



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA

VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE *HELICOBACTER*
***PYLORI* EN MUESTRAS DE SALIVA**

POR MICHELLE ANAÍS CORDONIER TELLO

Trabajo de Tesis presentado a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

Profesor Guía: Ph.D Felipe Zúñiga A.
Profesora Co-Guía: Ph.D Apolinaria García C.
Colaborador Médico: Carlos Valenzuela V.
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

23 de enero 2025
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| INDICE DE TABLAS | 5 |
| INDICE DE FIGURAS | 7 |
| 1. RESUMEN | 9 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 10 |
| 2.1 <i>Helicobacter pylori</i> | 10 |
| 2.2 Patogenicidad de <i>H. pylori</i> | 12 |
| 2.2.1 Genes de patogenicidad..... | 12 |
| 2.2.2 Patogenicidad..... | 17 |
| 2.3 Métodos de diagnóstico..... | 21 |
| 2.4 <i>H. pylori</i> en la cavidad oral | 24 |
| 3. PROBLEMA | 27 |
| 4. PREGUNTA..... | 27 |
| 5. HIPÓTESIS..... | 27 |
| 6. OBJETIVOS..... | 27 |
| 6.1 OBJETIVO GENERAL | 27 |
| 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 28 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 29 |
| 7.1 Obtención muestras de saliva y biopsias gástricas | 29 |
| 7.2 Extracción material genómico..... | 32 |
| 7.3 Cuantificación ADN muestras de saliva y biopsias | 36 |
| 7.4 Condiciones para PCR en tiempo real..... | 36 |
| 7.4.1 Protocolo amplificación genes <i>H. pylori</i> | 36 |
| 7.4.2 Elaboración de curva de calibrado | 38 |
| 7.5 Condiciones para Nested PCR..... | 39 |
| 7.5.1 Protocolo amplificación gen <i>16S rRNA H. pylori</i> | 39 |

| | |
|---|----|
| 7.5.2 Protocolo amplificación genes de virulencia <i>H. pylori</i> | 42 |
| 7.6 Validación Metodología | 44 |
| 8. RESULTADOS..... | 46 |
| 8.1 Pacientes y resultados test de ureasa..... | 46 |
| 8.2 Cuantificación de ADN de muestras de saliva y biopsia..... | 47 |
| 8.3 Detección gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de saliva y biopsia a través de PCR en tiempo real..... | 54 |
| 8.4 Detección gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de saliva y biopsia a través de Nested PCR..... | 59 |
| 8.5 Detección de genes de virulencia de <i>H. pylori</i> en muestras de saliva y biopsia por PCR convencional..... | 72 |
| 8.5.1 Gen <i>cagA</i> | 72 |
| 8.5.2 Gen <i>vacA s1</i> | 74 |
| 8.5.3 Gen <i>vacA m1</i> | 75 |
| 9. DISCUSIÓN | 77 |
| 10. CONCLUSIÓN | 86 |
| 11. REFERENCIAS | 88 |
| 12. ANEXOS | 95 |
| 12.1 Sobre consentimiento Informado para investigación seres humanos.... | 95 |
| 12.2 Protocolo manejo y desecho residuos biológicos | 95 |
| 12.3 Consentimiento Informado..... | 97 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Partidores utilizados para estudio de gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> por qPCR. | 37 |
| Tabla 2: Preparación mezcla de qPCR | 37 |
| Tabla 3: Protocolo Three-Step Fast | 38 |
| Tabla 4: Partidores utilizados para estudio de genes de <i>H. pylori</i> por Nested PCR. | 39 |
| Tabla 5: Preparación mezcla de Nested PCR (Primera amplificación) | 40 |
| Tabla 6: Preparación mezcla de Nested PCR (Segunda amplificación interna)..... | 41 |
| Tabla 7: Protocolo 3-step PCR para la primera amplificación | 42 |
| Tabla 8: Protocolo 3-step PCR para la segunda amplificación interna..... | 42 |
| Tabla 9: Partidores utilizados para estudio de genes de <i>H. pylori</i> para PCR convencional. | 43 |
| Tabla 10: Preparación mezcla de PCR convencional | 43 |
| Tabla 11: Protocolo 3-step PCR para reacción de PCR convencional..... | 44 |
| Tabla 12: Tabla 2x2 para validar un test candidato según estándar CLSI | 45 |
| Tabla 13: Características de pacientes reclutados..... | 47 |
| Tabla 14: Cuantificación de ADN de muestras de saliva y biopsia..... | 48 |
| Tabla 15: Valores de Ct para muestra concentrada y diluciones 1:10. | 55 |
| Tabla 16: Resultados de test de ureasa y qPCR por paciente para determinar la presencia de <i>H. pylori</i> | 58 |
| Tabla 17: Resultados de test de ureasa y Nested PCR por paciente para determinar la presencia de <i>H. pylori</i> | 67 |
| Tabla 18: Frecuencia <i>16S rRNA</i> + y <i>16S rRNA</i> - para <i>H. pylori</i> en muestras de saliva y biopsias gástricas. | 71 |
| Tabla 19: Frecuencia <i>cagA</i> + y <i>cagA</i> - para <i>H. pylori</i> en muestras de saliva y biopsias gástricas. | 74 |

