



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
DIRECCIÓN DE POSGRADO
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR**

**“IMPLEMENTACION DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN
BACTERIANO PARA LA DETECCION DE *Helicobacter Pylori* EN
MUESTRAS DE HECES HUMANAS”**

AUTOR Lcdo. JHOAN FABRICIO GUAMÁN ANGULO

TUTOR Ing. FAVIAN BAYAS MOREJON PhD.

GUAYAQUIL – ECUADOR

Mayo 2017



Presidencia
de la República
del Ecuador



Plan Nacional
de Ciencia, Tecnología,
Innovación y Saberes



REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS

TÍTULO Y SUBTÍTULO “ IMPLEMENTACION DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO PARA LA DETECCION DE *Helicobacter Pylori* EN MUESTRAS DE HECES HUMANAS”

AUTOR: Lcdo. JHOAN FABRICIO GUAMÁN ANGULO		TUTOR: Ing. FAVIAN BAYAS MOREJON PhD	
		REVISORES: Dr. Manuel González	
INSTITUCIÓN: Universidad de Guayaquil.		FACULTAD: Dirección de Posgrado	
CARRERA: Maestría en Biotecnología Molecular			
FECHA DE PUBLICACIÓN: Mayo/2017		No. DE PÁGS: 68	
TÍTULO OBTENIDO: Licenciado en Ciencias de la Salud Especialidad Laboratorio Clínico e Histopatológico.			
ÁREAS TEMÁTICAS: Bióloga Molecular , Genética			
PALABRAS CLAVE: Extracción de ADN, <i>Helicobacter Pylori</i> , PCR, Gastritis			
RESUMEN: El trabajo de investigación va dirigido a un Diseño de un Método experimental para la extracción de ADN Bacteriano para la detección de <i>Helicobacter Pylori</i> en muestras de biológicas humanas (heces) a través de PCR convencional como ayuda un diagnóstico temprano y menos invasivo en la población del cantón Guaranda.			
No. DE REGISTRO :		No. DE CLASIFICACIÓN:	
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):			
ADJUNTO PDF:	x SI	NO	
CONTACTO CON AUTOR/ES	Teléfono: 0983857868	E-mail:jfabrig@hotmail.com	
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Dirección de Posgrado		
	Teléfono: 2325530-38 Ext. 114		
	E-mail: upid@ug.edu.ec		

CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del Programa de Maestría en BIOTECNOLOGIA MOLECULAR , nombrado por el Director General de la Unidad de Posgrado, Investigación y Desarrollo, CERTIFICO: que he analizado la Tesis presentada, como requisito para optar el grado académico de Magíster en BIOTECNOLOGIA MOLECULAR titulada: **“IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO PARA LA DETECCIÓN DE *Helicobacter Pylori* EN MUESTRAS DE HECES HUMANAS.”** la cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que demanda el reglamento de posgrado.

Firma



Ing. Favian Bayas Morejón PhD.

N° ced. 0201811916

Guayaquil a 31 de Mayo del 2017

CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO

ZULAY MARINA NIÑO RUIZ Título profesional Doctorado en Ingeniería Química, con registro del SENESCYT 12413429 por medio del presente tengo a bien **CERTIFICAR:** Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado, elaborado (a) por el Señor (a) Jhoan Fabricio Guamán Angulo con C.I. 0201814787 previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR.**

Tema de tesis:

“IMPLEMENTACION DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO PARA LA DETECCION DE *Helicobacter Pylori* EN MUESTRAS DE HECES HUMANA”

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo con a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.

Nombre: Zulay Marina Niño Ruiz

N° Cédula: 1757560303

Registro SENESCYT12413429

Número de teléfono: 0979717336

Correo: znino09@gmail.com

DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR

Yo, JHOAN FABRICIO GUAMÁN ANGULO declaro bajo juramento ante la Dirección de Posgrado de la Universidad de Guayaquil, que el trabajo aquí descrito, así como sus resultados, conclusiones y recomendaciones presentadas es de mi autoría y exclusiva responsabilidad, que es inédito y no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional.

La reproducción total o parcial de esta tesis en forma idéntica o modificada, no autorizada por los editores transgrede los derechos de autoría. Cualquier utilización debe ser previamente solicitada a la Universidad de Guayaquil, a través de la Dirección de Posgrado o al autor.

Firma. -----

N° Cédula 0201814787

AGRADECIMIENTOS

El hombre tiene un paso por la historia, las elocuentes adversidades que se dan son la lucha por alcanzar sus ideales, la formación académica y profesional es una de ellas, quiero agradecer primero al creador nuestro Dios por permitirme dar este paso tan importante que sin su bendición no lo hubiera logrado, luego de ello expresarle mi agradecimiento profundo a mi director de tesis Dr. Favian Bayas Morejón mi gran amigo y mentor.

También me es satisfactorio agradecer al Centro de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar a su personal donde formamos nuevos lazos de amistad y por abrirme las puertas para realizar este trabajo. A la Universidad de Guayaquil y su departamento de posgrado a Kerly, Jenny nuestras amigas secretarias que siempre nos extendieron esa mano generosa.

En fin me quedo sin palabras para agradecerles a todos y cada uno de ustedes amigos y personas que colaboraron de una u otra forma me apoyaron para cumplir mi objetivo lo llevare siempre presente.

DEDICATORIA

Este trabajo de importancia para mi vida académica y profesional siempre a tenido un meta es pensar en el bienestar familiar es por eso que orgullo dedico mi investigación a mis amados hijos: **Josue David y Jhojan Camilo** que con sus locuras y ocurrencias llenan mi vida y sus días de sin mi presencia quedaron al cuidado de mi esposa **Verónica** quien no ha dejado de apoyarme nunca y ha hecho que llegara cumplir mi objetivo. También dedico esta investigación a mis padres **Víctor Hugo y Flor Angélica**, que gracias a la bendición de dios aun los tengo conmigo son también la pieza clave, su apoyo económico moral siempre estuvieron ahí a pesar de las adversidades como un eje firme.

Mis hermanas también dedicarles este trabajo porque han visto en mi un ejemplo para sus hijos y que estoy seguro que lo seguirán.

Un dios les pague a todos los llevo en mi corazón y prometo seguir trabajando duro como siempre lo hecho para posar mi nombre y el de todos ustedes en la historia, “Porque un hombre que sueña con ser grande nadie lo detiene”.

Jhoan.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
1. Problema	3
2. Objetivos.....	5
2.1. Objetivo General:	5
2.2. Objetivos Específicos:.....	5
3. Hipótesis	5
4. Variables.....	6
4.1. Operacionalización de Variables	6
CAPÍTULO II.....	8
5. Marco Teórico.....	8
5.1. <i>Helicobacter pylori</i>	8
5.2. Aspectos Microbiológicos del Helicobacter Pylori.	9
5.3. Vías de contagio o infestación de los huéspedes.....	9
5.4. Patologías más comunes	10
5.4.1. Gastritis	10
5.4.2. Cáncer de estómago	11
5.5. Factores De Riesgo.....	12
5.5.1. Genético.....	12
5.5.2. Ambientales.	12
5.5.3. Premalignos.	12
5.5.4. Infecciosos	13
5.5.5. Linfoma del estómago	13
5.5.6. <i>Helicobacter pylori</i> y trastornos pépticos.....	13
5.6. Métodos de diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	13
5.7.1. Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i>	14
5.7.2. Serología.....	15
5.8. El rastreo de antígenos.....	16
5.9. Métodos Moleculares.....	16
5.9.1. Extracción de ADN bacteriano	17
5.9.2. Chelex.	18
5.9.3. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	18
5.9.4. <i>Amplificación</i>	19
5.9.5. Amplificación in vitro de ADN (PCR)	19
5.9.6. <i>Detección</i>	21
CAPÍTULO III.....	23
6. Metodología o Diseño de la Investigación.....	23
6.1. Modalidad: Cuantitativa	23
6.2. Tipo de investigación:	23
7. Materiales y Métodos.....	24
2. Diseño experimental	24
7.1. Materiales	24

7.2. Recolección de Muestras.....	25
7.3. Rastreo de antígenos.....	26
7.4. Cultivo en placa	27
7.5. Extracción de ADN bacteriano	27
7.5.1. Descripción del método de extracción de ADN con la resina Chelex.....	29
7.5.2. Identificación de aislados de <i>Helicobacter</i> mediante análisis molecular.....	30
CAPÍTULO IV	33
8. Análisis e interpretación de resultados	33
8.4. Detección por cultivo.....	34
8.5. Método Chelex.....	35
8.6. Identificación de los aislados obtenidos de <i>Helicobacter Pylori</i> por PCR.	37
8.7. Comprobación de Hipótesis.....	43
CAPÍTULO V	44
9. Conclusiones y Recomendaciones	44
Referencias.....	46
ANEXOS.....	53

INDICE DE TABLAS

<i>ANEXO 1: Abreviaturas Empleadas</i>	53
<i>ANEXO 2: Medios de cultivo empleados</i>	54
<i>ANEXO 3: Reactivos para PCR y soluciones.</i>	56
<i>ANEXO 4: Iniciadores utilizados para la amplificación</i>	58
<i>ANEXO 5: Reporte de Muestra analizadas</i>	59
<i>ANEXO 6: Número de aislados y posterior PCR.</i>	61
<i>ANEXO 7: Absorbancias Método de Chelex</i>	63
<i>ANEXO 8: Caracterización de la población estudiada.</i>	64
<i>ANEXO 9: Ficha de Recolección de datos.</i>	65
<i>ANEXO 10: Fotografías de la parte experimental</i>	67

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Segunda etapa del proceso inflamatorio de la mucosa gástrica por Helicobacter pylori. (Grávalos, 2017).</i>	11
--	----

<i>Figura 2: Detección y diagnóstico de enfermedades a través de biología molecular. (BIMODI, 2017)</i>	22
<i>Figura 3: Materiales utilizados en la investigación.</i>	24
<i>Figura 4: Materiales utilizados en la Investigación.</i>	25
<i>Figura 5: Proceso de preparación de la muestra.</i>	26
<i>Figura 6: Esquema de detección de Helicobacter en muestras biológicas humana.</i>	28
<i>Figura 7: Rastreo antigénico en muestras de Heces.</i>	34
<i>Figura 8: Colonias de H. pylori aisladas en medio selectivo BAS y morfología microscópica</i>	35
<i>Figura 9: Análisis de electroforesis del ADN extraído mediante el método Chelex en el aislado Hp17C1; Calles: 1= tratamiento 1, 2= tratamiento 2, 3= tratamiento 3, 4= tratamiento 4, 5= tratamiento 5, 6= tratamiento 6, 7= Control negativo, M= Marcador de peso molecular(50pb).</i>	36
<i>Figura 10: Análisis de electroforesis del ADN extraído mediante el método Chelex en el aislado Hp34C1, Calles: 1= tratamiento 1, 2= tratamiento 2, 3= tratamiento 3, 4= tratamiento 4, 5= tratamiento 5, 6= tratamiento 6, 7= Control negativo, M= Marcador de pesos molecular (50pb).</i>	37
<i>Figura 11: Análisis de electroforesis amplificado por PCR del ADN amplificado y extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 “A2B2”) en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp1C2, 2= Hp1C3, 3=Hp3C1, 4= Hp4C1, 5= Hp4C2, 6=Hp5C1, 7= Control negativo, M= Marcado</i>	38
<i>Figura 12: Análisis de electroforesis del amplificado por PCR del ADN amplificado extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 “A2B2”) en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp6C1, 2= Hp9C2, 3=Hp9C3, 4= Hp10C1, 5= Hp10C2, 6=Hp14C1, 7= Control negativo, M= Marcador. ...</i>	39
<i>Figura 13: Análisis de electroforesis del amplificado por PCR del ADN amplificado extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 “A2B2”) en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp16C1, 2= Hp17C1, 3=Hp17C2, 4= Hp174, 5= Hp19C2, 6=Hp19C4, 7= Hp23C1, 8= Hp23C2, 9= Control negativo, M= Marcador de pesos moleculares (100 pb).</i>	39

Figura 14:Análisis de electroforesis del amplificado por PCR del ADN amplificado extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 “A2B2”) en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp23C3, 2= Hp27C1, 3=Hp27C2, 4= Hp27C3, 5= Hp27C4, 6=Hp28C1, 7= Hp28C2, 8= Control negativo, M= Marcador de pesos moleculares (100 pb)..... 40

Figura 15:Análisis de electroforesis del amplificado por PCR del ADN amplificado extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 “A2B2”) en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp31C2, 2= Hp33C3, 3=Hp34C1, 4= Hp34C2, 5= Hp39C1, 6= Control negativo, M= Marcador de pesos moleculares (100 pb) 40

INDICE DE ANEXOS

<i>ANEXO 1: Abreviaturas Empleadas</i>	<i>53</i>
<i>ANEXO 2: Medios de cultivo empleados</i>	<i>54</i>
<i>ANEXO 3: Reactivos para PCR y soluciones.</i>	<i>56</i>
<i>ANEXO 4: Iniciadores utilizados para la amplificación.....</i>	<i>58</i>
<i>ANEXO 5: Reporte de Muestra analizadas.....</i>	<i>59</i>
<i>ANEXO 6: Número de aislados y posterior PCR.</i>	<i>61</i>
<i>ANEXO 7: Absorbancias Método de Chelex.....</i>	<i>63</i>
<i>ANEXO 8: Caracterización de la población estudiada.</i>	<i>64</i>
<i>ANEXO 9: Ficha de Recolección de datos.</i>	<i>65</i>
<i>ANEXO 10: Fotografías de la parte experimental.....</i>	<i>67</i>

RESUMEN

El *Helicobacter pylori* un microorganismo perteneciente a la familia de Helicobacteraceae, orden de los Campylobacterales está clasificada dentro de las bacterias Gram negativas por ser una proteobacteria, es un bacilo flagelado, microaerófilo, con forma de espiral, microorganismo capaz de colonizar la mucosa gástrica de los seres humanos de forma natural, la transmisión por *H. pylori* al hombre está asociada al consumo de agua y alimentos crudos o poco cocidos, aunque la mayor parte de especies patógenas pertenecientes a este orden son de origen fecal. Es así que la proliferación del microorganismo es más común de lugares donde existe la falta de servicios básicos como sanitarios permitiéndose que se desarrolle el patógeno de manera natural. El interés Médico despertado por la OMS Organización Mundial de la Salud en el año 1994, lo clasificó a este patógeno como agente carcinógeno tipo I causante del cáncer, sino también de otro tipo de enfermedades digestivas o gástricas. Por lo expuesto en el trabajo se plantea la implementación de un método de extracción de ADN para la detección del patógeno a partir de 50 muestras de heces, se empleó métodos convencionales para la detección como el rastreo de antígenos de *H. pylori* en heces, se aisló al patógeno mediante cultivo en placa con Brucella agar sangre. Se aplicó un método de extracción de ADN con Chelex, para luego ser detectadas por PCR convencional. Los resultados en función del sexo fueron 38% para mujeres frente al 12% en hombres tras el rastreo Antígenos *H. pylori*. Se obtuvieron 32 aislados tras la recuperación de los cultivos en placa BAS. Mediante la detección por PCR 11 resultaron positivos 7 de mujeres y 4 de hombres. En conclusión la metodología de la extracción mediante Chelex permite obtener ADN con calidad necesaria para ser detectada por PCR, volviéndola una metodología rápida para su aplicación diagnóstica para *H. Pylori*.

PALABRAS CLAVE Extracción de ADN, *Helicobacter Pylori*, PCR, Gastritis

SUMMARY

The *Helicobacter pylori*, a microorganism belonging to the family of Helicobacteraceae, order of the Campylobacterales is classified within the Gram negative bacteria as a proteobacteria, is a flagellated, microaerophilic, spiral-shaped bacillus, microorganism able to colonize the gastric mucosa of the human beings in a natural way, transmission by *H. pylori* to men is associated with the consumption of water and raw or undercooked foods, although most of the pathogenic species belonging to this order are of fecal origin. Thus, the proliferation of the microorganism is more common in places where there is a lack of basic services such as toilets allowing the pathogen to develop naturally. The Medical interest awakened by the WHO World Health Organization in 1994, classified this pathogen as a carcinogen type I causing cancer, but also of other types of digestive or gastric diseases. For this reason, the implementation of a DNA extraction method for the detection of the pathogen from 50 stool samples was proposed, conventional methods were used for the detection as the detection of *H. pylori* antigens in faeces. isolated the pathogen by plaque culture with Brucella agar blood. A method of extracting DNA with Chelex was applied, to be detected by conventional PCR. The results based on sex were 38% for women versus 12% for men after the *H. pylori* Antigens screen. 32 isolates were obtained after the recovery of the BAS plate cultures. Through PCR detection, 11 were positive for women and 4 for men. In conclusion, the Chelex extraction methodology allows us to obtain DNA with the necessary quality to be detected by PCR, making it a fast methodology for its diagnostic application for *H. pylori*.

