



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Medicina-Programa de Magister en Salud Sexual y Reproductiva

**“DETERMINACIÓN DE LA TRANSMISIÓN DE  
*HELICOBACTER PYLORI* A TRAVÉS DE ESPECIES  
DE LEVADURAS DE ORIGEN VAGINAL DE MUJERES  
EMBARAZADAS DE TÉRMINO A SUS RECIÉN  
NACIDOS”**

Tesis para optar al grado de Magíster en Salud Sexual y Reproductiva

LILLIAN NATALIA MATAMALA VALDÉS  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2016

Profesora guía: Apolinaria García Cancino  
Departamento de Obstetricia y Puericultura, Facultad de Medicina  
Universidad de Concepción



***Dedicado a:***

*Dios, por permitirme en esta vida.....crecer como profesional*

## **Agradecimientos:**

- *A Dios por ser generoso conmigo y brindarme esta gran oportunidad de capacitarme como profesional.*
- *A mis padres Sara y Diógenes, por el gran apoyo, como siempre.*
  - *A mi esposo David, por su comprensión, apoyo y dedicación.*
- *A mis pequeños hijos Maite y José Ignacio por entender muchas veces mi lejanía.*
  - *A mi querida hermana Fabiola, por ser una referente para mí.*
- *A mis queridas amigas Marcela y Michelle, por ser mis apoyos en los momentos difíciles.*
- *A mis colegas del Departamento de Obstetricia y Puericultura que me ayudaron cada vez que lo necesité.*
- *A mis colegas de los CESFAM “Víctor Manuel Fernández”, “O’Higgins” y “Tucapel”, por brindar su valiosa cooperación en la toma de las muestras.*
- *A mi amigo Cristian Parra por su valiosa ayuda en el procesamiento de las muestras.*
  - *A mi docente guía, la señora Apolinaria García Cancino, por su constante apoyo y confianza.*
    - *A la docente Katia Sáez, por su tiempo y dedicación.*
- *A todos los estudiantes de la carrera de Obstetricia y Puericultura que me apoyaron.*
  - *A todas las embarazadas y sus hijos quienes participaron en esta investigación*

## TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS .....	vii
INDICE DE FIGURAS .....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT .....	x
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL .....	6
Historia del género <i>Helicobacter</i> .....	6
Patogenia .....	9
Factores de virulencia más importantes de <i>H. pylori</i> .....	11
A continuación se mencionan los factores de virulencia más importantes de esta bacteria: .....	11
Vías de transmisión .....	16
3.- HIPÓTESIS .....	22
4.- OBJETIVOS .....	23
5.- MATERIAL Y MÉTODO .....	24
Diseño metodológico .....	24
Clasificación: .....	24
Tipo de estudio: .....	24
Población: .....	24
Criterio de inclusión: .....	24
Criterio de exclusión: .....	25
Muestra: .....	25
Método .....	27
Análisis Estadístico: .....	27
Toma de muestra: .....	27
CHROMagar <i>Candida</i> .....	30
Prueba del Tubo Germinal.....	30

Identificación por Sistema API® <i>Candida</i> .....	31
Desarrollo del objetivo 2: Detectar <i>H. pylori</i> intracelular provenientes de levaduras de origen bucal de recién nacidos de término.....	31
Detección por microscopía óptica: .....	31
Detección por inmunofluorescencia: .....	32
Desarrollo del objetivo 3: Genotipificar <i>H. pylori intracelular</i> proveniente de levaduras de origen bucal de recién nacidos de término. ....	33
Extracción de ADN.....	33
Cuantificación de ADN .....	35
Amplificación de genes .....	35
Electroforesis en Gel de Agarosa .....	37
Objetivo 4: Detectar antígenos de <i>H. pylori</i> en meconio de recién nacidos de término. ....	37
Objetivo 5: Genotipificar <i>H. pylori</i> intracelular proveniente de levaduras de origen vaginal de las madres de los recién nacidos infectados con la bacteria.....	38
6.- RESULTADOS.....	40
Identificación de levaduras de cultivos orales provenientes de recién nacidos de término. ....	40
Patrones de lectura de las especies de levaduras de origen bucal provenientes de los recién nacidos de término.....	41
Identificación de inclusiones de levaduras de origen bucal de recién nacidos de término. ....	43
Identificación de <i>H. pylori intracelulares</i> en levaduras de origen bucal de recién nacidos de término mediante Inmunofluorescencia. ....	44
Detección molecular de <i>H. pylori</i> .....	46
Amplificación del ARNr 16S.....	46
Amplificación del gen <i>cagA</i> .....	47
Amplificación del gen <i>dupA</i> .....	48
Amplificación del gen <i>vacAs1a</i> .....	49
Amplificación del gen <i>vacAs1b</i> .....	50
Amplificación del gen <i>vacAs2</i> .....	51
Amplificación del gen <i>vacAm1</i> .....	52
Amplificación del gen <i>vacAm2</i> .....	53

Kit Premier Platinum HpSA® Plus (Meridian Bioscience Europe, Italia).....	55
7.- DISCUSION.....	59
8.- CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	63
9. - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	64
10.- ANEXOS.....	80
Anexo I: “Aprobación del estudio por el Comité de Ética del Servicio de Salud Concepción .....	80
Anexo II: Consentimiento Informado.....	82
Anexo III: Recomendaciones del fabricante para sistema API <i>Candida</i> .....	87
Anexo IV: Lectura de Sistema API. ....	90
Anexo V: Lista de perfiles numéricos para la identificación de especies de <i>Candida</i> . .....	91
Anexo VI: Procedimiento de detección de antígeno de <i>H. pylori</i> en meconio de recién nacidos de término.....	92



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Partidores utilizados en la detección y genotipificación de <i>H. pylori</i> intracelular en levaduras .....	36
<b>Tabla 2:</b> Tabla de genes positivos en el genoma de cepas de referencia de <i>H. pylori</i> .....	39
<b>Tabla 3:</b> Identificación de especies de levaduras aisladas de cultivos orales de recién nacidos de término .....	42
<b>Tabla 4:</b> Detección de <i>H. pylori</i> intracelular en levaduras de origen bucal de recién nacidos de término .....	45
<b>Tabla 5:</b> Genotipificación de la cepa de <i>H. pylori</i> en base a los genes de virulencia <i>cagA</i> , <i>dupA</i> y <i>vacA</i> , mediante el método de PCR.....	54
<b>Tabla 6:</b> Identificación de recién nacidos infectados con <i>H. pylori</i> intracelular en levaduras y en meconio a través de antígenos en estas heces.....	56
<b>Tabla 7:</b> Relación entre especies de levaduras encontradas en los cultivos orales de los recién nacidos y tipo de parto.....	57
<b>Tabla 8:</b> Genotipificación de cepas de <i>H. pylori</i> en base a los genes de virulencia <i>cagA</i> , <i>dupA</i> y <i>vacA</i> , mediante el método de PCR, de la madre y del recién nacido positivo para <i>H. pylori</i> .....	58

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Muestra la forma en espiral y los flagelos monopolares del género <i>Helicobacter</i> (Imagen tomada de Lee A, Phillips et al.) .....	7
<b>Figura 2:</b> Cultivo primario de levaduras de origen bucal. ....	29
<b>Figura 3:</b> Tinción de Gram de levaduras aisladas de muestras de hisopado oral de recién nacidos. ....	30
<b>Figura 4:</b> Identificación de levaduras de cultivos orales provenientes de recién nacidos de término. ....	40
<b>Figura 5:</b> Patrones de lectura de las especies de levaduras de origen bucal provenientes de neonatos de término, a partir del sistema de identificación API <i>Candida</i> . ....	41
<b>Figura 6:</b> Examen en fresco de las muestras de los cultivos obtenidos a partir de muestra bucal de recién nacidos de término. ....	43
<b>Figura 7:</b> Ensayo de inmunofluorescencia .....	44
<b>Figura 8:</b> Amplificación del ARNr 16S. ....	46
<b>Figura 9:</b> Amplificación del gen <i>cagA</i> . ....	47
<b>Figura 10:</b> Amplificación del gen <i>dupA</i> . ....	48
<b>Figura 11:</b> Amplificación del gen <i>vacAs1a</i> .....	49
<b>Figura 12:</b> Amplificación del gen <i>vacAs1b</i> .....	50
<b>Figura 13:</b> Amplificación del gen <i>vacAs2</i> .....	51
<b>Figura 14:</b> Amplificación del gen <i>vacAm1</i> .....	52
<b>Figura 15:</b> Amplificación del gen <i>vacAm2</i> .....	54
<b>Figura 16:</b> Kit HpSA <sup>®</sup> Plus (Meridian Bioscience Europe, Italia) .....	54



## RESUMEN

**Antecedentes:** Existe evidencia que propone la transmisión vertical de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*); sin embargo, faltan investigaciones que confirmen dicha transmisión; por lo que este estudio propone determinar si existe transmisión vertical de esta bacteria.

**Objetivo:** Determinar la transmisión vertical de *H. pylori* por medio de levaduras de origen vaginal de embarazadas a sus recién nacidos (RN).

**Metodología:** Estudio transversal, descriptivo. Las muestras se obtuvieron de neonatos (hisopado oral y meconio) y flujo vaginal de sus madres. La identificación de especies de levaduras se realizó utilizando las siguientes técnicas, CHROMagar *Candida*, Prueba del Tubo Germinal y sistema de identificación API *Candida*, luego las levaduras se observaron por microscopía óptica y de fluorescencia. Se realizó detección de antígeno de *H. pylori* en meconio y PCR para amplificación de genes específicos de esta bacteria.

**Resultados:** Se detectó *H. pylori* intracelularmente en *Candida glabrata* (*C. glabrata*) aislada de hisopado oral de un RN, dicha bacteria en base a los genes estudiados, resultó ser genotípicamente idéntica a la encontrada intracelularmente en la misma especie de levadura aislada de flujo vaginal de la madre de este neonato.

**Conclusión:** Los resultados sugieren que hubo transmisión vertical de *H. pylori*; ya que la levadura encontrada tanto en la madre como en el RN eran de la misma especie, *C. glabrata*. Además, el perfil genotípico de ambas cepas de *H. pylori* encontradas intracelularmente en *C. glabrata* eran concordantes. Sin embargo, es necesario secuenciar el genoma completo de ambas cepas de *H. pylori* para confirmar dicha transmisión.

**Palabras claves:** *Helicobacter pylori*, transmisión vertical, *Candida glabrata*.

## ABSTRACT

**Background:** There is evidence that suggests the vertical transmission of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*); however, lacking research to confirm such transmission; so this study aims to determine whether there is vertical transmission of this bacterium.

**Objective:** Determine the vertical transmission of *H. pylori* through vaginal yeast origin of pregnant women to their newborns (RN).

**Methodology:** transversal, descriptive study. The samples were obtained from neonates (oral swabs and meconium) and vaginal discharge of their mothers. Identifying yeast species was performed using the following techniques, CHROMagar *Candida*, Test Tube and Germinal identification system API *Candida* and yeasts then observed by optical microscopy and fluorescence. Antigen was performed in meconium and PCR amplification of specific genes of *H. pylori*.

**Results:** *H. pylori* was detected intracellularly in *Candida glabrata* (*C. glabrata*) isolated from oral swab of an RN, the bacteria proved to be phenotypically identical to that found intracellularly in the same species of yeast isolated from vaginal discharge of the mother of this baby.

**Conclusion:** It is suspected that there were vertical transmission of *H. pylori*; *C. glabrata* as yeast found in both the mother and the newborn were phenotypically identical, besides the genotypic profile of both strains *H. pylori*, found intracellularly in *C. glabrata* were consistent; however, it is necessary to sequence the entire genome of *H. pylori* strains both to confirm the transmission.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, vertical transmission, *Candida glabrata*

## 1.- INTRODUCCIÓN

El concepto de transmisión vertical comprende todas aquellas infecciones que pueden ser transmitidas desde la madre al feto o al recién nacido (RN) durante los procesos inherentes a la maternidad; es decir, a la gestación, al trabajo de parto, al parto y a la lactancia materna, como es el caso del virus del VIH que puede ser adquirido por el RN durante la etapa de amamantamiento.

Con respecto a la etiología de las infecciones perinatales se han observado modificaciones a través de la historia, probablemente secundarias a los cambios en la ecología microbiana del canal del parto de las embarazadas. Es así que en las últimas dos décadas predominan como agentes etiológicos las bacterias Gram positivas sobre todo *Streptococcus beta-hemolítico del grupo B: Streptococcus agalactiae* (EGB), *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Dentro de los Gram negativos predominan *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Pseudomonas*, y dentro de las levaduras *Candida sp.*

En los últimos años parece observarse un tímido resurgimiento del neumococo, *Streptococcus pneumoniae*, y la aparición de microorganismos poco habituales en el espectro etiológico de la infección neonatal como *Haemophilus influenzae*. Por el contrario, ha desaparecido casi por completo una de las bacterias que con más frecuencia provocaba formas graves de infección neonatal en los años setenta, como es *Listeria monocytogenes*. Todos estos agentes mencionados, pueden ser transmitidos verticalmente al feto o al RN.

El verdadero reservorio de las bacterias que colonizan el canal genital de la mujer es el recto, a partir del cual alcanzan las mucosas del tracto genital de ésta. Desde el canal del parto de la gestante el feto puede infectarse con virus, como citomegalovirus, VIH, virus de la hepatitis B, papovavirus, virus del herpes simple, y sobre todo puede infectarse por bacterias como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* *Enterococcus faecalis* y hongos, como se mencionó anteriormente, del género *Candida*.

Algunos investigadores consideran la transmisión vertical, como una forma de adquisición de la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) por parte de los RN desde sus madres; esto sería al pasar el feto a través del canal del parto.

Hasta ahora no se ha informado de que la bacteria se haya aislado directamente de la mucosa vaginal, pero se propone una relación simbiótica entre especies de levaduras del género *Candida* y la bacteria *H. pylori*.

Existen varios estudios en los que se demuestran que las bacterias, en general, pueden sobrevivir en vacuolas de organismos eucariotas, como las amebas de vida libre, tal es el caso de *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Legionella pneumophila*. Esta última, se ha observado que puede sobrevivir dentro de vacuolas de *Acanthamoeba castellanii*, mediante la inhibición de la fusión del fago-lisosoma; observándose el mismo fenómeno en *Pseudomonas aeruginosa*, que crecían intracelularmente en amebas de diferentes géneros aisladas de tuberías de un hospital. Este hecho llamó la atención de un grupo de investigadores, *Siavoshi et al.*, en el año 2013, los cuales se preguntaron ¿Qué eucariota podría estar sirviendo a *H. pylori* de vehículo y protección al medio ambiente?; fue entonces donde hicieron la relación entre dicha bacteria con levaduras orales; ya que como se sabe, este último microorganismo se encuentra como comensal en la

superficie de la mucosa de la cavidad oral, intestinal y vaginal del ser humano. Fue entonces que *Siavoshi et al.*, aislaron levaduras de la cavidad oral de pacientes dispépticos, donde pudieron amplificar mediante PCR genes específicos de *H. pylori* (ARNr 16S, *cagA*, *vacA* y *ureAB*) y observaron por microscopía óptica células de *H. pylori* intracelulares dentro de las vacuolas de las levaduras pertenecientes al género *Candida*, llegando a la conclusión de que posiblemente *H. pylori* usaba a *Candida* como protección en condiciones de estrés.

*Candida albicans* es la especie de levadura que habitualmente coloniza a adultos y niños sanos, así como pacientes hospitalizados, siendo en primer lugar la superficie de la mucosa oral y luego la superficie de la mucosa vulvovaginal los sitios anatómicos colonizados por dicha levadura.

Haciendo mención a la colonización de *Candida* en la vagina, aproximadamente el 40% de las mujeres es portadora asintomática de *Candida* sp., el crecimiento de este microorganismo se mantiene controlado por la respuesta inmune y por la presencia de otros microorganismos como *Lactobacillus* sp., cuando el equilibrio de la microbiota vaginal se pierde y hay una sobrepoblación de *Candida* se produce una vulvovaginitis candidiásica (VVC).

La VVC es un proceso muy común en las mujeres adultas, con un pico máximo de incidencia entre los 20 y 40 años. Se calcula que a los 25 años, el 50% de las mujeres habrá tenido al menos un episodio de VVC y que entre las mujeres premenopáusicas, el 75% habrá sufrido al menos, un episodio de VVC y el 45% dos episodios o más. En la mayoría de casos de VVC, la responsable es la especie *Candida albicans*, un microorganismo comensal que puede aislarse en la cavidad vaginal. También puede estar causada por

otras especies de *Candida no-albicans* pero estos hongos son menos habituales.

Durante el embarazo la vagina es más susceptible a cualquier infección. Las tasas de colonización de la gestante por *Candida* sp., descritas en las publicaciones son siempre superiores a las de la mujer no embarazada. Según una revisión publicada recientemente de Cararach Tur y cols., en el 2013, hasta un 28% de gestantes puede mostrar *Candida* sp. en el flujo vaginal. Como mecanismos patogénicos se han descrito el incremento del nivel estrogénico que da lugar a un aumento de contenido en glucógeno en el medio vaginal, una mayor adhesividad de las células epiteliales vaginales y una potenciación de la formación de micelios por la presencia de receptores específicos para estrógenos en el citosol de las levaduras. De esta manera, la reducción de la inmunidad local facilita la colonización de la vagina y la posterior infección.

La colonización de los RN por la especie *Candida albicans* ocurre tempranamente y ésta se da por la adquisición de las levaduras por transmisión vertical; es decir, al pasar el feto por el canal del parto y adquirir las levaduras por ingestión oral.

Con los antecedentes antes mencionados, Siavoshi *et al.* en el año 2013, se cuestionaron si las levaduras de origen vaginal provenientes de mujeres embarazadas también podrían contener *H. pylori*; para responder su pregunta, analizaron 108 muestras vaginales de mujeres embarazadas, de las cuales en 30 de ellas (27.8%) aislaron *Candida* sp., pudiendo detectar *H. pylori* en 18/30 (60%) de ellas, además detectaron genes de *H. pylori* en 5/7 levaduras aisladas de la cavidad oral de recién nacidos de las madres en el estudio, en donde hubo concordancia entre el genotipo de la especie de *H. pylori* que se encontraba intracelularmente en *Candida* sp. y *H. pylori*

encontrado intracelularmente en los cultivos orales de *Candida* sp. de los recién nacidos. Con estos resultados llegaron a la conclusión que otra vía de transmisión de la infección por *H. pylori* a temprana edad podría ser por la adquisición de dicha bacteria intracelular en *Candida* sp. a través del canal del parto, es decir por transmisión vertical.



## 2.- MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

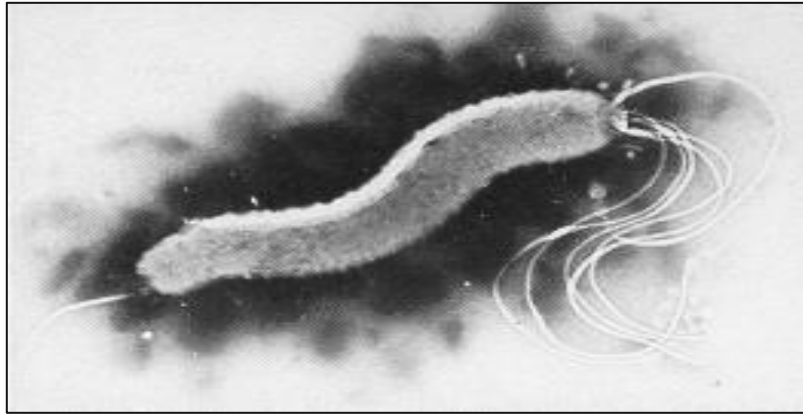
### **Historia del género *Helicobacter*:**

*H. pylori* es una bacteria Gram-negativa con forma espiralada, que mide de 2.5 - 5.5 micras de largo y de 0.5 - 1.0 micra de ancho, posee de cuatro a ocho flagelos monopolares recubiertos por una estructura lipídica que aparentemente protege a estos flagelos de la degradación por el medio ácido del estómago. La presencia de los flagelos es esencial para la movilidad y adhesión de esta bacteria al epitelio gástrico.

Las bacterias del género *Helicobacter*, son de crecimiento lento, cuyo período de incubación es de 4 a 8 días a 37°C en una atmosfera microaerofílica.