Tabla 20: Clasificación y manejo de residuos biológicos. Extraído desde manual MATPEL (2016). 96

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Mapa global de prevalencia de infección por <i>H. pylori</i> en adultos durante los años 1970-2016 | 11 |
| Figura 2: Mecanismo de patogenicidad e infección de <i>H. pylori</i> | 20 |
| Figura 3: Esquema test rápido de ureasa (HelicotecUT® Plus). | 22 |
| Figura 4: Resultados biopsias gástricas en test rápido de ureasa HelicotecUT® Plus. (a) Resultado negativo, (b) Resultado positivo, (c) Resultado ambiguo .. | 31 |
| Figura 5: (a) Curvas de amplificación en escala linear, (b) Curva de melting, qPCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> ATCC 43504. Serie de diluciones 1:10. | 54 |
| Figura 6: Curva de calibrado serie de diluciones 1:10 control positivo <i>H. pylori</i> ATCC 43504. | 55 |
| Figura 7: Curvas de amplificación en escala linear qPCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . (a) muestras P1-P6, (b) muestras P7-P21. Curvas de melting qPCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . (c) muestras P1-P6, (d) muestras P7-P21 ... | 57 |
| Figura 8: Procedimiento de un Nested PCR | 60 |
| Figura 9: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción ensayo Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> | 61 |
| Figura 10: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P3, P6, P9, P12, P16 | 62 |
| Figura 11: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P1, P2, P7, P8, P9 | 63 |
| Figura 12: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P10, P11, P13, P14, P18 | 63 |
| Figura 13: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P20, P22, P24, P26, P27 | 63 |
| Figura 14: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P28, P29, P30, P31, P32 | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 15: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P33, P35, P36, P37, P39 | 64 |
| Figura 16: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P40, P41, P42, P43, P45 | 64 |
| Figura 17: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P46, P47, P49, P50, P51 | 65 |
| Figura 18: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P52, P53, P54, P55, P56 | 65 |
| Figura 19: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P57, P58, P59, P60, P61 | 65 |
| Figura 20: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P62, P63, P65, P66, P67 | 66 |
| Figura 21: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras P68, P69, P70, P71, P72, P73, P74, P76, P77. | 66 |
| Figura 22: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> . Muestras de saliva P4, P5, P15, P17, P19, P21, P23, P25, P34, P38, P44, P48, P64, P75. | 67 |
| Figura 23: Gel de agarosa (2%) de productos de reacción PCR convencional para gen <i>cagA</i> (región constante) para muestras positivas a gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> | 73 |
| Figura 24: Gel de agarosa (2%) de productos de reacción PCR convencional para gen <i>vacA</i> (región <i>s1</i>) para muestras positivas a gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> | 74 |
| Figura 25: Gel de agarosa (2%) de productos de reacción PCR convencional para gen <i>vacA</i> (región <i>m1</i>) para muestras positivas a gen <i>16S rRNA</i> de <i>H. pylori</i> | 75 |

1. RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa asociada a patologías como gastritis crónica y cáncer gástrico. Los métodos "gold standard" para su diagnóstico incluyen análisis histológico y prueba rápida de ureasa, ambos basados en biopsias gástricas obtenidas por endoscopia. Aunque confiables, son invasivos, incómodos y complejos, lo que limita su aplicación masiva.

Dada la alta prevalencia de *H. pylori* en Chile, es necesario desarrollar métodos diagnósticos menos invasivos. Estudios sugieren que este patógeno podría estar presente en la cavidad bucal. Así, se plantea la hipótesis de una correlación entre su presencia en saliva y biopsias gástricas.

Este estudio buscó determinar la presencia de *H. pylori* y marcadores genéticos en ambas muestras mediante PCR en tiempo real (qPCR). Debido a la baja sensibilidad inicial, se implementó Nested PCR, detectando *H. pylori* en 37 de 77 pacientes (48,1%). De estos, 8 (21,6%) presentaron el gen *cagA*, pero no se detectó el genotipo *vacAs1m1*.

