Cerebro-Corazón (BHI), suplementado con 0.1% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1% de Isovitalex (BD, BIOXON) y una mezcla de antibióticos (Anfotericina B 2 mg/mL, Vancomicina 10 mg/mL, Trimetoprim 5 mg/mL y Polimixina B 250 UI/mL); la fase líquida esta constituida por los mismos componentes que la fase sólida, solo que el agar BHI es sustituido por caldo BHI. El medio líquido consiste de una solución de extracto de levadura al 1%, suplementado con 1% de Isovitalex (BD, BIOXON) y adicionado con la mezcla de antibióticos previamente mencionada. Estos medios fueron inoculados con 1 mL de las muestras de agua después de la ISM e incubados durante 48 h a 37° C en condiciones de microaerofilia. Posteriormente, se tomó una asada del medio bifásico y se sembró por agotamiento en una placa de agar HTM suplementado con 7% de suero de caballo, se incubó durante 48h a 37° C en condiciones de microaerofilia, transcurrido este tiempo si se observaban colonias con morfología típica de *H. pylori*, se tomaba una colonia sospechosa y se sembraba en agar HTM suplementado con 7% de suero de caballo y se realizaron Gram, catalasa, oxidasa y prueba de urea.

Seguimiento de formas cocoides de H. pylori. Un cultivo de 48 horas de *H. pylori* 26695 (ATCC 700392) fue cosechado y suspendido en 5 mL de Solución Salina Isotónica (SSI) estéril, se almacenó a temperatura ambiente, se tomaron alícuotas de 400 µL en distintos tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 16, 17, 21 días). Las alícuotas se emplearon para hacer dos frotos, uno para tinción de Gram y el segundo para Inmunofluorescencia indirecta.

Secuenciación del gen 16S RNAr para la identificación de la cepa ambiental. Esta se hizo por la amplificación de un fragmento de 880 pb del gen *16S RNAr* por PCR. Brevemente; cinco µL del templado de DNA (extracción con GES) se adicionaron a una mezcla de reacción para PCR que contenía: MgCl₂ 1.5 mM, 300 µM de cada uno de los deoxinucleótidos (Roche, Manheim, Alemania), 20 pmol de cada uno de los iniciadores 16S-27F [AGAGTTTGATCMTGGCTCGAG (M = A + C)] y 16S-907R [CCGTCAATT CMTTTRAGTTT (M = A + C; R = A + G)] y 1.5 UI de *Taq* DNA polimerasa (Roche, Manheim, Alemania). La amplificación por PCR se realizó en un Termociclador GeneAmp 9700 (PE, Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 94° C/5min, 94° C/1min, 48° C/1min, 72° C/1.5min y 72° C/7min; 35 ciclos. El producto amplificado fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio a través de un transiluminador con luz ultravioleta. El producto fue purificado utilizando ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) y enviado para su secuenciación.

RESULTADOS

Fase de estandarización. La estandarización de la amplificación por PCR-hibridación para la detección de *H. pylori* a partir de muestras de agua, se realizó mediante el uso de las cepas tipo (ATCC 53726, ATCC 43504); una vez comprobado que el DNA de las cepas tipo amplificaba, se emplearon 10 muestras de agua, las cuales provenían de la Planta de Tratamiento de agua del Cerro de la Estrella (Tabla 5). Al realizar la amplificación del gen *16S RNAr* tres de las diez muestras de agua fueron positivas a la presencia de DNA de *H. pylori* (Figura 8A), las muestras positivas provenían de un canal de riego, agua después de la cloración y agua después del tratamiento biológico (lodos activados); al hibridar estos productos de amplificación con la sonda pHp, se encontró que sólo dos de ellas fueron positivas a la hibridación, estas fueron las muestras de agua después de la cloración y agua después del tratamiento biológico (Figura 8B).

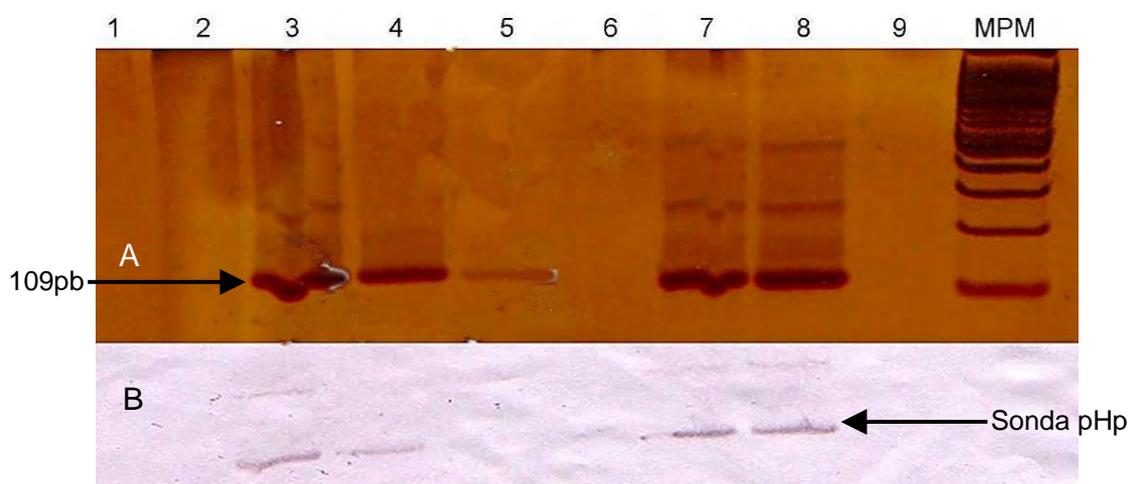


Figura 8. Detección de *H. pylori* por PCR-Hibridación. A) gel de poliacrilamida al 12 %, teñido con plata. B) hibridación de los productos de amplificación con la sonda pHp. En el carril 1. Blanco de reactivos, 2. Control negativo, 3 y 4 Controles positivos (ATCC 53726, ATCC 43504), 5. Canal de riego, 6. Influyente de Xochimilco, 7. Agua después del tratamiento químico, 8. Agua después del tratamiento biológico, 9. Influyente de la planta de tratamiento "Cerro de la Estrella", MPM Marcador de Peso Molecular.