Al realizar pruebas enzimáticas a estas bacterias pueden ser clasificadas como catalasa, oxidasa y ureasa positiva, enzimas que favorecen su colonización. <sup>(1-4)</sup>





**Figura 1:** Muestra la forma en espiral y los flagelos monopolares del género *Helicobacter*. Imagen tomada de Lee A, Phillips et al. <sup>(1)</sup>

Las primeras observaciones de *H. pylori* se remontan a inicios del siglo XX, donde un grupo de investigadores alemanes lograron observar bacterias en forma de espiral colonizando la mucosa del estómago de perros y gatos. <sup>(5)</sup>

En 1906, Krienitz en sus investigaciones encontró microorganismos espirales en biopsias humanas provenientes de pacientes que padecían cáncer gástrico. Este hallazgo no causó impacto en ese momento, ya que al igual que el anterior no fue posible realizar cultivos de la bacteria y fue hasta 1940 cuando Freedberg y Berron consiguen relacionar estos microorganismos con úlceras gástricas, habiendo observado este tipo de bacterias espiraladas en un porcentaje de muestras provenientes de pacientes con patologías gástricas. <sup>(6)</sup>

Como no se había podido aislar *H. pylori*, este tema era solamente una hipótesis, la cual fue anulada en 1954, donde se realizó un estudio con alrededor de 1.100 biopsias gástricas, donde en ninguna de ellas se observó la presencia de bacterias en espiral, llegando a la conclusión errada que el

estómago era un órgano estéril y que las bacterias observadas en los estudios anteriores no eran más que contaminación.<sup>(7)</sup>

Fue en el período comprendido entre 1979-1984 donde las observaciones de Warren y Marshall (1983), permitieron a ellos y a otros investigadores encajar todas las pistas encontradas en los estudios anteriores. Es así como en 1981 se inicia un estudio en pacientes sometidos a endoscopia oral, donde se demostró la presencia de bacterias Gram negativas al realizar la tinción de Gram, pero no tuvieron éxito en la realización de cultivo para el aislamiento de estos microorganismos. La visualización de estas bacterias no era suficiente para asociarlas con enfermedades gástricas, ya que anteriormente se decía que su aparición era producto de contaminación.

Estos investigadores se enfocaron en tratar de cultivar las bacterias encontradas y así determinar su asociación con gastritis y/u otros síntomas clínicos, por tanto iniciaron un cultivo consecutivo en 100 biopsias de antro.<sup>(8)</sup>

El cultivo de las muestras lo realizaron siguiendo las condiciones descritas por Skirrow (1987) para el aislamiento de *Campylobacter* spp, con la diferencia de que los cultivos permanecieron cinco días en la incubadora en lugar de 48 horas y fue de esta manera que pudieron aislar la bacteria, en ese entonces denominada *Campylobacter pylori*.<sup>(9)</sup>

Estudios posteriores, de secuenciación de la región 16S del RNA ribosómico demostraron que la especie denominada *Campylobacter pylori* era distinta de las especies de *Campylobacter* descritas hasta el momento,<sup>(10)</sup> siendo en 1989 donde adoptó la nueva denominación de *Helicobacter*, pasando a denominarse *Helicobacter pylori*.<sup>(11)</sup>

## Patogenia

La infección por *H. pylori* se inicia cuando esta bacteria ingresa al organismo humano, se adhiere e inicia la colonización en el epitelio gástrico, este tejido responde a esta situación mediante exfoliación celular y cambios regenerativos, tratando de eliminar la infección, también se puede observar en este proceso la participación de la respuesta inmune celular y humoral; los productos bacterianos promueven la secreción de mediadores proinflamatorios y la secreción de IL-8, la cual es un potente quimioatrayente de neutrófilos. En este proceso un pequeño porcentaje de individuos logra neutralizar la infección pero otro gran número de la población permanece infectada por muchos años, lo que provoca daños y cambios en la morfología de las células del epitelio gástrico.<sup>(12-14)</sup>

Debido a lo anteriormente señalado, la infección por dicha bacteria se asocia a enfermedades gastroduodenales como las que se describen a continuación:

**Gastritis:** Esta manifestación clínica se desarrolla poco tiempo después de la infección, en algunos casos puede ser asintomática o verse acompañada por síntomas característicos de la gastritis aguda como dolor epigástrico, náuseas y vómitos. En la mayoría de los casos el sistema inmune no logra neutralizar la infección, lo que conlleva al desarrollo de una inflamación crónica, y esta manifestación clínica de una gastritis aguda se transforma a una gastritis crónica, evolucionando esta última hacia atrofia, afectando el antro y extendiéndose hasta el cuerpo del estómago.<sup>(13, 15, 16)</sup>

**Úlcera Péptica:** La asociación de la infección por *H. pylori* con esta patología está totalmente aceptada, observándose dicha bacteria en el 95% de los

pacientes con úlcera duodenal y en el 70% de los pacientes con úlcera gástrica. <sup>(15,17)</sup> En esta patología están sobre todo presentes las cepas de *H. pylori cagA* positivas, las cuales se conoce que son las más virulentas, ya que incrementan la exfoliación de la superficie del epitelio y promueven la degeneración epitelial.<sup>(18)</sup>

**Linfoma Gástrico tipo MALT:** Es un tipo de linfoma no Hodgking de células B, la asociación de esta patología con *H. pylori* se describió por primera vez en 1991, y en la actualidad, existen varios estudios que apoyan dicha teoría ya que han demostrado que, una vez erradicada la infección provocada por la bacteria, existe una regresión del linfoma de bajo grado en, por lo menos, el 77% de los pacientes con MALT gástrico. <sup>(19-21)</sup> Es por ese motivo que la eliminación de la infección por *H. pylori* se ha convertido en el tratamiento de elección para los pacientes con MALT gástrico de bajo grado.<sup>(22)</sup>

**Cáncer Gástrico:** Es el cuarto tipo de cáncer con mayor frecuencia mundial, y es la segunda causa de muerte por cáncer; se calcula que cada año se diagnostican 930.000 nuevos casos de esta patología, <sup>(23-25)</sup> se considera que la infección por *H. pylori* es un factor predisponente para el desarrollo de cáncer gástrico ya que como se mencionó anteriormente, causa cambio morfológico en el epitelio gástrico y una constante inflamación en el mismo, lo cual conlleva a una gastritis crónica, la cual en algunos casos, evoluciona a gastritis atrófica progresando a metaplasia intestinal y finalmente desarrollándose el adenocarcinoma.<sup>(14,15,26)</sup> Por lo antes expuesto, la Agencia de Investigación del Cáncer en 1994, clasificó a este microorganismo como carcinógeno grupo I para el ser humano. <sup>(27)</sup>

Recientes estudios han asociado a *H. pylori* con patologías extragástricas como la anemia ferropénica, hiperémesis gravídica, restricción del crecimiento intrauterino, preeclampsia (Todas ellas patologías propias del

embarazo),<sup>(28, 29, 30, 31)</sup> diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, y síndrome metabólico.<sup>(32, 33)</sup>

### **Factores de virulencia más importantes de *H. pylori***

A continuación se mencionan los factores de virulencia más importantes de esta bacteria:

**Ureasa:** Esta enzima es de gran importancia para la adhesión, colonización y metabolismo de *H. pylori*; se activa dependiendo de las condiciones del pH del medio en que se encuentre dicho microorganismo <sup>(34,35)</sup> y actúa hidrolizando la urea en amoníaco y ácido carbónico. La presencia de estos últimos compuestos aumenta el pH del medio gástrico, alcalinizándolo y con ello permitiendo la colonización de *H. pylori*. <sup>(34)</sup> Como se mencionó anteriormente la presencia de esta enzima es fundamental; ya que se ha observado que en cepas mutantes que no sintetizan la ureasa, las bacterias son incapaces de colonizar.<sup>(36)</sup> Además de proteger a la bacteria del medio ácido, se ha visto que la producción de amonio puede causar daño a las células del epitelio gástrico,<sup>(37)</sup> favoreciendo también la formación de gastritis atrófica y con ello aumentando el desarrollo de cáncer gástrico.

**Morfología y presencia de flagelos:** Como se ha mencionado anteriormente, esta bacteria posee flagelos y su morfología en espiral le permite movilizarse libremente a través de la capa mucoide del epitelio gástrico, contrarrestando el peristaltismo gástrico y logrando la adhesión a la superficie epitelial. <sup>(38, 39)</sup>

**Adhesinas:** El primer paso para que un microorganismo pueda causar infección es que éste tenga la capacidad de adherirse para después colonizar. *H. pylori* posee múltiples tipos de adhesinas que le permiten anclarse al epitelio gástrico, evitando que una sola clase de anticuerpos pueda reconocer adhesinas específicas y de esta manera evitar la infección en el hospedero. Las adhesinas más importantes son las del tipo BabA (blood antigen binding adhesion). Éstas se unen a los antígenos de Lewis encontrados en las células epiteliales gástricas. Se ha visto que este tipo de unión favorece la pérdida de células epiteliales y el desarrollo de gastritis crónica ya que promueve la síntesis de auto-anticuerpos;<sup>(40 - 42)</sup> otro tipo de adhesina son las tipo OipA (outer membrane inflammatory protein), cuyo gen que las codifica está presente en todas las cepas, pero no todas la expresan. Cuando esta adhesina está presente promueve una síntesis mayor de IL-8, pero hasta el momento se desconoce exactamente su aporte real a la inflamación ya que este tipo de adhesina está mayormente presente en las cepas *cagA* positivas.<sup>(43)</sup>

**VacA (Proteína de Vacuolización):** Esta es una proteína vacuolizante, que se encuentra en todas las cepas de *H. pylori*. Induce un gradiente de pH atrayendo sustancias alcalinas dentro de la célula gástrica, provocando que capte agua por osmosis lo que genera, como su nombre lo indica, una vacuolización celular y con ello muerte celular, favoreciendo a la degradación del epitelio gástrico.<sup>(44, 45)</sup> Esta proteína se ha visto mayormente asociada a pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico.<sup>(46)</sup> El gen que sintetiza esta proteína está formado por tres regiones, cada una de las cuales posee alelos correspondientes. De esta manera se encuentra la región señal (región S) con sus alelos *s1a*, *s1b*, *s2c* y *s2*, y la región media que posee los alelos *m1a*, *m1b*, *m2a* y *m2b*, donde los alelos de la región señal se combinan con los alelos de la región media obteniéndose varios perfiles, conociéndose que las cepas *s1/m1* son más virulentas que las *s2/m2*, asignándose letras

dependiendo los niveles de citotoxicidad así  $s1 > s1b > s1c > s2$  y  $m1 > m2$ .<sup>(47-49)</sup> Estudios recientes han demostrado que existe una tercera región denominada intermedia (*i*) la cual consta de *i1* e *i2*, siendo la primera más citotóxica y asociándose al perfil  $s1/m1$ .<sup>(50)</sup> Esta proteína también es capaz de promover la liberación de citocromo C de las mitocondrias, provocando la muerte celular programada (apoptosis) ya que promueve la permeabilización de la membrana de la mitocondria; observándose este fenómeno con mayor frecuencia en los perfiles  $s1/m1$  que en los  $s2/m2$ .<sup>(55-51)</sup>

**CagA ( proteína citotóxica asociada al gen-A)**: Esta proteína es codificada por el gen *cagA*, localizado en la isla de patogenicidad PAI ( esta isla contiene 31 genes asociados), y es inyectada por el sistema de secreción tipo IV, cabe mencionar que no está presente en todas las cepas de *H. pylori*, pero cuando se encuentra se relaciona con las patologías más graves asociadas a la infección por *H. pylori* como la gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico ya que se aísla en el 90% de los casos.<sup>(52-54)</sup> Esta proteína al ser inyectada a la célula, promueve la reorganización del citoesqueleto de las células del epitelio gástrico mediante la fosforilación proteica,<sup>(55)</sup> esta proteína también es inductora de IL-8, que como se mencionó anteriormente promueve la llegada de neutrófilos al sitio de infección, promueve la producción de otras proteínas proinflamatorias como la IL-1, y el factor de necrosis tumoral TNF $\alpha$ .<sup>(56)</sup>

**Proteína DupA Codificada por el gen *dupA* (gen promotor de úlcera duodenal)**: Este gen fue descrito en el año 2005 por *Lu et al.*,<sup>(57)</sup> los cuales observaron que las cepas en las que se encontró este gen aumentaban el riesgo de producir úlcera duodenal, pero tenían un efecto protector para el desarrollo de gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico. La proteína codificada por *dupA* hasta el momento no se ha purificado, pero se asocia específicamente a una patología ligada a la infección por esta

bacteria, al parecer *dupA* promueve la secreción de IL-8 en el antro lo que conduce a una gastritis con predominio en el antro, característica conocida en la úlcera duodenal.<sup>(57)</sup>

## Epidemiología

La infección por *H. pylori* está ampliamente distribuida en el mundo, estudios indican que la seroprevalencia de esta infección alcanza el 50% de la población mundial, porcentaje que varía de acuerdo al nivel socioeconómico y demográfico de cada país, alcanzando un 60-80% en países en vías de desarrollo y de un 15-20% en países desarrollados, cabe mencionar que la adquisición de la infección es con mayor frecuencia durante la infancia; ya que, los niños tienen un contacto más cercano con otros niños y con adultos como los padres o abuelos,<sup>(58, 59)</sup> variando la prevalencia en esta población en un 15 a un 35%, dependiendo como se mencionó anteriormente a condiciones socioeconómicas de cada país.<sup>(60, 61)</sup>

En el año 2013 Porras C *et al.*, realizaron un estudio en seis países de Latinoamérica, donde realizaron el diagnóstico de *H. pylori* en determinadas regiones de estos países (Honduras, Costa Rica, México, Colombia y Nicaragua), mediante la prueba del aliento con urea, obteniendo resultados que indican una alta prevalencia de la infección, demostrando los siguientes porcentajes: Copán-Honduras un 82.6%, Guanacaste-Costa Rica de 76.4%, León-Nicaragua 83.3%, Túqueres-Colombia 83.1%, en Tapachula-México 70.1% y en Obregón- México 84.7%,<sup>(62)</sup> cabe destacar que este estudio revela que la prevalencia puede variar en las diferentes regiones, fenómeno también demostrado por la Organización Mundial de Gastroenterología en el año 2010.<sup>(61)</sup>



En Chile la población infantil, en un rango de edad de 3-9 años, alcanza una prevalencia del 36% y en adultos varía en un 70-90% de acuerdo a las condiciones socioeconómicas de cada región. <sup>(61)</sup>

Existen dos patrones que determinan la variabilidad de la prevalencia de la infección por *H. pylori* en los diferentes países y también en las diferentes regiones de un mismo país, por un lado se observan la población de los países o regiones de un mismo país donde la mayor adquisición de la infección ocurre durante la infancia y la mayoría de las personas están infectadas al llegar a la adultez. Este patrón se observa principalmente en los países en vías de desarrollo, y por otro lado, se encuentra el patrón que se observa en los países desarrollados, en el cuales la mayor parte de la infecciones ocurre durante la edad adulta y solo un pequeño porcentaje de la población infantil ha adquirido la infección. <sup>(61, 63)</sup>

### **Fuentes de transmisión**

A pesar de que *H. pylori* está siendo estudiado en detalle por su alta prevalencia y las patologías que se le asocian, la manera en que esta bacteria se disemina no está totalmente clara. <sup>(64)</sup> En la actualidad se considera la cavidad oral como una fuente importante de transmisión, ya que se han podido detectar genes de dicha bacteria en la placa dental y saliva. <sup>(64-66)</sup> Estudios recientes han demostrado que existen fuentes de transmisión aparte del ser humano, *Ahmad et al.*,<sup>(66)</sup> en el año 2008, analizaron 200 muestras de agua de distintas fuentes, demostrando la presencia de *H. pylori* en 14 de ellas por medio de PCR y confirmando 5 de estas muestras mediante cultivo;<sup>(66)</sup> por otro lado, recientes estudios han determinado la presencia de este microorganismo en leche de vaca, camello, cabra, oveja y búfalo.<sup>(67, 68)</sup> Además, se ha propuesto que esta infección puede ser una

zoonosis ya que algunos investigadores han detectado genes de *H. pylori* en animales tales como gato, cerdos, ovejas y vacas <sup>(64, 69)</sup> pero hasta el momento no existe ningún estudio que muestre la ocurrencia de transmisión desde animales al ser humano.

### **Vías de transmisión**

Es aceptado que la transmisión ocurre de persona a persona y que la diseminación intrafamiliar es la más frecuente. <sup>(61, 70)</sup> Hasta el momento, las vías de transmisión más aceptadas son oral-oral y la vía fecal-oral, debido a que el ser humano parece ser el reservorio natural de *H. pylori*, ya que ésta tiene predilección por adherirse a las células del epitelio gástrico y los jugos gástricos pasan a través del intestino conteniendo células viables de dicha bacteria y de esta manera llegan a encontrarse en las heces, pudiendo llegar a infectar al ser humano por falta de medidas de higiene. <sup>(71)</sup>

Actualmente se siguen planteando hipótesis acerca de la diseminación de *H. pylori*. Es así como se ha planteado también, que puede ser una infección de transmisión sexual, por contacto oral- genital o anal-oral, <sup>(72, 73)</sup> pero hasta el momento es tan solo una hipótesis más.

A pesar de que *H. pylori* es un microorganismo exigente en cuanto a sus requerimientos necesarios para su sobrevivencia, es capaz de encontrarse en diferentes fuentes o reservorios, esto hace cuestionarse de que manera lo hace, demostrándose que este microorganismo es capaz de formar biopelículas. <sup>(74)</sup> Se definen las biopelículas como una matriz de polisacáridos, ADN extracelular, lípidos y proteínas, formada por el propio microorganismo, la cual le permite adaptarse y sobrevivir en condiciones de

estrés.<sup>(75)</sup> De esta manera estudios han demostrado que *H. pylori* puede sobrevivir en fuentes de agua, pudiendo llegar de esta manera hasta el ser humano.<sup>(76-79)</sup> Otra de las formas, en la que se ha encontrado este microorganismo en el ambiente es en la forma cocoide, viable pero no cultivable, estadio al cual pasa *H. pylori* cuando se encuentra en condiciones de estrés,<sup>(80)</sup> la cual se considera que es un estado de dormancia de la bacteria hasta que encuentre el ambiente adecuado para revertir su estado cocoide. Esta hipótesis aún sigue estando en controversia, ya que aún no hay evidencia de la transformación de forma cocoide a espiral infecciosa.<sup>(81)</sup>

Existen varios estudios en los que se demuestra que las bacterias pueden sobrevivir en vacuolas de organismos eucariotas, como las amebas de vida libre, tal es el caso de, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Legionella pneumophila*. Esta última, se ha observado que puede sobrevivir dentro de vacuolas de *Acanthamoeba castellanii*, mediante la inhibición de la fusión del fago-lisosoma,<sup>(82)</sup> observándose el mismo fenómeno en *Pseudomonas aeruginosa*, que crecía intracelularmente en amebas de diferentes géneros aisladas de tuberías de un hospital.<sup>(82)</sup> Este hecho llamó la atención de un grupo de investigadores en el año 2013, los cuales se preguntaron ¿Qué eucariota podría estar sirviendo a *H. pylori* de vehículo y protección al medio ambiente? Fue entonces donde hicieron la relación entre dicha bacteria con levaduras orales, ya que, como se sabe, este último microorganismo se encuentra como comensal en la superficie de la mucosa de la cavidad oral, intestinal y vaginal del ser humano.<sup>(83)</sup> Fue entonces que *Siavoshi et al.* (2013)<sup>(84)</sup> aislaron levaduras de la cavidad oral de pacientes dispépticos, donde pudieron amplificar mediante PCR genes específicos de *H. pylori* (ARNr 16S y *cagA*, *vacA* y *ureAB*) y observando por microscopía óptica *H. pylori* dentro de vacuolas de levaduras pertenecientes al género *Candida* llegando a la conclusión de que, posiblemente, *H. pylori* usaba a *Candida* como protección en condiciones de estrés;<sup>(85, 86)</sup> reproduciendo este

estudio en levaduras de origen gástrico obteniendo los mismos resultados anteriores, comprobando la presencia de la bacteria mediante inmunodetección de proteínas específicas de *H. pylori*.<sup>(87)</sup> Cabe mencionar que el hallazgo de la detección de *H. pylori* intracelular en levaduras de origen humano, dio pie a investigar *H. pylori* en levaduras aisladas de alimento, lo cual dieron resultados que revelan que esta relación no solo ocurre en el ser humano, ya que, lograron identificar la presencia de *H. pylori* en especies de *Candida* aisladas de diferentes alimentos como yogurt, cascara de banana, jugo de uva, pan tradicional y mermelada de membrillo.<sup>(88)</sup> Con los antecedentes mencionados, Siavoshi *et al.* (2013)<sup>(84)</sup> se cuestionaron si las levaduras de origen vaginal provenientes de mujeres embarazadas también podrían contener dicha bacteria, por lo que analizaron 108 muestras vaginales de mujeres embarazadas, de las cuales en 30 de ellas (27.8%) aislaron *Candida sp.*, pudiendo detectar *H. pylori* en 18/30 (60%) de ellas. Además detectaron genes de *H. pylori* en 5/7 levaduras aisladas de la cavidad oral de recién nacidos de las madres en el estudio, llegando a la conclusión que otra vía de transmisión de infección por *H. pylori* a temprana edad podría ser, por la adquisición de dicha bacteria intracelular en *Candida sp.*, a través del canal del parto, es decir por transmisión vertical.<sup>(88)</sup>