Los resultados confirman la detección de *H. pylori* en saliva y biopsias mediante técnicas moleculares, aunque es necesario mejorar la sensibilidad. Validar esta metodología podría facilitar un diagnóstico menos invasivo y de mayor alcance poblacional, contribuyendo a un manejo más efectivo de la infección.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) corresponde a una bacteria helicoidal Gram negativa identificada en 1982 por Warren y Marshall, quienes descubrieron que la presencia de una infección bacteriana en el epitelio gástrico (principalmente en la zona del antro) era la causante de la gastritis crónica y aislando con éxito el microorganismo responsable [1]. Este hallazgo derriba la visión antigua en donde se asumía que el estómago, al poseer un pH ácido, lo convertía en una zona estéril. Es por ello que Warren y Marshall destacan en su trabajo la importancia de ver al estómago como un órgano no estéril, y que las bacterias presentes en este deben ser reconocidas e investigar su importancia. Gracias a este trabajo, el microorganismo aislado fue reconocido primeramente como *Campylobacter pylori*, siendo re-clasificado como *Helicobacter pylori* en 1989 [2].

En muchos países, la tasa de incidencia de infección por *H. pylori* ha disminuido en el tiempo, siendo relacionado con la mejora en la calidad de vida. Sin embargo, en países en vías de desarrollo esta incidencia sigue siendo alta, debiéndose

microorganismo generalmente son asintomáticas, pero cuando esto es persistente en el tiempo se ha asociado a patologías como el cáncer gástrico, gastritis crónica, úlcera péptica y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) [7] Debido a su capacidad patogénica a nivel gástrico es que ha sido designado como un carcinógeno de grupo 1 por parte de la Agencia de Investigación sobre el Cáncer de la OMS [8].

2.2 Patogenicidad de *H. pylori*

2.2.1 Genes de patogenicidad

H. pylori tiene la capacidad de sobrevivir por múltiples vías en el hospedador, a través de variados genes de patogenicidad, siendo estos los principales responsables de la colonización y supervivencia de la bacteria en el estómago [9].

2.2.1.1 BabA

Uno de los primeros mecanismos que posee este patógeno para iniciar la colonización y el ingreso a las células epiteliales gástricas consiste en producir y expresar OMPs (outer membrane proteins). Existen diversos genes que son parte

de las OMPs, pero en el caso particular para *H. pylori* se ha descrito una familia que se denomina como HOP (*Helicobacter* outer membrane proteins), correspondiente a una familia de adhesinas expresadas en la membrana externa de la bacteria, con la capacidad de unirse a mucinas y receptores de membrana de las células epiteliales gástricas. Existen variadas adhesinas que son miembros de la familia HOP, destacándose principalmente la adhesina de unión al antígeno de grupo sanguíneo o BabA [10].

La adhesina BabA corresponde a una proteína en la cual su tamaño varía de 75-80 kDa y codificado por el gen del mismo nombre, *babA*. Esta proteína fue inicialmente descrita cuando se descubrió que *H. pylori* tenía la capacidad de unirse a antígenos de grupos sanguíneos fucosilados marcados [11]. Concretamente, BabA tiene la función de mediar la adhesión de *H. pylori* a través de la unión al antígeno de Lewis b (Le^b), el cual es específico del epitelio gástrico, y a mucinas [10]. Sumado a esto, se ha visto que el gen codificante de esta proteína posee 2 variantes: *babA1* y *babA2*, pero se ha descrito que sólo este último sería funcionalmente activo [12]. Esta unión BabA-Le^b permitiría el anclaje de la bacteria al epitelio gástrico, dándole la oportunidad a esta para liberar hacia la lámina propia otras proteínas virales que continuaran este proceso infeccioso.

2.2.1.2 CagA

CagA es una proteína de 120-140kDa, la cual es codificada en una región del genoma de *H. pylori*, específicamente en la isla de patogenicidad (PAI) del “gen asociado a la citotoxina”, o *cag* PAI. Este último es un segmento de ADN de 40 kb, el cual se cree que se incorporó en el genoma de *H. pylori* mediante un proceso de transferencia horizontal. El gen *cagA* que codifica a la proteína CagA está localizado en un extremo de esta *cag* PAI, un segmento de ADN de 40 kb [13, 14]. En este sentido, *H. pylori* se puede subdividir en 2 clases de cepas: las que son *cagA* positivas (*cagA*+) y las que son *cagA* negativas (*cagA*-), siendo las más virulentas las que presentan este gen. Muchos de los genes presentes en la *cag* PAI codifican un sistema de secreción de tipo IV (T4SS), definida como una estructura de pilus similar a una jeringa [15, 16]. El T4SS es el responsable de transportar la proteína CagA y ciertos metabolitos hacia el citoplasma de las células epiteliales gástricas del huésped mientras ocurre la adherencia bacteriana en el estómago [17, 18]. Aproximadamente, un 60% de la población en países occidentales es considerada como *cagA*, mientras que en población de países pertenecientes a Asia Oriental las cepas son todas consideradas como *cagA*+ [16, 18].