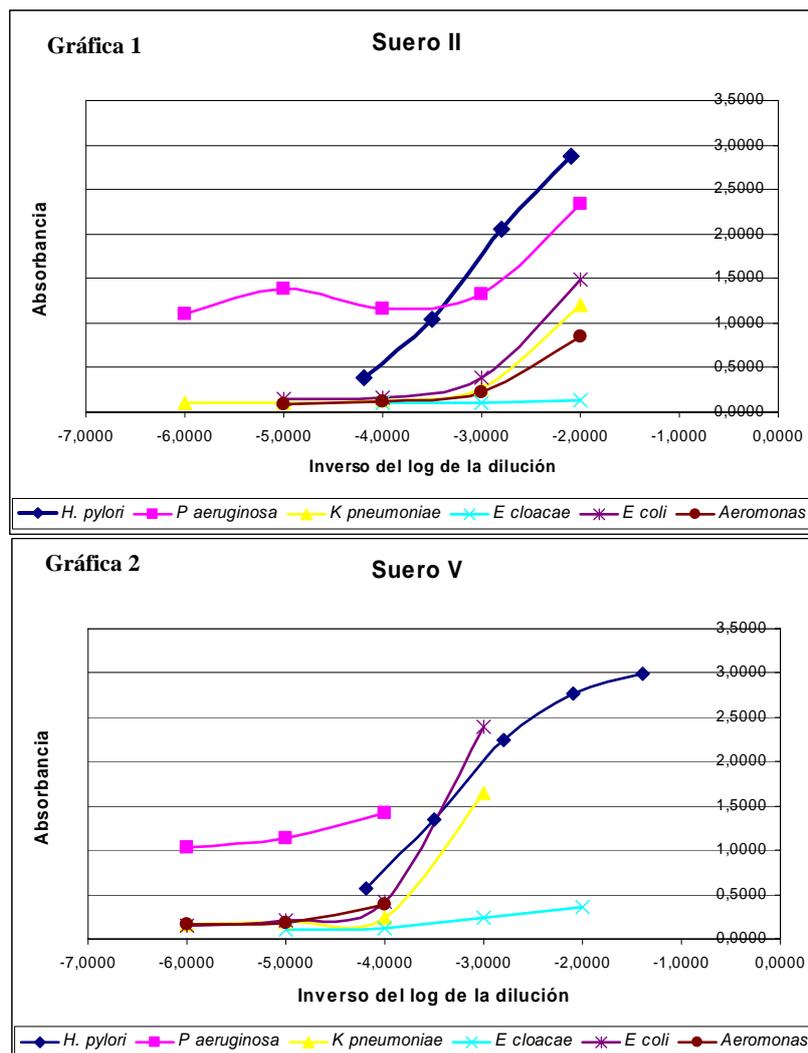
Un medio diseñado por Degnan y cols. se probó para el aislamiento de *H. pylori*. En ninguno de los medios empleados (estría cruzada y membrana) se recuperó *H. pylori*; la cepa tipo ATCC 700392 creció adecuadamente en este medio.

Tabla 5. Sitios de los cuales se tomó una muestra en la planta de tratamiento del cerro de la Estrella.

ID	Sitio
1	Influente a la planta de tratamiento Cerro de la Estrella
2	Después del tratamiento biológico (lodos activados)
3	Después del tratamiento químico (cloración)
4	Influente a los canales de Xochimilco
5	Canal de Riego
6	Toma domiciliaria (Tepepan)
7	Efluente del Sistema
8	Pozo Tepepan
9	Pozo San Luis
10	Toma domiciliaria (Cutzamala)

Para realizar la estandarización de la inmunofluorescencia indirecta y la inmunoseparación magnética fue necesaria la purificación de anticuerpos anti-*H. pylori*; en el laboratorio del PIMM se contaba con una colección de nueve sueros hiperinmunes de conejo, los cuales se purificaron mediante columna de Afigel-proteína A, el título de los anticuerpos se determinó mediante ELISA, obteniendo títulos de 1:125 hasta 1:10,000.

La especificidad de estos anticuerpos contra bacterias encontradas frecuentemente en muestras de agua (aislamientos ambientales), se probó, ver Gráficas 1 y 2; por lo cual se seleccionaron los anticuerpos II y V para ser utilizados en las técnicas de IFI e IMS.



Gráficas 1 y 2. Curvas de titulación de los sueros II y V contra *H. pylori* y bacterias aisladas frecuentemente de muestras de agua.

Los anticuerpos II y V fueron probados contra proteínas totales de tres cepas distintas de *H. pylori* (ATCC 700392, ATCC 700824 y 7C), las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12%, uno de los geles, fue teñido por tinción de Azul de Coomassie y posteriormente con nitrato de plata (Figura 10), el segundo gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para realizar un inmunoblot con los anticuerpos II y V. Ambos anticuerpos reconocieron una considerablemente de proteínas, abarcando un amplio intervalo de masa molecular, desde 10 hasta 250 kDa (figura 11). En la figura 11 se observa que las proteínas que reconocen estos anticuerpos son en su mayoría de alto peso molecular y que el perfil de reconocimiento no es el mismo, si bien hay proteínas que ambos anticuerpos policlonales reconocen, también hay proteínas que son reconocidas por solo uno de ellos, en la figura 11, panel A, se observa que el anticuerpo II reconoce una banda que se encuentra aproximadamente en 50 kDa, mejor que el anticuerpo V; en cambio, el anticuerpo V reconoce mejor proteínas de bajo peso molecular en el área de 15 a 25 kDa. Las proteínas que se esperaban fueran reconocidas por los anticuerpos eran VacA, CagA, BabA, las subunidades A y B de la ureasa, debido a que estas proteínas son las reportadas como altamente inmunogénicas [77].

Los anticuerpos purificados II y V se utilizaron en combinación para la estandarización de la IFI de acuerdo al protocolo descrito en Current Protocols in Immunology [78], con los títulos obtenidos experimentalmente para los anticuerpos primarios contra *H. pylori* ATCC 700392 (1:5000 y 1:10,000) y el título de 1:5000 para el anticuerpo secundario fluoresceinado (Figura 12).

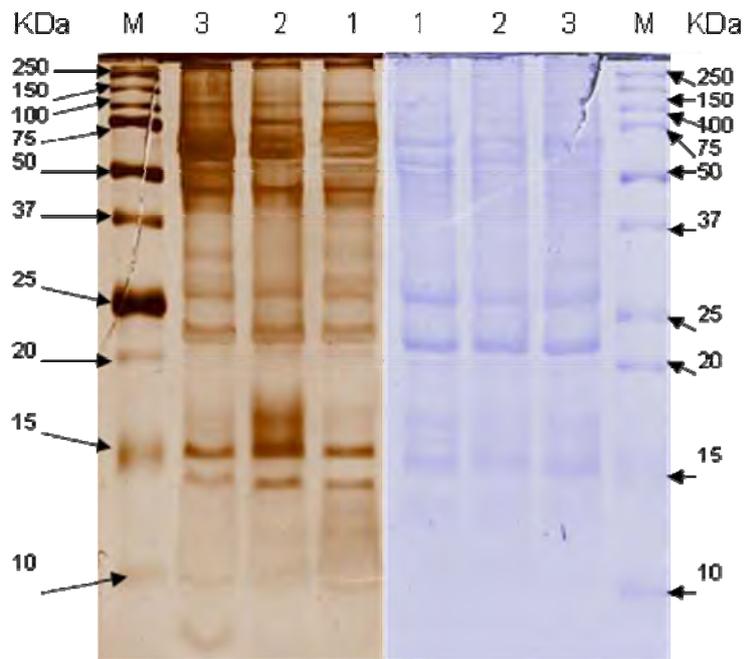


Figura 10. Perfiles electroforéticos e inmublot de las proteínas totales de *H. pylori* [1) Hp 7C, 2) Hp ATCC 700824, 3) Hp ATCC 700392, M) Marcador de masa molecular] en gel de poliacrilamida al 12%. A) gel teñido con nitrato de plata, B) gel teñido con azul de Coomassie.