KEYWORDS DNA: Extraction, *Helicobacter pylori*, PCR, Gastritis

INTRODUCCIÓN.

El *Helicobacter pylori* es considerada un patógeno de interés global por ser un microorganismo de muy fácil contagio entre los hospedadores o huésped (Cobas, 2003) La infección por *Helicobacter pylori* se reconoce ahora como un problema que causa gastritis crónica, enfermedad ulcerosa péptica, desordenes linfoproliferativos y es un factor de riesgo mayor para el cáncer gástrico. (Pagola, 2009). Los métodos diagnósticos para detectar *H. pylori* se clasifican en directos o invasivos cuando identifican de manera directa la bacteria obtenida mediante biopsia de la mucosa gástrica por endoscopia histología con diversas técnicas de tinción, cultivo y PCR y en indirectos o no invasivos o serológicas como la prueba del aliento con urea marcada con ^{13}C . (Navas, 2000) Cada una de estas técnicas o métodos de detección empleados tiene sus ventajas e inconvenientes en su funcionamiento, no son perfectos pero se han ido mejorando en la última década, especialmente los moleculares. El Objetivo General es evaluar la aplicación un método de extracción de ADN bacteriano para la detección de *Helicobacter pylori* en muestras de heces humanas mediante PCR convencional. Se cumplieron los siguientes objetivos específicos: a) Aislar las cepas de *H pylori* a partir de las Muestras de Heces. b) Realizar un análisis espectrofotométrico y electroforético a cada uno de los tratamientos para la extracción de ADN mediante Chelex c) Detectar mediante PCR *Helicobacter pylori* a partir de ADN obtenido con el mejor tratamiento, hipótesis planteadas, se tomó en consideración el métodos de extracción de ADN bacteriano determinados Chelex, (Onofri Yunez Oriana, 2008). Los tratamientos de extracción de ADN serán iguales tras el análisis de electroforesis de acuerdo a la temperatura y el tiempo empleado, y no serán iguales tras el análisis. El trabajo está organizado por capítulos siendo el Capítulo I el planteamiento del problema donde se detalló el interés por realizar un diagnóstico a través de la detección molecular de *H pylori* en muestras de heces un proceso menos invasivo, En la investigación se contó con total

de 50 (100%) muestra de pacientes de las cuales 34 (68%) mujeres y 16 (32%) hombres, las muestras fueron seleccionadas, de pacientes a partir de una ficha clínica por la importancia Médica de la investigación previa a una recolección de datos. De un total de 50 muestras que se procesaron en el inicio de la investigación para su aplicación. En el Capítulo II se presenta el marco teórico conceptual en relación a descripción del tema en su sustento científico basado en evidencias y trabajos previos que dan importancia al estudio, en el Capítulo III, se detalla el diseño de la investigación en su modalidad cuantitativa y su parte experimental a través del Muestreo, el Rastreo antigénico, Cultivo en placa, Extracción de ADN a partir del método Chelex, los mismos que se describen en el texto, y la detección mediante PCR, en el Capítulo IV se detallan los resultados obtenidos por cada uno de los métodos aplicados en la investigación, por último en el Capítulo V se incluyen las siguientes conclusiones acordes a los resultados obtenidos en la investigación.

CAPÍTULO I

1. Problema

El *Helicobacter pylori* es considerada un patógeno de interés global por ser un microorganismo de muy fácil contagio entre los hospedadores o huésped susceptible, el primer aislamiento de *H. pylori* fue en 1982 por Marshall y Warren nos adentraron en una nueva era de la microbiología gástrica (Cobas, 2003). Los infectados por *H. pylori* han ido aumentando considerablemente ya que un tercio de población mundial la tiene, mientras que el resto no sabe si la posee o no, en países en desarrollo existe una tasa de infección que va de entre el 60% y el 90% de la población, no es el caso en países desarrollados que va desde el 20% hasta 40%, (Rodríguez & Landaverde Carpio, 2012). Las enfermedades ulcerosas gastroduodenal constituyen un cofactor primordial en el desarrollo del adenocarcinoma y linfoma gástricos, (Gisbert, 2017). La causa de muerte por cáncer gástrico en la provincia de Bolívar, en los cantones de Guaranda y San Miguel, es de alrededor de 377 casos, los que se han suscitado hasta el 2015 según. (Sociedad de Lucha contra el Cancer, 2017)

De acuerdo a estudios realizados muchas de las especies patógenas de *H. pylori* son de origen fecal. La transmisión al hombre parece estar asociada al consumo de agua, alimentos crudos o poco cocidos. (Bayas, 2016). En el Ecuador de acuerdo a las estadísticas los quintiles de pobreza alcanzados hasta el 2015 son del 35% según datos del INEC, que tienen una estrecha relación con la falta de servicios básicos como el agua potable y servicios sanitarios, un factor común en la población es la contaminación por agua y alimentos. (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica_MSP - Ecuador, 2017) como señala (Bayas, 2016) en su investigación.

Los diferentes métodos empleados para el diagnóstico de van desde el rastreo antigénico (Ag) hasta técnicas moleculares. Las técnicas de rastreo antigénico se han asociado con una elevada sensibilidad de un límite de detección de la prueba de *Helicobacter pylori* que es de 4-8 ng/mL y de un 95% de concordancia en especificidad en comparación con la prueba Elisa, (LINEAR CHEMICALS S.L , 2017), que no duran mucho tiempo pero tienen reacciones cruzadas, no sólo en el diagnóstico inicial de la infección, sino también en la confirmación de la erradicación después del tratamiento (Cobas, 2003) en el cultivo en placa habitualmente se le considera una técnica difícil y tediosa; el método de diagnóstico, tiene la ventaja de tipificar el organismo y determinar su sensibilidad frente a los agentes antibacterianos, lo que tiene importancia desde el punto de vista epidemiológico. (Gisbert J. ,2016). Los métodos como la endoscopia para obtener una muestra a través de una biopsia son muy utilizados en la actualidad es un procedimiento muy traumático e invasivo que puede causar complicaciones como Infecciones, Perforaciones, Aspiración, Hemorragia, Incarceración del endoscopio. (Fundación Española de Endoscopia Digestiva, 2009).

La falta de un método de detección rápido y específico dificulta un diagnóstico oportuno, por ello se realizó la extracción de ADN bacteriano para la detección de *Helicobacter pylori* a través de un diseño factorial AxB , trabajo que servirá de aporte a futuras investigación donde la toma de muestras sea menos invasiva y traumática para su estudio en la detección temprana de *H. pylori*.

Los altos costos que implican la detección de patógenos, impiden que laboratorios particulares y públicos los realicen comúnmente, además la falta de kits para diagnóstico molecular imposibilita las diferentes investigaciones, por lo que en el mercado local hoy todavía no cuenta con la oferta suficiente. La evolución de la Biología Molecular ha permitido realizar algunos diagnósticos Clínicos de importancia, a través del INSPI una institución del MSP en la detección de varias

enfermedades. (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI, 2017).con el apoyo de universidades.

El objetivo fue evaluar un método de extracción de ADN bacteriano para la detección de *Helicobacter pylori*. En la hipótesis planteada se tomaron en consideración la aplicación de un método de extracción de ADN Bacteriano con sus respectivos tratamientos para la detección por PCR.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General:

Evaluar la aplicación de un método de extracción de ADN bacteriano para la detección de *Helicobacter pylori* en muestras de heces humanas mediante PCR convencional.

2.2. Objetivos Específicos:

- Aislar cepas de *Helicobacter pylori* a partir de muestras de heces humanas
- Realizar análisis espectrofotométrico y electroforético en cada uno de los tratamientos para la extracción de ADN mediante Chelex.
- Detectar mediante PCR *Helicobacter pylori* a partir del ADN obtenido del mejor tratamiento.

3. Hipótesis

En la hipótesis planteada se tomó en consideración el método de extracción de ADN con sus respectivos tratamientos.

H-1. Los tratamientos de extracción de ADN serán iguales tras el análisis mediante electroforesis. H-1: $T1(A1B1) = T2(A1B2) = T3(A1B3) = T4(A2B1) = T5(A2B2) = T6(A2B3)$

H-0. Los tratamientos de extracción de ADN no serán iguales tras el análisis mediante electroforesis. H-0: $T1(A1B1) \neq T2(A1B2) \neq T3(A1B3) \neq T4(A2B1) \neq T5(A2B2) \neq T6(A2B3)$.

4. Variables.

Variable independiente

- Métodos de extracción de ADN y moleculares

Variable dependiente

- Detección de *Helicobacter pylori*.

Variable Cualitativa

- Población Afectada

4.1. Operacionalización de Variables

Para este trabajo se consideraron variables como: Edad del paciente, sexo, estilo de vida y sintomatologías relacionadas a la infección con *H. pylori*. (Ver Tabla 1)

Tabla 1: Variables de Análisis

Variables	Definición conceptual	Indicador	Dimensión	Escala
Detección de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i> (previamente conocido como <i>Campylobacter pylori</i> o <i>pyloridis</i>) se considera que <i>H. pylori</i> es carcinógeno para el ser humano, e incluso se ha asociado a otras enfermedades, tales como accidentes cerebrovasculares, tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus, entre otras, esta bacteria reside en el estómago de la mayoría de los humanos. Se encuentra de modo habitual en las porciones más profundas del gel de moco que recubre la mucosa gástrica o entre la capa de moco y el epitelio gástrico.	Los síntomas frecuentes que se asocian a la gastritis, ulcera peptídica o carcinoma.	Dolor o incomodidad, generalmente como quemazón en la parte superior del abdomen.	Leve Moderado Severo
			Sensación de hinchazón del estómago.	Generalizada Localizada.
			Saciedad rápida del hambre, generalmente después de comer tan sólo una pequeña cantidad de alimento.	Nunca Casi siempre Siempre
			Náuseas o vómitos. Heces oscuras.	Nunca Rara vez Siempre Nunca Frecuente
Métodos	Técnicas de análisis a nivel de las Biomacromoléculas como	Detección a nivel de especie de <i>H. pylori</i>	Detección por PCR	Positivas

Moleculares	son las proteínas y los ácidos nucleicos	mediante la amplificación del gen de la proteína vacuolizante VacA		Negativas
Población Afectada	En el Ecuador los índices pobreza alcanzados hasta el 2015 son del 35% según datos (INEC, 2016) lo que supone una de las causas de contaminación es la falta de servicios básicos como el agua potable así como la falta de sistemas Sanitarios Adecuados.	Muestra obtenida 50 pacientes	Edad	5 a 65 años
			Sexo	Hombres Mujeres
		Estilo de vida	Alimentación	Muy Buena Regular Mala
		Servicios Básicos	Actividades cotidianas	Estudiante Servicio publico Servicio Privado.
			Agua	Agua potable Agua entubada Pozo Otras

CAPÍTULO II

5. Marco Teórico

5.1. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria espiral que no forma esporas, Gram negativa, que coloniza el estómago humano y es prevalente en todo el mundo (Smolka y Backert, 2012). Se ha asociado con la enfermedad de la úlcera péptica, el adenocarcinoma gástrico y el linfoma B de grado inferior asociado a la mucosa. Además, se piensa que el organismo está implicado en otras enfermedades humanas tales como trastornos hematológicos y autoinmunes, resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (Hasni, 2012). Aunque casi el 50% de la población está infectada con *H. pylori* en todo el mundo, la prevalencia, la incidencia, la distribución por edades y las secuelas de infección son significativamente diferentes en los países desarrollados y en desarrollo.

Helicobacter pylori (previamente conocido como *Campylobacter pylori* o *pyloridis*) se aisló por primera vez del ser humano en 1982. (Mandell, 2012) Desde 1994 se considera que *H. pylori* es carcinógeno para el ser humano, e incluso se la ha asociado con otras enfermedades, tales como accidentes cerebrovasculares, tiroiditis autoinmune, diabetes mellitus, entre otras (Palomino, 2016) Esta bacteria reside en el estómago de la mayoría de los humanos. Se encuentra de modo habitual en las porciones más profundas del gel de moco que recubre la mucosa gástrica o entre la capa de moco y el epitelio gástrico. (Harrison, 2012).

La bacteria constituye uno de los hallazgos más importantes para los gastroenterólogos, quienes durante años buscaron respuesta a múltiples problemas intestinales. Es así como el gastroenterólogo Walery Jaworski en 1899 tras analizar muestras de espirados gástricos humanos aisló una bacteria alargada de forma espiral y la denominó *Vibrio regula*, dichos resultados los publico en el Manual de enfermedades gástricas, sin

embargo, a dichos hallazgos no se les dio la importancia que merecían al estar escrito en polaco y no en inglés (Konturek, 2003).

De tal modo que tuvieron que transcurrir 79 años para que la bacteria sea redescubierta por los médicos australianos Barry Marshall y Robin Warren, quienes lograron realizar el primer aislamiento a través de un cultivo puro en 1979. Dicho redescubrimiento les permitió ser laureados con el premio Nobel en 2005. (Novo, 2007).

5.2. Aspectos Microbiológicos del *Helicobacter Pylori*.

Taxonómicamente podemos describir a *H. pylori* por su tamaño, forma, color función bioquímica, género, especie y su relación con otras especies; *H. pylori* es una bacteria de crecimiento lento, con forma de espiral, es un bacilo pequeño curvo, microaerófilico y Gram negativo, móvil por la presencia de flagelos, el bacilo presenta terminaciones redondeadas. Estos microorganismos miden (0,5-1,0 mm de ancho por 2,5 - 4,0 mm de largo), puesto que guardan un gran parecido con los miembros del género *Campylobacter*. (Mandell, 2012).

Las múltiples características genotípicas y fenotípicas son diferentes de las de *Helicobacter*, por lo que se estableció este nuevo género que incluyen: *H. cinaedi* y *H. fennelliae*. Las dos especies de *Helicobacter* que causan enfermedad diarreica, *H. cinaedi* y *H. fennelliae*, son microorganismos intestinales, más que gástricos; en cuanto a las manifestaciones clínicas de la enfermedad que generan, estas bacterias son más parecidas a *Campylobacter* que a *H. pylori* (Harrison, 2012). Las características clínicas de las infecciones causadas por estas *Helicobacter* son similares a las debidas a especies de *Campylobacter*.

5.3. Vías de contagio o infestación de los huéspedes.

Las evidencias epidemiológicas y microbiológicas tienen varias vías de transmisión han sido propuestas en los estudios realizados. Las rutas gastro-oral, oral-orales y fecal-orales constituyen las vías más relevantes de la transmisión. (Palomino, 2016). Otras de las vías de importancia también es la lactancia materna y la transmisión iatrogénica también se

incluyen como formas alternantes para la transmisión del agente patógeno. Las posibilidades de difundirse el patógeno son de tres posibles vectores que se han sugerido para mantener la forma viable de la bacteria: agua, alimentos, y animales.

La presencia del patógeno fue enfocada en un estudio sobre la prevalencia de *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Arcobacter* desarrollado por (Samie, 2007) mediante métodos moleculares, en 322 muestras de heces de pacientes con y sin VIH en Sudáfrica, encontraron que *A. butzleri* era la tercera especie más frecuentes (6,2 %), después de *Helicobacter pylori* (50,6 %) y *Campylobacter jejuni* (10,2 %). De hecho, en dos estudios independientes realizados en Bélgica y Francia (Vandenberg, 2006) este es un aporte de la tesis doctoral. (Bayas, 2016).

5.4. Patologías más comunes

5.4.1. Gastritis

El termino gastritis debe reservarse para la inflamación histológicamente demostrada de la mucosa gástrica. La gastritis no es el eritema mucoso que se observa durante la endoscopia ni es intercambiable con el término “dispepsia” (Harrison, 2012). Por otra parte los diferentes factores etiológicos que causan la gastritis son múltiples y heterogéneos, a la gastritis se la ha clasificado con una base cronológica (aguda o crónica), como son: tipologías histológicas, distribución anatómica o su mecanismo patógeno, correlación clínica, datos histológicos, dolor abdominal o dispepsia y los datos endoscópicos en la investigación de la mucosa gástrica (Harrison, 2012).

La patogénesis de la gastritis crónica por *Helicobacter pylori* incluye 2 etapas: la primera está caracterizada por la llegada y penetración del microorganismo al mucus gástrico donde se asienta y se multiplica. En la segunda etapa se presenta una amplificación de la respuesta inflamatoria, por la interacción de linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células mastoides y células no inmunes que, al ser atraídos al sitio de la lesión, liberan gran variedad de mediadores químicos como: citoquinas, eicosanoides,

metabolitos reactivos de oxígeno (radicales libres de oxígeno) y el sistema de complemento, que perpetúan la inflamación (Jiménez, 1999).