2.2.1.3 VacA

La citotoxina vacuolante A o VacA, corresponde a una toxina que se produce como un precursor con un tamaño de 140kDa, el cual posteriormente se somete a un procesamiento proteolítico para producir esta citotoxina de 88kDa. Asimismo, VacA puede volver a pasar por un procesamiento proteolítico para finalmente formar 2 fragmentos, uno N-terminal de 33kDa (dominio p33) y otro C-terminal de 55kDa (dominio p55) [19, 20]. Cada fragmento cumple con una función en particular, el dominio p33 posee una actividad formadora de poros, importante en el proceso de formación de vacuolas que realiza la toxina, mientras que el dominio p55 se encarga de mediar la unión receptor-células diana en la zona apical de la membrana de las células epiteliales gástricas, permitiendo el ingreso de la toxina. Sumado a ello, realiza el ensamblaje de moléculas de VacA en estructuras oligoméricas, necesarias en el proceso de formación de vacuolas [9, 21, 22].

Todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen *vacA*, pero existen diferencias en la actividad de la toxina en las diversas cepas. Dicha diferencia se debe a la alta variedad alélica presente en el gen *vacA*, el cual se ha categorizado en 3 regiones principales y corresponden a las más estudiadas: región señal (*s*), región media (*m*) y región intermedia (*i*) [19, 23]. Estas regiones pueden subdividirse cada una en distintas familias, en el caso de la región *s* del gen *vacA* puede ser de tipo *s1*

(*s1a*, *s1b* y *s1c*) o *s2*. La región *s1* corresponde a las más secretada y se le ha asociado con la aparición de úlceras pépticas [24] . Para la región *m* este puede ser del tipo *m1* o *m2*, siendo la *m1* la que se encuentra asociada en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en procesos de apoptosis y autofagia [19]. La región *i*, de igual manera que la *m*, puede ser de tipo *i1* o *i2*, siendo señalada en algunos estudios como un importante marcador independiente de la toxicidad de *H. pylori*, debido a que la presencia de la región *i1* genera un mayor riesgo de atrofia y adenocarcinoma gástricos en los pacientes [25].

Dada la alta variabilidad alélica que puede presentar este patógeno, es posible la generación de diferentes combinaciones entre las distintas regiones previamente descritas, causando una variación en la capacidad citotóxica del gen *vacA*. Específicamente, se ha reportado que el genotipo conformado por las regiones *s1m1i1* correspondería a la cepa más virulenta de *H. pylori*, mientras que los genotipos que presentan las regiones *s2*, *m2* o *i2* dentro de su combinatoria alélica tendrían una menor toxicidad. En el caso particular de las cepas que poseen el genotipo *s2m2*, se ha descrito que su capacidad de virulencia es baja o casi nula [19, 20] .

Por lo tanto, el determinar la variabilidad presente en el gen *vacA* permite establecer una base para la identificación de los genotipos de *H. pylori* más asociados a cáncer.

Cada gen de virulencia previamente mencionado desempeña distintas funciones, las cuales en conjunto van a ayudar a la bacteria a colonizar e infectar exitosamente el epitelio gástrico. Por consiguiente, estos genes son los que componen el mecanismo de patogenicidad de *H. pylori*.

2.2.2 Patogenicidad

El mecanismo de patogenicidad de *H. pylori* ha sido ampliamente estudiado, destacándose por su alta complejidad y variabilidad según cuantos genes de virulencia exprese el patógeno (**Figura 2**), permitiendo entender cómo puede llegar a causar patologías gástricas en la población.

La colonización e infección puede ser dividida en 4 etapas: (i) adaptación al ambiente ácido propio del estómago, (ii) movilización y penetración al epitelio gástrico, (iii) adhesión y colonización de las células epiteliales gástricas, (iv) daño al tejido y generación de una respuesta inmune [26].

Como primera etapa, para que la bacteria pueda acercarse al epitelio gástrico esta debe primeramente sintetizar ureasa, la cual tiene la función de hidrolizar la urea en amoníaco y dióxido de carbono, neutralizando el pH ácido por un breve periodo de tiempo. Esto permite la supervivencia y colonización de la bacteria en el estómago [27]. Asimismo, se ha descrito que la ureasa producida por esta bacteria conduce a las células endoteliales a ser dependientes de ROS, permitiendo así el desarrollo de la infección de *H. pylori* en el huésped [28].