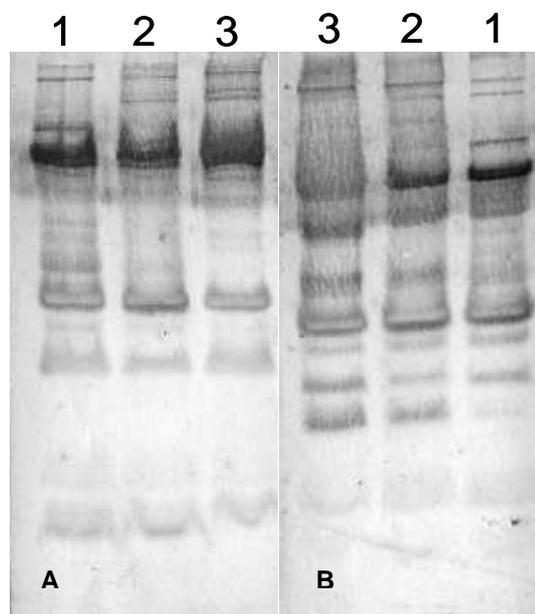


Figura 11. Perfil de las proteínas totales extraídas de las cepas de *H. pylori* [1) Hp 7C, 2) Hp ATCC 700824, 3) Hp ATCC 700392]. Inmublot A anticuerpo II; B Anticuerpo V.

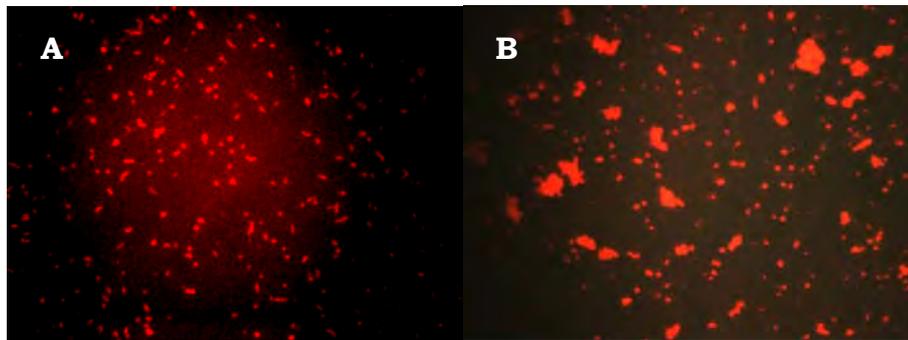


Figura 12. Inmunofluorescencia indirecta de *Helicobacter pylori* ATCC 700392. A) Formas bacilares y B) Formas cocoides.

La recuperación de *H. pylori* por inmunoseparación magnética (ISM) se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor, para la cepa tipo de *H. pylori* 26695 (ATCC 700392); sin embargo, no se recuperaron microorganismos; por lo cual, se probaron diferentes condiciones de temperatura, velocidad de centrifugación, tiempos de incubación con los anticuerpos, solución amortiguadora con y sin surfactante (Tween-20). Las condiciones a las cuales se recuperó la cepa tipo de *H. pylori*, fueron las siguientes: incubación con la mezcla de anticuerpos primario y secundario a 37° C, sin centrifugación y con una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) sin Tween-20.

Por otro lado, se realizó un seguimiento de la conversión de formas bacilares a formas cocoides, a las cuales se les realizó tinción de Gram (Figura 13), amplificación del gen *16S RNAr* por PCR y la Hibridación del fragmento amplificado, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Figura 14). Los anticuerpos probados con formas bacilares son capaces de reconocer formas cocoides hasta por 21 días, no se hizo un seguimiento de formas cocoides más allá de este tiempo; por lo tanto, la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta en las condiciones

empleadas es capaz de detectar formas cocoides de *H. pylori* envejecidas durante 21 días. En el caso de la amplificación del gen *16S RNAr* PCR-Hibridación también hubo detección hasta por 21 días (Figura 15.).

Fase experimental. Una vez que las metodologías habían sido probadas con la cepa tipo ATCC 700392, estas se probaron con once muestras de agua, ocho de ellas provenientes de canales de riego de Xochimilco y tres de Valle de Bravo.

Tabla 6. Sitio de procedencia de las muestras de agua probadas para la detección y aislamiento de *H. pylori*.

Muestra	Sitio de procedencia
A	Canal de Xochimilco (Japón)
B	Canal de Xochimilco (Draga)
C	Canal de Xochimilco (Japón)
D	Canal de Xochimilco (Draga)
E	Canal de Xochimilco (Riego)
F	Canal de Xochimilco (Japón)
G	Canal de Xochimilco (Draga)
H	Canal de Xochimilco (Apatlaco)
I	Valle de Bravo (Costa)
J	Valle de Bravo (Centro)
K	Valle de Bravo (Cortina)

En los frotis hechos antes de la ISM se observó una amplia variedad de microorganismos, cocos, bacilos, algas; y después de la ISM se observaron en la mayoría de las muestras cocos y bacilos, disminuyó considerablemente la cantidad de microorganismos presentes en el agua después de la ISM (Figura 16).

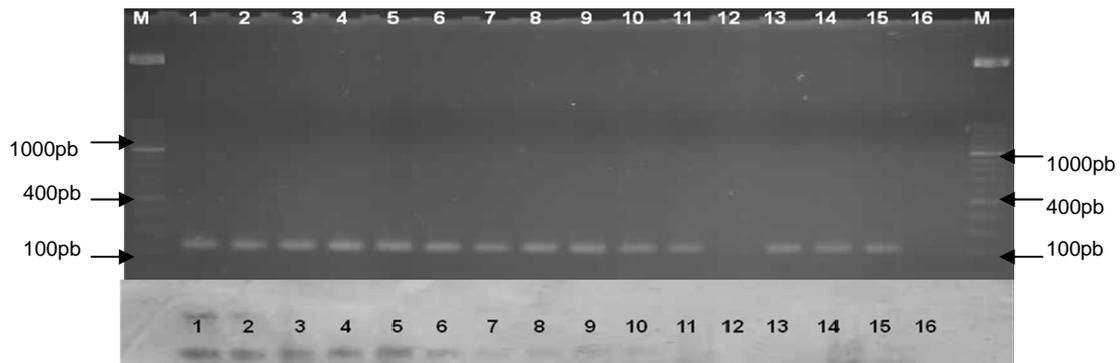


Figura 15. Parte superior, electroforesis en gel de agarosa 2%; parte inferior, membrana de nitrocelulosa después de la hibridación con la sonda pHp. M: marcador de masa molecular; **1**, formas cocoides (fc) 0 días; **2**, fc 1 día; **3**, fc 2 días; **4**, fc 3 días; **5**, fc 4 días; **6**, fc 5 días; **7**, fc 8 días; **8**, fc 11 días; **9**, fc 15 días; **10**, fc 16 días; **11**, fc 21 días; **12 y 13**, controles negativos; **14 y 15**, controles positivos; **16**, Blanco de reactivos.