Como se ha demostrado *Candida sp.* puede provenir de diferentes fuentes y servir de reservorio para *H. pylori*,<sup>(84-87)</sup> hecho que puede explicar la alta diseminación de la bacteria alrededor del mundo. *Candida sp.* es un hongo unicelular, definido como comensal patógeno oportunista. Coloniza la superficie de la mucosa de la cavidad oral, tracto gastrointestinal y conducto vaginal de mujeres sanas y cuando hay un desequilibrio por parte del sistema inmune, desórdenes hormonales o uso de antibióticos hay una sobrepoblación de dicho organismo causando infección,<sup>(89,90)</sup> como candidiasis oral, paroniquia,<sup>(90, 91)</sup> y la candidiasis vulvovaginal (VVC).<sup>(92)</sup>

Haciendo mención a la presencia de *Candida* en la vagina, aproximadamente el 30% de las mujeres es portadora asintomática de *Candida*.<sup>(93)</sup> El crecimiento de este microorganismo se mantiene controlado por la respuesta inmune y por la presencia de otros microorganismos como *Lactobacillus* sp., cuando el equilibrio de la microbiota vaginal se pierde y hay una sobrepoblación de *Candida* se produce una VVC.<sup>(92, 94)</sup>

En el embarazo el porcentaje de mujeres colonizadas por *Candida* aumenta aproximadamente a un 46%.<sup>(95)</sup> El embarazo se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de VVC, ya que existe un incremento en la secreción de hormonas sexuales, principalmente la progesterona y el estrógeno. En la actualidad se desconoce la manera exacta en la que estas dos hormonas contribuyen a la colonización de *Candida* en el epitelio vaginal,<sup>(92)</sup> una de las propuestas es que el aumento de progesterona y estrógeno, conducen al incremento de la capa de glucógeno vaginal, el cual proporciona una excelente fuente nutricional para el crecimiento de *Candida*.<sup>(96)</sup>

La epidemiología de la VVC no está totalmente definida, ya que no es una infección de reporte obligatorio. Se estima que el 75% de las mujeres sanas tienen por lo menos un episodio de candidiasis en un momento de su vida y un porcentaje del 5-8% puede sufrir de candidiasis vulvovaginal recurrente que definido como tres o más episodios de candidiasis vaginal por año.<sup>(97)</sup>

En Chile, en el período comprendido entre septiembre de 2009 y agosto de 2010, se realizó el diagnóstico de vulvovaginitis micótica en 230 adolescentes y jóvenes entre 10 y 25 años, diagnosticando VVC en el 43.9% de ellas.<sup>(98)</sup> Entre las especies aisladas en la vulvovaginitis se encuentran según el orden de frecuencia, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C.*

*krusei* <sup>(99)</sup> y muy rara vez *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), la presencia de esta última, es asociada principalmente con mujeres que trabajan en panaderías o cervecerías, <sup>(100)</sup> estimándose que la prevalencia es de un 1% , aunque estudios recientes han demostrado que el porcentaje ha aumentado a un 8%. <sup>(101)</sup>

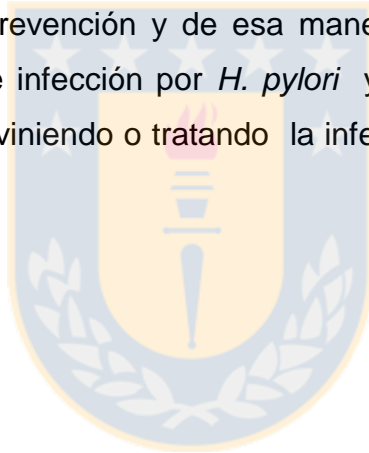
Hasta el momento los desafíos contra *H. pylori* se han enfocado en la eliminación de la infección mediante la creación de regímenes terapéuticos efectivos. <sup>(101,102)</sup> Sin embargo, no se ha podido erradicar ni disminuir la prevalencia de la infección por dicho microorganismo, ya que por una parte, hay cepas que han creado mecanismos de resistencia a los antibióticos que se utilizan para tratar la infección <sup>(103, 104)</sup> y por otro lado las personas en las que la farmacoterapia ha sido exitosa, no quedan protegidas contra la reinfección. <sup>(105-107)</sup>

Sin duda, y como se ha mencionado anteriormente, las madres probablemente juegan un rol muy importante en la transmisión de la bacteria a sus hijos e hijas. Así hay estudios científicos como el de Konno M. *et al.*, (2008), que señalan que si las madres son portadoras de *H. pylori*, los hijos e hijas de estas mujeres infectados con la bacteria tienen la misma cepa de su madre; por lo tanto la transmisión vertical ha surgido como una probable vía de transmisión de la bacteria de madre a hijo e hija. <sup>(108)</sup>

Por otro lado se ha investigado el rol de la lactancia materna como forma de transmisión vertical pero los resultados han sido contradictorios. <sup>(109,110)</sup> En la revisión sistemática de Chak *et al.* <sup>(110)</sup> (2009), no se logró determinar el rol protector de la lactancia materna contra *H. pylori*. En el estudio de Appelmelk *et al.* <sup>(111)</sup> (1994), informaron que la lactoferrina de la leche materna humana fue capaz de unirse al lipopolisacárido de la bacteria e inactivarla. En el estudio de Thomas *et al.* <sup>(112)</sup> (1999), se determinó que los títulos de IgA

específicas de *H. pylori* aumentan cuando se mantiene una lactancia duradera, es decir mayor de 6 meses, retrasando la adquisición de la infección.

Lo anteriormente expuesto, determina, la importancia de seguir investigando nuevas formas de disminuir la prevalencia de la infección por *H. pylori*. Determinar si existe transmisión vertical en forma intracelular por medio de especies de levaduras que habitan comúnmente en la mucosa vaginal de las embarazadas, que podrían además estar protegiendo a *H. pylori* del medio que le rodea y le sirva de vehículo de transmisión, significaría un gran avance en la investigación , ya que con este hallazgo, se podrían crear nuevas medidas de prevención y de esa manera aportar a la solución de disminuir los casos de infección por *H. pylori* y con ello las enfermedades que se le asocian, previniendo o tratando la infección desde el momento del nacimiento.



### 3.- HIPÓTESIS

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos presentados, se plantea la siguiente hipótesis:

“Las levaduras de origen vaginal de mujeres embarazadas de término son un vehículo de transmisión vertical para la adquisición de *Helicobacter pylori* por parte de sus recién nacidos”.





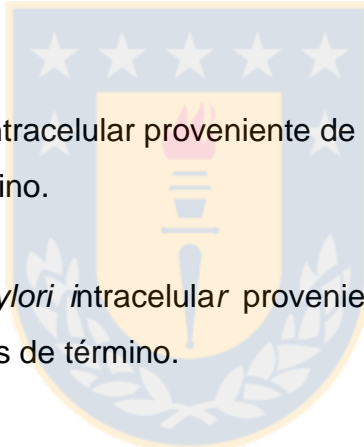
#### 4.- OBJETIVOS

##### **Objetivo General:**

Determinar la transmisión de *H. pylori* desde mujeres embarazadas a sus recién nacidos a través de la transmisión vertical por medio de levaduras de origen vaginal.

##### **Objetivos específicos:**

- 1.- Identificar las especies de levaduras de origen bucal obtenidas de recién nacidos de término.
- 2.- Detectar *H. pylori* intracelular proveniente de levaduras de origen bucal en recién nacidos de término.
- 3.- Genotipificar *H. pylori* intracelular proveniente de levaduras de origen bucal en recién nacidos de término.
- 4.- Detectar antígenos de *H. pylori* en meconio de recién nacidos de término.
- 5.- Genotipificar *H. pylori* intracelular proveniente de levaduras de origen vaginal de las madres de los recién nacidos infectados con la bacteria.



## 5.- MATERIAL Y MÉTODO

### Diseño metodológico

**Clasificación:** Estudio cuantitativo

**Tipo de estudio:** Observacional, descriptivo de temporalidad transversal.

### Población:

La constituyeron los RN de término, hijos de mujeres que controlaron su embarazo en los siguientes Centros de Salud Familiar (CESFAM): “Dr. Víctor Manuel Fernández”, “O’Higgins” y “Tucapel”, en los meses de agosto a diciembre de 2015, en la ciudad de Concepción, región del Biobío, Chile.

### Criterio de inclusión:

RN de término, hijos de mujeres que aceptaron participar en el estudio, mediante la firma del consentimiento informado para la obtención de las muestras de sus hijos/hijas o la firma de este consentimiento por parte de los tutores de los neonatos.

**Criterio de exclusión:**

- RN que no fueron dados de alta junto a su madre y estén hospitalizados al momento de la toma de la muestra.
- RN prematuros.
- RN sin consentimiento informado firmado por sus madres o tutor al momento de la toma de la muestra.

**Muestra:**

La muestra estuvo constituida por todos los RN de aquellas mujeres que llegaron a término en su embarazo y que cumplieron con los criterios de inclusión.

El tamaño de la muestra fue calculado según el número aproximado de mujeres que controlaron su embarazo en los CESFAM antes mencionados y sus respectivos hijos e hijas, estimándose que fueron atendidas 5 mujeres embarazadas de término al mes por cada CESFAM, por un periodo de 5 meses; con un error máximo permitido del 5% y un nivel de confianza deseado del 95%, con una prevalencia del 17%, entonces la muestra mínima requerida era de 56 recién nacidos.

La muestra se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$n \geq \frac{Nz_{1-\alpha/2}^2 PQ}{z_{1-\alpha/2}^2 PQ + d^2 (N-1)}$$

Dónde:

n: Es la muestra

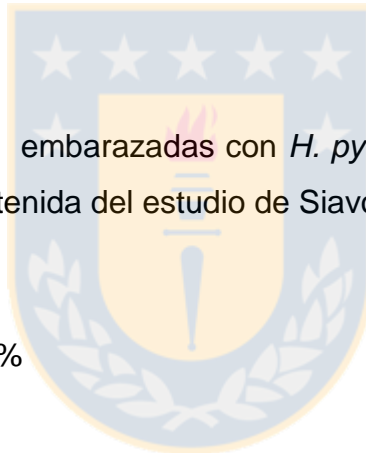
N: Es la población

P: Es la proporción de embarazadas con *H. pylori* intracelular en levaduras, esta proporción fue obtenida del estudio de Siavoshi et al. <sup>(95)</sup>

Q: 1-P

d: Error permitido de 5%

$z_{1-\alpha/2} = 1.96$



Cabe señalar que al momento de tomarles la muestra, al total de 108 RN, 43 madres no quisieron seguir en el estudio, 2 madres se fueron a sus casas antes del alta establecida y 4 RN quedaron hospitalizados, por lo que el total de RN que finalmente participo en el estudio fue de 53 RN.

Además es importante mencionar que esta tesis es la continuación del trabajo realizado por la señorita Michelle Sánchez Alonso, Tecnóloga Médica, estudiante del Magister de Ciencias Biomédicas con Mención en Microbiología Clínica de la Universidad de Talca, quien estudio a las mujeres embarazadas, madres de los neonatos estudiados en esta tesis.

## **Método**

El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética del Servicio de Salud de Concepción con el código 15-06-22, cabe mencionar que esta tesis es parte de un Proyecto de Iniciación de la Universidad de Concepción el cual lleva como nombre **“Determinación de la Transmisión de *H. pylori* a través de levaduras de origen vaginal de mujeres embarazadas de término a sus recién nacidos”** (Anexo 1).

Presentación y firma del consentimiento informado (Anexo 2).

### **Análisis Estadístico:**

Los datos obtenidos de las encuestas fueron ingresados a una base de datos Excel y se analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 19.0.

Las variables cualitativas se presentarán en frecuencia absoluta y relativa porcentual.

### **Toma de muestra:**

Antes de la toma de la muestra se les dio a conocer a todas las embarazadas en qué consistía el estudio científico. Se les informó que se les tomaría una muestra de heces y de hisopado oral a sus recién nacidos, antes de que estos fueran dados de alta de la maternidad y se les explicó la manera en que se realizaría la toma de muestra a sus hijos e hijas, dejándoles en claro que la participación en el estudio era totalmente voluntaria y que podían retirarse en cualquier etapa del mismo.

La muestra de hisopado oral a los recién nacidos se tomó introduciendo un hisopo en la boca y rotándolo en las mejillas, encías y debajo de la lengua, para así obtener una mayor cantidad de muestra. Luego, éstas se trasladaron al laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad de Concepción, en tubos con medio Stuart (Deltalab, España) en una caja hermética a temperatura ambiente para su procesamiento.

Para la toma de muestra de heces se utilizaron frascos recolectores de boca ancha, que contenían los apellidos del recién nacido, nombre de la madre y días de vida del niño o niña. Las muestras eran tomadas por la investigadora principal del estudio, quién pasaba por las salas de puerperio recolectando las muestras y trasladándolas al laboratorio de Patogenicidad Bacteriana en una caja hermética con hielo para su posterior procesamiento.

### **Desarrollo del objetivo número 1: Identificar las especies de levaduras de origen bucal obtenidas de recién nacidos de término.**

Para la realización de este objetivo se utilizaron las siguientes cepas control:

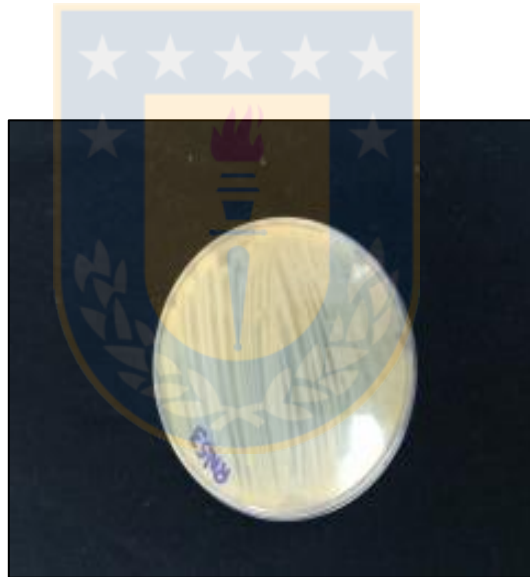
- 1.- Cepa de *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 90028
- 2.- Cepa de *Candida glabrata* (*C. glabrata*) ATCC 90030

Las cepas de *C. albicans* y *C. glabrata* se sembraron en Agar Sabouraud Dextrosa, suplementado con Cloranfenicol (OXOID, Inglaterra), incubándose a 37° C por 24 horas.

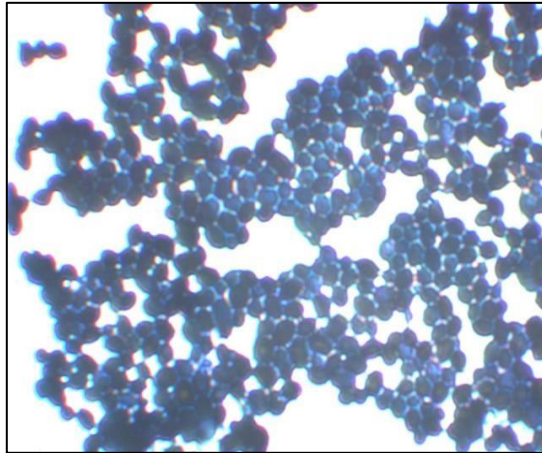
Cada muestra de hisopado oral de recién nacido se sembró en placas Petri 94X16 (Greiner Bio-one) que contenían 20 ml de Sabouraud Dextrosa Agar

(Difco, EEUU) preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante y suplementado con cloranfenicol (OXOID, Inglaterra) de acuerdo a las instrucciones del mismo, distribuyendo la muestra con hisopo en toda la superficie de la placa, incubándose a 37° C por 24 horas. Una vez que se observó crecimiento de levaduras, se comprobó que era cultivo puro mediante la realización de tinción de Gram a colonias al azar.

Para disminuir el riesgo de contaminación, a cada cultivo primario, se le realizó cuatro resiembras en placas que contenían el mismo medio de cultivo que el cultivo primario, incubándose en las mismas condiciones, además se realizó una tinción de Gram a cada resiembra para confirmar la pureza del cultivo.



**Figura 2:** Cultivo primario de levaduras de origen bucal.



**Figura 3:** Tinción de Gram de levaduras aisladas de muestras de hisopado oral de RN.

### **CHROMagar *Candida***

Una vez aisladas las levaduras desde las muestras de hisopado oral de los recién nacidos y sembradas en las placas Petri en Sabouraud Dextrosa Agar (OXOID, Inglaterra), se tomó un inculo de las colonias con un ASA curva y se sembraron por estría en placas Petri 94x16 que contenían medio CHROMagar *Candida* (Difco, EEUU) preparado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se incubaron a 37° C por 72 horas, revisando las placas cada 24 horas para observar si existía crecimiento y diferenciación de *Candidas* a través de color.

### **Prueba del Tubo Germinal**

Una vez que se observó crecimiento y ya que el CHROMagar solamente es capaz de identificar *C. albicans* (colonias color verde), *C. kefyr* (colonias color



rosa) y *C. tropicalis* (colonias color azul), según la información ofrecida por el fabricante, a las colonias que eran de color verde se les realizó la prueba de Tubo Germinal, para diferenciar *C. albicans* o *C. dubliniensis* de *Candida* no *albicans*. Para esto se agregó a un tubo de ensayo 500 µl de suero de caballo (provisto en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción, Chile) y luego con un Asa curva se agregó una colonia del cultivo, se incubó por 2 horas, a 37° C en aerobiosis. Luego con una micropipeta se agregaron 30 µl de la suspensión sobre un portaobjeto de 22.4X76.2 mm, se colocó sobre éste un cubreobjeto de 22x22 mm observándose al microscopio con el objetivo de 10X y el de 40X.

### **Identificación por Sistema API® *Candida***

Se realizó la confirmación de las especies del género *Candida* mediante el sistema de identificación de levaduras API® *Candida* (BIOMÉRIEUX, Francia) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo 3). La lectura de las baterías bioquímicas del sistema API se leyeron de acuerdo a las indicaciones descritas en el (Anexo 4), al leerse dicha batería se obtiene un perfil numérico, el cual para obtener la especie de la levadura se compara con los perfiles que se encuentran en el (Anexo 5).

### **Desarrollo del objetivo 2: Detectar *H. pylori* intracelular provenientes de levaduras de origen bucal de recién nacidos de término.**

#### **Detección por microscopía óptica:**

Para la realización de este objetivo, se utilizó como control la cepa de *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 90028.

Se depositó en un portaobjetos de 22.4X76.2 mm (Sail Brand, China) una gota de suero fisiológico al 0.9%, luego con un asa curva, se depositó un inóculo de una colonia al azar y se colocó sobre la muestra un cubreobjetos de 22x22 mm (Sail Brand, China) y se observó en el microscopio con el objetivo de 40X.

### **Detección por inmunofluorescencia:**

Este ensayo se realizó utilizando anticuerpos policlonales de conejo, IgG anti- *H. pylori* marcados con FITC (Abcam, EEUU), cuya concentración es de 5.000 mg/ml, observándose a una longitud de onda de 528 nm. Se utilizó como control negativo la cepa ATCC 90028 de *C. albicans* y como control positivo la cepa ATCC 53504 de *H. pylori*.

Las muestras y controles se diluyeron en un tubo Eppendorf con 1 ml de PBS 1X, ajustándolo a una turbidez igual al patrón del tubo número 2 de la escala de McFarland. En una placa de 96 pocillos se agregaron 200 µl de muestra en su respectivo pocillo y se agregó 1 µl de anticuerpos anti-*H. pylori* marcados con FITC, incubándose por una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Terminado el tiempo de incubación, se agregó en un cubreobjetos 10 µl de la muestra y se observó en el microscopio confocal espectral LSM780 NLO, ZEISS que posee el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Universidad de Concepción, el objetivo utilizado fue Plan Achromatic 63X NA 1.4 más zoom de hasta 2X.

Las imágenes fueron obtenidas con DIC (imágenes luz transmitida) y fluorescencia con excitación láser Ar488 nm e emisión entre 490 - 560 nm. Las imágenes fluorescentes corresponden a un plano de 2 – 4 µm de espesor. El software de adquisición utilizado fue el Zen 2012.