Para que la bacteria pueda hacer ingreso a las células epiteliales gástricas, primero debe adherirse a dichas células. Para ello, este produce y usa una variedad de proteínas de la membrana externa (OMP por sus siglas en inglés), en la que se destaca BabA. Como se describió en el capítulo anterior, *H. pylori* es capaz de expresar la adhesina BabA, la cual se destaca por su unión a receptores presentes en el epitelio gástrico, específicamente al antígeno Le^b [29]. Esta unión de la bacteria al epitelio permite el desarrollo de la colonización e infección, dado que de esta manera el patógeno es capaz de liberar sus otras proteínas virulentas a la lámina propia del estómago [4, 12].

El gen *vacA* va a inducir alteraciones de las uniones estrechas, conduciendo a la formación de grandes vacuolas en las células [30]. La formación de estas vacuolas genera diversos efectos en las células epiteliales gástricas, donde se

destaca principalmente la inducción a apoptosis de dichas células, el ingreso de antígenos propios de la bacteria, causando de esta manera una respuesta del sistema inmune a través la activación de monocitos/macrófagos extravasados [26, 27]. Estas células al activarse causan la liberación de diversas citoquinas pro-inflamatorias (IL-8, IL-6, IL-12 e IL-1 β) las cuales en consecuencia inducen la activación de células T_{H1} CD4+, y por consiguiente, la liberación de más citoquinas pro-inflamatorias [4]. Sumado a esto, se genera daño tisular en las células epiteliales gástricas debido a la liberación de ROIs (Intermediarios reactivos de oxígeno) [27, 31]. Todo esto en conjunto provocará la inflamación en la zona gástrica afectada.

El gen *cagA* va a ser secretado hacia el citoplasma de las células epiteliales gástricas con la ayuda del T4SS [4, 27]. Una vez secretado, este gen para por un proceso de fosforilación de tirosina, ya que de esta manera la forma fosforilada de CagA puede interaccionar directamente con otras moléculas presentes las células huésped [4]. Específicamente, la CagA fosforilada va a causar una desregulación en la transducción de señales en las células epiteliales gástricas, teniendo diversas consecuencias a nivel inmunológico [32]. Por ejemplo, se ha reportado que la unión de CagA a Sh2 (dominio de homología de src) desregula las funciones de dicho dominio y de la vía Ras-ERK, provocando diversos efectos como proliferación y movimiento anormal de las células epiteliales gástricas [33,

34]. También se ha reportado que la translocación de precursores metabólicos de lipopolisacáridos (LPS) como la HBP o β -ADP-heptosa generan una activación de la vía de señalización ALPK1-TIFA, induciendo procesos oncológicos en las células [35]. La activación de la vía ALPK1-TIFA, y por consiguiente la activación de la vía NF- κ B, genera un aumento de la respuesta inflamatoria, debido a que induce la liberación citoquinas pro-inflamatorias, provocando quimiotaxis y el posterior reclutamiento de neutrófilos, amplificando la respuesta inflamatoria [27, 30].