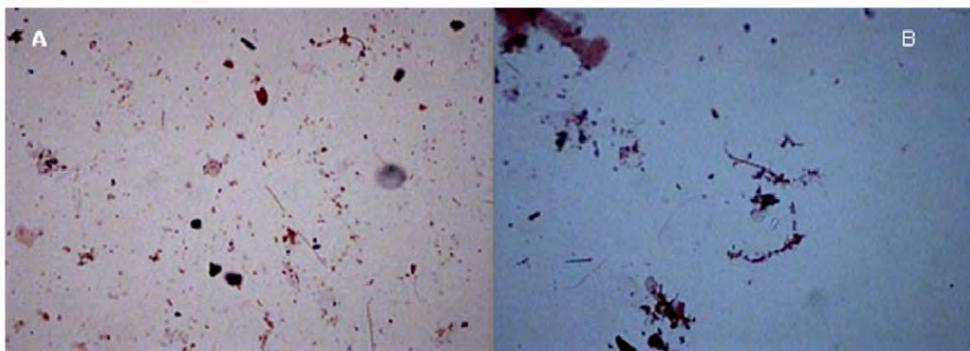


Figura 16. Tinción de Gram de la muestra proveniente del canal de riego Draga. A. Antes de la IMS. B. Después de la IMS.

Al realizar la amplificación del gen *16SRNAr* ninguna de las muestras antes y después del proceso ISM dio positivo para la presencia de *H. pylori*; también se realizó amplificación a alícuotas de los medios líquidos y bifásicos tomadas después de 48 horas y ninguna de estas dio cultivo positivo para la bacteria.

Al realizar el cultivo en medio bifásico, líquido y en placa sólo una de las ocho muestras de agua presentó una colonia con morfología macroscópica típica de *H. pylori*, esta colonia fue aislada y propagada, se hizo tinción de Gram y mostró una morfología microscópica característica de *H. pylori* (bacilos gramnegativos cortos); se hicieron las pruebas de oxidasa, ureasa y catalasa, de las cuales solo dio positiva a la última. La amplificación del gen *16S RNAr* a partir de DNA extraído de esta cepa y fue negativo para la presencia de *H. pylori*, ni para la presencia de microorganismos del género *Helicobacter*. Por lo cual se realizó la amplificación de un fragmento de 880 pb del gen 16S RNAr usando iniciadores universales (Figura 17), el fragmento se secuenciará para la identificación del microorganismo.

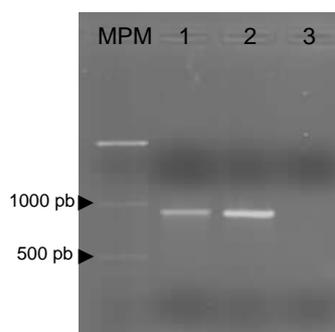


Figura 17. Amplificación de un fragmento de 880 pb del gen *16S RNAr* de la cepa recuperada en agua del canal Japón. MPM = Marcador de peso molecular, 1 = cepa recuperada del canal Japón, 2 = *H. pylori* ATCC 700392, 3 = Control de reactivos.

DISCUSIÓN

Es importante destacar que aún no se ha encontrado un reservorio de *H. pylori* fuera del cuerpo humano, por lo cual se ha planteado que la transmisión pueda darse de persona a persona; aún no se ha establecido una vía de transmisión para *H. pylori*, si bien hay evidencia a favor de las vías fecal-oral, oral-oral y gastro-oral [28, 38, 41, 43, 47, 79-81], también existe evidencia en contra [39, 42]. Se ha sugerido al agua como posible vehículo de transmisión ya que se ha detectado la presencia de *H. pylori* por métodos moleculares en distintas fuentes de agua, así como en distintas regiones geográficas [9, 31, 37, 49, 50, 53, 57, 63-66, 68, 82, 83]. Además, Lu y cols., utilizando Inmunoseparación magnética, reportaron el aislamiento mediante cultivo microbiológico de *H. pylori* a partir de agua de desecho; sin embargo, no ha sido reproducible la recuperación en cultivo microbiológico del microorganismo [64]. Son muchos los factores por los cuales es probable que esta bacteria no pueda ser recuperada de agua, ya que es un medio hostil para una bacteria exigente nutricionalmente; por otro lado, se ha sugerido que la bacteria bajo estas condiciones entra a un estado cocoide, como una forma de persistencia en el ambiente [84]. Diversos estudios han comparado la forma cocoide y la bacilar, en los cuales han encontrado que existen diferencias tales como: la forma cocoide tiene un contenido de DNA menor que la forma bacilar [11], en relación a la actividad metabólica, se ha encontrado que las formas cocoides presentan actividad metabólica hasta 3 meses después de su conversión, dicha actividad metabólica se requiere para la preservación de estructuras celulares tales como, citoplasma, membrana celular, flagelos y DNA; además, el perfil de proteínas antigénicas en formas bacilares y cocoides es casi idéntico, por ejemplo, ambos

presentan la proteína asociada a la citotoxina (CagA) (120-128 kDa), ureasa (29-31 kDa), una adhesina (30 kDa) y una porina (30 kDa) [10, 77].

La técnica de PCR utilizada fue reportada por primera vez por Ho y cols., la metodología fue empleada para la detección de *H. pylori* en muestras humanas y de animales; en la cual se utiliza la amplificación del gen *16S RNAr*, la técnica mostró ser sensible y específica, y para su confirmación se utiliza una sonda interna o la secuenciación del producto de amplificación [73]. Esta metodología ha sido empleada por distintos grupos de investigación [40, 47, 66]. En el desarrollo del presente proyecto, se utilizó esta metodología, en la cual se incluyeron controles positivos, negativos y de reactivos para la validación de los resultados de los diferentes ensayos.