**Desarrollo del objetivo 3: Genotipificar *H. pylori intracelular* proveniente de levaduras de origen bucal de recién nacidos de término.**

**Extracción de ADN**

La extracción ADN se realizó mediante kit UltraClean<sup>®</sup> Microbial DNA Isolation (M.O BIO, EEUU), realizando pequeñas modificaciones al protocolo recomendado por el fabricante:

1. Se agregó a un tubo de colección de 2 ml (provisto en el kit) 1.5 ml de suero fisiológico estéril, y se agregó a éste, con un asa en anillo todo el crecimiento de las de colonias de levaduras en medio Sabouraud, se centrifugó a 13,400 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 13,400 x g por 30 segundos y por último se retiró completamente el sobrenadante con una pipeta; esto se realizó para obtener el pellet de las levaduras.
2. Se resuspendió el pellet con 300 µl de MicroBeads Solution y se mezcló en vórtex, luego se transfirió toda la mezcla a los MicroBeads Tube (provistos en el kit). La MicroBeads Sotution tiene sales y un buffer el cual estabiliza y dispersa homogéneamente las células para su posterior lisis.
3. Se agregó 50 µl de solución MD1 a los MicroBeads Tube. La solución MD1 contiene SDS y otros agentes requeridos para la lisis celular. El SDS, es un detergente aniónico que rompe los ácidos grasos asociados a la membrana celular de varios organismos.

4. Se colocaron los tubos horizontalmente en el vórtex y se mezclaron a velocidad máxima por 10 minutos; en este paso se combina la lisis mecánica y la lisis química.
5. Una vez terminado el tiempo de mezcla en el vórtex, se centrifugaron a 13,400 rpm por 30 segundos, al centrifugar los restos de las células se quedan en el fondo del tubo, mientras que el ADN permanece en el sobrenadante.
6. Se transfirió el sobrenadante a un tubo 2 ml provisto en el kit, y se agregaron 100 µl de solución MD2 al sobrenadante, cada tubo se mezcló en vórtex por 5 segundos, y luego se incubaron a 4°C por 5 minutos, una vez terminado el tiempo de incubación, se centrifugó a 13,400 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente; la solución MD2 contiene un reactivo para precipitar material inorgánico u orgánico como los restos de las células lisadas y las proteínas, es importante la eliminación de estos ya que pueden reducir la pureza del ADN.
7. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 2 ml provisto en el kit y se agregaron 900 µl de solución MD3 y se mezcló en vórtex por 5 segundos, luego se transfirieron 700 µl de ésta a la Spin Filter, la solución MD3 tiene una alta concentración de sal que permite que la hebra de ADN gire y se una al filtro de membrana de sílica, se centrifugó a 13,400 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente, se descartó el filtrado y se agregó el resto de la solución con MD3, centrifugando nuevamente a 13,400 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente, se descartó el filtrado.
8. Se agregó a la Spin Filter 300 µl de solución MD4 y se centrifugó a 13,400 rpm por 30 segundos, y se descartó el filtrado; la solución MD4 es una solución de lavado a base de etanol, utilizado para eliminar cualquier residuo de sal u otro contaminante del ADN que está unido al filtro de membrana de

sílica, además permite que este permanezca adherido a la membrana. Luego se centrifugó a 13,400 rpm por 1 minuto para eliminar cualquier residuo de solución MD4.

9. Luego se transfirió la membrana a un tubo nuevo de 2 ml (provisto en el kit) y se agregaron 50  $\mu$ l de solución MD5 en el centro de la membrana, y se centrifugó a 13,400 rpm por 30 segundos, la solución MD5 es Tris al 10 mM con pH 8 y no contiene ningún tipo de sal, se utiliza para liberar el ADN de la membrana, el ADN es liberado porque solo se une a la membrana en presencia de sal.
10. Luego se descartó la Spin Filter y se almacenó a  $-20^{\circ}$  C hasta la realización del PCR.

### **Cuantificación de ADN**

La concentración del ADN fue determinada mediante el espectrofotómetro (TECAN, suiza), se utilizó como blanco la solución MD5. Las concentraciones de las muestras variaron en un rango entre 4.85- 31.7 ng/ $\mu$ l. La calidad del ADN fue determinada según las relaciones entre las absorbancias de la muestra a 260 nm, 280 nm. Las muestras utilizadas mantuvieron relaciones 260/280 sobre 1.8.

### **Amplificación de genes**

La amplificación de los genes *ARNr 16S*, *cagA*, *dupA*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1*, *vacAm2*, se realizó utilizando el kit SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (TAKARA BIO INC, Japón), realizando modificaciones

recomendadas por el fabricante; para cada muestra se utilizó 12.5 µl de Master Mix, 1 µl de Forward Primer, 1 µl de Reverse Primer, 2 µl de ADN de la muestra así como de los controles, y 8.5 µl de agua grado PCR, para obtener un total de 25 µl mezcla para la PCR. Las condiciones de la PCR fueron:

- Temperatura de desnaturalización inicial 94°C/1 minuto.
- Temperatura de desnaturalización 98°C/ 5 segundos
- Temperatura de hibridación dependió de la requerida por los partidores, los cuales se detallan en la tabla 1, por un tiempo de 5 segundos
- Extensión 72°C/ 40 segundos.

Se realizaron 30 ciclos para cada reacción PCR, utilizando el termociclador (Eppendorf, EEUU).

**Tabla 1 Partidores utilizados en la detección y genotipificación de *H. pylori* intracelular en levaduras**

Gen	Región	Secuencia	Tm °C	pb (amplicón)	Referencia
<i>ARNr 16S</i>		F- 5' CTC GAG AGA CTA AGC CCT CC 3' R- 5' ATT ACT GAC GCT GAT GTG C 3'	53	110	Proyecto Fondef D03i1105
<i>cagA</i>		F- 5' GAT AACAGGCAAGCTTTTGAGG 3' R- 5' CTGCAAAGATTGTTTGGCAG A3'	55	349	Shimoyama T <i>et al.</i> 1998 <sup>(113)</sup>
<i>dupA</i>		F- 5' ACAAGG ACG ATT GAG CGA TGG 3' R- 5' TGG CTA GTT TGA GGT CTT AGG 3'	61	515	Proyecto Fondef D03i1105
<i>vacA</i>	<i>s1a</i>	F- 5' GTCAGC AT CACACCGCAA 3' R- 5' CTGCTTGAATGCGCCAAA C 3'	55	190	Atherton JC <i>et al.</i> , 1995 <sup>(54)</sup>
<i>vacA</i>	<i>s1b</i>	F- 5' AGCGCCATACCGCAA GAG 3' R- 5' CTGCTTGAATGCGCCAAA C 3'	55	187	Atherton JC <i>et al.</i> , 1995 <sup>(53)</sup>
<i>vacA</i>	<i>s2</i>	F- 5' GCTAACACGCCAAAT GAT CC 3' R- 5' CTG CTTGAATGCGCCAAA C 3'	55	199	Atherton JC <i>et al.</i> , 1995 <sup>(54)</sup>
<i>vacA</i>	<i>m1</i>	F- 5' GGTCAAATGCGGTCATG G 3' R- 5' CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC 3'	50	290	Atherton JC <i>et al.</i> , 1995 <sup>(54)</sup>
<i>vacA</i>	<i>m2</i>	F- 5' GGAGCCCCAGGAAACATT G 3' R- 5' CAT AAC TAG CGCCTTGCA C 3'	55	352	Atherton JC <i>et al.</i> , 1995 <sup>(54)</sup>

## **Electroforesis en Gel de Agarosa**

Una vez amplificados los genes, se realizó la electroforesis en geles de agarosa (Lonza, EEUU) al 2 %. El gel se preparó agregando 1.6 g de agarosa para 80 ml de TAE 1X (80 ml es la capacidad de la base de la cámara electroforética que se utilizó para realizar la corrida del gel); una vez fundida la agarosa se agregaron 2 µl de REDGEL (Biotium, EEUU), la agarosa con REDGEL se agregó a la base de la cámara y una vez que solidificó, se agregó en el primer pocillo 1 µl de marcador de corrida de 100 pb (MAESTROGEN, EEUU) rango 100 pb a 3,000 pb se agregaron 10 µl de los productos amplificados en los pocillo, y el gel se corrió a 70 voltios por 2 horas. Al terminar el gel se visualizó en bajo luz ultravioleta, utilizando el transiluminador.

### **Objetivo 4: Detectar antígenos de *H. pylori* en meconio de recién nacidos de término.**

La detección del antígeno en heces, en este caso meconio de recién nacidos se realizó utilizando en kit Premier Platinum HpSA<sup>®</sup> Plus (Meridian Bioscience Europe, Italia) siguiendo las recomendaciones del fabricante Anexo (6), la reacción se leyó en el espectrofotómetro (TECAN, Suiza); los controles utilizados en este ensayo fueron los provistos por el kit.

**Objetivo 5: Genotipificar *H. pylori* intracelular proveniente de levaduras de origen vaginal de las madres de los recién nacidos infectados con la bacteria.**

La muestra de flujo vaginal se tomó introduciendo un hisopo en el fondo del saco posterior del cuello del útero y con movimientos rotatorios se extrajo mayor cantidad de muestra posible y estas se trasladaron al laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, en tubos con medio Stuart (Deltalab, España) en una caja hermética a temperatura ambiente para su procesamiento.

Para la realización de este estudio se utilizaron las siguientes cepas control:

- 1.- Cepa de *H. pylori* ATCC J99, aislada de un paciente con úlcera duodenal.
- 2.- Cepa de *H. pylori* ATCC 43504 aislada de antro gástrico humano de un paciente con cáncer gástrico.

Cada cepa de *H. pylori* se utilizó como control positivo de acuerdo al gen buscado.

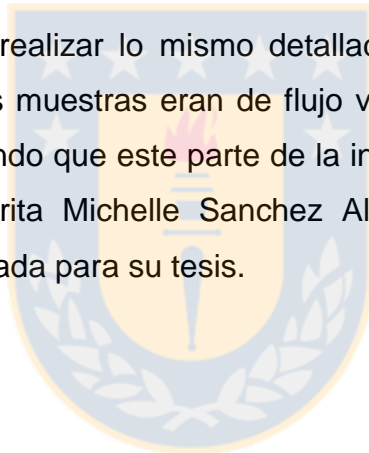
A continuación se muestra la tabla en la cual se observan los genes positivos para cada cepa, éstas se sembraron en Agar Columbia (OXOID, Inglaterra), suplementado con Dent (OXOID, Inglaterra) de acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante, y sangre de caballo al 5%, incubándose a 37° C en microaerofílica (10% CO<sub>2</sub>) por 5-8 días.



**Tabla 2** Tabla de genes positivos en el genoma de cepas de referencia de *H. pylori*.

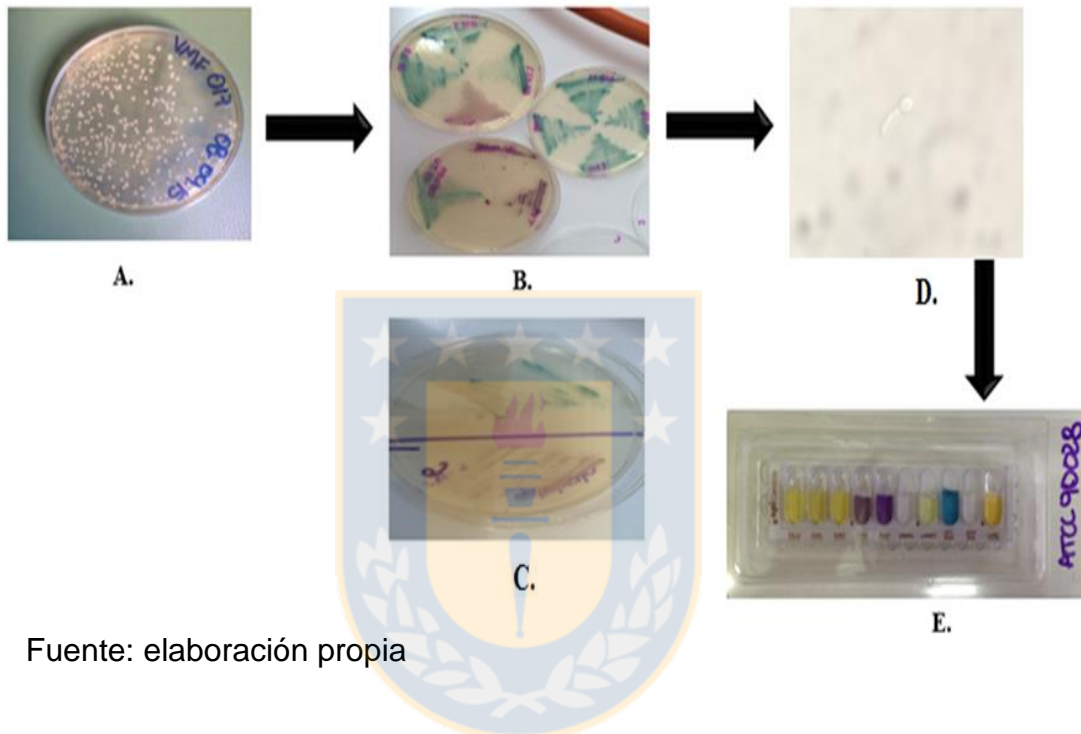
Cepa/gen	<i>cagA</i>	<i>dupA</i>	<i>vacAs1a</i>	<i>vacAs1b</i>	<i>vacAs2</i>	<i>vacAm1</i>	<i>vacAm2</i>
ATCC 43504	+	-	+	-	-	+	-
ATCC J99	+	+	+	+	+	+	+

Luego se procedió a realizar lo mismo detallado en el objetivo número 3, pero en este caso, las muestras eran de flujo vaginal de las madres de los recién nacidos, aclarando que esta parte de la investigación fue trabajada en conjunto con la señorita Michelle Sanchez Alonso, pues es parte de la investigación desarrollada para su tesis.



## 6.- RESULTADOS

### Identificación de levaduras de cultivos orales provenientes de recién nacidos de término.



Fuente: elaboración propia

**Figura 4:** Identificación de levaduras de cultivos orales provenientes de recién nacidos de término. En la imagen (A) se observan levaduras aisladas en Agar Sabouraud Dextrosa, en la imagen (B) se observa la Identificación fenotípica de levaduras en CHROMagar. Según el fabricante, las colonias que tienen pigmento verde, son levaduras *C. albicans* y las colonias de color morado deben confirmarse ya que podría ser cualquier *Candida no albicans*, En la imagen (C) se observa la identificación en CHROMagar de las cepas ATCC de *C. albicans* y *C. glabrata*, en la imagen (D) se observa la Prueba del tubo germinal, realizada para confirmar las levaduras de la especie *C. albicans* y en la imagen (E) se observa la Identificación de levaduras

mediante sistema API *Candida*, la imagen muestra el resultado del control el cual fue la cepa ATCC 90028 perteneciente a *C. albicans*.

### Patrones de lectura de las especies de levaduras de origen bucal provenientes de los recién nacidos de término



Fuente: elaboración propia

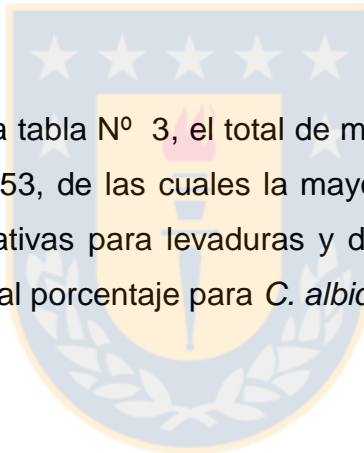
**Figura 5:** Patrones de lectura de las especies de levaduras de origen bucal provenientes de neonatos de término, a partir del sistema de identificación API *Candida*.

Tabla 3: Identificación de especies de levaduras aisladas de cultivos orales de recién nacidos de término

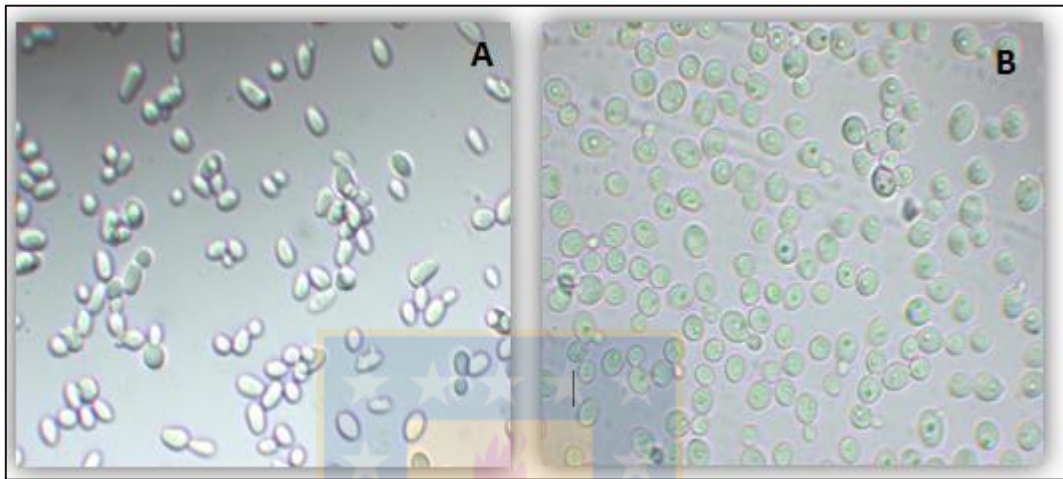
Cultivos orales de recién nacidos de término	Frecuencia	Porcentaje (%)
<i>C. albicans</i>	2	3,8
<i>C. glabrata</i>	2	3,8
Negativo	49	92,4
Total	53	100

Fuente: elaboración propia

Como se observa en la tabla N° 3, el total de muestras de cultivos orales de recién nacidos fueron 53, de las cuales la mayoría de las muestras 92,4 % (n=49) resultaron negativas para levaduras y de las muestras positivas las especies fueron en igual porcentaje para *C. albicans* 3,8% (n= 2) y para 3,8% (n= 2) % *C. glabrata*.



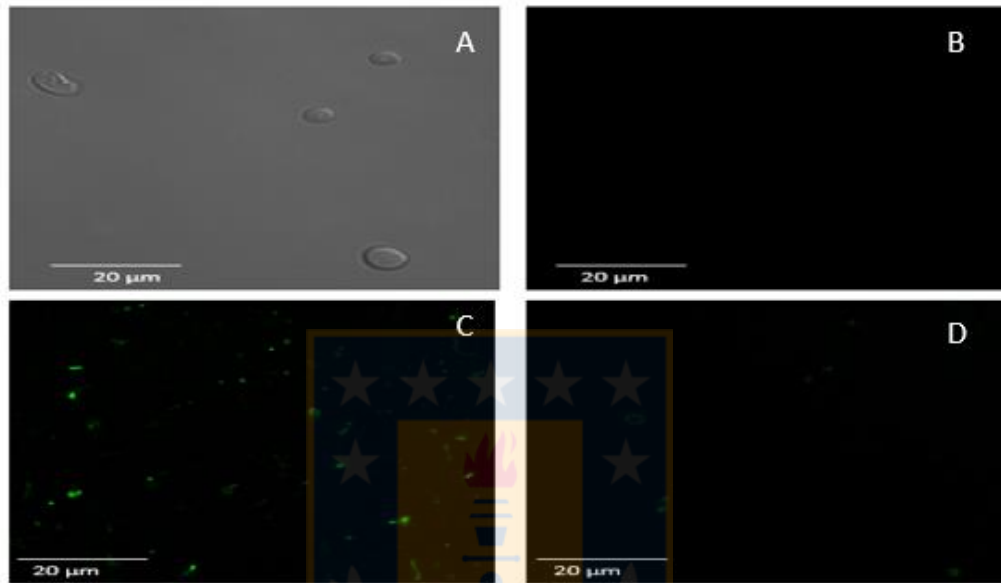
**Identificación de inclusiones de levaduras de origen bucal de recién nacidos de término.**



Fuente: elaboración propia

**Figura 6:** Examen en fresco de las muestras de los cultivos obtenidos a partir de muestra bucal de recién nacidos de término. En la imagen (A) se observa el examen en fresco de la cepa ATCC 90028 usada como control negativo. En la imagen (B) se pueden observar levaduras aisladas de las muestras de hisopado oral de los recién nacidos, apreciándose pequeñas inclusiones dentro de las vacuolas de dichos microorganismos. Las muestras se observan en un aumento de 400 veces.