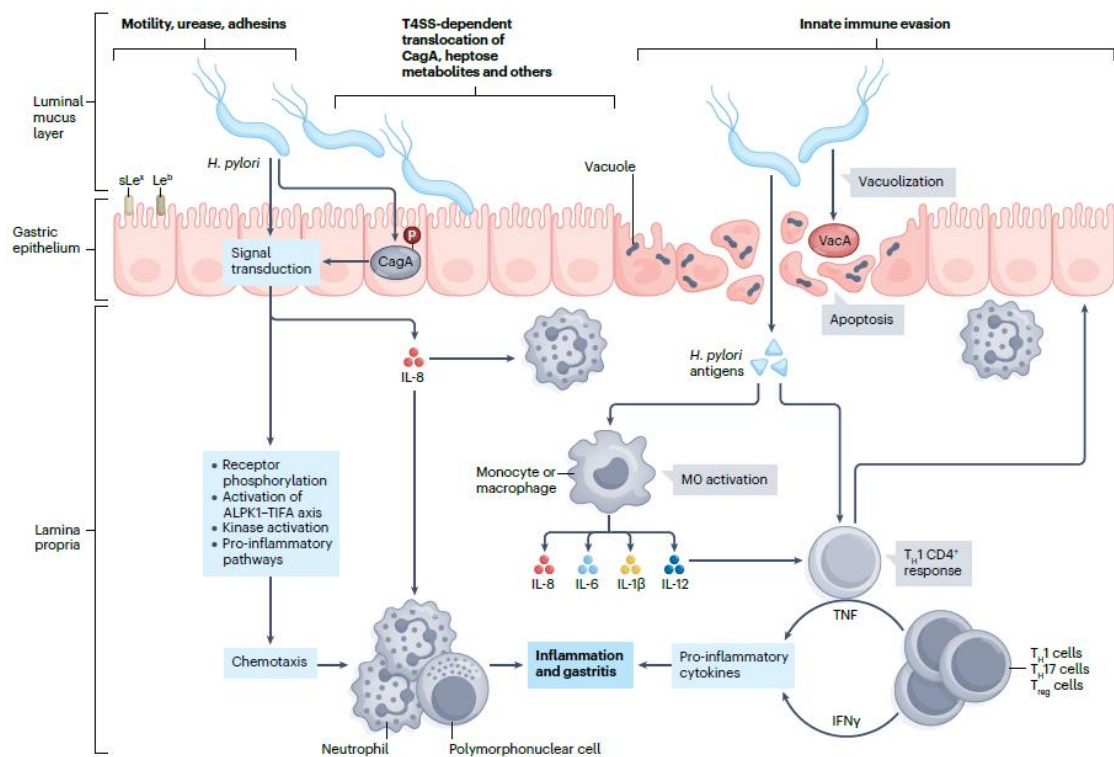


Figura 2: Mecanismo de patogenicidad e infección de *H. pylori*. Los aspectos clave de la colonización bacteriana incluyen la motilidad flagelar, la actividad de la ureasa, los mecanismos de adhesión y el daño al epitelio gástrico por vacuolización. La isla de patogenicidad de *H. pylori* ejerce un papel clave en la

inflamación, compone un sistema secretor tipo IV (T4SS) y promueve la inyección intracelular del antígeno del gen A asociado a la citotoxina (CagA). La respuesta inmunitaria del huésped se caracteriza por una invasión mucosa inicial con células polimorfonucleares, seguida de la activación del sistema inmunitario innato y adaptativo con interacciones complejas de células T cooperadoras 1 (TH1), TH17 y células T reguladoras (Treg). Leb, antígeno del grupo sanguíneo Lewis b; sLex, antígeno sialil-Lewis x [4]

El mecanismo de patogenicidad de *H. pylori* es un sistema altamente complejo, que para su éxito requiere de sus diversos factores y genes de virulencia los cuales le ayudan a aumentar la tasa de éxito de colonización e infección. La variabilidad en la patogenicidad de esta bacteria radica en que tantos factores y genes secretados por este se encuentren involucrados en todo el mecanismo de acción.

2.3 Métodos de diagnóstico

La detección de *H. pylori* puede realizarse mediante diversos test, los cuales corresponden a técnicas tanto invasivas como no invasivas. En la actualidad no existe un solo método el cual sea definido como gold standard, sino más bien es la combinación de estos métodos la que permite realizar un diagnóstico más certero y confiable [36]. Dentro de las técnicas invasivas podemos encontrar el

cultivo, el test rápido de ureasa y el análisis histológico. Estos dos últimos, en conjunto, se consideran como un “Gold Standard”.

En particular, el test de ureasa corresponde a un test rápido cualitativo para detectar *H. pylori* en biopsias gástricas basado en la actividad de la enzima ureasa, en donde este al hidrolizar la urea a amoníaco genera un aumento del pH y, por lo tanto, un cambio en la coloración del test de amarillo (negativo) a rosado (positivo). El método de uso consistía en transferir la muestra de biopsia directamente al papel del test, sellarlo y esperar un cambio de coloración (**Figura 3**).



Figura 3: Esquema test rápido de ureasa (HelicotecUT® Plus). Extraído desde manual de uso del fabricante. Extraído de Strong BioTech Corporation.

Para la aplicación y análisis a través de estas técnicas es necesario realizar la toma de muestra a través de endoscopias y obtener muestras de biopsias gástricas, por ello su clasificación como técnica invasiva. Estas técnicas tienen

ciertas limitaciones como la posibilidad de generar falsos negativos, siendo posible en casos de pacientes que se encuentren en tratamiento con inhibidores de la bomba de protones (IBP) o antibióticos, generando una disminución de la carga bacteriana [37]. Asimismo, la endoscopia corresponde a un procedimiento en el cual, tanto la preparación previa como el examen propiamente tal, no es un proceso cómodo para los pacientes. Sumado a esto, las biopsias pueden presentar sesgo de muestreo, ya que *H. pylori* no presenta una distribución uniforme en el estómago [38].

Por lo tanto, dentro de la búsqueda de métodos de detección que eviten la aplicación de una endoscopia para la toma y análisis de muestra, es que existe la otra categoría de las técnicas no invasivas de diagnóstico de *H. pylori*.