En esta tesis se utilizó la ISM para la recuperación de *H. pylori* a partir de las muestras de agua, se decidió emplear esta técnica debido a que en reportes previos fue utilizada como un método para descontaminar muestras para su posterior procesamiento por PCR [63] y como un paso previo al aislamiento del microorganismo en cultivo microbiológico [64]. En el caso del presente trabajo experimental se emplearon anticuerpos obtenidos en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana, estos fueron purificados en el laboratorio debido a que para la obtención de los mismos se emplearon células completas de *H. pylori* de nueve cepas distintas, dichas cepas provenían tanto de aislamientos clínicos como de colecciones (ATCC), de esta manera se esperaba cubrir un perfil amplio de reconocimiento de antígenos; finalmente los anticuerpos utilizados para realizar la ISM fueron uno de aislamiento clínico y otro de una colección; esta técnica ha sido empleada para otros microorganismos (*E. coli*, *Shigella spp*, *Chlamydia trachomatis*, microorganismo de origen

ambiental como *Pseudomonas putida*, *Enterovirus*, *Cytomegalovirus*, *Plasmodium falciparum*) [62].

La mezcla de anticuerpos contra *H. pylori* II y V, seleccionados de los nueve obtenidos, reconocen una cantidad considerable de proteínas del extracto de *H. pylori* abarcando un amplio rango de masa molecular, desde 10 hasta 250 kDa; en las figuras 10 y 11 se puede apreciar que hay diferencias en el perfil de reconocimiento de cada anticuerpo por lo cual resultó conveniente utilizar la mezcla de estos anticuerpos; así como diferencias de reconocimiento entre las cepas utilizadas, una de ellas, la cepa 7C, la cual es un aislamiento clínico y las otras dos son cepas provenientes de una colección de cultivos tipos (ATCC). Por la masa molecular de las banda que fueron reconocidas en el western-Blot podemos asumir que las proteínas que reconocen estos anticuerpos podrían ser la subunidad alfa (26 kDa), la subunidad beta (61 kDa) y proteína C de la ureasa (49 kDa), *fliH* (29 kDa) (Bumann); además del reconocimiento de proteínas tales como: VacA, CagA, UreA, UreB, puesto que estas han sido reportadas como las proteínas altamente inmunogénicas de *H. pylori* [10], así que las regiones en las cuales se esperaba el mayor reconocimiento eran el área de alto peso molecular (arriba de 50 kDa), el área de 25 a 37 kDa y el área de 20 a 25 kDa, el uso de los dos anticuerpos está justificado porque, como podemos ver en la Figura 11, hay proteínas que reconoce un anticuerpo pero el otro no, así que al utilizar ambos anticuerpos aumentaban las probabilidades de identificar al microorganismo. De reportes previos se sabe que el perfil inmunogénico de la forma cocoide y la bacilar no varía significativamente, así que no esperábamos que hubiese problemas de reconocimiento de *H. pylori* en alguna de sus formas por los anticuerpos [10].

En el caso de la estandarización de la IMS, probamos con las condiciones indicadas por el fabricante, pero no obtuvimos recuperación de la bacteria; probamos incubando la suspensión bacteriana con los anticuerpos primarios, hacer lavados y después adherir el anticuerpo secundario, pero no hubo recuperación utilizando estas condiciones; en la investigación bibliográfica Enroth y col., reportaron que incubar primero los anticuerpos primario y secundario y una vez que estos habían reaccionado, incubar con la muestra de agua les dio buenos resultados como método de descontaminación [63], decidimos hacer este cambio y con estas condiciones logramos recuperar la cepa de *H. pylori* ATCC 700392; no reportamos porcentaje de recuperación debido a que al hacer las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para este experimento se obtuvo un número de colonias incontables para las diluciones a las cuales se realizó; ajustamos al tubo de 3 de MacFarland para posteriormente hacer diluciones, el problema con *H. pylori* es que produce una gran cantidad de lipopolisacárido, por lo cual tiende a formar cúmulos de bacterias y la densidad óptica no corresponde con la cantidad de bacterias reportadas para otros microorganismos.

Otro aspecto importante a considerar en el presente proyecto, es que *H. pylori* probablemente no se encuentra en forma bacilar y mas bien se en forma cocoide, puesto que este es un ambiente adverso para dicho microorganismo por la baja cantidad de nutrientes, el pH y la temperatura, por lo tanto era necesario determinar si nuestras técnicas eran capaces de detectar estas formas cocoides, por esta razón es que se decidió hacer el seguimiento de la transformación de forma bacilar a forma cocoide por un periodo de 21 días; se verificó que no hubiese contaminación y el cambio de morfología mediante al tinción de Gram y al hacer la IFI, pudimos observar que las formas bacilares se distinguen

perfectamente bien, pero al ir cambiando a forma cocoide se forman cúmulos de bacterias complicando la distinción de la morfología microscópica mediante esta técnica. Aunque la técnica de PCR ya había sido estandarizada para la bacteria, no se había probado para la detección de formas cocoides y ya que existen reportes en los que se cree que son formas degenerativas (formas anucleadas), y que por lo tanto no fuese posible detectar DNA de estas formas después de cierto tiempo, y puesto que de estar presente en las muestras de agua se debería a una contaminación reciente, por lo que se decidió hacer este muestreo por un tiempo corto, 21 días; se encontró que la amplificación del gen *16S RNAr* fue exitosa en cada uno de los tiempos muestreados en el seguimiento de la conversión de forma bacilar a cocoide, en la figura 15, se observa que hay un producto de aproximadamente 109 pb en cada uno de los tiempos de muestreo, que en los carriles de los controles positivos se observa también este producto, en el caso de los controles negativos se observa que hay un producto en el correspondiente al DNA de *E. coli*, probablemente esto se debió a una amplificación inespecífica, al realizar la hibridación se observó que esta señal se pierde, mientras que para los controles positivos está presente, aunque débil y que para las muestras del seguimiento de la conversión de forma bacilar a cocoide la señal se va debilitando conforme aumenta el tiempo de la conversión, esto probablemente se deba a que la cantidad de DNA y la calidad en las formas cocoides ya no es la misma que en las bacilares, esto ha sido reportado por Narikawa y cols [11].