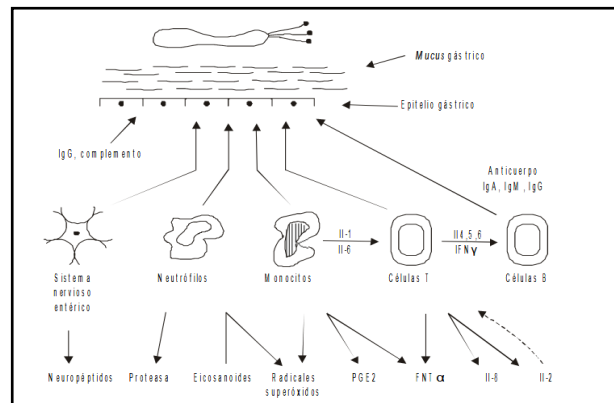


Figura 1: Segunda etapa del proceso inflamatorio de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori*. (Grávalos, 2017).

5.4.2. Cáncer de estómago

Es el crecimiento incontrolado de las células del estómago. Los tumores malignos pueden originarse en cada una de las tres capas: mucosa, muscular y serosa. (Grávalos, 2017). A este se lo conoce también como cáncer gástrico que se origina en el estómago (American Cancer Society., 2016). Como factor de riesgo se considera a cualquier causa que aumenta la probabilidades de tener una enfermedad, como el cáncer, incluso varios componentes de riesgo no significan que dicha persona tendrá la enfermedad; Algunos científicos connotaron que varios son los riesgos que lleve a una persona ser más propensa a padecer cáncer de estómago como:

- **Incidencia según el sexo.-** El cáncer de estómago es más frecuente en hombres que en mujeres.
- **Edad.-** La tasa del cáncer de estómago en personas de más de 50 años aumenta bruscamente. (Hinojosa, 2017).
- **Origen étnico.-** En los Estados Unidos, el cáncer de estómago es más común entre los estadounidenses de origen hispano, las personas de raza negra y los asiáticos e isleños, En comparación

con las personas de raza blanca que no son de origen hispano. (American Cancer Society., 2016).

- **Geografía.-** A escala mundial, el cáncer de estómago es más común en Japón, China, Europa oriental y del sur así como América Central y del sur. (American Cancer Society., 2016).

5.5. Factores De Riesgo

Se han descrito diversos factores de riesgo del cáncer gástrico, los cuales desempeñan un papel primordial en su génesis, algunos de ellos permanecen en discusión, y otros, por el contrario, se han ido confirmando de forma cada vez más clara. (Jimenez D F,1998).

5.5.1. Genético

Dentro de los factores de riesgo genético (American Cancer Society, 2016) tenemos:

- Familias de pacientes con cáncer gástrico: incidencia 2-3 veces mayor.
- Grupo sanguíneo A.

5.5.2. Ambientales.

Dentro de los factores de riesgo ambientales (American Cancer Society., 2016) tenemos:

- Alimentación (variable en cada país): pescados secos y salados, alimentos muy condimentados, carnes rojas, entre otros.
- Ingestión de alcohol, de bebidas calientes, de nitrato de sodio. Tabaco masticado.
- Radiaciones.

5.5.3. Premalignos.

Dentro de los factores de riesgo Premalignos (American Cancer Society., 2016) tenemos:

- Gastritis atrófica, metaplasma intestinal y displasia.
- Anemia perniciosa (20 veces más frecuente que en sujetos normales).
- Pólipos gástricos: hiperplásicos múltiples, mayores de 2 cm con cierto grado de displasia 0,4-4 % de asociación con cáncer gástrico. (American Cancer Society., 2016)

5.5.4. Infecciosos

Sobre crecimiento bacteriano.

Helicobacter pylori Ca G+. (Jiménez D. F, 1998).

5.5.5. Linfoma del estómago

Las personas que han padecido cierto tipo de linfoma de estómago, conocido como linfoma de tejido linfático asociado con la mucosa (MALT), tiene un mayor riesgo de padecer adenocarcinoma del estómago, probablemente a causa de una infección con *H. pylori* (American Cancer Society, 2016).

5.5.6. *Helicobacter pylori* y trastornos pépticos

La infección gástrica producidas por la bacteria ***H. pylori*** en la mayoría de los casos de ulcera péptica también son importante en la aparición de linfomas que se originan en el tejido linfoide (MALT) y en el adenocarcinoma gástrico. (Harrison, 2012). Siendo la ulcera peptídica una de las causas de hemorragias internas del tracto digestivo superior con complicaciones severas que conllevan a un adenocarcinoma (Harrison, 2012).

5.6. Métodos de diagnóstico de la infección por *H. pylori*

Los métodos diagnósticos de la infección por *H. pylori* se han clasificado tradicionalmente en directos e indirectos, los primeros se basan en la demostración “directa” del microorganismo mediante el

estudio de muestras obtenidas por biopsia gástrica (Gisbert, 2016). Esta técnica utilizada resulta muy estresante e incómoda para el paciente a un más cuando es invasiva

Los otros métodos indirectos se basan en la detección de ciertas características de la bacteria como, por ejemplo, la capacidad de hidrolizar a través de la urea y la basada en la prueba del aliento o de la respuesta del sistema inmunológico a través de la medición de anticuerpos específicos. Su ventaja primordial es su carácter no invasor. (Gisbert, 2016).

5.7. Técnicas Histológicas

La presencia del germen puede reconocerse con la tinción habitual de hematoxilina-eosina, aunque se demuestra más fácilmente con otras tinciones como la de Giemsa. La histología no solamente demuestra la presencia del microorganismo, sino que informa sobre los cambios morfológicos de la mucosa gástrica, lo que representa una ventaja en relación con otros procedimientos (Gisbert, 2016).

5.7.1. Cultivo de *Helicobacter pylori*.

En condiciones óptimas *H. pylori* es extremadamente difícil de cultivar, debido a sus exigentes requerimientos nutricionales y su lento crecimiento. El cultivo de *H. pylori* suele ser lento, las primeras colonias suelen aparecer entre el quinto y el séptimo día, y pueden tardar hasta 10 días. Al ser un microorganismo microaerófilo requiere atmosferas con 5-10 % de O₂, 5-10 % de CO₂ y 80-90 % de N₂ a 35-37 °C, con una humedad del 90-95 % (Castillo *et al.*, 2004).

La selección e inoculación de las bacterias depende de la cantidad y tipos de pruebas a ser realizadas, así como también, de los factores, el tipo de bacteria, importancia clínica del aislamiento, disponibilidad de la cepa y el método fiable de comprobación (Scott, 2009). El cultivo en placa posee ventajas que van desde tipificar el organismo y determinar su sensibilidad frente a los agentes antibacterianos, por ello tiene importancia estudios desde el punto de vista epidemiológico, porque

permite conocer el patrón de resistencia frente a distintos regímenes terapéuticos con una especificidad del 100% y una sensibilidad inferior a la de otras técnicas diagnósticas (Gisbert, 2017). Este microorganismo, además, es ureasa, oxidasa y catalasa positiva, características que con frecuencia son utilizadas en la identificación del microorganismo, aunque su aislamiento es relativamente complejo (Palomino, 2016).

Habitualmente se le considera una técnica difícil y tediosa; sin embargo, adoptando una serie de mínimas precauciones la mayoría de los laboratorios consiguen el crecimiento del microorganismo. (Gisbert JP. 2016).

Ventajas

La temperatura óptima a la que deben colocarse las placas de cultivo es de 35 a 37 °C. (FerrúsG, 2007)

Desventajas.

Dado que *H. pylori* es muy sensible a la desecación y a las condiciones atmosféricas habituales, es de suma importancia transportar las muestras de modo adecuado y en el espacio de tiempo más breve posible. (Pagola, 2009)

Las muestras destinadas a cultivo permanecen viables durante aproximadamente 5 h cuando se conservan en suero salino a 4 °C, o durante más de 24 h si se conservan a 4 °C en un medio de transporte específico para *H. pylori*. (Lichtendahl-Bernards, 1993)

5.7.2. Serología

Las técnicas serológicas únicamente indican una exposición previa al microorganismo, pero no discriminan entre personas con infección activa y enfermedad en individuos sanos con exposición previa a la infección (Gisbert, 2016). Las pruebas rápidas son métodos para la detección de antígenos y anticuerpos tanto en suero, plasma, sangre total y otros fluidos, cuyo resultado se obtiene en algunos minutos. (Secretaria

de Salud, 2006) , estas técnicas serológicas son muy utilizadas en la actualidad para el diagnóstico rápido en Laboratorios.

La técnica de enzimoimmunoensayo ELISA es muy utilizada para ejecutar estudios epidemiológicos de un considerable número de individuos; es un hecho muy importante que ambos pueden aclarar temporalmente la infección e inducir un falso resultado negativo como cuando se utilizan otros métodos diagnósticos convencionales y rápidos dentro de la serología tanto en sangre como en otros líquidos biológicos, aunque implican mayor rapidez y facilidad con resultados óptimos.

5.8. El rastreo de antígenos

Este es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa del antígeno de *H. pylori* en muestras de heces humanas para diagnóstico de la infección, con una sensibilidad relativa será mayor a 94%, especificidad 95% y exactitud del 97,5%, ya que es una técnica in vitro (ad-bio, 2017) que algunas ocasiones suele tener un falso positivo por las reacciones cruzadas con otros organismos se analizó a 1,0E9 organismos / ml. Los siguientes organismos se encontraron negativos con el antígeno *H. pylori* (Feci) Prueba de *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, Group A *Streptococcus*, Group B *Streptococcus*, Group C *Streptococcus* *Hemophilus influenza*, *Klebsiella pneumonia*, *Neisseria gonorrhea*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rotavirus*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Adenovirus* a partir de este método se empleó un cultivo (SCREEN, 2017)

5.9. Métodos Moleculares

Se denomina así a todas las técnicas de laboratorio que se usan para aislar ADN o extraerlo en alta pureza, visualizarlo para ver su estado, cortarlo y pegarlo nacimiento de la Ingeniería genética, (Iglesias, 2008) o amplificar una región en una enorme cantidad de moléculas, clonación de

fragmentos en bacterias u otros vectores como virus, así también, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las enfermedades infecciosas se han transformado en la “punta de lanza” para el desarrollo de test de diagnóstico molecular, siendo más del 50% de las técnicas disponibles hoy en día. La principal explicación a este desarrollo se debe a la dificultad de detectar un patógeno mediante la microbiología clásica (Farfan., 2015).

El ácido desoxirribonucleico o ADN (DNA) una micro molécula que guarda el código genético de todas las células. Sin importar que el organismo sea multicelular o unicelular, eucariota o procariota, todos tienen el ADN como vehículo de su código genético

5.9.1. Extracción de ADN bacteriano

De todas las muestras biológicas que podemos someter a un proceso de extracción de ADN, las suspensiones bacterianas, son quizás las que ofrecen menos problemas por la homogeneidad y riqueza del material. En particular, las suspensiones densas de bacterias gram negativas pueden liberar cantidad suficiente de ADN en condiciones bastante suaves como pueden ser una simple ebullición, congelación o una combinación de ambas. (Newsletter, 2009)

Para una extracción de DNA efectiva usted deberá conocer las características básicas de la muestra con la que trabajará, se debe conocer si el DNA a ser extraído proviene de una célula procariota o eucariótica dado que los componentes que forman la pared y membrana celular de estos organismos es distinta. (Ríos Velázquez, 2017) Existen diversos métodos de extracción de DNA que se ajustan a las necesidades de cada tipo de muestra, estos incluyen tratamientos físicos, químicos, enzimáticos o una combinación de los mismos.

La técnica de extracción física de DNA utilizando esferas de cristal o porcelana conocidas en inglés como “bead beating”. (Sambrook, 2001). Involucra el añadir partículas en forma de esferas de diversos tamaños, a

la muestra. Mediante el proceso de colisión dichas moléculas van a fusionar la pared celular del organismo causando mayor efectividad en la lisis celular. Otro método físico es el cambio drástico de temperaturas conocido como “freezing and thawing”, en la misma se realizan alrededor de 3 ciclos en donde se coloca su muestra a una temperatura entre -70 á -80°C y luego se calienta. (Sambrook, 2001).

5.9.2. Chelex.

La resina de intercambio de iones Chelex quelante tiene inusualmente alta preferencia por cobre, hierro y otros metales pesados a los cationes monovalentes como sodio y potasio. Su selectividad por divalente sobre monovalente iones es de aproximadamente 5.000 a 1, y tiene una muy fuerte atracción para los metales de transición, incluso en solución de sal concentrada. (Alfred Nobel Dr., 2017).

La resina quelante está disponible como grado analítico Resina Chelex 100, Biotecnología Grado Chelex 100, 20 de grado técnico. La resina Chelex 100 de grado analítico ha sido exhaustivamente dimensionado, purificado y convertida para hacerlo capaz de técnicas analíticas precisas y reproducibles. (Alfred Nobel Dr., 2017)

La resina Biotechnology Grado Chelex 100 es analítica resina de grado que está certificada para contener menos de 100 microorganismos por gramo de resina.

5.9.3. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La PCR (acrónimo de *polymerase chain reaction*) o en español Reacción en cadena de la polimerasa, cuyo objetivo es la amplificación directa de un gen o fragmento de ADN, presente en muestras muy diversas, sin necesidad de una purificación previa (Hernandez, 2012). La *PCR* es una técnica molecular inventada en el año 1985 por el Bioquímico de origen Estadounidense Kary Mullis (Novo, 2007). La *PCR* es una de las técnicas que ha venido evolucionando en función de las necesidades del mundo científico actual en la base molecular, a esta técnica científica se la

considera como una clonación molecular o de ácidos nucleicos que permitirá amplificar el ADN sin emplear células por ellos decimos que es considerada una clonación acelular. La *PCR* hoy en día es considerada una herramienta imprescindible en los laboratorios de biología molecular, el objetivo de la técnica es amplificar de forma directa un gen o un fragmento de DNA (Herráez, 2012). Así pues, esta técnica ha permitido realizar un sinnúmero de propósitos como es clonación de fragmentos de ADN, detección de secuencias sin purificación previa, y preparación de muestras para secuencias de ácidos nucleicos, rastreos de mutaciones, polimorfismos y diagnósticos de enfermedades entre otras (Herráez, 2012).

5.9.4. Amplificación

Basada en realizar varias copias idénticas a la de una cadena molde El principio de esta técnica se basa en la amplificación al azar de fragmentos de ADN usando un partidor, (Becerra, 2000), Los ADN genómico molde, nucleótidos, cloruro de magnesio y *Taq* ADN polimerasa. Son sometidos a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permitirá la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena ya conocida.

5.9.5. Amplificación in vitro de ADN (PCR)

La amplificación propiamente dicha es disponer de cantidad suficiente de material genético para utilizarlo, con fines diversos, como tal supone una clonación ya que cada componente individual de un clon posee la misma información genética (Hernandez, 2012).

El método se desarrolla en un periodo de pocas horas y no incluye ningún paso de digestión, ligación ni transformación, sino que se basa en la acción cíclica de una polimerasa de ADN que amplifica selectivamente solo la región de interés y ninguna otra. (Novo, 2007). El punto central de la técnica de PCR es la síntesis de ADN desde un punto concreto,

repetida durante un número elevado de veces (ciclos). Por tanto, hay dos elementos esenciales de la técnica:

- a.** Conseguir que la amplificación se limite exclusivamente a la región genómica de interés.
- b.** Utilizar algún tipo de polimerasa que permita repetir el proceso de síntesis de ADN muchas veces.

En lo que respecta al literal.

- a)** La técnica utiliza algo que ya era conocido, como es la capacidad de las polimerasas de ADN de catalizar la síntesis de ADN a partir del extremo 3' libre de un oligonucleótido que está unido a una cadena complementaria más larga, la cual actúa como molde de la síntesis. Este proceso habitual en la replicación del ADN celular, puede reproducirse en el laboratorio utilizando pequeñas moléculas de ADN complementarias a una región concreta de una doble cadena más larga. Como es de conocimiento general, una de las formas de desnaturalizar el ADN es decir, separar las dos cadenas de una doble hélice es mediante calor, la temperatura necesaria para alcanzar dicha desnaturalización depende de la secuencia de la molécula, pero a partir de los 92-94 °C la totalidad de la molécula estará desnaturalizada.
- b)** Al desnaturalizar una molécula de ADN, obtendremos dos cadenas libres; al dejar enfriar la preparación, ambas moléculas vuelven a unirse por complementariedad de bases hasta que el ADN se renaturaliza por completo. Este proceso es lento, por lo que si la renaturalización se lleva a cabo en presencia de pequeños oligonucleótidos cuya secuencia es complementaria a alguna porción de la molécula larga original, estas pequeñas moléculas se unirán rápidamente a la región complementaria de la molécula larga antes de que ésta llegue a renaturalizarse. El resultado es que cada una de las cadenas originales se mantiene monocatenaria excepto en la región en que se ha unido el

oligonucleótido. En esa región, una polimerasa de ADN puede sintetizar a partir del extremo 3' libre de la molécula pequeña.