Dentro de estas técnicas encontramos la serología, antígeno en deposiciones y la prueba de aire aspirado. La ventaja más evidente, en comparación con los métodos invasivos radica en que no requieren de una muestra de mucosa gástrica y, por lo tanto, no es necesaria una endoscopia. En la serología, una desventaja es que este no es capaz de detectar una infección activa, ya que se ha visto que puede dar positivo en pacientes que presenten erradicada la bacteria. En el caso de antígeno en deposiciones, su desventaja radica principalmente en que disminuye su sensibilidad en pacientes que se encuentren

en tratamiento antibiótico. Sumado a esto último, también se debe tener precaución en pacientes con cuadro diarreico, ya que esto disminuye la carga patogénica y su concentración antigénica. Finalmente, la prueba de aire aspirado es un método diagnóstico con una alta sensibilidad y especificidad, pero que también puede presentar falsos negativos si el paciente se encuentra en tratamiento antibiótico [36, 38, 39].

Dentro de la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos que no sean invasivos para el paciente, surge la premisa de la posible presencia de este patógeno bacteriano en la cavidad oral [40–42]

2.4 H. pylori en la cavidad oral

Existen diversos estudios los cuales han investigado si la cavidad oral, especialmente saliva y placa dental, puede formar parte de un reservorio extra-gástrico y entregar las condiciones óptimas para que *H. pylori* sea capaz de sobrevivir en este ambiente y posteriormente bajar al sistema gastrointestinal, causando enfermedades en esta área. Específicamente la placa dental corresponde a un ambiente propicio debido a la presencia de urea, por lo que microorganismos productores de ureasa sobreviven en dicho lugar [43].

En otro estudio, se concluyó que existe una correlación entre la presencia de este microorganismo en la mucosa gástrica y en la cavidad oral. Asimismo, se señala que las técnicas de diagnóstico molecular, específicamente PCR, sería la más adecuada para detectar concentraciones mínimas de *H. pylori* [44].

En este sentido, un artículo concluyó que un test de Nested PCR utilizando muestras de saliva podría ser un método confiable y reproducible, ya que fueron capaces de amplificar repetidamente ADN proveniente de *H. pylori* a partir de muestras de saliva positivas, señalando que esta técnica molecular podría servir como un método de diagnóstico auxiliar en muestras controversiales (pacientes con sangrado o que se encuentren medicados con inhibidores de la bomba de protones) [45].

También se han establecido estudios comparativos entre *Helicobacter* que está presente en muestras de biopsias gástricas y de saliva, dado que existe la interrogante si el mismo genotipo de este patógeno pudiese estar presente tanto en el estómago como en la cavidad oral. Una investigación realizada en Chile señala que existe una variedad de genotipos de virulencia de *H. pylori* en el estómago y cavidad oral, identificando siete combinaciones diferentes [42].

Aun habiendo diferentes estudios que confirman la presencia del patógeno en la cavidad oral, existe una incertidumbre con respecto a si la saliva es una muestra fiable para la detección de la *H. pylori*, ya que su concentración de ADN puede verse alterada por diversos factores. Sin embargo, es importante ampliar las investigaciones en torno a este patógeno, más aún correlacionar la presencia de este en saliva y estómago, ya que las enfermedades causadas por *H. pylori* siguen teniendo un alto porcentaje de prevalencia a nivel mundial.

3. PROBLEMA

Dada la alta prevalencia y patogenia de *H. pylori* se hace necesario buscar otros métodos de detección que además se pueda aplicar de forma masiva. En este contexto, se ha visto que este patógeno se encontraría asociado a componentes de la cavidad bucal.

4. PREGUNTA

¿Cuál es la correlación entre la presencia de *H. pylori* en saliva y biopsia gástrica detectada por métodos de diagnóstico molecular?

5. HIPÓTESIS

Existe una correlación positiva entre la presencia de *H. pylori* por métodos de diagnóstico molecular en muestras de saliva y biopsia gástrica.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *H. pylori* en muestras de saliva a través de PCR en tiempo real.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia, por PCR en tiempo real, de marcadores genéticos de *H. pylori* y sus genes de virulencia, en muestras de saliva y biopsias gástricas.
2. Validar la detección por PCR en tiempo real de *H. pylori* en muestras de saliva.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención muestras de saliva y biopsias gástricas

Todas las muestras de saliva y biopsia gástrica fueron recolectadas previa explicación y firma del consentimiento informado (Anexo 12.3) por parte del paciente y de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Este estudio, junto con su respectivo consentimiento informado fue aprobado por el comité ético científico de la Universidad de Concepción y por el comité de ética del Servicio de Salud Talcahuano (Res N° 2308308150).

En el presente estudio participaron 77 pacientes, de los cuales 52 fueron mujeres (67,5%) y 25 hombres (32,5%), quienes asistieron a la Unidad de Endoscopía del Hospital Las Higueras para realizarse un examen de endoscopía digestiva alta (EDA).

Una vez realizado el ingreso del paciente a la sala de espera previo al examen, se procedió a la lectura y explicación del presente estudio por medio del consentimiento informado respectivo, siendo voluntaria la participación de este

trabajo de investigación. En el caso de querer participar, se solicitó la firma de dicho consentimiento, entregándole una copia de éste al paciente.