El grupo de la Dra. Mazari Hiriart del Instituto de Ecología en colaboración con el grupo de la Dra. López Vidal de la Facultad de Medicina de la UNAM han reportado la detección mediante métodos moleculares de *H. pylori* en distintos tipos de agua del Valle de México (superficial, tratada, de pozos), ya que se cuenta con estos antecedentes se esperaba aislar al

microorganismo de agua. Las muestras provenían principalmente de dos lugares, canales de Xochimilco (agua de riego) y de Valle de Bravo (agua de uso recreativo); la cantidad de materia orgánica y microorganismos variaba radicalmente de las muestras de Xochimilco, donde había una mayor cantidad de ambas, a las muestras provenientes de Valle de Bravo. Al hacer las tinciones de Gram, antes y después de la ISM, las muestras provenientes de los canales de riego de Xochimilco presentaban una amplia gama de microorganismo, algas, protozoarios y bacterias, en su mayoría gramnegativas; en cambio, las muestras provenientes de Valle de Bravo mostraban pocos microorganismos. Al hacer la IFI, no se distinguen microorganismos con una morfología definida, a excepción de algunos cocos, en todas las muestras. Cabe mencionar que aún cuando los anticuerpos elegidos presentaban títulos altos y baja reactividad cruzada con las cepas frecuentemente encontradas en muestras de agua, como *P. aeruginosa*. Había una mayor probabilidad de que en las muestras donde había una mayor cantidad de microorganismos estuviese presente *H. pylori*, esto debido a que se ha reportado que puede encontrarse en biopelículas con otras especies de bacterias [55, 57-59].

CONCLUSIONES

Se recuperó por inmunoseparación magnética y cultivo microbiológico un bacilo gramnegativo, oxidasa positivo con morfología macroscópica típica de *H. pylori*.

No se detectó la presencia de *H. pylori* en las muestras de agua provenientes de canales Xochimilco y Valle de Bravo por las técnicas moleculares ni por inmunofluorescencia indirecta.

PERSPECTIVA

Las ruta de transmisión de *H. pylori* es un área de investigación de gran interés, se propone establecer un modelo murino para la recuperación de formas bacilares de *H. pylori* a partir de muestras de agua positivas a formas cocoides por técnicas moleculares e inmunofluorescencia.

Por otro lado, se determinará la identidad del microorganismo aislado mediante la secuenciación de un fragmento de 880 pb del gen *16S RNAr*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall BJ, Warren JR: **Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.** *Lancet* 1984, **1**(8390):1311-1315.
2. Owen RJ: **Helicobacter-species classification and identification.** *British medical bulletin* 1998, **54**(1):17-30.
3. Mitchell HM: **Epidemiology of Infection.** In: *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* Edited by Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL. Washington, DC: ASM Press; 2001: 7-18.
4. Cremonini F, Gasbarrini A, Armuzzi A, Gasbarrini G: **Helicobacter pylori-related diseases.** *European journal of clinical investigation* 2001, **31**(5):431-437.
5. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ: **Pathogenesis of Helicobacter pylori infection.** *Clinical microbiology reviews* 2006, **19**(3):449-490.
6. Fox JG, Megraud F: **Helicobacter.** In: *Manual of Clinical Microbiology.* Edited by Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, 9th edn. Washington, DC: ASM Press; 2007: 947-962.
7. Amieva-Fernández RI, Castillo-Rojas G, López-Vidal Y: **Antimicrobial Susceptibility Determination of Helicobacter pylori in Haemophilus Test Medium (Abstract).** *103rd General Meeting of the American Society for Microbiology* 2003:C079.
8. Nilsson HO, Blom J, Abu-Al-Soud W, Ljungh AA, Andersen LP, Wadstrom T: **Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of Helicobacter pylori.** *Applied and environmental microbiology* 2002, **68**(1):11-19.
9. Adams BL, Bates TC, Oliver JD: **Survival of Helicobacter pylori in a natural freshwater environment.** *Applied and environmental microbiology* 2003, **69**(12):7462-7466.
10. Benaissa M, Babin P, Quellard N, Pezennec L, Cenatiempo Y, Fauchere JL: **Changes in Helicobacter pylori ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form.** *Infection and immunity* 1996, **64**(6):2331-2335.
11. Narikawa S, Kawai S, Aoshima H, Kawamata O, Kawaguchi R, Hikiji K, Kato M, Iino S, Mizushima Y: **Comparison of the nucleic acids of helical and coccoid forms of Helicobacter pylori.** *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 1997, **4**(3):285-290.
12. Gribbon LT, Barer MR: **Oxidative metabolism in nonculturable Helicobacter pylori and Vibrio vulnificus cells studied by substrate-enhanced tetrazolium reduction and digital image processing.** *Applied and environmental microbiology* 1995, **61**(9):3379-3384.
13. She FF, Lin JY, Liu JY, Huang C, Su DH: **Virulence of water-induced coccoid Helicobacter pylori and its experimental infection in mice.** *World Journal of Gastroenterology* 2003, **9**(3):516-520.
14. Mizoguchi H, Fujioka T, Kishi K, Nishizono A, Kodama R, Nasu M: **Diversity in protein synthesis and viability of Helicobacter pylori coccoid forms in response to various stimuli.** *Infection and immunity* 1998, **66**(11):5555-5560.
15. Cellini L, Allocati N, Angelucci D, Iezzi T, Di Campli E, Marzio L, Dainelli B: **Coccoid Helicobacter pylori not culturable in vitro reverts in mice.** *Microbiology and immunology* 1994, **38**(11):843-850.

-
16. Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y: [***Helicobacter pylori*: focus on CagA and VacA major virulence factors**]. *Salud publica de Mexico* 2004, **46**(6):538-548.
 17. Montecucco C, Rappuoli R: **Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach**. *Nature reviews* 2001, **2**(6):457-466.
 18. van Amsterdam K, van Vliet AH, Kusters JG, van der Ende A: **Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases**. *FEMS microbiology reviews* 2006, **30**(1):131-156.
 19. Asaka M, Sepulvera AR, Sugiyama T, Graham DY: **Gastric Cancer**. In: *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Edited by Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL. Washington, DC: ASM Press; 2001: 481-496.
 20. Suerbaum S, Michetti P: ***Helicobacter pylori* infection**. *The New England journal of medicine* 2002, **347**(15):1175-1186.
 21. Hardman J: **Las bases farmacológicas de la terapéutica**, vol. I. México: McGraw-Hill; 1996.
 22. **Erradicación de Helicobacter pylori** [<http://www.facmed.unam.mx/bmd/textocompleto/revotras/medsur/enemar97/p-8.htm>]
 23. Misiewicz G HA: **Manual Médico sobre Helicobacter pylori**. UK: Science Press; 1995.
 24. Pérez PN EC, DQ Pérez: **Tratamiento de la infección por Helicobacter pylori: Comentario al Respecto**. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999, **18**:236-240.
 25. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ: **Helicobacter pylori**. *Clinical microbiology reviews* 1997, **10**(4):720-741.
 26. Cave DR: **How is Helicobacter pylori transmitted?** *Gastroenterology* 1997, **113**(6 Suppl):S9-14.
 27. Cave DR: **Transmission and epidemiology of Helicobacter pylori**. *The American journal of medicine* 1996, **100**(5A):12S-17S; discussion 17S-18S.
 28. Parsonnet J: **Helicobacter pylori: the size of the problem**. *Gut* 1998, **43**(Suppl 1):S6-9.
 29. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Munoz O: **A community-based seroepidemiologic study of Helicobacter pylori infection in Mexico**. *The Journal of infectious diseases* 1998, **178**(4):1089-1094.
 30. Azevedo NF, Guimaraes N, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ: **A new model for the transmission of Helicobacter pylori: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity**. *Critical reviews in microbiology* 2007, **33**(3):157-169.
 31. Bellack NR, Koehoorn MW, MacNab YC, Morshed MG: **A conceptual model of water's role as a reservoir in Helicobacter pylori transmission: a review of the evidence**. *Epidemiology and infection* 2006, **134**(3):439-449.
 32. Blaser MJ: **Helicobacter pylori phenotypes associated with peptic ulceration**. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement* 1994, **205**:1-5.
 33. Mobley HL: **Defining Helicobacter pylori as a pathogen: strain heterogeneity and virulence**. *The American journal of medicine* 1996, **100**(5A):2S-9S; discussion 9S-11S.