Los métodos moleculares siguen siendo los de uso regular. Cabe destacar procedimientos de este corte como el PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la hibridación in situ fluorescente (FISH), y otras técnicas como el inmunoensayo y los métodos tradicionales tal como el cultivo el cual ha sido modificado. (Travis, 2010)

El polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas, pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en ADN, la investigación en esta área se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores, aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de ADN al Azar (RAPD), Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP), mini satélites (VNTR) y micro satélites (SSR), entre otros. (Becerra, 2000)

5.9.6. Detección

Es un proceso capaz de señalar la presencia de un determinado organismo. Para poderlo detectar en muestras con una pequeña cantidad de DNA diana. (Hernandez, 2012). Lo que facilita la posibilidad de ser diagnosticado de forma molecular.

La utilización de las técnicas de biología molecular en la detección de una variedad de enfermedades, tanto infecciosas, genéticas, neoplásicas o de identificación de individuo, son aplicadas al diagnóstico las mismas ofrecen mayor sensibilidad, especificidad y rapidez con requerimientos mínimos de muestra, en comparación con las pruebas convencionales. (BIMODI, 2017) Las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de enfermedades infecciosas en ocasiones superan las limitaciones que imponen los organismos para su aislamiento y posterior identificación. Los ácidos nucleicos microbianos extraídos de una muestra clínica pueden

ser analizados para buscar la presencia de secuencias de ADN específicas de los organismos sin importar si dichos microbios están vivos o no.

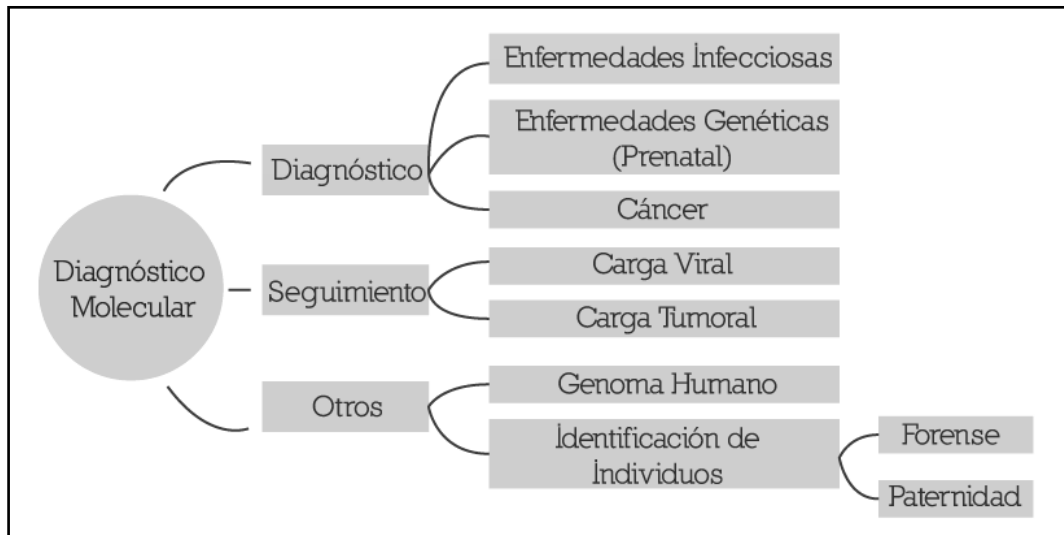


Figura 2: Detección y diagnóstico de enfermedades a través de biología molecular. (BIMODI, 2017)

CAPÍTULO III

6. Metodología o Diseño de la Investigación.

6.1. Modalidad: Cuantitativa

6.2. Tipo de investigación:

Se aplicó un tipo de estudio experimental en el área de biología molecular, con las muestras obtenidas de pacientes que presentaron problemas gástricos o sintomatología asociada; se realizó un rastreo antigénico, un cultivo en placa, se extrajo ADN bacteriano aplicando un diseño experimental para comprobar el mejor tratamiento y la efectividad del método Chelex respectivamente luego se procedió a la detección del patógeno mediante PCR.

Sitio:

El trabajo de Investigación se llevó acabo en la provincia Bolívar cantón Guaranda, específicamente en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico perteneciente a la Universidad Estatal de Bolívar, Campus Agropecuario Laguacoto II, (km. 1 1/2 Vía Guaranda -San Simón). El laboratorio cuenta con una dimensión de 300 m² que se encuentra dividida por un área de seguridad personal, pesaje, almacenamiento, esterilización, refrigeración y un área microbiológica de análisis Molecular. También se realizó parte experimental en el Laboratorio Clínico privado María Auxiliadora (LCMA) Ubicado en la ciudad de San Miguel de Bolívar en la Calle Pedro Carbo y Ángel Alfredo Coloma detrás del Hospital Básico San Miguel, en este laboratorio se realizó el rastreo antigénico. Este laboratorio cuenta con un área de 100 m² el mismo que se encuentra dividido con una sala de recepción, toma de muestras y área de análisis: serología, microbiología, bioquímica.

7. Materiales y Métodos.

Los materiales fueron seleccionados bajo especificaciones técnicas y bibliográficas para ser empleadas en la investigación experimental. Ver la figura 2 y 3 de los materiales

2. Diseño experimental

Los materiales fueron seleccionados bajo especificaciones técnicas y bibliográficas para ser empleadas en la investigación experimental. Ver las figuras 3 y 4 de los materiales

7.1. Materiales

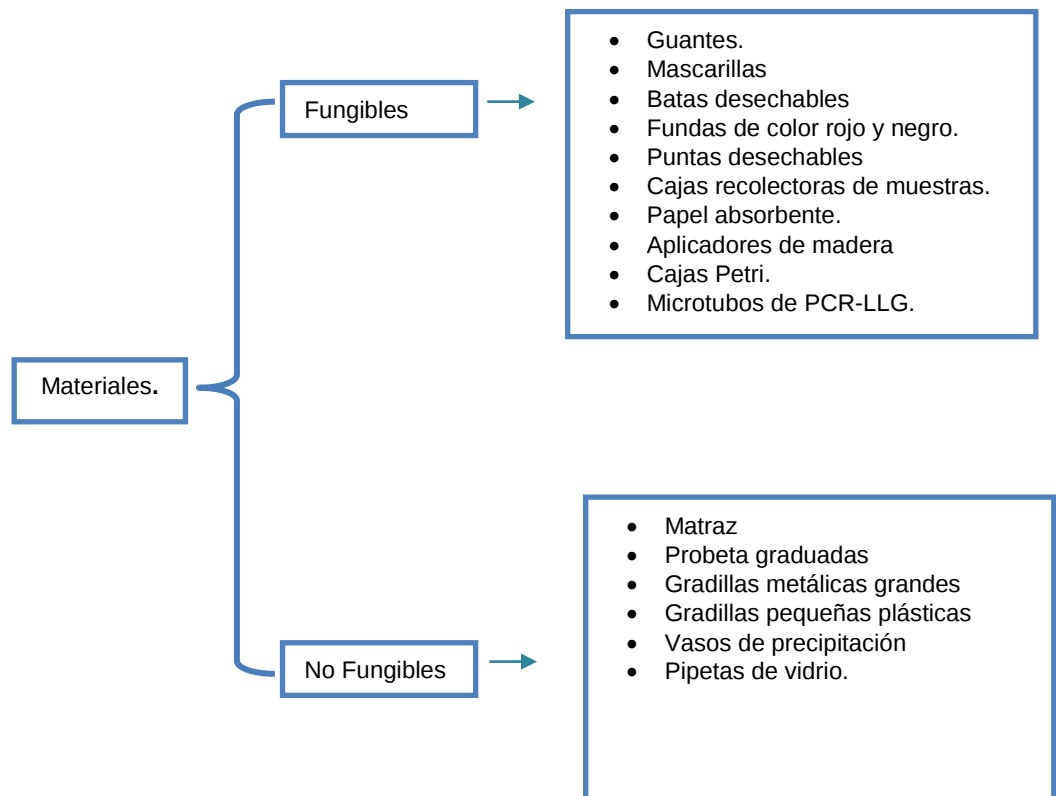


Figura 3: Materiales utilizados en la investigación.

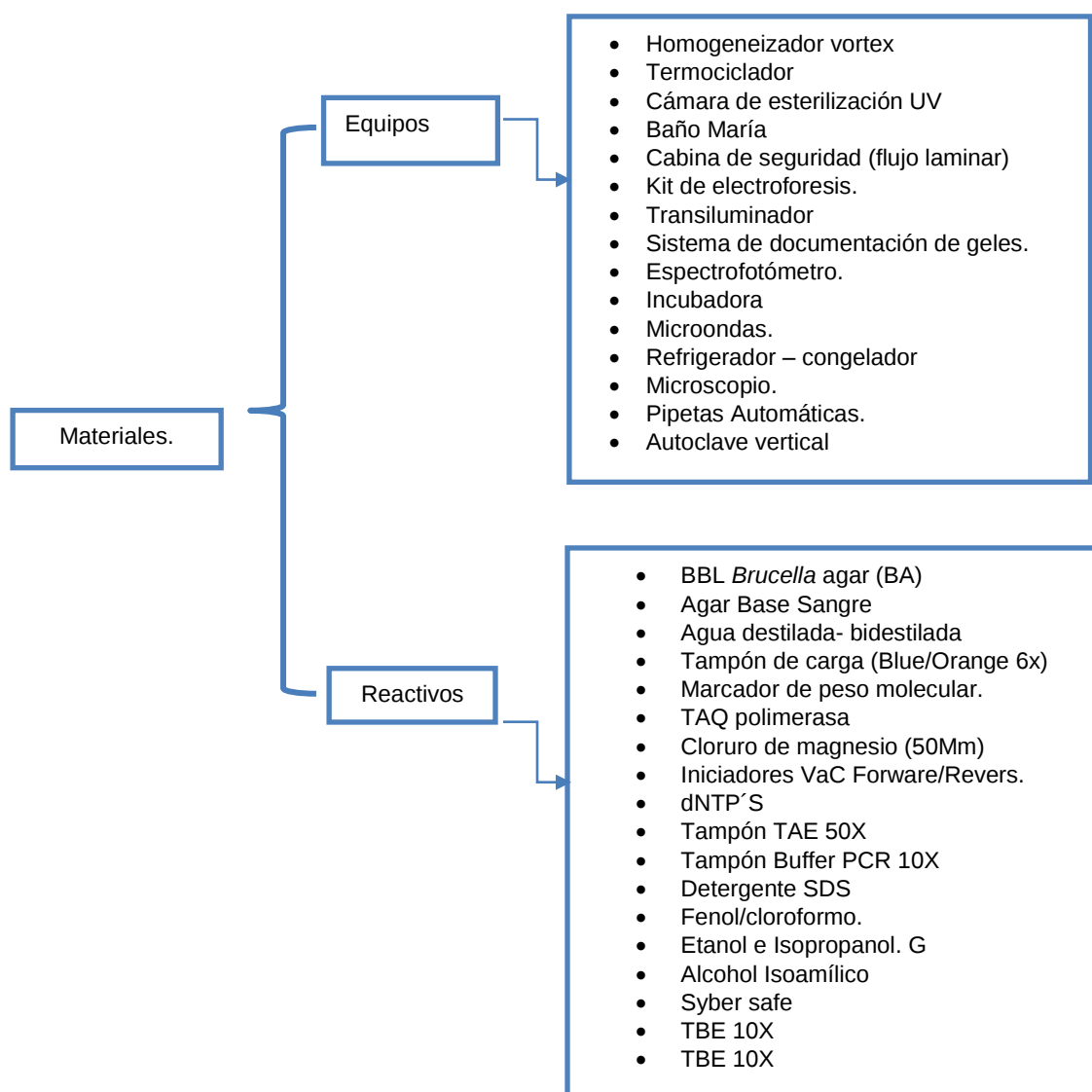


Figura 4: Materiales utilizados en la Investigación.

7.2. Recolección de Muestras

Los pacientes se seleccionaron mediante una ficha de datos clínicos además de la sintomatología, la población del estudio solo fueron 50 pacientes que colaboraron para la investigación por cumplir los criterios descritos.

7.3. Rastreo de antígenos

El rastreo de antígenos se realizó mediante la aplicación del método cromatográfico Ag-*H. Pylori* Feci Screen (REF IHP-602, Italia). Este es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa del antígeno de *H. pylori* en muestras de heces humanas para diagnóstico de la infección, con una sensibilidad relativa será mayor a 94%, especificidad 95% y exactitud del 97,5%, ya que es una técnica in vitro, que algunas ocasiones suele tener un falso positivo por las reacciones cruzadas con otros organismos.

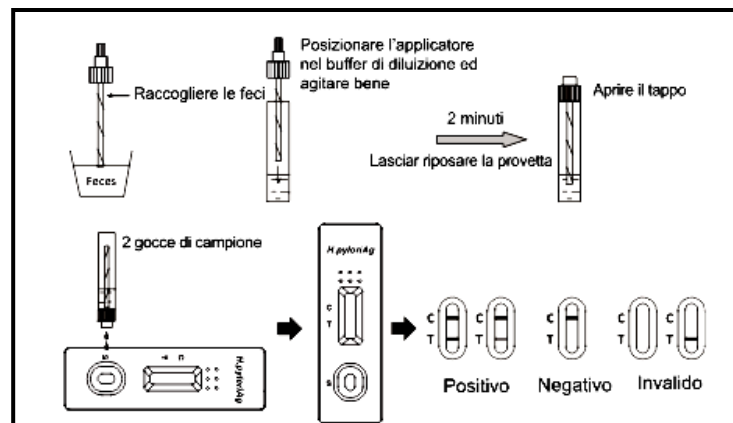


Figura 5: Proceso de preparación de la muestra.

Para el análisis se mantener el casett a temperatura ambiente 25 a 30 °C colocar 1 - 2 mL o 1 - 2 g d la muestra, colocar en el buffer de la dilución y esperar entre dos minutos, luego de ello colocar en el casett 80 uL de la muestra o 2 gota en su equivalencia y esperara los reporte en un tiempo máximo de 10 minutos. (SCREEN, 2017).

Tabla 2: Identificación de Sexo y Edad de pacientes de los cuales se recolectaron las muestras.

		11- 20	21- 30	31- 40	41 años en	
EDAD	5- 10 años	años	años	años	adelante.	TOTAL
Hombres	0	7	2	4	3	16
Mujeres	3	9	9	7	6	34
Total	3	16	11	11	9	50

7.4. Cultivo en placa

Para el cultivo en placa, se prepararon 10 g de muestra en 90 mL de Agua peptona tamponada (APT) estéril, se homogeneizó y se llevó a incubar a 37°C durante 24 horas, transcurrido este tiempo, se colocó 100µL de cada homogeneizado fue depositado sobre placas previamente preparadas con *Brucella* Agar sangre [Agar *Brucella* + 5% de Sangre humana tipo B (+) con anticoagulante EDTA]. Las placas fueron llevadas a incubar a 37°C bajo condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) durante 3 a 4 días, tras este tiempo, las placas que presentaban colonias con morfología característica para *H. pylori* fueron seleccionadas y re-cultivadas en nuevas placas, todas las colonias fueron confirmadas mediante tinción de Gram, para observar si presentaban el aspecto típico de bacilos Gram negativos, curvados, en forma espiral, finalmente los aislados fueron conservados en crioviales a -20°C (Ver figura 6).

7.5. Extracción de ADN bacteriano

Se aplicó la técnica de extracción de ADN bacteriano usando el Método Chelex (Suenaga y Nakamura, 2005). Para lo cual, las cepas de *H. pylori* (Hp5C1, Hp10C1, Hp17C2, Hp26C3, Hp27C3 y Hp34C1) previamente confirmadas por microscopía fueron utilizadas (grupo de aislados por cultivo en placa) para su utilización en las pruebas de extracción de ADN. Con el objeto de identificar la presencia del ADN obtenido para ello se aplicó la combinación de factores mediante diseño experimental para el método de extracción del material genético mediante el uso de la resina Chelex, las combinaciones fueron de acuerdo con los que se muestra en las tablas 3 y 4.