**Identificación de *H. pylori* intracelulares en levaduras de origen bucal de recién nacidos de término mediante Inmunofluorescencia.**



Fuente: elaboración propia

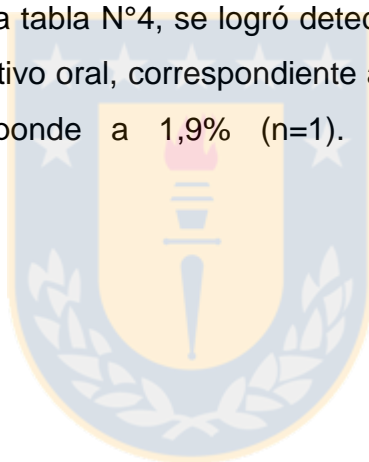
**Figura 7:** Ensayo de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos policlonales anti-*H. pylori* marcados con FITC, en la figura (A) se observa la cepa ATCC de *C. albicans* utilizada como control negativo, vista con DIC, la figura (B) muestra el control negativo, donde no se observa fluorescencia. En la figura (C) se muestra la cepa J99 de *H. pylori* utilizada como control positivo y en la figura (D) se muestra la presencia de *H. pylori* intracelular en las levaduras aisladas de cavidad oral de neonatos de término.

Tabla 4: Detección de *H. pylori* intracelular en levaduras de origen bucal de recién nacidos de término.

<b>16S para <i>H. pylori</i></b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Negativo	52	98,1
Positivo	1	1,9
Total	53	100

Fuente: elaboración propia

Como se observa en la tabla N°4, se logró detectar *H. pylori* intracelular solo de una muestra de cultivo oral, correspondiente a la especie de levadura *C. glabrata* que corresponde a 1,9% (n=1). Detección confirmada por inmunofluorescencia.



## Detección molecular de *H. pylori*

Amplificación del *ARNr 16S*

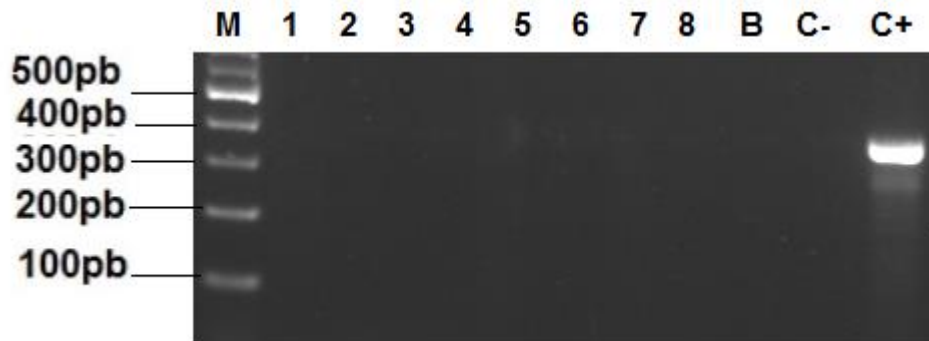


Fuente: elaboración propia

**Figura 8:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la determinación de amplificación de *ARNr 16S* de *H. pylori* en ADN extraído de levaduras aisladas de hisopado oral, con un tamaño esperado de 110 pb. Donde el carril M es el marcador de peso molecular de 100 pb (rango de 100 pb a 3,000 pb) el carril C+ (control positivo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 43504, el carril C- (control negativo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 90028 y el carril B que corresponde al blanco, los carriles 1-4 es el ADN de las muestras recién nacidos de término.



## Amplificación del gen *cagA*



Fuente: elaboración propia

**Figura 9:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la determinación de amplificación del gen *cagA* de *H. pylori* en ADN extraído de levaduras aisladas de hisopado oral, con un tamaño esperado de 349 pb, donde el carril M es el marcador de peso molecular de 100 pb (rango de 100 pb a 3,000 pb), los carriles 1-8 son las muestras obtenidas recién nacidos de término en término, el carril C+ (control positivo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 43504, el carril C- (control negativo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 90028 y el carril B que corresponde al blanco.

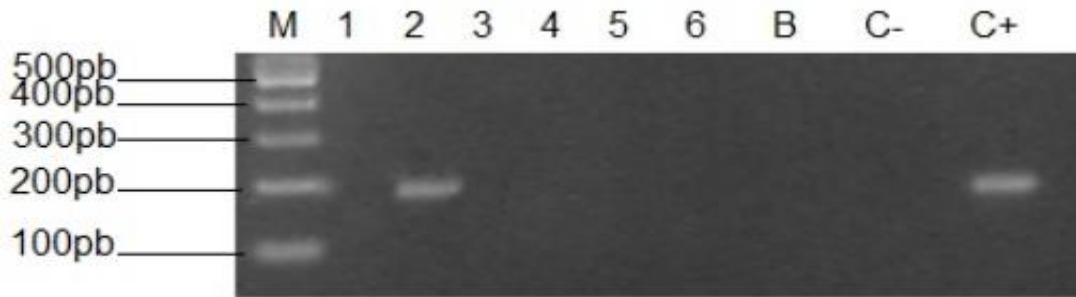
### Amplificación del gen *dupA*



Fuente: elaboración propia

**Figura 10:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la determinación de amplificación del gen *dupA* de *H. pylori* en ADN extraído de levaduras aisladas de hisopado oral, con un tamaño esperado de 515 pb. Donde el carril M es el marcador de peso molecular de 100 pb (rango de 100 pb a 3,000 pb), los carriles 1-6 son las muestras obtenidas de recién nacidos de término, el carril C+ (control positivo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 43504, el carril C- (control negativo) y el carril B que corresponde al blanco. Se puede observar que no hubo amplificación del gel en ninguna de las muestras.

## Amplificación del gen *vacAs1a*



Fuente: elaboración propia

**Figura 11:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la determinación de amplificación de la región *s1b* del gen *vacA* perteneciente a *H. pylori* en ADN extraído de levaduras aisladas de muestra de hisopado oral término, con un tamaño de amplicón esperado de 187 pb, donde el carril M es el marcador de peso molecular de 100 pb (rango de 100 pb a 3,000 pb), los carriles 1-6 son las muestras de recién nacidos de término, el carril C+ (control positivo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC J99, el carril C- (control negativo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 90028 y el carril B que corresponde al blanco. No se observó amplificación del alelo *s1b* del gen *vacA* en ninguna de las muestras.

## Amplificación del gen *vacAs1b*



Fuente: elaboración propia

**Figura 12:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la determinación de amplificación de la región *s1b* del gen *vacA* perteneciente a *H. pylori* en ADN extraído de levaduras aisladas de muestra de hisopado oral término, con un tamaño de amplicón esperado de 187 pb, donde el carril M es el marcador de peso molecular de 100 pb (rango de 100 pb a 3,000pb), los carriles 1-6 son las muestras de recién nacidos de término, el carril C+ (control positivo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC J99, el carril C- (control negativo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 90028 y el carril B que corresponde al blanco. No se observó amplificación del alelo *s1b* del gen *vacA* en ninguna de las muestras.

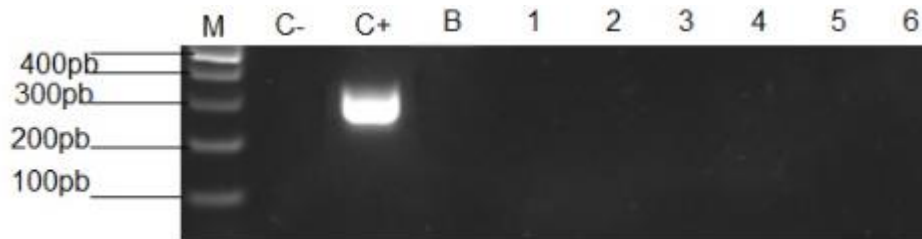
## Amplificación del gen *vacAs2*



Fuente: elaboración propia

**Figura 13:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la determinación de amplificación de la región *s2* del gen *vacA* perteneciente a *H. pylori* en ADN extraído de muestras de hisopado oral de recién nacidos de término, con un tamaño de amplicón esperado de 199 pb, donde el carril M es el marcador de peso molecular de 100 pb (rango de 100 pb a 3,000 pb), los carriles 1-6 son las muestras obtenidas de recién nacidos de término, el carril C+ (control positivo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC J99, el carril C- (control negativo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 90028 y el carril B que corresponde al blanco. Se puede observar que no amplificó ninguna muestra para este gen. No se observó amplificación del alelo *s1b* del gen *vacA* en ninguna de las muestras.

### Amplificación del gen *vacAm1*



Fuente: elaboración propia

**Figura 14:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la determinación de amplificación de la región *m1* del gen *vacA* perteneciente a *H. pylori* en ADN extraído de levaduras de hisopado oral, con un tamaño esperado un amplicón de 290pb, donde el carril M es el marcador de peso molecular de 100pb (rango de 100pb a 3,000pb), los carriles 1-6 son las muestras obtenidas de recién nacidos de término, el carril C+ (control positivo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 43504, el carril C- (control negativo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 90028 y el carril B que corresponde al blanco.

## Amplificación del gen *vacAm2*



Fuente: elaboración propia

**Figura 15:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la determinación de amplificación de la región m2 del gen *vacA* perteneciente a *H. pylori* en ADN extraído de levaduras aisladas de hisopado oral, con un tamaño esperado un amplicón de 352pb, donde el carril M es el marcador de peso molecular de 100pb (rango de 100pb a 3,000pb), los carriles 1-6 son las muestras obtenidas de recién nacidos de término, el carril C+ (control positivo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC J99, el carril C- (control negativo) utilizando como control ADN extraído de la cepa ATCC 90028 y el carril B que corresponde al blanco.

Tabla 5 Genotipificación de la cepa de *H. pylori* en base a los genes de virulencia *cagA*, *dupA* y *vacA*, mediante el método de PCR.

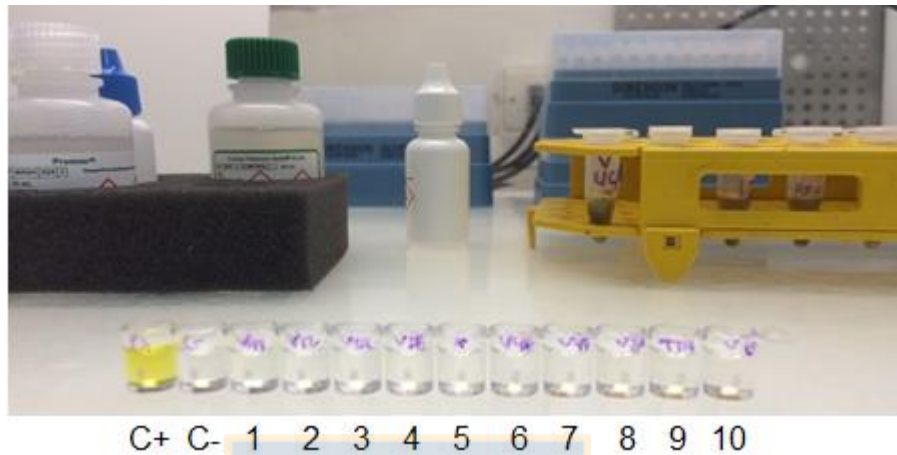
Muestra ARNr 16S positiva para <i>H. pylori</i> en RN	<i>cagA</i>	<i>dupA</i>	<i>vacAs1a</i>	<i>vacAs1b</i>	<i>vacAs2</i>	<i>vacAm1</i>	<i>vacAm2</i>	Genotipo
RN VMF53	-	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> -, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i> +

Fuente: elaboración propia

Como se observa en la tabla N°5, el genotipo de *H. pylori* encontrada intracelularmente en la especie *C.glabrata* en el cultivo oral del recién nacido, en base a los genes de virulencia *cagA*, *dupA* y *vacA*, fue *cagA*-, *dupA*-, *vacAs1a*+, mediante PCR.



## Kit Premier Platinum HpSA<sup>®</sup> Plus (Meridian Bioscience Europe, Italia)



Fuente: elaboración propia

**Figura 16:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) para la detección de antígeno de *H. pylori* en meconio de recién nacido de término, el pocillo color amarillo corresponde al control positivo, el control negativo se observa transparente y los pocillos del 1-10 corresponden a las muestras de meconio de recién nacidos. Los controles utilizados en la técnica corresponden a los ofrecidos por el fabricante del kit.

Tabla 6: Identificación de recién nacidos infectados con *H. pylori* intracelular en levaduras y en meconio a través de antígenos en estas heces

Variable		Frecuencia	Porcentaje (%)
<i>Antígeno de H. pylori</i>			
	Negativo	53	100
<i>ARNr 16S de H. pylori</i>			
	Negativo	52	98,1
	Positivo	1	1,9
Total		53	100

Fuente: elaboración propia

Como se observa en la tabla N° 6, el número de recién nacidos infectados con *H. pylori* intracelular en la especie *C. glabrata* corresponde al 1,9% (n=1) neonato, mientras que no hubo ninguna muestra positiva para antígeno de la bacteria en meconio.

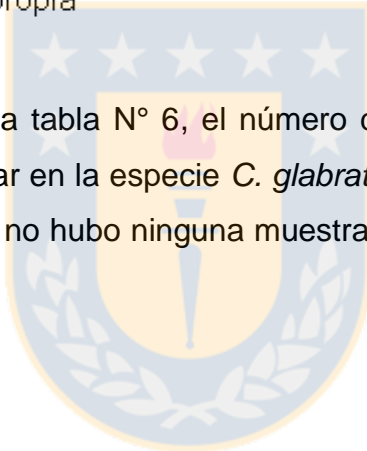


Tabla 7: Relación entre especies de levaduras encontradas en los cultivos orales de los recién nacidos y tipo de parto.

	Tipo de parto			
	Cesárea		Vaginal	
Cultivo oral	n	%	N	%
<i>C. albicans</i>	0	0	2	100
<i>C. glabrata</i>	1	50	1	50
Negativo	12	24,5	37	75,5
Total	13	24,5	40	75,5

Fuente: elaboración propia

Como puede observarse en la tabla N° 7, no hubo ningún cultivo positivo para *Candida albicans* en los neonatos que nacieron a través de vía cesárea y solo dos cultivos positivos en los neonatos que nacieron vía parto vaginal. En el caso de cultivo positivo para *Candida glabrata* hubo un cultivo positivo para un neonato que nació vía vaginal y otro cultivo positivo para otro neonato nacido vía cesárea.

Esto nos sugiere que puede haber mayor transmisión de levaduras desde la madre al neonato a través del paso del feto por el canal del parto y no así en los neonatos que nacen por vía alta.

Tabla 8 Genotipificación de cepas de *H. pylori* en base a los genes de virulencia *cagA*, *dupA* y *vacA*, mediante el método de PCR, de la madre del recién nacido positivo para *H. pylori*.

Muestra ARNr 16S positivas para <i>H. pylori</i>	<i>cagA</i>	<i>dupA</i>	<i>vacAs1a</i>	<i>vacAs1b</i>	<i>vacAs2</i>	<i>vacAm1</i>	<i>vacAm2</i>	Genotipo
OH5	-	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> -, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
OH7	+	-	+	-	-	+	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
OH11	+	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
OH22	+	-	+	-	-	+	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i> /m1
T2	+	-	+	-	-	+	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i> /m1
T3	+	-	+	-	-	+	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i> /m1
T4	+	-	+	-	-	+	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i> /m1
T7	+	-	-	-	-	+	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAm1</i>
T9	+	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
T11	-	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> -, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
T13	+	-	+	-	-	+	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i> /m1
VMF1	+	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
VMF4	+	-	-	-	-	-	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacA</i> -
VMF16	+	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacA</i> -s1a
VMF18	-	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> -, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
VMF32	-	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> -, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
VMF42	+	-	+	-	-	+	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i> /m1
VMF43	-	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> -, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
VMF47	+	-	+	-	-	+	-	<i>cagA</i> +, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i> /m1
VMF53	-	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> -, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
VMF54	-	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> -, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>
VMF57	-	-	+	-	-	-	-	<i>cagA</i> -, <i>dupA</i> -, <i>vacAs1a</i>

Fuente: elaboración propia

Como se observa en la tabla N°8, el genotipo de la cepa *H. pylori* encontrada intracelularmente en la especie *C.glabrata* de la muestra identificada como VMF53 (subrayada en rojo) obtenida de flujo vaginal de la madre del recién nacido positivo, cuando esta estaba embarazada de término, en base a los genes de virulencia *cagA*, *dupA* y *vacA*, fue *cagA*-, *dupA*-, *vacAs1A*+, mediante el método de PCR.

## 7.- DISCUSION

Hasta el momento las vías de transmisión más aceptadas de *H. pylori* son oral-oral y la vía fecal-oral, pudiendo llegar a infectar al ser humano por falta de medidas de higiene.<sup>(71)</sup> Sin embargo se establece que la infección por *H. pylori* ocurre a temprana edad en los países en desarrollo, presentando las más altas tasas de infección antes de los 10 años de edad<sup>(114)</sup>, lo que hace aconsejable que las estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección estén dirigidas a los niños<sup>(114)</sup>, sin tener certeza aún si los RN pudieran en el momento del parto adquirir la infección desde sus madres; es decir a través de transmisión vertical.

En este estudio se determinó que sí existió transmisión vertical de *H. pylori* a través del análisis de muestras de hisopado oral, muestras de meconio de RN(s) y muestras de flujo vaginal de las madres de estos neonatos cuando estaban en el término de su embarazo; a través de una relación endosimbiótica de *H. pylori* con *Candida* sp. Estudio semejante al realizado por *Siavoshi et al.*, (2005)<sup>(85)</sup>

Según una revisión bibliográfica publicada recientemente por Cararach Tur y cols. (2013), hasta un 28% de las gestantes puede mostrar *Candida* sp., en el flujo vaginal.<sup>(117)</sup> Entre el 75-90% de las VVC son producidas por *C. albicans*. El resto de levaduras son las llamadas especies no-albicans, entre las que destaca *Candida glabrata*<sup>(116)</sup>. Este dato está en concordancia con los resultados de este estudio; ya que, las especies de levaduras encontrada en la muestra de flujo vaginal de las madres de los recién nacidos cuando estas estaban en el tercer trimestre de embarazo fueron *C. albicans* y *C. glabrata*, (en primer y segundo orden respetivamente), especies que también se encontraron en las muestra de hisopado oral de los recién nacidos.

Este hecho supone que en el momento del parto, los recién nacidos se colonizan con las levaduras presentes en el flujo vaginal de la parturienta; sin embargo hay estudios que explican que la colonización de los neonatos también puede ocurrir por fuentes no vaginales.<sup>(84)</sup> Pero en el caso de este estudio las muestras de hisopado oral se tomaron antes del alta de la maternidad; o sea antes de los tres días de vida, lo que disminuye las posibilidades de colonización por otra fuente no vaginal.

El tipo de parto también es otro factor que juega un papel importante en la transmisión vertical de levaduras. En este estudio hubo dos neonatos que demostraron tener cultivo positivo para *C. albicans* en las muestras de hisopado oral que nacieron a través de parto vaginal y dos neonatos que demostraron tener cultivo positivo para *C. glabrata*, uno que nació por cesárea y otro que nació por vía vaginal, quien era el neonato positivo para *H. pylori* de forma intracelular en *C. glabrata*. Resultados semejantes a los encontrados en el estudio de *Siavoshi et al.*,(2005)<sup>(84)</sup> Esto podría sugerir una relación, ya que la transmisión vertical ocurre principalmente en aquellos RN(s) que nacen por vía vaginal.

Dentro de las limitantes de este estudio se señalan que 43 embarazadas con consentimiento informado firmado al momento de tomarles las muestras a sus recién nacidos, no quisieron continuar en el estudio, aludiendo que no querían someter a su hijo/hija a los procedimientos para la adquisición de las muestras, a pesar de la inocuidad de éstas. Por otro lado, dos madres se fueron antes del alta establecida y cuatro neonatos quedaron hospitalizados, por lo que finalmente fueron 53 RN(s) los que participaron en el estudio de los 102 de la muestra reclutada al principio.

En este estudio solo uno de los 53 RN(s) resulto positivo para *H. pylori* intracelularmente en la vacuola de la *C. glabrata*; este hecho se podría

explicar por qué las muestras de hisopado oral fueron tomadas en los RN(s) antes de ser dados de alta, es decir, a los dos días en el caso de nacimiento por parto vaginal y a los tres días de vida en el caso de nacimiento por cesárea; entonces se podría pensar que las levaduras aún no se encontrarían colonizando toda la boca de los RN(s), dificultando la obtención adecuada de la muestra. Por otro lado, los métodos que se utilizaron para realizar la identificación de las levaduras fueron escasos; esto se debió a que en general estos métodos son engorrosos, caros y dependen de la habilidad del operador, como se menciona en el estudio de Cararach Tur y cols. (2013)<sup>(117)</sup>, donde determinaron la asociación de las levaduras encontradas en la vagina de embarazadas en el tercer trimestre y las encontradas en muestras de hisopado oral de RN, argumentando que habían técnicas microbiológicas que detectaban *C. albicans* como CHROMagar *Candida*, pero al usar PCR en tiempo real aparecían otras levaduras no detectadas con la técnica anterior.