-
34. Husson MO, Gottrand F, Vachee A, Dhaenens L, de la Salle EM, Turck D, Houcke M, Leclerc H: **Importance in diagnosis of gastritis of detection by PCR of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from children.** *Journal of clinical microbiology* 1995, **33**(12):3300-3303.
 35. Kreiss C, Blum AL, Malfertheiner P: **Peptic ulcer pathogenesis.** *Current Opinion in Gastroenterology* 1995, **11** (Supplement 1):25-31.
 36. Suerbaum S, Wadstrom T: **Bacterial pathogenic factors.** *Current Opinion in Gastroenterology* 1995, **11**(Supplement 1):11-15.
 37. Hegarty JP, Dowd MT, Baker KH: **Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States.** *Journal of applied microbiology* 1999, **87**(5):697-701.
 38. Ferguson DA, Jr., Li C, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E: **Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva.** *Journal of clinical microbiology* 1993, **31**(10):2802-2804.
 39. Lizza F, Imeneo M, Maletta M, Paluccio G, Nistico S, Perticone F, Foca A, Pallone F: **Suggestion against an oral-oral route of transmission for *Helicobacter pylori* infection: a seroepidemiological study in a rural area.** *Digestive diseases and sciences* 1998, **43**(7):1488-1492.
 40. Wahlfors J, Meurman JH, Toskala J, Korhonen A, Alakuijala P, Janatuinen E, Karkkkainen UM, Nuutinen P, Janne J: **Development of a rapid PCR method for identification of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsy specimens.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995, **14**(9):780-786.
 41. Megraud F: **Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route.** *Alimentary pharmacology & therapeutics* 1995, **9 Suppl 2**:85-91.
 42. Ishihara K, Miura T, Kimizuka R, Ebihara Y, Mizuno Y, Okuda K: **Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth.** *FEMS microbiology letters* 1997, **152**(2):355-361.
 43. Kelly SM, Pitcher MC, Farmery SM, Gibson GR: **Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom.** *Gastroenterology* 1994, **107**(6):1671-1674.
 44. Dore MP, Osato MS, Malaty HM, Graham DY: **Characterization of a culture method to recover *Helicobacter pylori* from the feces of infected patients.** *Helicobacter* 2000, **5**(3):165-168.
 45. Thomas JE, Whatmore AM, Kehoe MA, Skillen AW, Barer MR: **Assay of urease-inhibiting activity in serum from children infected with *Helicobacter pylori*.** *Journal of clinical microbiology* 1992, **30**(5):1338-1340.
 46. van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, Schirm J, Snijder JA: **Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients.** *Journal of clinical microbiology* 1994, **32**(5):1346-1348.
 47. Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA, Axon AT, Tompkins DS, Dixon MF, Quirke P: **Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR.** *Journal of clinical pathology* 1993, **46**(6):540-543.
 48. Ashbolt NJ: **Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions.** *Toxicology* 2004, **198**(1-3):229-238.
 49. Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO: **Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children.** **Gastrointestinal Physiology Working Group.** *Lancet* 1991, **337**(8756):1503-1506.

-
50. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, Evans DG, Engstrand L, Graham DY, El-Zaatari FA: ***Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru.** *Gastroenterology* 1996, **110**(4):1031-1035.
 51. Ahmed KS, Khan AA, Ahmed I, Tiwari SK, Habeeb MA, Ali SM, Ahi JD, Abid Z, Alvi A, Hussain MA *et al*: **Prevalence study to elucidate the transmission pathways of *Helicobacter pylori* at oral and gastroduodenal sites of a South Indian population.** *Singapore medical journal* 2006, **47**(4):291-296.
 52. Goodman KJ, Correa P, Tengana Aux HJ, Ramirez H, DeLany JP, Guerrero Pepinosa O, Lopez Quinones M, Collazos Parra T: ***Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways.** *American journal of epidemiology* 1996, **144**(3):290-299.
 53. Hulten K, Enroth H, Nystrom T, Engstrand L: **Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water.** *Journal of applied microbiology* 1998, **85**(2):282-286.
 54. Fujimura S, Kato S, Kawamura T: ***Helicobacter pylori* in Japanese river water and its prevalence in Japanese children.** *Letters in applied microbiology* 2004, **38**(6):517-521.
 55. Cole SP, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG: **Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*.** *Journal of bacteriology* 2004, **186**(10):3124-3132.
 56. Park SR, Mackay WG, Reid DC: ***Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system.** *Water research* 2001, **35**(6):1624-1626.
 57. Bunn JE, MacKay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT: **Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life.** *Letters in applied microbiology* 2002, **34**(6):450-454.
 58. Mackay WG, Gribbon LT, Barer MR, Reid DC: **Biofilms in drinking water systems - a possible reservoir for *Helicobacter pylori*.** *Water Science and Technology* 1998, **38**(12):181-185.
 59. Stark RM, Gerwig GJ, Pitman RS, Potts LF, Williams NA, Greenman J, Weinzweig IP, Hirst TR, Millar MR: **Biofilm formation by *Helicobacter pylori*.** *Letters in applied microbiology* 1999, **28**(2):121-126.
 60. Cellini L, Del Vecchio A, Di Candia M, Di Campli E, Favaro M, Donelli G: **Detection of free and plankton-associated *Helicobacter pylori* in seawater.** *Journal of applied microbiology* 2004, **97**(2):285-292.
 61. Degnan AJ, Sonzogni WC, Standridge JH: **Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples.** *Applied and environmental microbiology* 2003, **69**(5):2914-2918.
 62. Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, Cudjoe KS, Hornes E, Ugelstad J, Uhlen M: **Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology.** *Clinical microbiology reviews* 1994, **7**(1):43-54.
 63. Enroth H, Engstrand L: **Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens.** *Journal of clinical microbiology* 1995, **33**(8):2162-2165.
 64. Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K: **Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater.** *Applied and environmental microbiology* 2002, **68**(3):1436-1439.