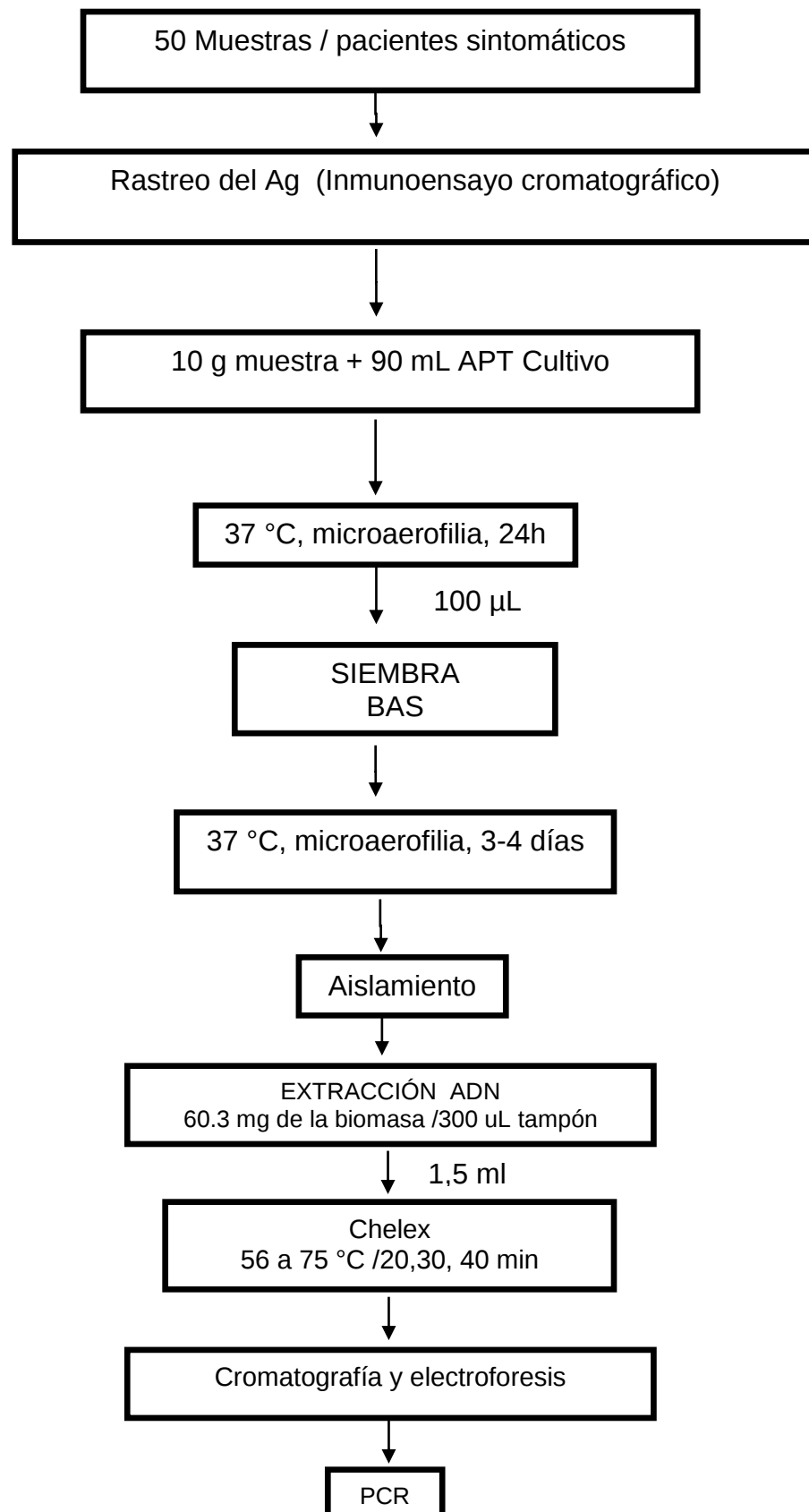


Figura 6: Esquema de detección de *Helicobacter* en muestras biológicas humana.

Tabla 3: Diseño Método Chelex

Factor A (Temperaturas de incubación)	A ₁ = 56°C A ₂ = 75°C
Factor B (Tiempos de incubación)	B ₁ = 20 min B ₂ = 30 min B ₃ = 40 min

Tabla 4: Combinación de Factores de Diseño

Tratamientos	Descripción
A ₁ B ₁ (T ₁)	Incubado a 56°C durante 20 minutos
A ₁ B ₂ (T ₂)	Incubado a 56°C durante 30 minutos
A ₁ B ₃ (T ₃)	Incubado a 56°C durante 40 minutos
A ₂ B ₁ (T ₄)	Incubado a 75°C durante 20 minutos
A ₂ B ₂ (T ₅)	Incubado a 75°C durante 30 minutos
A ₂ B ₃ (T ₆)	Incubado a 75°C durante 40 minutos

7.5.1. Descripción del método de extracción de ADN con la resina Chelex

La técnica se llevó acabo de la siguiente manera:

- Una asada de cultivo cuya cantidad media recolectada fue de 60.3 mg de biomasa bacteriana, se re suspende en 300 µL de tampón TAE (tris acético EDTA) 1X en microtubos eppendorf de 1,5 mL.
- El re-suspendido se centrifuga a 13000 xg durante 15 minutos a 4°C, tras eta etapa se procede a la eliminación del sobrenadante conservando el pellet.
- El pellet es lavado 3 veces suspendiéndolo en 1,5 mL de acetona.
- Cada preparación se centrifuga a 13000 xg durante 10 min a 4°C.
- El sobrenadante es eliminado y el pellet es conservado para su posterior procesado son la resina Chelex.

- Unos 200 μL de chelex-100 (5%) y 0,2 mg de proteinasa K se adicionan a los pellets y luego se incuban a 56°C y 75°C (en un baño) durante 20, 30 y 40 minutos de acuerdo con el diseño previamente mostrado.
- Cada una de las preparaciones son sometidas a agitación en un vortex y posteriormente centrifugadas a 100000 xg durante 5 minutos.
- Finalmente, unos 100 μL del sobrenadante se transfirieron a tubos estériles y se almacena a -20°C para su posterior análisis.

De estos resultados, se aplicó un diseño de bloques completo al azar (DBCA) con arreglo factorial AxB con 3 repeticiones para el método de extracción.

Con el objeto de confirmar la presencia del ADN obtenido, se realizó un análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1 X (Invitrogen, 24710-030, EE-UU), con la adición de 10 μL fue expuesto a 100 voltios durante 30 minutos. Se utilizó un volumen de producto de ADN de 10 μL previamente mezclado con 2 μL de tampón de carga (Promega, G190A, EE-UU). En cada gel se incluyó un marcador de pesos moleculares de 50-pb (Invitrogen, 10488-043, EE-UU), los fragmentos se visualizaron en un Transiluminador (Dark reader, DR-46B, EE-UU) bajo luz ultravioleta (UV).

7.5.2. Identificación de aislados de *Helicobacter* mediante análisis molecular.

Tras la extracción del ADN de todos los aislados viables se procedió al análisis de verificación de los aislados a nivel de especie para lo cual se amplificó un fragmento de 394 pb de la proteína vacuolizante Vac, específico de *H. pylori*, utilizando los iniciadores, reactivos y condiciones descritos previamente por (Santiago et al.2015) con ciertas modificaciones. (Ver anexo 4).

VacAF: 5'-GGCACACTGGATTTGTGGCA-3'

VacAR: 5'-CGCTCGCTTGATTGGACAGA-3'

Los iniciadores fueron enviados a sintetizar a la empresa estadounidense BIORESEARCH.

Para la reacción de amplificación el volumen final fue de 50 µl, conteniendo 45 µl de la mezcla y 5 µl de ADN molde.

Tabla 5: Reactivos utilizados en la PCR

Reactivos	Concentración final
Tampón	1X
dNTP's	0,2mM/cada
MgCl ₂	1,5mM
Iniciadores	0,5µM
Taq polimerasa	5U

Para la reacción de PCR, la mezcla de reacción se sometió a las condiciones que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones de temperatura utilizadas en la PCR

Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Fases
1	95	5 minutos	Desnaturalización inicial
	94	1 minuto	Desnaturalización
33	57	1 minuto	Unión de iniciadores
	72	1 minuto	Extensión inicial
1		5 minutos	Extensión final

Los productos generados en esta reacción de amplificación se analizaron mediante electroforesis, para lo cual se utilizó un volumen de 10 µL de producto amplificado, previamente mezclado con 2 µL de tampón de carga Blue/ orange 6X, loading Dye (Promega, G190A, EE-

UU), en gel de agarosa al 1,5 % en tampón TAE 1 X, con la adición de 10 µL de (Invitrogen, 247110-030, EE-UU), sometido a 100 voltios durante 45 minutos. En cada gel se incluyó un marcador de pesos moleculares de 50-pb (Invitrogen, 10488-043, EE-UU) Finalmente, los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador bajo luz UV.

CAPÍTULO IV

8. Análisis e interpretación de resultados

De la información obtenida tras la recopilación de datos a través de la ficha clínica se obtuvieron los siguientes resultados. (ver anexo 9).

De las 50 muestras de heces analizadas, mediante rastreo antigénico y datos proporcionados por la fichas de datos Clínicos, donde se contrasto la sintomatología con la Clínica expresado los siguientes resultados tras el análisis cualitativo: 25 dieron positivas para *H. pylori* de los cuales (6 pertenecía a varones y 19 a mujeres) lo que supone una prevalencia del 50%. (Ver Anexo 5).

Tabla 7: Rastreo de Antígenos de H. Pylori en muestras de heces método inmunoensayo cromatográfico cualitativo.

Rastreo antigénico cualitativo		
Descripción	Hombres	Mujeres
Positivos	6	19
Falsos positivos	1	3
Negativos	9	12
TOTAL	16	34

La mediana de la edad de la población estudiada fue de 30 años (rango 5 - 65 años). De acuerdo a los resultados realizados por (F. Sánchez Ceballos, 2007) en la ciudad de Madrid en una población de 618 individuos, donde solo 418 fueron aceptados para su participación a un análisis mediante el test de aliento para ureasa, la prevalencia para la infección por *H. pylori* obtenida fue del 77,8% solo 290 personas de las estudiadas con una frecuencia mayor en el sexo femenino a diferencia del masculino, en comparación con las pruebas serológicas donde se incurre en resultados falsos positivos, lo cual ha permitido su utilidad medica según el área geográfica donde prevalece la infección, y esta dependerá directamente del país donde se desarrolle el patógeno. En comparación

con el estudio, realizado tras una selección sujetos que acudieron a la unidad médica Laboratorio del HANM y al Laboratorio privado María Auxiliadora, donde se realizó el análisis del rastreo de anticuerpos para *H. pylori* en las muestras de heces. Los resultados muestran que de las 50 muestras analizadas, solo 29 nos dieron positivas, 6 corresponde a hombres y 19 a mujeres, solo 4 mostraron ser falsos positivos, la prevalencia de la infección por *H. pylori*, en función del sexo fue 38% para mujeres frente al 12% en hombres la frecuencia es mayor en sexo femenino en el estudio realizado. (Ver figura 4 y Anexo 5).



Figura 7: Rastreo antigénico en muestras de Heces.

8.4. Detección por cultivo.

Mediante el cultivo en placa utilizando el medio selectivo *BAS* y a partir de las colonias que presentaban la morfología característica, se realizó tinción Gram, para confirmar que se trataba de bacilos Gram negativos, curvados, en forma de espiral (Ver Figura 8). Por cultivo inicial en placa, 50 muestras fueron aisladas, resultaron 28 positivas para *H. pylori* (56%) con 57 aislados característicos. Sin embargo, este valor se redujo al lograrse solo recuperar por re-cultivo de cepas congeladas solo 19 muestras fueron positivas con 32 aislados equivalen a (38%).

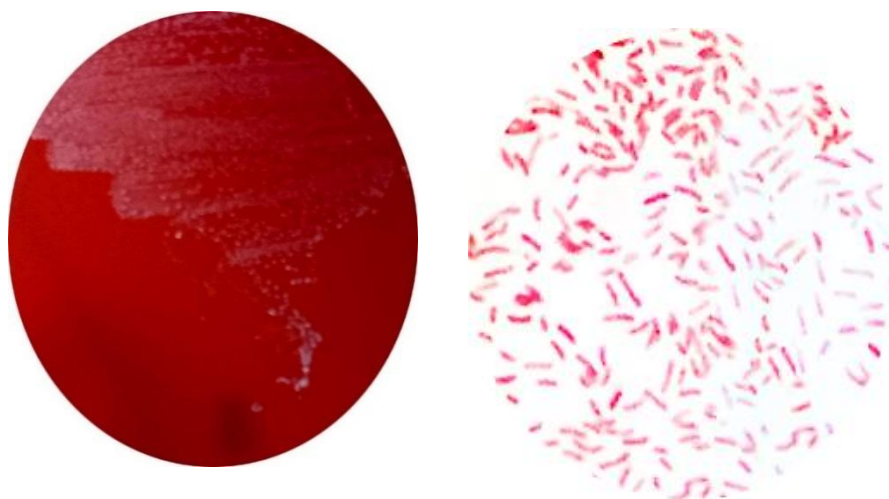


Figura 8: Colonias de *H. pylori* aisladas en medio selectivo BAS y morfología microscópica

Esta reducción en células viables se debe especialmente a las exigencias del microorganismo para poderse desarrollar y a las condiciones de cultivo. (Ferrúsa, 2007). De los 32 aislados recuperados tras cultivo en placa y confirmados por microscopía 6 de ellos (Hp5C1, Hp10C1, Hp17C2, Hp26C3, Hp27 C1, Hp34C1) fueron seleccionados por su viabilidad en placa para ser extraídos su ADN mediante la aplicación del método Chelex conforme al Diseño experimental mostrado previamente en el *Apartado de materiales y métodos*.

Tabla 8: Edad vs Positivos para Helicobacter Pylori del rastreo de Ag vs cultivo en placa.

EDAD	5- 10 años	11- 20 años	21- 30 años	31- 40 años	41 años en adelante.	TOTAL
Hombres	0	2	2	1	1	6
Mujeres	3	5	3	4	3	18
Falsos Positivos Hombres (Ag vs Placa)	0	1	0	0	1	2
Falsos Positivos mujeres (Ag vs Placa)	0	1	1	0	1	3
Total	3	9	6	5	6	29

8.5. Método Chelex

El método de extracción con la resina Chelex es rápido y resulta efectivo, dado que es el primer paso para la amplificación de ADN

template, la técnica se caracteriza especialmente por la calidad de ADN a obtener sin contaminación ni inhibidores (Butler, 2007).

Tras este análisis se puede considerar que existe diferencia estadística entre los tratamientos y que el tratamiento “5” A₂B₂ (Incubado a 75°C durante 30 minutos) fue el que presentó un mayor nivel de absorbancia de 1,88 nm de λ . Este resultado si se encuentra dentro de lo establecido para ser considerado el ADN de calidad óptima 1,8 a 2 mn (Ver anexo 7). De acuerdo al Banco Nacional de ADN Carlos III de la Universidad de Salamanca (2004), La calidad del ADN fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa con transiluminación muy aceptable.

Tabla 9: Prueba de Tukey de los tratamientos de extracción de ADN mediante el método Chelex.

Factor A	Factor B	Medias	Rangos
Temperaturas	Tiempos		ordenados
2	2	1,88	A
2	3	1,66	B
1	3	1,64	BC
2	1	1,62	C
1	2	1,18	D
1	1	0,95	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Para el análisis de electroforético de los tratamientos, se utilizaron 6 aislados (control) Hp5C1, Hp10C1, Hp17C2, Hp26C3 Hp27C1, Hp34C1, las mismas que presentaron mayor viabilidad en placa.

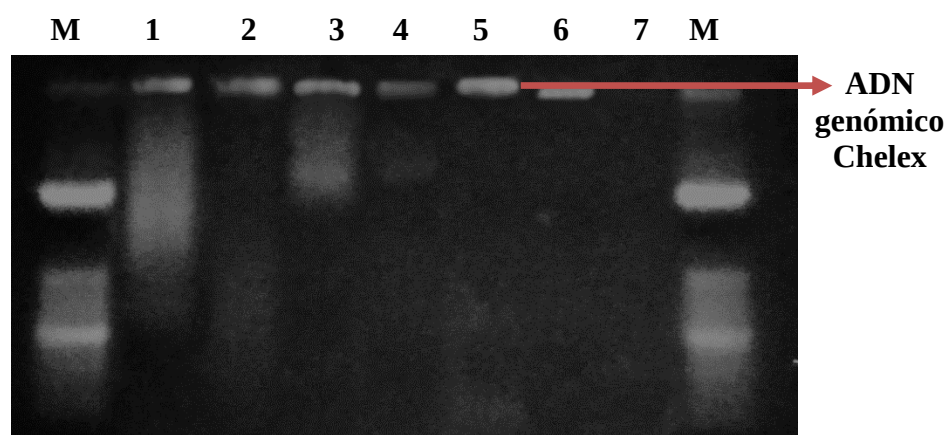


Figura 9: Análisis de electroforesis del ADN extraído mediante el método Chelex en el aislado Hp17C1; Calles: 1= tratamiento 1, 2= tratamiento 2, 3= tratamiento 3, 4= tratamiento 4, 5= tratamiento 5, 6= tratamiento 6, 7= Control negativo, M= Marcador de peso molecular(50pb).