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* ha probado ser más difícil en niños que en adultos. Estudios científicos como los liderados por el O’Ryan *et al.*, (2013)<sup>(118)</sup> han descrito la existencia de pocos estudios que validan la efectividad de los distintos métodos no invasivos para establecer el diagnóstico de la infección en niños. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de métodos diagnósticos no invasivos que sean indoloros, seguros, de bajo costo y de fácil uso en población pediátrica, tanto con fines epidemiológicos como clínicos. De este modo, uno de los objetivos de este estudio fue detectar antígenos de *H. pylori* en meconio (HpSA) de RN de término. Este método, comparado con la búsqueda de antígenos de *H. pylori* por serología, no es invasivo, corresponde a una toma de muestra indolora, fácil de obtener y con un buen rendimiento (sensibilidad 94% y especificidad 97%). En este estudio ninguno de los 53 RN resultó positivo en la búsqueda de antígenos de *H. pylori* en meconio, lo cual se correlaciona con lo descrito en

el estudio chileno de O’Ryan et al. , (2013) <sup>(118)</sup> en el cual solo una de 102 muestras de deposición tomada a los 3 meses de vida resultó positiva. En dicho estudio se evaluó la infección por *H. pylori* de forma persistente o transitoria, en una cohorte de niños con seguimiento hasta los 5 años de vida, además de evaluar la dinámica de infección en ese grupo etario. El hecho de no encontrar RN detectados en nuestro grupo puede deberse al tiempo en que se tomó la muestra, que era a los tres días de nacido y a la poca cantidad de muestra recolectada.

Si bien la infección por *H. pylori* se adquiere tempranamente en la infancia, existe escasa información acerca del rol de la lactancia materna y la adquisición de la bacteria en la etapa neonatal/lactante. En nuestro estudio todos los RN tuvieron apego precoz y lactancia materna exclusiva hasta el momento del alta de la maternidad.

Se realizó la genotipificación de la cepa de *H. pylori* en base a los genes de virulencia *cagA*, *dupA* y *vacA*, mediante el método de PCR, tanto para la madre como para el RN, obteniendo perfiles genéticos concordante entre ambas cepas; por lo tanto, se sospecha que hubo transmisión vertical de *H. pylori* ya que *C. glabrata*, la levadura encontrada tanto en la madre como en el RN eran fenotípicamente iguales, además el perfil genotípico de ambas cepas *H. pylori*, encontradas intracelularmente en *C. glabrata* eran concordantes. Sin embargo, es necesario secuenciar el genoma completo de ambos cepas *H. pylori* encontrados para afirmar que hubo transmisión vertical.

Conocer si existe transmisión vertical desde el momento del nacimiento, con una muestra más amplia, incluyendo otras técnicas diagnósticas, y teniendo en cuenta las limitantes de este estudio, sería la meta para un próximo estudio.



## 8.- CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

*H. pylori* fue detectado intracelularmente en las vacuolas de *C. glabrata* por inmunofluorescencia, ensayo que se realizó utilizando anticuerpos policlonales de conejo IgG anti- *H. pylori* marcados con FITC, confirmándose por la presencia de genes específicos para *H. pylori*; esto en una muestra de hisopado oral de RN de término y una muestra de flujo vaginal de la madre de este RN, cuando estaba en el tercer trimestre de embarazo.

El genotipo de *H. pylori* encontrada intracelularmente en la especie *C. glabrata* en el cultivo oral del recién nacido, en base a los genes de virulencia *cagA*, *dupA* y *vacA*, fue *cagA*-, *dupA*-, *vacAs1a*+, determinado mediante PCR y este mismo resultado *cagA*-, *dupA*-, *vacAs1a*+, se encontró para *H. pylori* encontrada en la levadura *C. glabrata* en el flujo vaginal de la madre del RN en cuestión.

Lo anterior sugiere que existió transmisión vertical a través del paso del canal del parto del feto, pero se necesitaría secuenciar el genoma completo de ambas cepas de *H. pylori* encontradas para reafirmar la hipótesis de este estudio.

Sera necesario realizar un seguimiento a estos RN para detectar en que momento de sus vidas se infectan con *H. pylori* y utilizar otras técnicas microbiológicas como PCR en tiempo real para la detección de levaduras en muestras de hisopado oral, así como aumentar la cantidad de meconio en las muestras y seguramente realizar antígeno en deposiciones en muestras de heces posteriores al meconio de los neonatos.

## 9. - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lee A, Phillips MW, O'Rourke JL, Paster BJ, Dewhirst FE, Fraser GJ, *et al.* *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int J Syst Bacteriol.* 1992; 42 (1): 27-36.
2. Goodwin C. S. AJA, Chilvers T., Peters M. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989; p. 397–405.
3. Shen Z, Fox JG, Dewhirst FE, Paster BJ, Foltz CJ, Yan L, *et al.* *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47 (3): 627-34.
4. Geis G, Suerbaum S, Forsthoff B, Leying H, Opferkuch W. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 1993; 38 (5): 371-7.
5. Blaser MJ. An Endangered Species in the Stomach. *Scientific American.* 2005; 292 (2): 38-45.
6. Ueber G. B. Die Schlauch formigen drusen des magendarmkanals und die beziehnungen ihres epithels zu dem oberflachenepitel der schleimhaut. *ArchMirkAnat.* 1892; 42:326-74.

7. Freedberg A, Barron LE. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am. J. Dig. Dis.*; 1940. p. 443-5.
8. Palmer ED. Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. *Gastroenterology*. 1954; 27 (2): 218-20.
9. Robin Warren J, Marshall B. Unidentified Curved Bacilli On Gastric Epithelium In Active Chronic Gastritis. *The Lancet*. 1983; 321 (8336): 1273-5.
10. McNulty CA, Watson DM. Spiral bacteria of the gastric antrum. *Lancet*. 1984; 1(8385): 1068-9.
11. Romaniuk PJ, Zoltowska B, Trust TJ, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR, *et al.* *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J Bacteriol*. 1987; 169 (5): 2137-41.
12. Marshall B GC. Revised Nomenclature of *Campylobacter pylori* *dis.* *Inf J Syst Bacteriol*; 1987. p. 68.
13. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust*. 1985; 142 (8): 436-9.
14. Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, Schorah CJ, Taylor JD, Rathbone BJ, *et al.* Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut*. 1991; 32 (11): 1415-8.
15. Warren JR. Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*. 2000; 29 (3): 705-51.

16. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med. 2002; 347 (15): 1175-86. vulvovaginitis candidiásica recorrente. Prog. Obstet Ginecol. 2013; 56(2):108-116
17. Genta RM, Hamner HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. Hum Pathol. 1993; 24 (6): 577-83.
18. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. Ann Intern Med. 1994; 120(12): 977-81.
19. Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon AT, Hawkey P, Dixon MF. Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. J Clin Pathol. 1998; 51 (1): 55-61.
20. Caulet S, Robert I, Bardaxoglou E, Noret P, Tas P, Le Prise Y, *et al.* Malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue: a new etiology of amyloidosis. Pathol Res Pract. 1995; 191 (12): 1203-7.
21. Stolte M, Eidt S. Healing gastric MALT lymphomas by eradicating *H. pylori*? Lancet. 1993; 342 (8871): 568.
22. Fukui T, Okazaki K, Tamaki H, Kawasaki K, Matsuura M, Asada M, *et al.* Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. Lab Invest. 2004; 84 (4): 485-92.

23. Morgner A, Bayerdorffer E, Neubauer A, Stolte M. Gastric MALT lymphoma and its relationship to *Helicobacter pylori* infection: management and pathogenesis of the disease. *Microsc Res Tech*. 2000; 48 (6): 349-56.

24. Parkin DM BF, Ferlay J. Global Cancer Statistics. *Cancer J. Clin*. 2005. p. 74-108.

25. Soreide K, Sandvik OM, Soreide JA, Giljaca V, Jureckova A, Bulusu VR. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): A systematic review of population-based cohort studies. *Cancer Epidemiol*. 2015; 40:39-46.

26. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60 (5): 277-300.

27. McNamara D, El-Omar E. *Helicobacter pylori* infection and the pathogenesis of gastric cancer: a paradigm for host-bacterial interactions. *Dig Liver Dis*. 2008; 40 (7): 504-9.

28. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Volumen 61. Lyon, France: IARC 1994.

29. Burns M, Muthupalani S, Ge Z, Wang TC, Bakthavatchalu V, Cunningham C, *et al*. *Helicobacter pylori* Infection Induces Anemia, Depletes Serum Iron Storage, and Alters Local Iron-Related and Adult Brain Gene Expression in Male INS-GAS Mice. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0142630.

30. Yokota S, Konno M, Mino E, Sato K, Takahashi M, Fujii N. Enhanced Fe ion-uptake activity in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with iron-deficiency anemia. Clin Infect Dis. 2008; 46 (4): e31-3.

31. Mansour GM, Nashaat EH. *Helicobacter pylori* and hyperemesis gravidarum. Int J Gynaecol Obstet. 2009;106(1):63-4.

32. Eslick GD, Yan P, Xia HH, Murray H, Spurrett B, Talley NJ. Foetal intrauterine growth restrictions with *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16 (9): 1677-82.

33. Franceschi F, Gasbarrini A, Polyzos SA, Kountouras J. Extragastric Diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2015; 20 Suppl 1:40-6.

34. Mobley HLT. Urease. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001. P. 179-91.

35. Marshall BJ, Barrett LJ, Prakash C, McCallum RW, Guerrant RL. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. Gastroenterology. 1990; 99 (3): 697-702.

36. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect Immun. 1991; 59 (7): 2470-5.

37. Murakami M, Yoo JK, Teramura S, Yamamoto K, Saita H, Matuo K, *et al*. Generation of ammonia and mucosal lesion formation following hydrolysis of

urea by urease in the rat stomach. J Clin Gastroenterol. 1990; 12 Suppl 1: S104-9.

38. Suerbaum S. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. Trends Microbiol. 1995; 3 (5): 168-70.

39. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol. 1992; 37 (2): 123-7.

40. Olfat FO, Zheng Q, Oleastro M, Voland P, Boren T, Karttunen R, *et al.* Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005; 44 (2): 151-6.

41. Nell S, Kennemann L, Schwarz S, Josenhans C, Suerbaum S. Dynamics of Lewis b binding and sequence variation of the BabA adhesin gene during chronic *Helicobacter pylori* infection in humans. MBio. 2014; 5 (6).

42. Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. World J Gastroenterol. 2008; 14 (27): 4265-72.

43. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010;7(11):629-41.

44. Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. J Biol Chem. 1994; 269 (14): 10566-73.

45. Pelicic V, Reyrat JM, Sartori L, Pagliaccia C, Rappuoli R, Telford JL, *et al.* *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin associated with the bacteria increases epithelial permeability independently of its vacuolating activity. *Microbiology*. 1999; 145 ( Pt 8): 2043-50.
46. Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M, Suto H, Ito Y, *et al.* Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (8): 3906-16.
47. Yang JC, Kuo CH, Wang HJ, Wang TC, Chang CS, Wang WC. Vacuolating toxin gene polymorphism among *Helicobacter pylori* clinical isolates and its association with m1, m2, or chimeric *vacA* middle types. *Scand J Gastroenterol*. 1998; 33 (11): 1152-7.
48. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995; 270 (30): 17771-7.
49. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR, *et al.* Diversity of *Helicobacter pylori vacA and cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol*. 1998; 36 (4): 944-8.
50. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, *et al.* A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterol*. 2007; 133 (3): 926-36.



51. Willhite DC, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol.* 2004; 6 (2): 143-54.

52. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 1997; 112 (1): 92-9.

53. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Bmj.* 1998; 316 (7143): 1507-10.

54. Covacci A, Falkow S, Berg DE, Rappuoli R. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol.* 1997; 5 (5): 205-8.

55. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 1997; 40 (3): 297-301.

56. Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol.* 2001; 42 (5): 1337-48.

57. Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2005; 128 (4): 833-48.

58. Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, *et al.* Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet*. 2002; 359 (9310): 931-5.

59. Urita Y, Watanabe T, Kawagoe N, Takemoto I, Tanaka H, Kijima S, *et al.* Role of infected grandmothers in transmission of *Helicobacter pylori* to children in a Japanese rural town. *J Paediatr Child Health*. 2013; 49 (5) :394-8.

60. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, van der Merwe S, *et al.* *Helicobacter pylori* in developing countries. World Gastroenterol Organisation Global Guideline. *J Gastrointest Liver Dis*. 2011; 20 (3): 299-304.

61. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007; 21 (2): 205-14.

62. Porras C, Nodora J, Sexton R, Ferreccio C, Jimenez S, Dominguez RL, *et al.* Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). *Cancer Causes Control*. 2013; 24 (2): 209-15.

63. Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther*. 1995; 9 Suppl 2: 33-9.

64. Payao SL, Rasmussen LT. *Helicobacter pylori* and its reservoirs: A correlation with the gastric infection. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2016; 7 (1): 126-32.

65. Silva DG, Stevens RH, Macedo JM, Albano RM, Falabella ME, Veerman EC, *et al.* Detection of cytotoxin genotypes of *Helicobacter pylori* in stomach, saliva and dental plaque. *Arch Oral Biol.* 2009; 54 (7): 684-8.

66. Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Iwamoto T, Masuo Y, Yamada K, *et al.* Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the saliva of patients complaining of halitosis. *J Med Microbiol.* 2008; 57 (Pt 12): 1553-9.

67. Bahrami AR, Rahimi E, Ghasemian H. Detection of *Helicobacter pylori* in city water, dental units' water, and bottled mineral water in Isfahan, Iran. *Scientific World J.* 2013; 2013: 280510.

68. Talaei R, Souod N, Momtaz H, Dabiri H. Milk of livestock as a possible transmission route of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2015; 8 (Suppl 1): S30-6.

69. Momtaz H, Dabiri H, Souod N, Gholami M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in cows, sheep, goats and human beings. *BMC Gastroenterol.* 2014; 14:61.

70. Hamed ME, Hussein HM, El Sadany HF, Elgobashy AA, Atta AH. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among family members of infected and non-infected symptomatic children. *J Egypt Soc Parasitol.* 2013; 43 (3): 755-66.

71. Sahay P, Axon AT. Reservoirs of *Helicobacter pylori* and modes of transmission. *Helicobacter.* 1996; 1 (3): 175-82.

72. Eslick GD. *Helicobacter pylori* infection transmitted sexually via oral-genital contact: a hypothetical model. *Sex Transm Infect.* 2000; 76 (6): 489-92.
73. Dimitriadi D. *Helicobacter pylori*: a sexually transmitted bacterium? *Cent European J Urol.* 2014; 67 (4): 407-9.
74. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Fukuda M, Kawakami H, Ochiai K, *et al.* Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.* 2009; 9:197.
75. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284 (5418): 1318-22.
76. Percival SL, Thomas JG. Transmission of *Helicobacter pylori* and the role of water and biofilms. *J Water Health.* 2009; 7 (3): 469-77.
77. Fedichkina TP, Solenova LG, Zykova IE. On the rating of *Helicobacter pylori* in drinking water. *Gig Sanit.* 2014; 93 (6): 42-6.
78. Richards CL, Broadaway SC, Eggers MJ, Doyle J, Pyle BH, Camper AK, *et al.* Detection of Pathogenic and Non-pathogenic Bacteria in Drinking Water and Associated Biofilms on the Crow Reservation, Montana, USA. *Microb Ecol.* Doi: 2015.
79. Percival SL, Suleman L. Biofilms and *Helicobacter pylori*: Dissemination and persistence within the environment and host. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014; 5 (3): 122-32.

80. Andersen LP, Rasmussen L. *Helicobacter pylori*-coccoid forms and biofilm formation. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 56 (2): 112-5.
81. Rudnicka K, Graczykowski M, Tenderenda M, Chmiela M. *Helicobacter pylori* morphological forms and their potential role in the transmission of infection. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2014; 68: 219-29.
82. Bozue JA, Johnson W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. Infect Immun. 1996; 64 (2): 668-73.
83. Michel R, Burghardt H, Bergmann H. *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1995; 196 (6): 532-44.
84. Weig M, Gross U, Muhlschlegel F. Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. Trends Microbiol. 6. England 1998. p. 468-70.
85. Siavoshi F, Salmanian AH, Akbari F, Malekzadeh R, Massarrat S. Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. *Helicobacter*. 2005; 10 (4): 318-22.
86. Salmanian AH, Siavoshi F, Akbari F, Afshari A, Malekzadeh R. Yeast of the oral cavity is the reservoir of *Helicobacter pylori*. J Oral Pathol Med. 2008; 37 (6): 324-8.
87. Saniee P, Siavoshi F, Nikbakht-Broujeni G, Khormali M, Sarrafnejad A, Malekzadeh R. Immunodetection of *Helicobacter pylori*-specific proteins in oral and gastric *Candida* yeasts. Arch Iran Med. 2013; 16 (11): 624-30.

88. Salmanian A-H, Siavoshi F, Beyrami Z, Latifi-Navid S, Tavakolian A, Sadjadi A. Foodborne Yeasts Serve As Reservoirs Of *Helicobacter pylori*. J of F Safet. 2012; 32 (2): 152-60.
89. Siavoshi F, Taghikhani A, Malekzadeh R, Sarrafnejad A, Kashanian M, Jamal AS, *et al*. The role of mother's oral and vaginal yeasts in transmission of *Helicobacter pylori* to neonates. Arch Iran Med. 2013; 16 (5): 288-94.
90. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Trop. 2002; 81 (2): 101-10.
91. Garcia-Cuesta C, Sarrion-Perez MG, Bagan JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. J Clin Exp Dent. 2014; 6 (5): e576-82.
92. Aguirre Urizar JM. [Oral candidiasis]. Rev Iberoam Micol. 2002; 19 (1): 17-21.
93. Seebacher C. *Candida* in dermatology. Mycoses. 1999; 42 Suppl 1: 63-7.
94. Goncalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. Crit Rev Microbiol. 2015; 1-23.
95. Priestley CJ, Jones BM, Dhar J, Goodwin L. What is normal vaginal flora? Genitourin Med. 1997; 73 (1) :23-8.
96. Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. Int J Gynaecol Obstet. 2000; 71 Suppl 1: S21-7.

97. Leli C, Mencacci A, Meucci M, Bietolini C, Vitali M, Farinelli S, *et al.* Association of pregnancy and *Candida* vaginal colonization in women with or without symptoms of vulvovaginitis. *Minerva Ginecol.* 2013; 65 (3): 303-9.
98. Dennerstein GJ, Ellis DH. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2001; 41 (3): 326-8.
99. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007; 369 (9577): 1961-71.
100. Cannoni G. BS. Vulvovaginitis e Infecciones de Transmisión Sexual en la Adolescencia. *REV. MED. CLIN. CONDES;* 2011. p. 49-57.
101. Mukasa KJ, Herbert I, Daniel A, Sserunkuma KL, Joel B, Frederick B. Antifungal Susceptibility Patterns of Vulvovaginal species among Women Attending Antenatal Clinic at Mbarara Regional Referral Hospital, South Western Uganda. 2015; 5 (4): 322-31.
102. Van Doorn HC, Coelingh Bennink F. Vaginal infection caused by *Saccharomyces cerevisiae*. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1995; 139 (21): 1093-5.
103. Papaemmanouil V, Georgogiannis N, Plega M, Lalaki J, Lydakis D, Dimitriou M, *et al.* Prevalence and susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* causing vaginitis in Greek women. *Anaerobe.* 2011; 17 (6): 298-9.
104. Zhang F, Bao ZJ, Shi DM, Xiang P, Xiao L, Huang YQ, *et al.* Efficacy of a quadruple therapy regimen for *Helicobacter pylori* eradication after partial gastrectomy. *Braz J Med Biol Res.* 2016; 49 (2).

105. Alborai M, Saad M, Al-Ali J, Malik M, Asem N, Schmidt I, *et al.* Quadruple therapy versus standard triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* in Kuwait. Arab J Gastroenterol. 2015; 16 (3-4): 131-5.
106. Yang T, Li H, Chen J, Zeng W, Mao J, Zhang Z, *et al.* Epidemiological study on antibiotic resistance among *Helicobacter pylori* in Taizhou district, Zhejiang, 2010-2013. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2014; 35 (6): 704-7.
107. Phan TN, Tran VH, Tran TN, Le VA, Santona A, Rubino S, *et al.* Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: current situation and management strategy in Vietnam. J Infect Dev Ctries. 2015; 9 (6): 609-13.
108. Konno M, Yokota S, Suga T, Takahashi M, Sato K, Fujii N. Predominance of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by random amplified polymorphic DNA DNA fingerprinting analysis in Japanese families. Pediatr Infect Dis J 2008; 27: 999-1003
109. Ertem D, Harmanci H, Pehlivanoğlu E. *Helicobacter pylori* infection in Turkish preschool and school children: role of socioeconomic factors and breast feeding. Turk J Pediatr 2003; 45: 114-122
110. Chak E, Rutherford GW, Steinmaus C. The role of breastfeeding in the prevention of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. Clin Infect Dis 2009; 48: 430-437
111. Appelmek BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, *et al.* Lactoferrin is a lipid A-binding protein. Infect Immun 1994; 62: 2628-2632.