-
65. Benson JA, Fode-Vaughan KA, Collins ML: **Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR.** *Letters in applied microbiology* 2004, **39**(3):221-225.
 66. Watson CL, Owen RJ, Said B, Lai S, Lee JV, Surman-Lee S, Nichols G: **Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England.** *Journal of applied microbiology* 2004, **97**(4):690-698.
 67. Keer JT, Birch L: **Molecular methods for the assessment of bacterial viability.** *Journal of microbiological methods* 2003, **53**(2):175-183.
 68. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Calva JJ: ***Helicobacter pylori* in water systems for human use in Mexico City.** *Water Science and Technology* 2001, **43**(12):93-98.
 69. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Castillo-Rojas G, Ponce de Leon S, Cravioto A: ***Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City.** *Archives of medical research* 2001, **32**(5):458-467.
 70. Mazari-Hiriart M, López-Vidal Y, Ponce de León S, Calva-Mercado J, Rojo-Callejas F: **Significance of Water Quality Indicators: A case study in Mexico City.** In: *Proceeding of the International Conference, Water and Wastewater: Perspectives of developing Countries.* Edited by Devi R, Ahsan N. New Delhi, India: International Water Association (IWA); 2002: 407-416.
 71. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Ponce-de-Leon S, Calva JJ, Rojo-Callejas F, Castillo-Rojas G: **Longitudinal study of microbial diversity and seasonality in the Mexico City metropolitan area water supply system.** *Applied and environmental microbiology* 2005, **71**(9):5129-5137.
 72. Pitcher D, Saunders N, Owen R: **Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate.** *Letters of Applied Microbiology* 1989, **8**:151-156.
 73. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, Dixon MF, Wyatt JI, Tompkins DS, Taylor GR *et al*: **Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals.** *Journal of clinical microbiology* 1991, **29**(11):2543-2549.
 74. **Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA.** In: *Molecular Cloning, a Laboratory Manual.* Edited by Sambrook J, Russell DW, vol. 1, 3 edn. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001: 6.46-46.49.
 75. **Purification of antibodies and preparation of antibody fragments.** In: *Current Protocols in Immunology.* Edited by Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. New York, USA: Greene Publishing Associated and Wiley-Interscience; 1991: 2.7.1-2.7.5.
 76. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.** In: *Current Protocols in Immunology.* Edited by Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. New York, USA: Greene Publishing Associated and Wiley-Interscience; 1991: 2.1.3-2.1.6.
 77. Bumann D, Habibi H, Kan B, Schmid M, Goosmann C, Brinkmann V, Meyer TF, Jungblut PR: **Lack of stage-specific proteins in coccoid *Helicobacter pylori* cells.** *Infection and immunity* 2004, **72**(11):6738-6742.
 78. **Identification of Cells in Tissue Sections.** In: *Current Protocols in Immunology.* Edited by Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. New York, USA: Greene Publishing Associated and Wiley-Interscience; 1991: 5.8.1-5.8.3.

-
79. Leung W, Sung J, Sin K, Kwok K, Cheng A, Sung R: **Isolation of *H. pylori* from vomitus in children (Abstract G0826)**. *Annual meeting "Digestive Disease Week"*, New Orleans 1998:A201.
 80. Queralt N, Bartolome R, Araujo R: **Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain**. *Journal of applied microbiology* 2005, **98**(4):889-895.
 81. Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G: **Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR**. *Journal of medical microbiology* 2000, **49**(4):349-353.
 82. Engstrand L: ***Helicobacter* in water and waterborne routes of transmission**. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)* 2001(30):80S-84S.
 83. Toze S: **PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater**. *Water research* 1999, **33**(17):3545-3556.
 84. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW, Vieira MJ: **Cocoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment**. *Applied and environmental microbiology* 2007, **73**(10):3423-3427.

APÉNDICE

- Purificación de anticuerpos

Solución amortiguadora de unión

Disuelva 31.4g de buffer de unión en 100mL de agua destilada desionizada. Agite durante 10 minutos. Filtre a través de un filtro de nylon de 0.22 μ m y mida el pH, este debe estar en 9.0 \pm 0.2. Si el pH no está en este rango, ajuste con NaOH 10N o HCl 6N. Almacene el buffer reconstituido a 4°C.

Solución amortiguadora de elución

Disuelva 2.2 g de buffer de elución en 100mL de agua destilada desionizada. Agite durante 10 minutos. Filtre a través de un filtro de nylon de 0.22 μ m y mida el pH, este debe estar en 3.0 \pm 0.2. Si el pH no está en este rango, ajuste con NaOH 10N o HCl 6N. Almacene el buffer reconstituido a 4°C.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

0.23g NaH₂PO₄ anhidro

1.15g Na₂HPO₄ anhidro

9.00g NaCl

Agregue agua destilada desionizada a 900mL, ajuste el pH (7.2-7.4) utilizando NaOH 1M o HCl 1M. Lleve al aforo a 1L.

Tris Base pH 9.0

121.14g Tris base

Disuelva en 1L de agua destilada desionizada. Ajustar a pH 9.0 con HCl concentrado.

-
- ELISA indirecto

Solución amortiguadora de bicarbonato

0.159g de carbonato de sodio

0.293g de bicarbonato de sodio

Disuelva en 100 mL de agua destilada. El pH debe permanecer en 9.6.

Solución amortiguadora de fosfatos- Tween 20 0.01% (PBS-Tween) pH 7.4±0.2

16 g cloruro de sodio

5.8 g fosfato ácido de sodio

0.4 g fosfato diácido de potasio

1mL Tween 20

Disuelva las sales en 800mL de agua destilada, ajuste el pH a 7.4±0.2; una vez ajustado el pH lleve al aforo a 2L.

Solución amortiguadora de citratos

0.730g ácido cítrico

1.180g fosfato ácido de sodio

Disuelva en 100 mL de agua destilada. El pH debe permanecer en 5.5. Conservar en refrigeración.

Solución reveladora

5.4mg de OPD

10mL de solución amortiguadora de citratos

3 µL de solución de peróxido de hidrógeno al 30%

Disolver el OPD en la solución amortiguadora de citratos y una vez disuelto agregar el peróxido de hidrógeno.

-
- Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Reactivo de Bradford

50mg Coomasie G-250

Disolver en 25mL de etanol absoluto, agregar 50mL de ácido fosfórico y llevar al aforo con agua destilada desionizada a 500mL. Filtrar en papel filtro Whatman #1. Almacenar en un frasco ámbar a 4°C.

Estándar de albúmina

Preparar una solución de 1mg/mL de Albúmina Sérica Bovina (BSA), cuya Absorbancia a una longitud de onda de 280nm debe ser 0.667; se hacen alícuotas de esta solución de 1 a 5mL cada una y se almacenan a -20° C.