Tras la electroforesis y observación del gel del corrido del ADN de los aislados Hp17C2 (Figura 9) y Hp34C1 (Figura 10) se evidenció gran calidad del ADN en todos los tratamientos, aunque con mayor fluorescencia en los tratamientos 1, 3, 5 y 6.

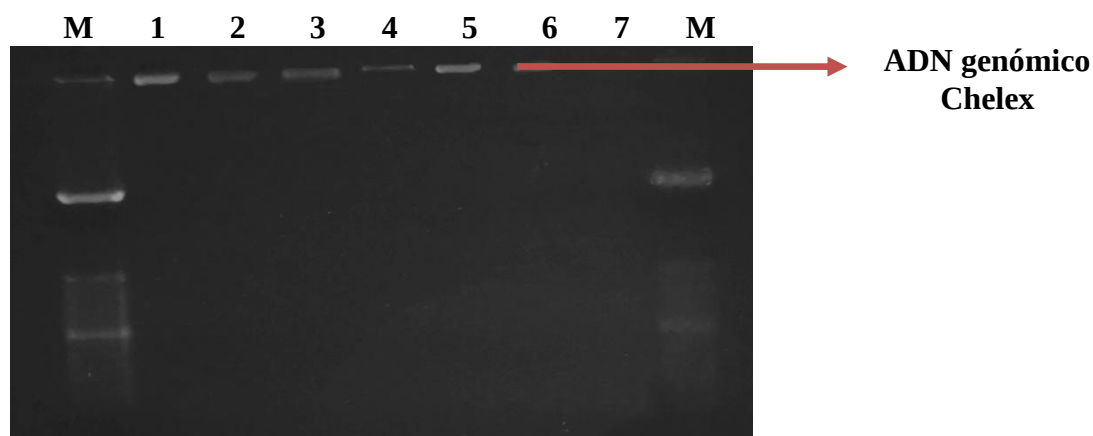


Figura 10: Análisis de electroforesis del ADN extraído mediante el método Chelex en el aislado Hp34C1, Calles: 1= tratamiento 1, 2= tratamiento 2, 3= tratamiento 3, 4= tratamiento 4, 5= tratamiento 5, 6= tratamiento 6, 7= Control negativo, M= Marcador de pesos molecular (50pb).

En resumen, considerando que la Absorbancia y transiluminación por electroforesis, mediante la aplicación de la resina Chelex, el mejor ADN obtenido fue a partir del tratamiento 5 “A₂B₂” (Incubado a 75°C durante 30 minutos). El tiempo y las temperaturas si influyeron de forma notable en la obtención del ADN, de hecho, a 75°C durante 30 minutos fue el que presentó un mayor nivel de absorbancia de 1,88 nm. Este resultado obtenido se encuentra dentro de lo establecido para ser considerado un ADN de óptima calidad (1,8 a 2 mn).

La electroforesis de los aislados Hp5C1, Hp10C1 Hp26C3, Hp27C1, presentaron similar transiluminación que se muestra en la figura 10 – 11.

8.6. Identificación de los aislados obtenidos de *Helicobacter Pylori* por PCR.

Considerando que el tratamiento 5 (A2B2) fue el mejor tras el análisis electroforético y estadístico de comparación de medias según Tukey, se

procedió a realizar la amplificación por PCR de todos los aislados obtenidos utilizando este tratamiento. Cuando la detección e identificación de especies del género *Helicobacter*, en especial *H. pylori*, se establece exclusivamente en función de métodos convencionales de cultivo, el proceso resulta bastante lento, tedioso y poco efectivo en muchas ocasiones, originando frecuentes falsos negativos. Los métodos de detección molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pueden suponer una alternativa más rápida, sensible y fiable. (Moreno, 2007)

En el presente estudio, de las 57 aislados obtenidos, 32 demostraron ser viables tras re-cultivo, estos luego de ser analizados por PCR con los iniciadores específicos para *Helicobacter pylori* VacAF y VacAR (Santiago *et al.*, 2015), de las 19 muestras resultaron positivos 11. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

En estos aislados se obtuvo la banda característica de 394-pb (Figuras de la 10 a la 16).

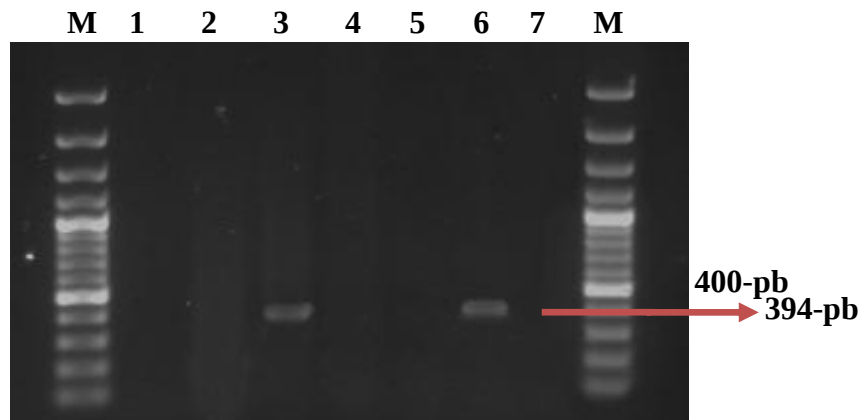


Figura 11: Análisis de electroforesis amplificado por PCR del ADN amplificado y extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 “A2B2”) en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp1C2, 2= Hp1C3, 3=Hp3C1, 4= Hp4C1, 5= Hp4C2, 6=Hp5C1, 7= Control negativo, M= Marcado

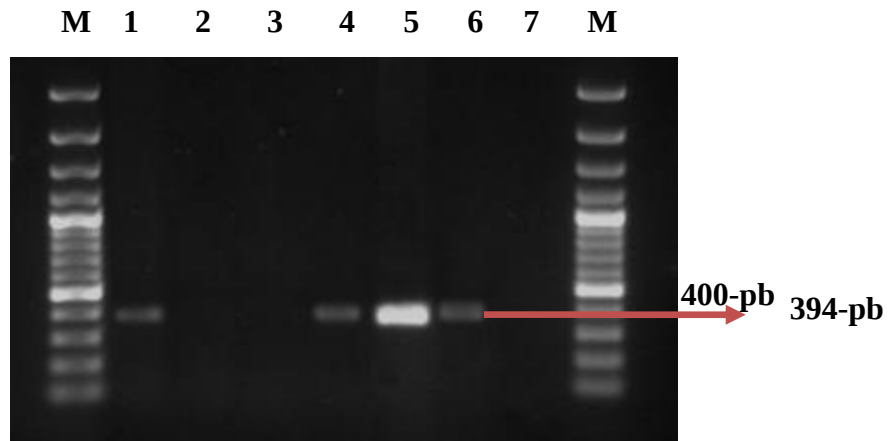


Figura 12: Análisis de electroforesis del amplificado por PCR del ADN amplificado extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 “A2B2”) en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp6C1, 2= Hp9C2, 3=Hp9C3, 4= Hp10C1, 5= Hp10C2, 6=Hp14C1, 7= Control negativo, M= Marcador.

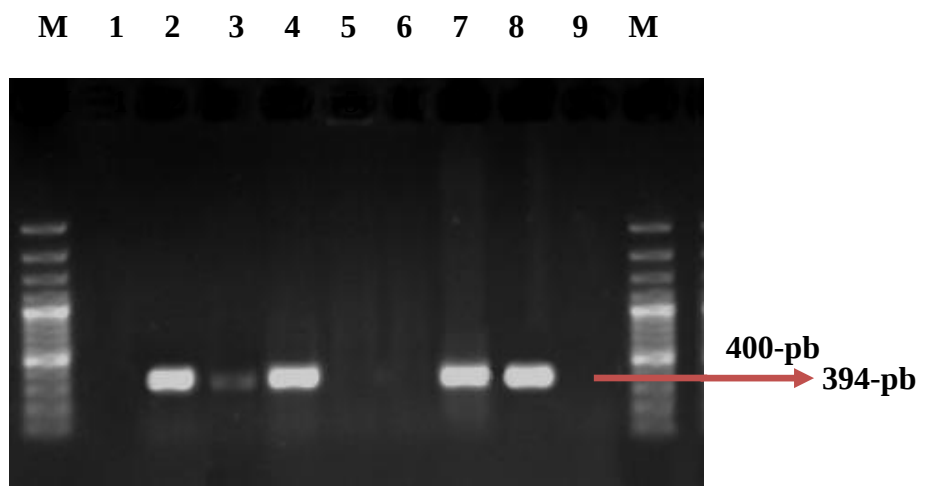


Figura 13: Análisis de electroforesis del amplificado por PCR del ADN amplificado extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 “A2B2”) en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp16C1, 2= Hp17C1, 3=Hp17C2, 4= Hp174, 5= Hp19C2, 6=Hp19C4, 7= Hp23C1, 8= Hp23C2, 9= Control negativo, M= Marcador de pesos moleculares (100 pb).

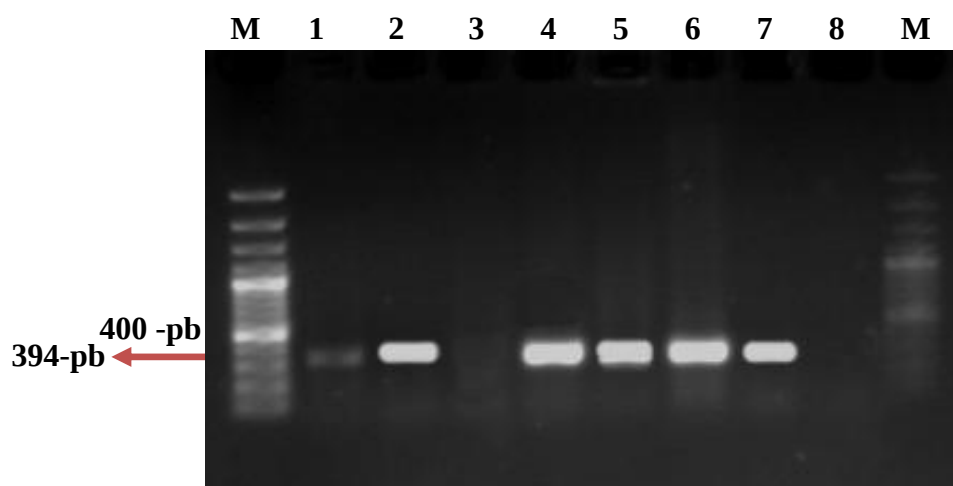


Figura 14: Análisis de electroforesis del amplificado por PCR del ADN amplificado extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 "A2B2") en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp23C3, 2= Hp27C1, 3=Hp27C2, 4= Hp27C3, 5= Hp27C4, 6=Hp28C1, 7= Hp28C2, 8= Control negativo, M= Marcador de pesos moleculares (100 pb).

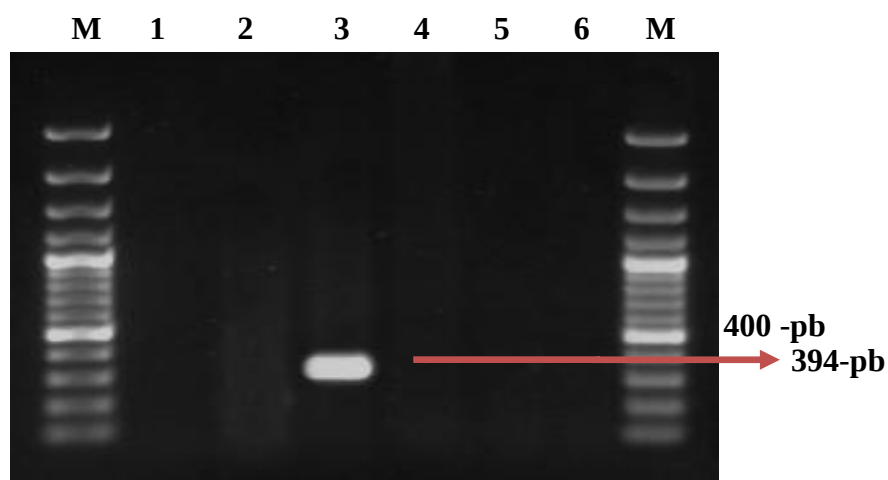


Figura 15: Análisis de electroforesis del amplificado por PCR del ADN amplificado extraído mediante el método Chelex (Tratamiento 5 "A2B2") en los aislados obtenidos, Calles: 1= Hp31C2, 2= Hp33C3, 3=Hp34C1, 4= Hp34C2, 5= Hp39C1, 6= Control negativo, M= Marcador de pesos moleculares (100 pb)

Tabla 10: Comparación de los métodos de detección de *Helicobacter pylori*

Muestra	Rastreo Antigénico	Cultivo inicial	Muestras positivas del cultivos más aislados	Cultivo y recuperación de células viables tras conservación	PCR
Hombres (16)	6 (12)	16 muestras	7 (+) con 13 aislados	4 muestras con 7 aislados	4(+)
Mujeres (34)	19 (38)	34 muestras	21(+) con 44 aislados	15 muestras con 25 aislados	7(+)
Total (50)	25 (50)	50 muestras cultivadas en BAS	28 con 57 aislados	19 muestras con 32 aislados recuperados	11 muestras positivas

Nota: Mediante el rastreo antigénico, existió 1 falso positivo en hombres y 3 en mujeres, por otro lado, mediante cultivo en placa, se obtuvo un total de 32 aislados viables de 19 muestras para el estudio, después de la recuperación, existió un falso positivo tanto en hombres como en mujeres, luego de la extracción del ADN genómico obtenido por Chelex se corrió PCR para la detección de las muestras extraídas con el tratamiento 5 tras la comprobación los resultados expuestos fueron 11 muestras positivas en la detección *Helicobacter Pylori*. Ver Tabla 11.

Tabla 11: Comparación de detección de *H. pylori* mediante rastreo antigénico/cultivo en placa / PCR, positivos y negativos.

Cód. Muestra	Ag de Pylori.	Aislados Cultivo	PCR
1 H.p	(+)	(+)	(-)
2 H.p	(-)	(-)	(-)
3 H.p	(-)	(+)	(+)
4 H.p	(+)	(+)	(-)
5 H.p	(+)	(+)	(+)
6 H.p	(-)	(+)	(+)
7 H.p	(-)	(-)	(-)
8 H.p	(+)	(-)	(-)
9 H.p	(+)	(+)	(-)
10 H.p	(+)	(+)	(+)
11 H.p	(+)	(-)	(-)
12 H.p	(-)	(-)	(-)

13 H.p	(-)	(-)	(-)
14 H.p	(-)	(+)	(+)
15 H.p	(+)	(-)	(-)
16 H.p	(-)	(+)	(-)
17 H.p	(+)	(+)	(+)
18 H.p	(-)	(-)	(-)
19 H.p	(+)	(+)	(-)
20 H.p	(-)	(-)	(-)
21 H.p	(+)	(-)	(-)
22 H.p	(-)	(-)	(-)
23 H.p	(-)	(+)	(+)
24 H.p	(+)	(-)	(-)
25 H.p	(+)	(-)	(-)
26 H.p	(+)	(+)	(+)
27 H.p	(+)	(+)	(+)
28 H.p	(-)	(+)	(+)
29 H.p	(+)	(+)	(-)
30 H.p	(-)	(-)	(-)
31 H.p	(-)	(+)	(-)
32 H.p	(+)	(-)	(-)
33 H.p	(+)	(+)	(-)
34 H.p	(+)	(+)	(+)
35 H.p	(+)	(-)	(-)
36 H.p	(-)	(-)	(-)
37 H.p	(+)	(-)	(-)
38 H.p	(+)	(-)	(-)
39 H.p	(+)	(+)	(-)
40 H.p	(-)	(-)	(-)
41 H.p	(+)	(-)	(-)
42 H.p	(+)	(-)	(-)
43 H.p	(-)	(-)	(-)
44 H.p	(-)	(-)	(-)
45 H.p	(-)	(-)	(-)
46 H.p	(-)	(-)	(-)
47 H.p	(-)	(-)	(-)
48 H.p	(-)	(-)	(-)
49 H.p	(-)	(-)	(-)
50 H.p	(-)	(-)	(-)
Total	25	18	11
	Positivos	Muestras	Positivos

Los resultados positivos tras el análisis del rastreo antigénico de *H. Pylori* como se muestra en la (tabla 11) son positivos por la presencia del

serotipo propio para *pylori* mientras que el resto atribuye la positividad a reacciones cruzadas con otros patógenos luego evidentes en la detección por PCR. Algunos aislados que fueron obtenidos por cultivo no fueron identificados como *H. pylori* mediante PCR, esto se debe a que posiblemente que se aisló otra especie bacteriana dentro del género *Helicobacter*, confusión que podría darse al presentar las mismas características en placa y microscopía, conociéndose que los iniciadores utilizados son específicos para *H. pylori*. Por otra parte, el número de aislados obtenidos por placa fueron mayores a los confirmados a ser *H. pylori* por PCR, esto debido probablemente a la presencia de inhibidores de PCR. (Rahimi et al., 2014).* todos los aislados obtenidos fueron obtenidos por el método Chelex mediante el tratamiento 5 (A2B2) para su posterior análisis de PCR.