112. Jaime F, Villagrán A, Cerca P, Harris R. Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en niños: estimando la edad de adquisición Rev. Med Chile, 141 (2013), pp. 1249-1254.

113. Thomas JE, Dale A, Harding M, Coward WA, Cole TJ, Weaver LT. *Helicobacter pylori* colonization in early life. *Pediatr Res* 1999; 45: 218-223.

114. Harris PR, Serrano C, González CG. Utilidad del diagnóstico serológico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. *Rev Chil Ped* 2005; 76: 241-51.

115. García Heredia M, García SD, Copolillo ES, Cora Eliseth M, Barata MD, Vay CA, *et al.* Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a antifúngicos. *Rev Arg Microbiol.* 2006; 38:9—12

116. Odds FC. *Candida and candidosis*. 2nd ed. London: Baillie`re Tindall; 1988.

117. Cararach M, Delgado R, Davi E, Marimon E, Martínez JC, Gil-Antuñano S, *et al.* La vulvovaginitis candidiásica recurrente. *Prog. Obstet Ginecol.* 2013; 56 (2): 108-116

118. O’Ryan M, Rabello M, Cortés H.B, Lucero Y, Peña A, Torres J. Dynamics of *Helicobacter pylori* detection in stools during the first 5 years of life in Chile, a rapidly developing country *Pediatr Infect Dis J.* 32 (2013), pp. 99-103

## 10.- ANEXOS

### Anexo I: “Aprobación del estudio por el Comité de Ética del Servicio de Salud Concepción”.



#### ACTADE EVALUACION/APROBACION COMITE ETICO CIENTIFICO

COMITÉ CONSTITUIDO EN CONFORMIDAD A LA RESOLUCIÓN EXENTA N°2444  
DE FECHA 14/08/2012.

CONCEPCION, 15 de Julio de 2015

Código CEC Nuevo Proyecto

15-06-22

Sra.

MT Lillian Matamala Valdes  
Investigador Responsable,  
Dpto. de Obstetricia y Puericultura  
Universidad de Concepción  
Presente

Estimada Sra. Matamala,

Junto con saludarle, nos permitimos informar a usted que el Comité Etico Cientifico del Servicio de Salud Concepción, en reunión del 09 de Julio de 2015, aprobó las enmiendas a las observaciones efectuadas en el Acta correspondiente a la reunión del 11 de Junio de 2015, de este comité, relativas al estudio titulado “Determinación de la transmisión de *Helicobacter pylori* a través de levaduras de origen vaginal de mujeres embarazadas de término a sus recién nacidos”. **Sin embargo, se deja constancia que en el documento de información a las mujeres participantes, aún se utilizan algunos términos técnicos que deben ser aclarados verbalmente por la IR durante el proceso de solicitud del consentimiento.**

Miembros del Comité Ético Científico que participaron en la sesión del 09 de Julio de 2015

Q: 06 / 10

Nombre y apellidos	Profesión/Institución	Cargo CEC
Juan Munizaga M.	Ingeniero informático /HGGB	Integrante permanente
Juan Ricardo Saldías C.	Ingeniero Comercial / HGGB	Integrante permanente / Secretario CEC
Mónica Zúñiga	Matrona	Integrante permanente /externo
Nelson Pérez	Médico Psiquiatra / HGGB	Integrante permanente / Vice Presidente CEC
Sylvia Asenjo M.	Médico Endocrinóloga / UdeC	Integrante permanente /externo
Irma Alarcón	Químico farmacéutico / HGGB	Integrante permanente

Excusas:, Felipe León, MC Fellay, María A. Bidegain S., Mirta Méndez

#### **CONCLUSION.**

Por lo tanto, con fecha 09 de Julio de 2015, el Comité aprueba la realización de este proyecto, bajo su conducción como investigador responsable y procede a aprobar y timbrar con esta fecha los siguientes documentos:

- Protocolo de estudio “Determinación de la transmisión de *Helicobacter pylori* a través de levaduras de origen vaginal de mujeres embarazadas de término a sus recién nacidos”, versión 02, fecha 05 de Julio de 2015

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC DEL SSC. Página 1



## ACTA DE EVALUACION/APROBACION COMITE ETICO CIENTIFICO


COMITÉ CONSTITUIDO EN CONFORMIDAD A LA RESOLUCIÓN EXENTA N°2444  
DE FECHA 14/08/2012.

- Documento de Información al participante y Consentimiento Informado, Vs. 02 de fecha 05/07/ 2015

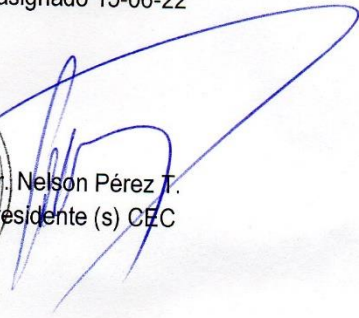
Además, este Comité solicita que:

- 1.- El investigador utilice el formulario de consentimiento informado con el timbre y fecha de aprobación del comité en los pacientes que serán enrolados en su institución.
- 2.- Los reportes de efectos adversos y enmiendas se entreguen al comité en conjunto con una opinión personal del investigador, sobre la relevancia de ellos en el proyecto, los riesgos y la voluntariedad del paciente.
- 3.- Informar a lo menos una vez al año de su estado de desarrollo, como también de cualquier publicación o presentación a congresos que de él se generen
- 4.- La validez de esta aprobación es por un año.
- 5.- Una vez finalizado el proyecto, el comité deberá ser informado de los resultados del estudio.
- 6.- Conservar toda la documentación en su poder por lo menos hasta quince años cerrado el estudio
- 7.- En toda futura correspondencia hacer referencia al número de código asignado 15-06-22

Atentamente,

  
Ing. Ricardo Saldías Cerda  
Secretario CEC



  
Dr. Nelson Pérez T.  
Presidente (s) CEC

- Distribución
- La indicada;
  - Dirección CESFAM Dr. Víctor Manuel F., O'Higgins y Tucapel
  - archivo CEC

---

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC DEL SSC.      Página 2

ESTE COMITÉ CUMPLE CON LAS GUÍAS DE BUENA PRACTICA CLINICA DEFINIDAS POR LA CONFERENCIA INTERNACIONAL DE ARMONIZACION(GCP-ICH); CON LAS LEYES CHILENAS N° 20.120 Y N° 19.628 Y CON LAS NORMAS INSTITUCIONALES DEL SERVICIO DE SALUD CONCEPCION



## Anexo II: Consentimiento Informado.



### INFORMACION AL PARTICIPANTE Y CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION



#### ANEXO 2

#### TITULO DEL ESTUDIO:

**"Determinación de la transmisión de *Helicobacter pylori* a través de especies de levaduras de origen vaginal de mujeres embarazadas de término a sus recién nacidos"**

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Lillian Matamala Valdés.

INVESTIGADOR ALTERNO: Apolinaria García Cancino.

CENTRO DE INVESTIGACION: Centro de Salud Familiar: Dr. Victor Manuel Fernández, O'Higgins y Tucapel.

TELÉFONO DE CONTACTO 24 HORAS: 91522311

#### INTRODUCCIÓN

La presente investigación es conducida por los siguientes profesionales: Lillian Matamala Valdés, Matrona Especialista en Perinatología, Docente del Departamento de Obstetricia y Puericultura, Facultad de Medicina, Apolinaria García Cancino, Dra. en Ciencias Biológicas, Docente del Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Katia Sáez Carrillo, Doctora en Ingeniería Eléctrica, área de Métodos de apoyo a la Decisión, Docente del Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Todas de la Universidad de Concepción.

Michelle Sánchez Alonzo, Tecnólogo Médico, estudiante de Magister en Ciencias Biomédicas con mención en microbiología clínica de la Universidad de Talca y Cristian Parra Sepúlveda, Biólogo, alumno del Magister en Microbiología de la Universidad de Concepción.

Se invita a usted a ser parte de esta investigación que tiene por finalidad determinar si usted es portadora de una bacteria denominada *Helicobacter pylori*, la cual puede estar viviendo dentro de una especie de levaduras llamada *Cándida Albicans* que está presente comúnmente en la vagina y de ser así, determinar si es que es transmitida en el momento del nacimiento a su hijo/hija.

Esta bacteria, antes mencionada, es causante de una infección que se localiza en el estómago, su presencia por largo tiempo en el estómago, constituye un importante factor de riesgo en la aparición de varias enfermedades gastroduodenales como gastritis crónica no autoinmune, úlcera gástrica, úlcera duodenal, cáncer gástrico y linfoma del tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT).

Además es importante que usted sepa que este microorganismo coloniza la superficie de la mucosa gastroduodenal de la mitad de la población mundial y que su prevalencia varía entre el 20% -50% en países industrializados y el 80% en países en vías de desarrollo.

Es bien sabido que la adquisición de la infección es durante la infancia pero la edad precisa y las rutas de transmisión no están completamente claras.

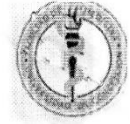
Existen investigaciones que han demostrado que la propagación intrafamiliar parece ser la principal vía de propagación de esta bacteria; ya que los niños son a menudo infectados por una cepa, que tiene una huella genética idéntica a la de sus padres, entonces tomando en cuenta que la infección es adquirida durante la infancia y además que estudios han demostrado que la cepa de los hijos tiene huellas idénticas a la de sus padres, se considera que la madre juega un papel importante transmisión temprana de este microorganismo al recién nacido, pudiendo ser la transmisión de madre a hijo/hija; lo que se conoce como transmisión vertical, una de ellas.

Por todo lo anterior mencionado se le solicita ser parte de este estudio que es cuantitativo, observacional, descriptivo de temporalidad transversal, leyendo la hoja informativa con atención y teniendo siempre presente que ante cualquier duda puede consultar de inmediato.

Versión: 02

Fecha de elaboración: 05 de julio de 2015

Página 1



## INFORMACION AL PARTICIPANTE Y CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION

### FUNDAMENTO

Este estudio está patrocinado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias y el Departamento de Obstetricia y Puericultura de la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción.

El objetivo de este estudio es determinar la existencia de transmisión de madre a hijo/hija de *Helicobacter pylori* a través de levaduras de origen vaginal como es la *Cándida Albicans* como habitad para esta bacteria y así transmitir la infección en el momento del parto a los hijos.

Esta investigación se realizará en los Centros de Salud Familiar (CESFAM): Dr. Victor Manuel Fernández, Tucapel y O'Higgins.

### RAZÓN POR LA QUE SE INVITA A LA PERSONA PARTICIPAR.

Como se mencionó anteriormente, las rutas de transmisión de *Helicobacter pylori*, aún no están completamente claras, conociéndose por otras investigaciones de este tipo (a las que usted puede acceder si así lo solicita) que los hijos e hijas podrían adquirir esta bacteria a través de sus padres; en donde específicamente la madre podría tomar un rol fundamental en la transmisión vertical; es decir, de madre a hijo/hija.

Entonces si al analizar su muestra vaginal usted diera positivo para *Helicobacter pylori* y las muestras de su recién nacido también, podríamos analizar que la transmisión de la bacteria ocurrió de madre a hijo y derivarla a usted y a su hijo e hija a especialista para su manejo.

### PARTICIPACIÓN Y RETIRO VOLUNTARIO

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.

Si usted se negase a participar esto no implicaría de ningún modo alguna sanción ni la pérdida de prestaciones otorgadas en su CESFAM.

Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento sin sanción de ninguna índole para usted ni para las atenciones de su hijo/hija.

### DISEÑO DEL ESTUDIO

En el estudio de investigación participarán las embarazadas de término y sus respectivos recién nacidos que se controlen en los Cesfam antes mencionados, que cumplan los criterios de inclusión y que accedan a participar en la investigación a través de la firma del consentimiento informado.

### DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO:

La matrona de su Cesfam, quien controla su embarazo le tomara una muestra de fluido vaginal en los últimos controles prenatales; es decir, cuando usted ya tenga un embarazo de término, entre las 37 a 40 semanas de gestación, en el mismo box de atención donde usted acude comúnmente a sus controles de embarazo. Esto significa que usted no será citada a un nuevo horario y fecha de atención, sino que la muestra será tomada en un control de embarazo. En esta muestra vaginal se buscara la presencia de una bacteria denominada *Helicobacter pylori*, asociada a enfermedades como úlcera péptica, gastritis duodenal y cáncer gástrico.

Es importante que usted sepa que la muestra se obtendrá de los fluidos que están en su vagina y para obtener dicha muestra se le colocara a usted un espéculo que no ocasionara molestias como dolor, ardor y menos alteraciones con su embarazo, solo puede ocasionar incomodidades en el momento de su postura que fácilmente se pasaran, pero nunca dolor ni problemas mayores ni para usted ni para su embarazo.

Versión: 02

Fecha de elaboración: 05 de julio de 2015



Página 2





## INFORMACION AL PARTICIPANTE Y CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION

Con respecto a la toma de las muestras de su recién nacido, la matrona Lillian Matamala Valdés quien es la investigadora responsable de esta investigación, se acercara al hospital donde nació su hijo/hija y a los tres días de vida de este, o antes que sea dado de alta de la maternidad, le tomara una muestra de hisopado oral (saliva del recién nacido) y para la obtención de la muestra de deposiciones a su hijo/hija, la misma matrona le proporcionara a usted un frasco de boca ancha, si es que usted acepta participar en la investigación, para que usted pueda depositar deposiciones de su hijo/hija y sea entregado por usted a la matrona.

Es importante que usted sepa que la obtención de las muestras de su hijo/hija de ninguna manera constituye procedimientos que originen dolor o molestias para su hijo/hija, ya que son muestras externas no invasivas.

No será necesario indagar ni en ficha clínica ni en la de su hijo/hija; ya que solo se necesitara las muestras mencionadas y datos necesarios que pueden ser proporcionados por usted verbalmente y seran adquiridos solo por la matrona responsable de la investigación.

De esta manera al procesar las muestras vaginales, orales y de deposiciones podremos saber si usted y/o su recién nacido respectivamente estan infectados con la bacteria *Helicobacter pylori*, informándole los resultados y derivándola a especialista para ambos.

### NÚMERO DE SUJETOS

La cantidad de participantes en el mejor de los casos será de un total mínimo de 111 embarazadas y sus respectivos recién nacidos.

### DURACIÓN ESPERADA

La investigación durara desde julio a noviembre, donde se recolectarán las muestras y en diciembre se analizaran los resultados.

### BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACION

Usted será contactada por el equipo de investigación para entregarle personalmente los resultados que arrojaron las muestras vaginales, orales y de deposiciones. Con estos resultados obtenidos usted podrá saber si está infectada con esta bacteria y si su hijo e hija también lo está y poder ser derivados a su CESFAM, para su respectivo tratamiento indicado en su centro de salud.

Le volvemos a reiterar que la obtención de las muestras no constituye de ninguna manera un riesgo para usted ni para su hijo/hija.

### RESPONSABILIDADES DEL SUJETO

Al participar de este estudio le solicitamos que al momento del nacimiento de su hijo e hija, usted nos pueda contactar para la toma de las muestras orales y de deposiciones del recién nacido.

### TERMINO ANTICIPADO

Es necesario comunicarle, que por si alguna condición su recién nacido queda hospitalizado dentro del período de toma de las muestras, no podrá ser parte de la investigación; ya que este es un criterio de exclusión que propuso el equipo de investigación.

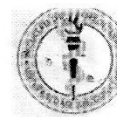
### COMPENSACIÓN

No hay costos alguno que usted tenga que asumir en este estudio.





## INFORMACION AL PARTICIPANTE Y CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION



### CONFIDENCIALIDAD

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él o posteriormente a la Investigadora responsable (Lillian Matamala Valdés) al email [lmataamala@udec.cl](mailto:lmataamala@udec.cl) o al teléfono 041-2204575. De la misma manera si tiene dudas respecto a sus derechos como participante de este estudio debe contactarse con el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción presidido por la Dra. María Antonia Bidegain. Por otro lado, debe saber que puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso la perjudique en ninguna forma.

### COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

Se le informara de los resultados obtenidos inmediatamente estos estén disponibles, le reiteramos que los resultados obtenidos será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.

Una vez obtenido los resultados de las embarazadas estos serán comunicadas a ellas de la siguiente manera: La investigadora responsable citara a la mujer con resultado positivo para *Helicobacter pylori* en el CESFAM correspondiente donde se controló el embarazo, donde se le manifestara el resultado positivo de su examen, procesado en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Se le entregara resultado por escrito emitido por la Doctora Apolinaria García Cancino, microbióloga e investigadora alterna de esta investigación.

La mujer será derivada con hora a médico especialista del CESFAM correspondiente, donde este seguirá el tratamiento.

Las mujeres con resultado negativo para *Helicobacter pylori*, serán notificadas vía contacto telefónico por la investigadora responsable y en control en CESFAM se le entregara en forma escrita resultado negativo avalado por la Doctora Apolinaria García Cancino.

En el caso de los resultados positivos en los recién nacidos el procedimiento se efectuara de la misma manera, contactando a la madre o tutores del niño/niña y derivándose a pediatra del CESFAM correspondiente para inicio del tratamiento

En caso de modificaciones importantes del diseño de este estudio que le afecten a usted o que se requiera de datos para otro estudio se solicitará un nuevo consentimiento con toda la explicación necesaria y que usted solicite.

### SEGUROS

En este estudio no existen riesgos asociados.

### PATOLOGIAS GES

En este estudio no existe tratamiento ni procedimiento que resulte incompatible con alguno de los procedimientos o tratamiento de alguna patología GES

### CONTACTO PARA EMERGENCIAS/CONTACTO CON CEC

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él o posteriormente a la Investigadora responsable (Lillian Matamala Valdés) al email

Versión: 02

Fecha de elaboración: 05 de julio de 2015

Página 4







## INFORMACION AL PARTICIPANTE Y CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION

---

[imatamala@udec.cl](mailto:imatamala@udec.cl) o al teléfono 041-2204575, celular: 91522311.

De la misma manera si tiene dudas respecto a sus derechos como participante de este estudio debe contactarse con el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción presidido por la Dra. María Antonia Bidegain S., Presidente del Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción, ubicado en San Martín 1436, Concepción, al teléfono 41 - 2722745.





## Anexo III: Recomendaciones del fabricante para sistema API *Candida*.

REF 10 500

**api**® *Candida*

08158 - es - 2011/10 **ES**

**IVD**

Sistema de identificación de levaduras

### INTRODUCCIÓN Y OBJETO DEL ENSAYO

API *Candida* es un sistema estandarizado para la identificación de levaduras en 18-24 horas, especialmente las que se encuentran más frecuentemente en microbiología clínica. Las especies identificables por el sistema están indicadas en la Tabla de Identificación al final de esta ficha técnica.

### PRINCIPIO

La galería API *Candida* se compone de 10 microtubos que contienen sustratos deshidratados, para realizar 12 tests de identificación (acidificación de azúcares o reacciones enzimáticas).

Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios espontáneos de color.

La lectura de las reacciones se hace con la ayuda de la Tabla de Lectura y la identificación, se obtiene consultando la lista de perfiles de la presente ficha técnica, o con la ayuda de un software de identificación.

### PRESENTACIÓN (caja de 10 tests)

- 10 galerías API *Candida*
- 10 ampollas de API NaCl 0,85% Medium (2 ml)
- 10 cámaras de incubación
- 10 hojas de resultados
- 1 prospecto proporcionado en el kit o disponible para descargar en [www.biomerieux.com/techlib](http://www.biomerieux.com/techlib)

### COMPOSICIÓN

#### Galería

La composición de la galería API *Candida* puede verse en el Tabla de Lectura de la presente ficha técnica.