8.7. Comprobación de Hipótesis

Las hipótesis planteadas tomando en consideración los dos métodos empleados en la extracción de ADN con sus respectivos tratamientos fueron:

H-1. Los tratamientos de extracción de ADN serán iguales tras el análisis mediante análisis de absorbancia y electroforesis.

H-1: $T1(A1B1) = T2(A1B2) = T3(A1B3) = T4(A2B1) = T5(A2B2) = T6(A2B3)$

H-0. Los tratamientos de extracción de ADN no serán iguales tras el análisis mediante análisis de absorbancia y electroforesis.

H-0: $T1(A1B1) \neq T2(A1B2) \neq T3(A1B3) \neq T4(A2B1) \neq T5(A2B2) \neq T6(A2B3)$

Tras este análisis y considerando el análisis estadístico, se puede concluir que existe diferencia estadística entre los tratamientos para los dos métodos de extracción ($p \leq 0,05$). Por ende, tras la aplicación del método, se aprueba la hipótesis alterna misma que considera que los tratamientos en sus resultados no son iguales uno de otro.

CAPÍTULO V

9. Conclusiones y Recomendaciones

1. El rastreo antigénico para *H. pylori* y la precisión y la sensibilidad de esta prueba tiene reacciones cruzadas como no es invasiva es inmunocromatografica cualitativa tiene un equivalente al test del aliento con una sensibilidad de 90-92%, en este estudio, mediante este método, la prevalencia de la infección por este patógeno fue del 50%, en función del sexo fue 38% para mujeres frente al 12% en hombres.
2. La efectividad del método de aislamiento por cultivo de *H. pylori* en medios selectivos constituido especialmente por BAS va de la mano con las condiciones ambientales y está condicionada por el tipo de muestra a analizar, de tal manera es conveniente asociarlo con otros métodos de detección de *H. pylori*, como rastreo antigénico y PCR para evitar falsos positivos.
3. En el cultivo inicial de las muestras biológicas humanas “heces”, la prevalencia de *Helicobacter pylori* fue del 56%, con un total de 50 muestras, sin embargo, tras re-cultivo y recuperación de los aislados, el valor porcentual redujo en un 18 % de un total de 28 muestras solo fueron viables 19 muestras que equivalen al 38% de las cuales 8% fueron hombres y 30% mujeres, esto debido especialmente a las exigencias del microorganismo para poderse desarrollar.
4. Se ha aplicado el método de aislamiento y purificación de ADN de *H. pylori* con el método Chelex. Al aplicar los tratamientos obtuvimos absorbancias que mostraron resultados de ABS bastante prometedores. De hecho, el tratamiento 5 - A₂B₂ presentó un valor de absorbancia de 1,88 nm, que está dentro de los

parámetros de calidad del ADN. Mediante técnica de separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico (electroforesis), el método de extracción Chelex, en todos sus tratamientos mostraron transiluminación siendo este un indicador aceptable para continuar con el trabajo.

5. La técnica de PCR convencional es una metodología eficaz para la detección de *Helicobacter pylori* en muestras biológicas, reduciendo considerablemente el tiempo de ensayo y mostrando una mayor sensibilidad que el método de cultivo, aunque en escasas ocasiones pueden producirse falsos negativos, probablemente debidas a la presencia de sustancias inhibidoras de la PCR.
6. Mediante PCR se ha detectado *H. pylori* en 11 muestras equivalente a un 22% de las analizadas luego de la extracción de ADN bacteriano mediante el método Chelex con el tratamiento 5 de las cuales (8% fueron hombres y 14% mujeres) no obstante, la prevalencia con relación al cultivo ha reducido (de 38% a 22%), esto no quita que por cultivo se haya aislado bacterias del género *Helicobacter* aunque no necesariamente sea del serotipo *H. pylori*, dado a que la PCR fue específica para esta especie. Sin embargo, los resultados de este trabajo demuestran la necesidad de seguir mejorando los métodos de detección y aislamiento del microorganismo en muestras biológicas humanas.

Referencias.

- A T Lichtendahl-Bernards, A. S. (1993). Effect of transport medium and transportation time on culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. *Journal of Clinical pathology*, 3.
- A.Ferrúsa, Y. L. (2007). Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res*, 41 (15): 3490-3496. *El Silver Water Research*, 6.
- ad-bio. (3 de Noviembre de 2017). *H. pylori Ag Prueba Rápida en Casete (muestras fecales)*. Obtenido de <http://www.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/pruebas-rapidas/ad0192c-hpylori-ag-rev-cpdf.pdf>.
- Alfred Nobel Dr., H. (30 de NOVIEMBRE de 2017). *Bio-Rad Laboratories*. Obtenido de http://www.biorad.com/webmaster/pdfs/9184_Chelex.PDF
- American Cancer Society. (jueves 8 de Diciembre de 2016). Obtenido de Society, American Cancer Atlanta, Ga: American Cancer: <http://www.cancer.org/cancer-de-estomago-pdf>
- Bayas, F. (2016). *Aportaciones a la epidemiología de arcobacter y helicobaaplicación de métodos moleculares a su detección e identificación en alimentos*. Valencia: Politecnica de Valencia.
- Becerra, V. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Scielo*, 3.
- BIMODI. (28 de noviembre de 2017). *Biología Molecular Diagnóstica*. Obtenido de <http://www.bimodi.com/index.php/tecnicas/93-temas-de-interes/233-diagnostico-molecular.html>.
- Butler, J.M. (2007). DNA extraction from forensic samples using chelex. *CSH. Protocols*. 1. Doi: 10.1101/pdb.prot5229.

- Cobas, F. C. (2003). Dos décadas de helicobacter pylori. *Scielo*, 10.
- Definiciones ABC en Salud. (20 de Febrero de 2017). Obtenido de <https://www.definicionabc.com/salud/cancer-de-estomago.php>
- Deseaphy, Helenen. (2013). alfaquimica andina (catalogo de Laboratorio). Germany: LLG-Lab Logistics Group.
- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica_MSP - Ecuador. (2017). *ANUARIO*. Obtenido de ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR AGUA Y ALIMENTOS: <https://public.tableau.com/profile/vvicentee80#!/vizhome/ETAS2014/ANUARIO>.
- F. Sánchez Ceballos. (2007). Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en población sana en la Comunidad de Madrid. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*.
- Farfan., B. M. (2015). Biología Molecular Aplicada Al Diagnóstico Clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 2.
- GenBank*. (s.f.). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Gisbert, J. and Molina-Infante, J. (2017). Tratamiento actual de la infección por *Helicobacter pylori*. *Med. Clin. (Barc.)*. 148:20–22.
- Gilberto, A. M. (2006). *Interpretación Clínica de Laboratorio*. Bogotá Colombia : PANAMERICANA.
- Gisbert. (26 sábado de Noviembre de 2016). *Infección por Helicobacter pylori*. Obtenido de http://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/ayudas-practicas/19_Infeccion_por_Helicobacter_pylori.pdf
- Grávalos, D. C. (2017). Cáncer gástrico. *Sociedad española de oncología médica*.
- Hasni, SA. (2012). Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 24 (4):429-34.

- Harrison. (2012). *Medicina interna volumen 2*. España: mcgraw-hill interamericana editores, s. A. de C. V.
- Harrison. (2012). *Principios de medicina interna*. España: mcgraw-hill interamericana editorES, S. A. de C. V.
- Herráez, Á. (2012). *Biología Molecular e Ingeniería Genética(2° Edición)*. Barcelona España: ELSEVIER.
- Hinojosa, M. M. (28 de Octubre de 2017). Obtenido de http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/091115_CANCER%20GASTRICO%20-%20JEMH.pdf
- Iglesias, G. (2 de Noviembre de 2008). Técnicas de biología molecular. *Desde Mendel hasta las moléculas.*, 1. Obtenido de <https://genmolecular.com/tecnicas-de-biologia-molecular/>
- INEC. (Sabado 26 de noviembre de 2016). *Instituto nacional de estadísticas y censos*. Obtenido de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas/>
- Infostat (2017). Programa estadístico, Universidad de Córdoba, Argentina. [www. Infostat.uc.ar](http://www.infostat.uc.ar)
- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI. (2017). *Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI*. Recuperado el Miercoles de octubre de 2017, de <http://www.investigacionsalud.gob.ec/proyectos-en-ejecucion/>.
- Jiménez, D. F. (1998). Cancer gastrico: factores de riesgo. *Revista cubana de oncología*, 2.
- Jiménez, D. F. (1999). Mediadores Bacterianos de la Inflamacion en La Gastritis. *Rev Cubana Medicina*, 2.
- Konturek, J.W. (2003). Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and cancer gastric. *J. Physiol. Pharmacol*, 54 (3): 23-41.

- Lopez, L. (2012). Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *REVISTA MVZ CÓRDOBA • Volumen 17(3) Septiembre - Diciembre*, 3.
- LINEAR CHEMICALS S.L . (26 de 11 de 2017). *website* . Obtenido de http://www.linear.es/ficheros/archivos/481_4245125H.PyloriAgcassette25tcas.pdf.
- Lopez, L. (2012). Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *REVISTA MVZ CÓRDOBA • Volumen 17(3) Septiembre - Diciembre*, 3..
- Mandell, R. (2012). *Enfermedades infecciosas Principios y Practicas*. España: Elsevier España, S.L.
- Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J.L., Jiménez, A., González, A., Ferrús, M.A. (2007). Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res*, 41 (15): 3490-3496.
- Nathan D Olson and Jayne B Morrow. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes* 2012, 5: 668, 2-14. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/668>.
- Navas, M. L. (2000). Detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool in patients with peptic ulcer for the diagnosis and follow-up of infection. *El silver*, 6.
- Newsletter. (2009). La extracción y purificación del . *Microbial*, 2.
- Novo Villaverde, F. J. (2007). *GENÉTICA HUMANA Conceptos, Mecanismos y Aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina* (Vol. 1ra EDICION). pearson prentice hall. doi:ISBN 978-848-322-359-8
- P, G. C. (2009). *PROTOCOLOS Y DIRECTRICES EN ENDOSCOPIA*. Obtenido de COMPLICACIONES DE LA ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA: <http://www.aeed.org/miembros/protsup7.htm>

- Pagola, M. F. (2009). Caracterización de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera gástrica. *Scielo/Medisur*, 9.
- Palomino, E. (Jueves 08 de Diciembre de 2016). *Manuales Venezolanos de Nutrición*. Obtenido de *Helicobacter pylori: Rol del agua y los alimentos en su transmisión*: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079807522012000200005.
- Pei Yun Lee1, J. C.-Y. (7 miercoles de diciembre de 2016). *JOVE*. Obtenido de *Electroforesis en gel de agarosa para la separación de los fragmentos de ADN*: <http://www.jove.com/video/3923/electroforesis-en-gel-de-agarosa-para-la-separacin-de-los-fragmentos?language=Spanish>
- Rahimi, E. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran. *Br. Poult. Sci*, 55 (2): 174-180.
- Rodríguez, Br. Juan José González, y Br. Ana Virginia Landaverde Carpio. «Tratamiento para Erradicación de en una población salvadoreña Terapia Secuencial vs Triple Terapia Convencional.» *tesis doctoral*. 2012.
- Ríos Velázquez, R. L. (31 de Noviembre de 2017). *Laboratorio de Genética de Bacterias manual de tecnicas*. Obtenido de <http://www.uprm.edu/biology/profs/rios/labman.pdf>.
- Sánchez-Ceballos, F., Taxonera, C., García-Alonso, M., Alba-López, C., Sainz de los Terreros, L., Díaz-Rubio, M. (2007). Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en población sana en la Comunidad de Madrid. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 99 (9): 497-501.
- Salinas, & José, P. (17 de Enero de 2012). Metodología de la investigación científica. Merida, Merida, Venezuela.

- Samie, A. (2007). Prevalence of Campylobacter species, Helicobacter pylori and Arcobacter species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *Journal of Infection ELsilver*, 2.
- Santiago, P., Moreno, Y and Ferrús, M.A. (2015). Identification of viable helicobacter pylori in drinking water supplies by cultural and molecular techniques. *Helicobacter*, 20 (4): 252-259.
- Sambrook, J. a. (2001). *"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samie, A. (2007). Prevalence of Campylobacter species, Helicobacter pylori and Arcobacter species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *Journal of Infection ELsilver*, 2.
- SCREEN. (29 de Noviembre de 2017). *Test rapido Antigene* . Obtenido de <http://www.screenitalia.it/wp-content/uploads/2017/11/Istruzioni-Screen-H.PyloriSITA-1.pdf>
- Secretaria de Salud. (2006). *GUIA PARA LA APLICACION DE PRUEBAS RAPIDAS*. MEXICO: Printed and Made in Mexico.
- Sociedad de Lucha contra el Cancer. (2017). *Mortalidad por cancer segun provincia canton o residencia del ecuador*. Obtenido de FUENTE DE INFORMACIÓN ANUARIO: <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/reportes/Mapas2-1.jsp>
- Suenaga, E y Nakamura, H. (2005). Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *Journal of Chromatography B*, 820: 137-141.
- Smolka, A.J, Backert, S.J. (2012). How *Helicobacter pylori* infection controls gastric acid secretion. *Gastroenterol.* 2012; 47(6): 609-618.
- Scott, B. (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires - Argentina: Panamericana.
- Tipos de Investigacion. (sabado 26 de Noviembre de 2016). Obtenido de <http://www.tiposdeinvestigacion.com/>

Travis, K. J. (2010). The association of drinking water quality and sewage disposal with *Helicobacter pylori* incidence in infants: the potential role of water-borne transmission. *Journal of Water and Health*, 2,3.

UNESCO. (miercoles 7 de Diciembre de 2016). *Nomenclatura internacional de para los campos de Ciencia y Tecnología*.
Obtenido de
<https://www.ub.edu/portal/documents/34829/459928/codigos+unesco.pdf/c5a61d3b-f072-4d98-b85c-a58ac6072bfb>

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. (2004). Banco Nacional de ADN Carlos III. *bancoadn*, 1.

Vandenberg, O. (2006). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-jejuni/coli campylobacters and arcobacters from Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* .

ANEXOS

ANEXO 1: Abreviaturas Empleadas

BAS	<i>Brucella</i> Agar Sangre
BAB	Blood Agar Base
BA	<i>Brucella</i> Agar
APT	Agua Peptona Tamponada
BA	Bacto Agar
DNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
H.P	<i>Helicobacter Pylori</i>
HANM	Hospital Alfredo Noboa Montenegro
LCMA	Laboratorio María Auxiliadora
LAB CLIN	Laboratorio Clínico
OMS	Organización Mundial de la Salud
MSP	Ministerio de Salud Publica
Pb	Pares de bases
Cod.	Código
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
TAE	Tris-acético-EDTA

ANEXO 2: MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Composición de los medios de cultivo referida a un litro de agua destilada

Medios generales líquidos

Composición de los medios de cultivo referidos en un litro de agua destilada

Medios generales líquidos

AGUA PEPTONA TAMPONADA / BUFFERED PEPTONA WATER

COD. 7418A (NEOGEN, EE-UU).

Formula per liter

Peptone.....	10 g
Sodium Chloride	5 g
Disodium phosphate.....	3,5 g
Monopotassium phosphate.....	1,5 g

Final pH: 7,2 ± 0,2 at 25°C

Medios generales Solidos

- ***BBL BRUCELIA AGAR (BD/FRANCIA - REF. 211086)***

Approximate Formula* Per Liter

Pancreatic Digest of Casein.....	10,0 g
Peptic Digest of Animal Tissue.....	10,0 g
Dextrose.....	1,0 g
Yeast Extract.....	2,0 g
Sodium Chloride.....	5,0 g
Sodium Bisulfite.....	0,1 g
Agar.....	15,0 g

Final pH: 7,0 ± 0,2

BLOOD AGAR BASE

REF. M075-1006 (IMEDIA, INDIA)

Meat infusion#.....	10,00g/L
Tryptose.....	10,00g.
Sodium chloride.....	5,00g
Agar.....	15,00g
pH (at 25°C – 7,3 ± 0,2)	

BACTO AGAR

REF.214010 (BD, Francia)

Solidifying Agent in Which Extraneous Matter

Pigmented portions and Salts have been reduced to a minimum.

ANEXO 3: Reactivos para PCR y soluciones.

Reactivos para PCR y soluciones.

Extracción de ADN

Resina Chelex

	1% cross-linked polystyrene cross- linked polyesterene beads.
Matrix	
Matrix active group	iminodiacetic acid (sodium form) paired iminodiacetate groups.
Matrix attachment	through methyl group to aromatic rings
Particle size	50-100 mesh (dry)
pH range	4 - 14
Capacity	≥0.3 meq/mL binding capacity
Ph	0.6 meq/g binding capacity (heavy metal ions)

Isopropanol (marca Roche/ Alemania)

InChI Key	YBYRMVIVWMBXKQ-UHFFFAOYSA-N
assay	98% (TLC)
mol wt	mol wt 174.2
mfr. no.	Roche
pKa	7.0
Solubility	: >10 mg/mL (Soluble to >10 mg/ml in isopropanol, ethanol, methanol, or 1,2-propanediol. Unstable in aqueous solution. In 100% isopropanol, stable for at least 9 months at +25°C.)
Shipped in	Ambient.

Alcohol

Nombre químico del producto: ALCOHOL ETILICO ABSOLUTO

Sinónimos: Alcohol etílico, etanol

Fórmula molecular: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

Peso molecular: 46.07

Familia química: ALCOHOLES

Uso del producto: Reactivo de laboratorio

Tampón TAE 50X (INVITROGEN, 24710-030, EE-UU)

Tris-HCl.....0,02 M

EDTA.....0,02 M

Ácido acético lacial.....0,02 M

Reacción de amplificación

dNTPs (PCR nucleotide mix, promega, v151b, promega, EE-UU)..... 10 mM

Taq DNA Polimerasa "5u/ µl (Invitrogen, 11615-010, EE-UU)..... 500 U

Tampón de reacción 10X (INVITROGEN, Y02028V, EE-UU).....

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 160 mM

Tris-HCl (pH = 8,8)670 mM

Teewn-200,1%

MgCl_2 (INVITROGEN, Y02016V, Brasil)..... 50 mM

TAMPÓN DE CARGA (blue/Orange 6X Loading DYE,PROMEGA, G190A, EE-UU).

Containing0,4%

Orange G.....0,003%

Bromophenol blue0,03%

Xylene cyanol FF,.....15%

Ficoll 400,10mM

EDTA 50mM pH.....	8
Tris -HCl, pH.....	15

MARCADOR DE PESOS MOLECULARES

Gene ruler 100 base pair DNA lader ready –to use (Thermo Fisher Scientific SM0323): de 100 a 3000 –pb
 50 pb *DNA LEADER*, Thermo Fisher Scientific “INVITROGEN”, 10488-043, EE-UU), 100 appls (01 µg/µ) L.

INICIADORES.

VaC FORWARE

Ref. #55453109-19 (BIOSEARCH, EE-UU)

VaC REVERS.

Ref.#55453109-20 (BIOSEARCH, EE-UU)

Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Agarosa Grado Molecular (FISHER SCIENTIFIC, BP 160-100 “100g”, EE-UU)

Pesar la agarosa y transferir a un matraz. Añadir el tampón TAE 1X, calentar hasta que rompa a hervir, agitar y a temperar hasta 45° C. A de tampón TAE 1X y verter en el molde.

ANEXO 4: Iniciadores utilizados para la amplificación

Iniciadores (BIOMOL®, EE-UU)

INICIADOR	SECUENCIA	LONGIT UD (pb)	DIANA	AMPLICON	REFERENCIA
VacAR	5'-CGCTCGCTTGATTGGACAGA-3'	20	<i>VacA</i>	394-pb	Nilson <i>et al.</i> (2002) mod:
VaCAF	5'-GGCACACTGGATTTGTGGCA-3'	20	<i>VacA</i>	394-pb	Santiago et al. (2015)

ANEXO 5: Reporte de Muestra analizadas

Reporte de resultados del rastreo antigénico de las muestras de heces de los pacientes.

Resultados del rastreo antigénico de <i>H. pylori</i> en (heces)					
N°	Nombres y Apellidos	Edad	Fecha	Laboratorio	Rastreo de Ag de H-pylori.
1	MS	30	06/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
2	NG	32	06/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
3	CG	48	06/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
4	AR	40	06/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
5	MO	40	07/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
6	MP	46	07/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
7	SV	17	07/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
8	JCH	19	08/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
9	MB	19	08/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
10	JT	19	08/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
11	RM	21	08/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
12	JG	19	09/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
13	VA	33	10/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
14	JGA	32	10/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
15	AP	5	14/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
16	MM	39	14/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
17	FA	56	14/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
18	EA	20	15/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
19	OR	26	15/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
20	JS	19	15/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
21	SG	19	18/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
22	MA	43	18/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
23	VG	28	18/03/2017	Lab. Clin. MA	Negativo
24	TA	29	21/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
25	VG	54	22/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
26	NV	54	23/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
27	TP	56	24/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
28	EF	56	27/03/2017	Lab. CLIN. MA	Negativo
29	TR	63	27/03/2017	Lab. Clin. MA	Positivo
30	NR	36	27/03/2017	Lab. Clin. HANM	Negativo
31	IS	4	27/03/2017	Lab. Clin. HANM	Negativo
32	LS	23	27/03/2017	Lab. Clin. HANM	Positivo
33	LV	6	27/03/2017	Lab. Clin. HANM	Positivo

34	GA	12	28/03/2017	Lab. Clin. HANM	Positivo
35	RS	28	28/03/2017	Lab. Clin. HANM	Positivo
36	AP	24	28/03/2017	Lab. Clin. HANM	Negativo
37	SC	24	28/03/2017	Lab. Clin. HANM	Positivo
38	MF	20	28/03/2017	Lab. Clin. HANM	Positivo
39	MG	20	29/03/2017	Lab. Clin. HANM	Positivo
40	MCH	34	29/03/2017	Lab. Clin. HANM	Negativo
41	SR	33	29/03/2017	Lab. Clin. HANM	Positivo
42	ZCH	31	29/03/2017	Lab. Clin. HANM	Positivo
43	AR	18	29/03/2017	Lab. Clin. HANM	Negativo
44	ECH	21	29/03/2017	Lab. Clin. HANM	Negativo
45	AB	18	29/03/2017	Lab. Clin. HANM	Negativo
46	MS	19	29/03/2017	Lab. Clin. HANM	Negativo
47	CG	28	30/032017	Lab. Clin. HANM	Negativo
48	FC	17	30/032017	Lab. Clin. HANM	Negativo
49	GG	16	30/032017	Lab. Clin. HANM	Negativo
50	MC	20	30/032017	Lab. Clin. HANM	Negativo

Nota: Las muestras analizadas son 50 de las cuales 25 resultaron positivas tras el rastreo del antígeno de *Helicobacter pylori*.

ANEXO 6: Número de aislados y posterior PCR.

Resultados de los aislados tras la recuperación y posterior PCR luego aplicar el método Chelex.

MUESTRA	CODIGO	Aislado recuperado tras re-cultivo	PCR
1	Hp1	Hp1C2,	-
		Hp1C3	-
3	Hp. 3	Hp3C1	+
4	Hp.4	Hp4C1,	-
		Hp4c2	-
5	Hp. 5	Hp5C1	+
6	Hp.6	Hp6c1	+
9	Hp. 9	Hp9C2,	-
		Hp9C3	-
10	Hp. 10	Hp10C1,	+
		Hp10C2	+
14	Hp. 14	Hp14C2	+
16	Hp. 16	Hp16C1	-
17	Hp. 17	Hp17C1,	+
		Hp17C2,	+
		Hp17C4	+
19	Hp. 19	Hp19C2,	-
		Hp19C4	-
23	Hp. 23	Hp23C1,	+
		Hp23C2	+
26	Hp. 26	Hp23C3	+
27	Hp. 27	Hp27C1,	+
		Hp27C2,	-
		Hp27C3,	+
		Hp27C4	+
28	Hp. 28	Hp28C1,	+

		Hp28C2	+
31	Hp. 31	Hp31C2	-
33	Hp. 33	Hp33C3	-
		Hp34C1,	+
34	Hp. 34	Hp34C2	-
39	Hp. 39	Hp39C2	-
	19	32	11
Total	muestras	aislados	muestras (+)

ANEXO 7: Absorbancias Método de Chelex

Absorbancias en ADN obtenidas tras la aplicación del método Chelex.

Tratamientos	Hp5	Hp10	Hp17	Hp27	Hp34	ABS
A1B1	0,950	0,895	0,920	0,921	0,950	0,927
A1B1	0,900	1,000	1,005	0,952	0,955	0,962
A1B1	0,890	0,990	0,980	0,950	1,001	0,962
A1B2	1,030	1,250	1,320	1,280	1,067	1,189
A1B2	1,200	1,250	1,090	1,190	1,230	1,192
A1B2	1,130	1,050	1,090	1,260	1,320	1,170
A1B3	1,626	1,666	1,589	1,650	1,658	1,638
A1B3	1,630	1,598	1,710	1,690	1,650	1,656
A1B3	1,590	1,623	1,680	1,678	1,620	1,638
A2B1	1,560	1,612	1,680	1,600	1,650	1,620
A2B1	1,540	1,600	1,680	1,650	1,630	1,620
A2B1	1,560	1,637	1,720	1,630	1,590	1,627
A2B2	1,980	1,978	1,890	1,820	1,759	1,885
A2B2	1,820	1,980	1,870	1,900	1,799	1,874
A2B2	1,790	1,989	1,900	1,899	1,829	1,881
A2B3	1,620	1,682	1,650	1,600	1,720	1,654
A2B3	1,589	1,710	1,698	1,620	1,698	1,663
A2B3	1,580	1,697	1,678	1,610	1,713	1,656

Nota: El tratamiento 5 presento una absorbancia óptima que determina un parámetro de calidad en la extracción del ADN con el método Chelex.

ANEXO 8: Caracterización de la población estudiada.

Esquema Epidemiológico según la Sexo/Edad/Etnia/Sintomas.													
Sexo	Edad					Etnia				Síntomas			
Escala	05 a 10	11 a 20	21 a 30	31 a 40	>a 41	total	%	Mestizo	Indígena	Afrodes.	Otro.	Total	%
Hombres	0	7	2	4	3	16	32	14	1	1	0	16	32
Mujeres	3	9	9	7	6	34	68	30	3	1	0	34	68
Total	3	16	11	11	9	50	100	44	4	2	0	50	100

ANEXO 9: Ficha de Recolección de datos.

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL / MAESTRIA DE BIOTECNOLOGIA

FICHA DE REOLECCION DE DATOS CLINICOS

Nombres y Apellidos

Edad

Fecha

Provincia

Sexo

M () F ()

Ciudad

Etnia

Mestizo ()

Indígena ()

Afros.()

Otros ()

SERVICIOS BASICO

(En el siguiente téis responderá si cuenta o no con alguno de estos servicios)

TIPO DE SERVICIO

AGUA

POTABLE () ENTUBADA ()

POZO ()

OTRO ()

CUENTA CON ALCANTARILLADO

SI ()

NO ()

ALIMENTACION

(En el siguiente téis responderá si realiza una de las siguientes actividades Alimentarias)

TIPO DE ALIMENTACION

COMIDA DE CASA

SIEMPRE () CASI NUNCA () NUNCA ()

COMIDA DE CALLE

SIEMPRE () CASI NUNCA () NUNCA ()

ACOSTUMBRA A DESAYUNAR

SIEMPRE () CASI NUNCA () NUNCA ()

DATOS DE IMPORTANCIA CLINICA

(En el siguiente téis responderá si a presentado o no algún signo o síntoma relacionado con la Gastritis)

TIPO

DOLOR ABDOMINAL

LEVE () MODERADO () SEVERO() NUNCA()

ARDOR DE ESTOMAGO

LEVE () MODERADO () SEVERO() NUNCA()

HINCHAZON

GENERALIZADA () LOCALIZADA () NUNCA()

SENSACION DE VOMITO

NUNCA () RARA VES () SIEMPRE ()

SACIEDAD DE HAMBRE

NUNCA() RARA VES () SIEMPRE ()

TRASTORNOS EN LA DEPOSICION

NUNCA () RARA VES () SIEMPRE ()

OTROS DATOS (PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS)

(En el siguiente téis responderá si se realizó o no algunas de las de estas pruebas de laboratorio)

TIPO DE PRUEBAS

ANTIGENOS DE HELICOBACTER PYLORI EN SANGRE

SI ()

NO ()

ANTIGENOS DE HELICOBACTER PYLORI EN HECES

SI ()

NO ()

ENDOSCOPIA

SI ()

NO ()

CA 19.9

SI ()

NO ()

TIPOS DE PATOLOGIAS

(En el siguiente téis responderá si presenta o no alguna enfermedad delas mencionadas)

PATOLOGIAS

ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

SI ()

NO ()

GASTRITIS

SI ()

NO ()

CANCER (CA DE ESTOMAGO)

SI ()

NO ()

OTRAS ENFERMEDADES DIGESTIVAS.

SI ()

NO ()

Lcdo. Jhoan Guamán

RESPONSABLE DEL LABORATORIO.

.....

PACIENTE.

ANEXO 10: Fotografías de la parte experimental



Foto: Rastreo Antigénico de *Helicobacter Pylori*.

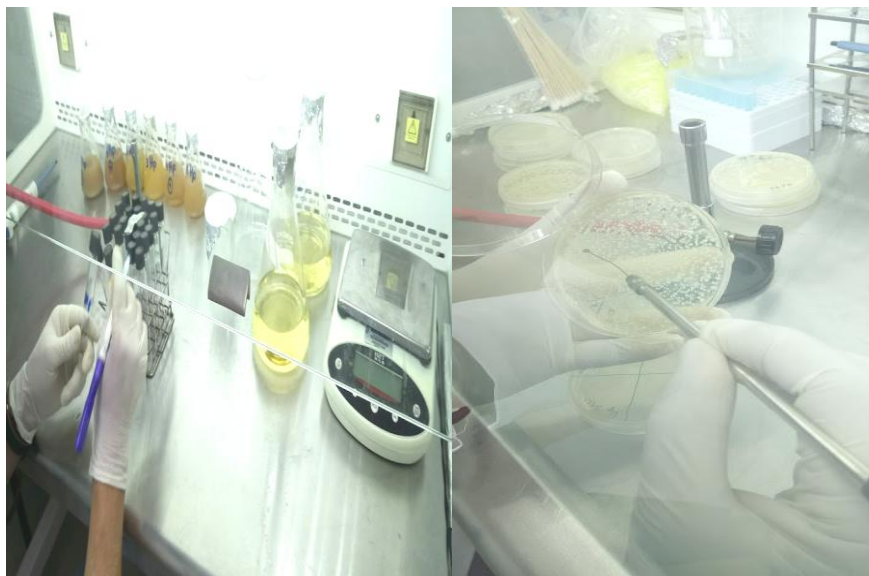


Foto: Cultivo APT y aislamiento de *Helicobacter Pylori* en *Brucella*.

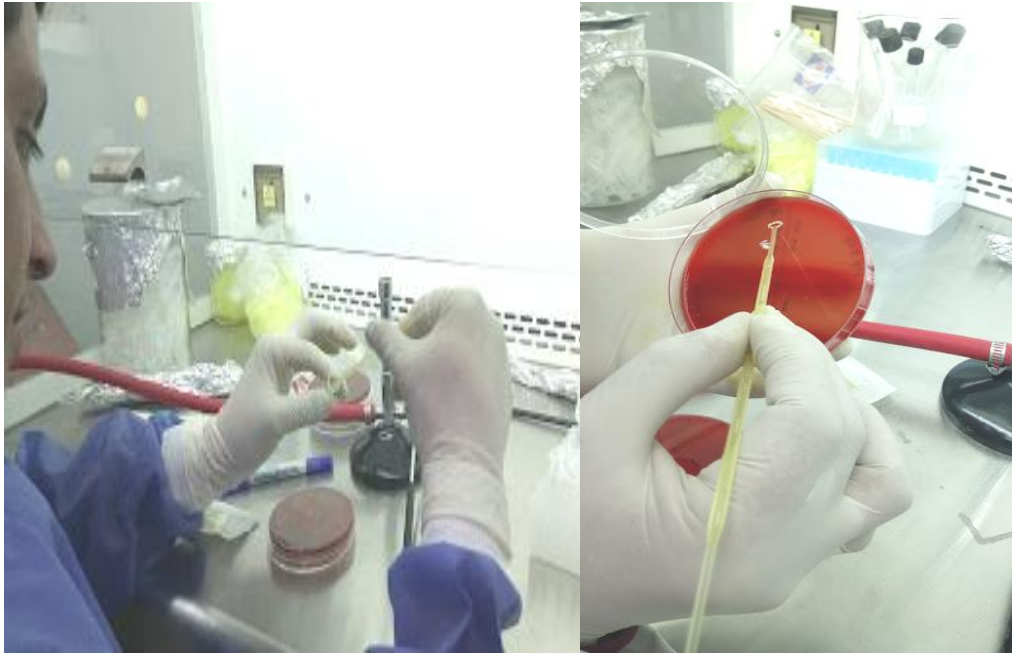


Foto: Cultivo y aislamiento en BAS.



Foto: Electroforesis para detectar ADN *Helicobacter Pylori*.