#### Medio

API C/Na 0,85%	Cloruro de sodio	8,5 g
Medium	Agua desmineralizada	1000 ml
2 ml		

### REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

#### Reactivos / Instrumentación

- McFarland Standard (ref. 70 900), punto 3
- Aceite de parafina (ref. 70 100)
- Software de identificación *apiweb*™ (Ref. 40 011) (consultar con *biMérieux*)

#### Material

- Pipetas o PSipettes
- Gradillas para ampollas
- Protege-ampolla
- Escobillones
- Equipo general de laboratorio de bacteriología

### PRECAUCIONES DE UTILIZACIÓN

- Para diagnóstico *in vitro* y control microbiológico.
- Exclusivamente para uso profesional.
- Todas las muestra, cultivos de levaduras y productos inoculados deben ser considerados como potencialmente infecciosos y ser manipulados de manera apropiada. Durante toda la manipulación, deben respetarse las normas de asepsia y tomar las precauciones habituales de manipulación de las levaduras; consultar: "CLSI® M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Revisión en vigor*". Para información complementaria sobre las precauciones de manipulación, consultar: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.- CDC/NIH-Última edición" o la reglamentación vigente en el país de utilización.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad.
- Antes de su utilización, verificar la integridad del envase y de sus componentes.
- No utilizar galerías que hayan sufrido una alteración física: cúpula deformada, bolsa deshidratante abierta, ...
- Antes de su uso, permitir que los medios alcancen la temperatura ambiente.
- Abrir las ampollas con delicadeza del modo siguiente:
  - Introducir la ampolla en el prote-ampolla.
  - Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
  - Presionar a fondo el tapón blanco.
  - Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
  - Sacar la ampolla del protege-ampolla y conservarla para un próximo uso.
  - Retirar delicadamente el tapón.
- Los resultados presentados han sido obtenidos mediante la metodología indicada en la presente ficha técnica. Toda desviación de la metodología puede alterar los resultados.
- La interpretación de los resultados del test debe ser realizada teniendo en cuenta un contexto clínico o de otro tipo, el origen de las muestras, los aspectos macro y microscópicos de la colonia y, eventualmente, los resultados de otros tests.



### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

#### Galerías

Las galerías se conservan a 2-8°C hasta la fecha límite de utilización indicada en el envase.

#### Medios

Los medios se conservan a 2-30°C hasta la fecha límite de utilización indicada en el envase.

**MUESTRAS (RECOGIDA Y PREPARACIÓN)**

API Candida no debe ser utilizada directamente a partir de muestras de origen clínico o de otro tipo. Los microorganismos a identificar debe aislarse en una primera fase sobre un medio de cultivo adecuado según las técnicas usuales de bacteriología.

**MODO DE EMPLEO****Selección de las colonias**

Verificar mediante un examen microscópico que la cepa estudiada sea efectivamente una levadura.

Los siguientes medios pueden ser utilizados para aislar las colonias antes de utilizar la galería API Candida:

- agar Sabouraud 2 (con o sin antibiótico);
- agar Albicans ID 2;
- agar con sangre;
- si se utilizan otros medios para el aislamiento, realizar un subcultivo en uno de los medios antes mencionados.

**Preparación de la galería**

- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles de liberar gases (Ej.: Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc.)) en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.
- Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara.
- Secar la galería de su envase individual.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.
- Desechar la bolsa deshidratante.

**Preparación del inóculo**

- Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Medium (2 ml) como se indica en el párrafo "Precauciones de utilización".
- Con una pipeta o un escobillón, tomar una muestra de una o varias colonias idénticas, bien aisladas, y realizar una suspensión de turbidez igual a la del patrón 3 de McFarland; comparar con un control de turbidez o con un densitómetro. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).
- Homogeneizar bien la suspensión de levaduras. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.

**Inoculación de la galería**

- Repartir la suspensión anterior de levaduras a tubos, evitando la formación de burbujas (inclinar la cámara de incubación hacia el colocar la pipeta o la Pstipette en el lado de la
- Recubrir los 5 primeros tests (GLU a RAE) y test (URE) con aceite de parafina (tests su) inmediatamente después de inocular la galería

**NOTA:** La calidad del llenado es muy importante: tubos insuficiente o excesivamente llenos pueden ser fuente de resultados falsamente positivos o falsos negativos.

- Cerrar la cámara de incubación.
- Incubar 18-24 horas a 36°C ± 2°C en aire aerobia.

**LECTURA E INTERPRETACIÓN****Lectura de la galería**

Después de 18-24 horas de incubación:

- Leer las reacciones remitiéndose a la Tabla de la ficha técnica, y anotarlas en forma de + o - en la hoja de resultados.
- Atención: los tubos 8 y 9 son bifuncionales y la realización de 2 reacciones en el mismo tubo:
  - tubo 8: BXYL (test n° 8) / BNAG (test n° 11).
  - tubo 9: BGUR (test n° 9) / BGAL (test n° 12).

**Interpretación**

- Codificar las reacciones obtenidas en un número; en la hoja de resultados, los tests separados en grupos de tres y se asigna para cada grupo un valor 1, 2 ó 4. Sumando el interior de cada grupo de números que corresponden a reacciones positivas se obtienen 4 cifras que constituyen el perfil numérico de identificación.
- Se realiza a partir de la base de datos (V 2.1).
- Con la ayuda de un perfil numérico:
  - Localizar el perfil en la lista de la ficha técnica
- Por medio del software de identificación apiwe
  - Introducir manualmente por teclado el número de 4 cifras
- En caso de discriminación débil entre varias es se recomienda realizar tests complementarios para distinguirlos (ver tablas al final de esta ficha). Los resultados de estos tests se han obtenido en la literatura (o de la base de datos ID 32 C).

+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
GLU	DAL	SAC	URE	BAL	ARA	MAN	URE	BAL	URE	MAN	BAL
7			5			1			0		

7 510 *Candida tropicalis*

### CONTROL DE CALIDAD

Las galerías y medios de cultivo son objeto de controles de calidad sistemáticos durante las diferentes etapas de su fabricación. El usuario puede realizar además un control bacteriológico de los diferentes tests de la galería, preferentemente con la cepa: 1. *Candida kefyr* ATCC® 4135 o una de las siguientes cepas:

- 2. *Trichosporon mucoides* ATCC 201382\* ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.
- 3. *Candida glabrata* ATCC 2001

	GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	BMAL	$\alpha$ AMY	GXYL	BGUR	URE	BNAG	BGAL
1.	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
2.	+	+	+	-	V	+	+	-	+	+	+	-
3.	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Perfiles obtenidos después del cultivo de las cepas en agar Sabouraud

\* *Trichosporon mucoides* identificado como *Trichosporon* spp 1 en API CANDIDA

El usuario es responsable de asegurarse que el control de calidad ha sido realizado conforme a la legislación local vigente.

#### LÍMITES DEL ENSAYO

- El sistema API Candida está destinado únicamente a la identificación de las especies de la base de datos (ver Tabla de Identificación al final de la ficha técnica), es decir, que pertenezcan a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*, y sólo y exclusivamente a éstos. No puede utilizarse para identificar otros microorganismos ni para excluir su presencia.
- Sólo se deben utilizar los cultivos puros que contengan un sólo tipo de microorganismo.

#### RESULTADOS ESPERADOS

Consultar la Tabla de Identificación que se incluye al final de esta ficha técnica para aclarar los resultados esperados en las diferentes reacciones bioquímicas.

#### RENDIMIENTOS

- Han sido ensayadas 646 cepas de diversos orígenes, así como cepas de colección pertenecientes a especies de la base de datos:
  - 97,99% de las cepas han sido identificadas correctamente (con o sin ensayos suplementarios).
  - 0,46% de las cepas no han sido identificadas.
  - 1,55% de las cepas se han identificado incorrectamente.

#### ELIMINACION DE LOS RESIDUOS

Los reactivos no utilizados pueden eliminarse como los residuos no peligrosos.

Eliminar los reactivos utilizados, así como los materiales de un solo uso contaminados siguiendo los procedimientos relacionados con los productos infecciosos o potencialmente infecciosos.

Es responsabilidad de cada laboratorio la gestión de los residuos y efluentes que produce, según la naturaleza y peligrosidad, garantizando (o haciendo garantizar) su tratamiento y eliminación según las reglamentaciones aplicables.

## Anexo IV: Lectura de Sistema API.

TABLA DE LECTURA

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cúp)	REACCIONES	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
1) <u>GLU</u>	D-glucosa	1,4	acidificación (GLUCosa)	violeta gris violeta	amarillo verde / gris
2) <u>GAL</u>	D-galactosa	1,4	acidificación (GALactosa)		
3) <u>SAC</u>	D-sacarosa	1,4	acidificación (SACarosa)		
4) <u>TRE</u>	D-trehalosa	1,4	acidificación (TREhalosa)		
5) <u>RAF</u>	D-rafinosa	1,4	acidificación (RAFinosa)		
6) <u>SMAL</u>	4-nitrofenil- $\beta$ -D-maltopiranosida	0,08	$\beta$ -MALtosidasa	incolore	amarillo pálido- amarillo intenso
7) <u><math>\alpha</math>AMY</u>	2-cloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriosida	0,168	$\alpha$ -AMilasa	incolore	amarillo pálido- amarillo intenso
8) <u>BXYL</u>	4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida	0,095	$\beta$ -XILosidasa	incolore-amarillo muy pálido / azul / verde **	amarillo pálido- amarillo intenso
9) <u><math>\beta</math>GUR</u>	4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucuronida	0,063	$\beta$ -GLUCuRonidasa	incolore / azul/verde	amarillo pálido- amarillo intenso
10) <u>URE</u>	urea	1,68	UREasa	amarillo-naranja pálido	rojo
11) <u><math>\beta</math>NAG</u> (en tubo n°8) *	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida	0,09	N-Acetil- $\beta$ -GlucoSaminidasa	incolore / amarillo	azul / verde **
12) <u><math>\beta</math>GAL</u> (en tubo n°9) *	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosida	0,0815	$\beta$ -GALactosidasa	incolore / amarillo	azul / verde

\* Los tubos 8 y 9 son bifuncionales : tubo 8 : BXYL (test n° 8) /  $\beta$ NAG (test n° 11)  
tubo 9 :  $\beta$ GUR (test n° 9) /  $\beta$ GAL (test n° 12)

\*\* Cualquier coloración verde en la cùpula  $\beta$  = BXYL (-)  $\beta$ NAG (+)

• Las cantidades indicadas pueden ser ajustadas en función de los títulos de las materias primas.

METODOLOGÍA	p. I
LISTA DE PERFILES NUMÉRICOS	p. II
TABLAS	p. III
TABLA DE IDENTIFICACIÓN	p. V
BIBLIOGRAFÍA	p. VII
TABLA DE SÍMBOLOS	p. VIII



## Anexo V: Lista de perfiles numéricos para la identificación de especies de *Candida*.

api® Candida

081591 - xF - 2011/10

**LISTE DES PROFILS NUMÉRIQUES / LIST OF NUMERICAL PROFILES / LISTE DER NUMERISCHEN PROFILE / LISTA DE PERFILES NUMÉRICOS / ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΩΝ ΠΡΟΦΙΛ / LISTA ÖVER NUMERISKA PROFILER / LISTE OVER NUMERISKE PROFILER / LISTA PROFILI NUMERYCZNYCH**

0 403 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 043 <i>Cryptococcus neoformans</i> 2	
0 412 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 051 <i>C. neoformans</i> 2 / <i>C. neoformans</i> 1	
0 413 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 053 <i>C. neoformans</i> 2 / <i>Trichosporon</i> spp 1 / <i>Cryptococcus neoformans</i> 1	(1)
0 417 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 100 <i>Candida famata</i>	(2)
1 000 <i>Candida krusei</i> *	(2)	7 102 <i>Candida albicans</i>	(2)
1 010 <i>Candida krusei</i> *	(2)	7 104 <i>Candida famata</i>	
1 100 <i>Candida glabrata</i>		7 110 <i>Candida tropicalis</i> / <i>Candida albicans</i>	(5)
1 300 <i>Candida glabrata</i>		7 112 <i>Candida albicans</i>	
1 402 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 120 <i>Candida lusitanae</i> / <i>Candida famata</i> / <i>Candida guilliermondii</i>	(6)
1 403 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 200 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
1 407 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 204 <i>Candida kefyr</i>	
1 412 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 213 <i>Trichosporon</i> spp 1 / <i>C. neoformans</i> 1	(1)
1 413 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 220 <i>Candida guilliermondii</i> **	(6)
1 416 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 224 <i>Candida kefyr</i>	
1 417 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 241 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1	
1 443 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 243 <i>C. neoformans</i> 1 / <i>C. neoformans</i> 2 / <i>Trichosporon</i> spp 1	(1)
1 453 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 251 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1	
2 403 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 253 <i>C. neoformans</i> 1 / <i>Trichosporon</i> spp 1	(1)
2 412 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 300 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
2 413 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 310 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
2 417 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 312 <i>Candida albicans</i>	
3 000 <i>Geotrichum</i> spp / <i>Candida parapsilosis</i> / <i>Candida krusei</i> *	(2)	7 320 <i>Candida guilliermondii</i> **	(6)
3 001 <i>Cryptococcus neoformans</i> 2		7 324 <i>Candida kefyr</i>	
3 003 <i>C. neoformans</i> 2 / <i>Trichosporon</i> spp 2	(1)	7 341 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1	
3 020 <i>Geotrichum</i> spp	(2)	7 351 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1	
3 041 <i>Cryptococcus neoformans</i> 2		7 413 <i>Trichosporon</i> spp 1 / <i>Trichosporon</i> spp 2	
3 043 <i>Cryptococcus neoformans</i> 2		7 417 <i>Trichosporon</i> spp 1 / <i>Trichosporon</i> spp 2	
3 051 <i>Cryptococcus neoformans</i> 2		7 420 <i>Candida lusitanae</i> / <i>Candida guilliermondii</i>	(6)
3 053 <i>Cryptococcus neoformans</i> 2		7 441 <i>C. neoformans</i> 1 / <i>C. neoformans</i> 2	
3 100 <i>Candida famata</i> / <i>Candida glabrata</i> / <i>Geotrichum</i> spp	(3)	7 453 <i>Trichosporon</i> spp 1	
3 241 <i>C. neoformans</i> 1 / <i>C. neoformans</i> 2		7 457 <i>Trichosporon</i> spp 1	
3 251 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1		7 500 <i>Candida lusitanae</i> / <i>Candida tropicalis</i> / <i>Candida famata</i>	(6)
3 402 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 510 <i>Candida tropicalis</i>	
3 403 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 512 <i>Candida albicans</i>	
3 407 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 513 <i>Trichosporon</i> spp 1	
3 412 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 520 <i>Candida lusitanae</i>	
3 413 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 530 <i>Candida tropicalis</i>	
3 416 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 553 <i>Trichosporon</i> spp 1	
3 417 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 557 <i>Trichosporon</i> spp 1	
3 443 <i>Trichosporon</i> spp 2 / <i>C. neoformans</i> 2	(1)	7 600 <i>Candida guilliermondii</i> **	(6)
3 453 <i>Trichosporon</i> spp 2		7 603 <i>Trichosporon</i> spp 1 / <i>C. neoformans</i> 1	(1)
3 641 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1		7 611 <i>Trichosporon</i> spp 1 / <i>C. neoformans</i> 1	(1)
3 651 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1		7 613 <i>Trichosporon</i> spp 1	
3 653 <i>Trichosporon</i> spp 1 / <i>C. neoformans</i> 1 / <i>Trichosporon</i> spp 2	(1)	7 617 <i>Trichosporon</i> spp 1	
5 000 <i>Candida famata</i> / <i>Candida parapsilosis</i>	(3)	7 620 <i>Candida guilliermondii</i> **	(6)
5 100 <i>Candida famata</i>		7 641 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1	
5 104 <i>Candida famata</i>		7 643 <i>C. neoformans</i> 1 / <i>Trichosporon</i> spp 1	(1)
5 200 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		7 647 <i>Trichosporon</i> spp 1	
5 241 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1		7 651 <i>C. neoformans</i> 1 / <i>Trichosporon</i> spp 1	(1)
5 243 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1		7 652 <i>Trichosporon</i> spp 1	
5 251 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1		7 653 <i>Trichosporon</i> spp 1 / <i>C. neoformans</i> 1	(1)
5 253 <i>C. neoformans</i> 1 / <i>Trichosporon</i> spp 1	(1)	7 657 <i>Trichosporon</i> spp 1	
5 300 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Candida famata</i>	(4)	7 671 <i>C. neoformans</i> 1 / <i>Trichosporon</i> spp 1	(1)
5 641 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1		7 700 <i>Candida guilliermondii</i> **	(6)
5 651 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1		7 713 <i>Trichosporon</i> spp 1	
5 653 <i>Trichosporon</i> spp 1 / <i>C. neoformans</i> 1	(1)	7 717 <i>Trichosporon</i> spp 1	
6 653 <i>Trichosporon</i> spp 1		7 720 <i>Candida guilliermondii</i> **	(6)
7 000 <i>Candida parapsilosis</i>		7 741 <i>Cryptococcus neoformans</i> 1	
7 001 <i>Cryptococcus neoformans</i> 2		7 751 <i>C. neoformans</i> 1 / <i>Trichosporon</i> spp 1	(1)
7 002 <i>Candida albicans</i>		7 753 <i>Trichosporon</i> spp 1	
7 003 <i>Cryptococcus neoformans</i> 2		7 757 <i>Trichosporon</i> spp 1	
7 012 <i>Candida albicans</i>			
7 041 <i>C. neoformans</i> 2 / <i>C. neoformans</i> 1			

\* *Candida inconspicua* / *Candida norvegensis* possible / möglich / posible / possibile / possível / πιθανόν / möglich / mulig / możliwość

\*\* *Candida famata* possible / möglich / posible / possibile / possível / πιθανόν / möglich / mulig / możliwość

(1) of Table 1 / siehe Tabelle 1 / cf Tabla 1 / cf Tabella 1 / cfr. Quadro 1 / cf Πίνακας 1 / se Tabell 1 / Se Tabel 1 / patrz Tabela 1









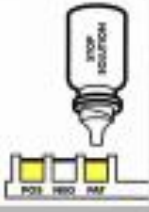
(2) of Table 2 / siehe Tabelle 2 / cf Tabla 2 / cf Tabella 2 / cfr. Quadro 2 / cf Πίνακας 2 / se Tabell 2 / Se Tabel 2 / patrz Tabela 2

(3) of Table 3 / siehe Tabelle 3 / cf Tabla 3 / cf Tabella 3 / cfr. Quadro 3 / cf Πίνακας 3 / se Tabell 3 / Se Tabel 3 / patrz Tabela 3

(4) of Table 4 / siehe Tabelle 4 / cf Tabla 4 / cf Tabella 4 / cfr. Quadro 4 / cf Πίνακας 4 / se Tabell 4 / Se Tabel 4 / patrz Tabela 4

Anexo VI: Procedimiento de detección de antígeno de *H. pylori* en meconio de recién nacidos de término.

PREMIER™ PLATINUM  
**HpSA PLUS**

SPECIMEN PROCESSING	<p><b>1</b></p> <p>Add 500 µL of Sample Diluent to a 5 mL tube.</p> 	<p><b>2</b></p> <p>30s1 stool. Using applicator stick, add approximately 2-4 mm diameter of thoroughly mixed stool to tube and emulsify using the applicator stick. Repeat stool during incubation period. Add 100 µL of stool to tube. Final optical density times.</p> 	<p><b>3</b></p> <p>Vortex for 15 seconds.</p> 
	<p><b>1</b></p> <p>Using the transfer pipette, add 100 µL of diluted stool to a test well (PNT).</p> 	<p><b>2</b></p> <p>Add 2 drops of positive control and 100 µL of negative control (sample diluent) reagents to designated wells.</p> 	<p><b>3</b></p> <p>Add 1 drop Enzyme Conjugate to all wells. Shake gently for 30 seconds. Seal the plate and incubate at 18-27°C for 1 hour.</p> 
	<p><b>1</b></p> <p>Wash 5 times with 7x Wash Buffer. *See package insert for proper wash procedure.</p> 	<p><b>2</b></p> <p>Add 2 drops of Substrate Solution to all wells. Shake gently for 20 seconds and incubate for 10 minutes at 18-27°C.</p> 	<p><b>3</b></p> <p>Add 2 drops of Stop Solution to each well and gently shake for 30 seconds.</p> 
INTERPRETATION OF RESULTS	<p><b>VISUAL</b></p> <p><b>NEGATIVE: COLORLESS TO FAINT YELLOW</b>  <b>POSITIVE: DEFINITE YELLOW COLOR</b></p> <p>A faint yellow color may be evaluated spectrophotometrically. If a spectrophotometer is unavailable, the result may be determined by an alternative method.</p>	<p><b>SPECTROPHOTOMETRIC SINGLE WAVELENGTH (450 NM)</b></p> <p>Positive Control: OD450 ≥ 0.840          Negative Control: OD450 &lt; 0.140          Positive Test: OD 450 ≥ 0.140          Negative Test: OD450 &lt; 0.140</p>	<p><b>SPECTROPHOTOMETRIC DUAL WAVELENGTH (450/630NM)</b></p> <p>Positive Control: OD450/630 ≥ 3.800          Negative Control: OD450/630 &lt; 0.100          Positive Test: OD 450/630 ≥ 0.100          Negative Test: OD 450/630 &lt; 0.100</p> <p><small>NOTE: This chart does not contain complete instructions for use. For further information, please thoroughly read the package insert.</small></p>

SN 11268 REVISION 12/05