Posterior a la firma del documento, se le explicó al paciente como se realiza la toma de muestra de saliva, consistiendo en la estimulación de la salivación, a través de movimientos con la lengua por toda la cavidad oral y depositando la saliva acumulada en un tubo falcon de 15 mL. Es importante mencionar que se le informó al paciente evitar tocar la parte del superior del tubo con la mano y solo manipularlo desde la parte inferior, para así evitar contaminación.

Se recolectó una cantidad aproximada de 1-4 mL de saliva por paciente, la cual fue rotulada y refrigerada inmediatamente a -20°C hasta su posterior transporte. Una vez finalizado este paso, se le entregaba un vaso con 10-20mL de Simeticona al 2%, un fármaco que se administra al paciente previo al examen y que su función consiste en disminuir la cantidad de burbujas en el tracto gastrointestinal, causando además una disminución en la producción de saliva en el paciente. Por lo tanto, todas las tomas de muestras de saliva debieron realizarse antes de la ingesta de dicho fármaco.

Una vez el paciente hizo su ingreso a pabellón, se le solicitó al personal médico pertinente la muestra de biopsia junto con el resultado de test de ureasa. Esta muestra corresponde a la obtenida durante el examen EDA, la cual se extrae desde la zona del antro del estómago y se deposita directamente en el test de ureasa realizado al paciente. El tamaño promedio de la muestra correspondía a 0,4 a 1 g aproximadamente.

El tiempo requerido para observar los resultados del test de ureasa era variable, pudiendo verse en algunos casos de manera inmediata el cambio de coloración y en otros se debió esperar hasta 1 hora aproximadamente para validar el test (Figura 4).

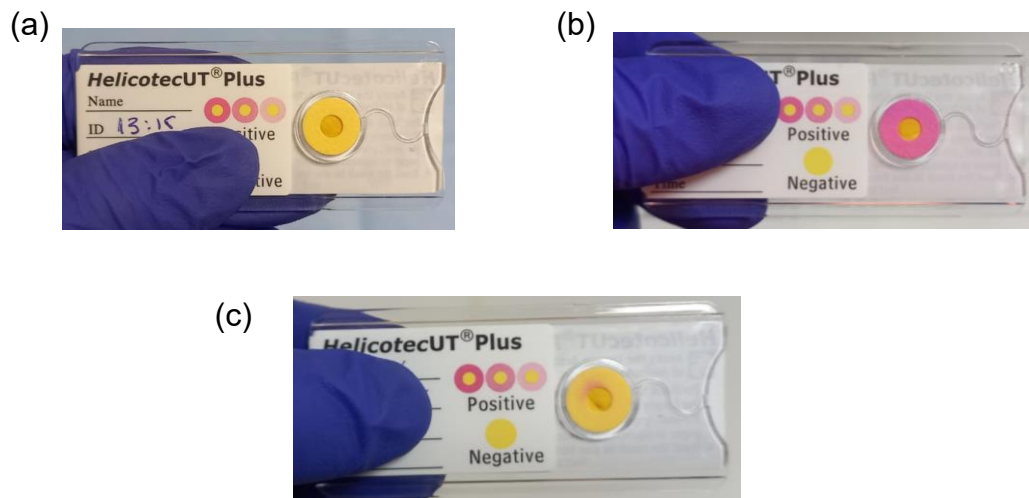


Figura 4: Resultados biopsias gástricas en test rápido de ureasa HelicotecUT® Plus. **(a)** Resultado negativo, **(b)** Resultado positivo, **(c)** Resultado ambiguo, validación a criterio del personal médico correspondiente.

Una vez validado el resultado del test, se procedió al retiro de la muestra de biopsia, procurando retirar la muestra con material estéril y depositándola en tubos eppendorf que contenían 200 µL de solución RNAlater™ (Thermo Fisher Scientific) para evitar la degradación del material genómico y refrigeradas inmediatamente a -20°C hasta su posterior traslado y procesamiento.

Todas las muestras se recolectaron y almacenaron a -20°C, para luego trasladarlas a las dependencias de la universidad en un bolso isotérmico, el cual contenía ice packs para permitir el mantenimiento de bajas temperaturas de las muestras.

7.2 Extracción material genómico

Para la extracción del ADN desde las muestras de biopsia gástrica, se utilizó el protocolo del kit Omega Bio-Tek (R6834-02), al cual se le realizaron modificaciones para optimizar el proceso de extracción desde tejidos.

➤ Protocolo purificación ADN desde tejidos:

1. Se extrajo la muestra de tejido o retirar del almacenamiento. Luego, se determinó el peso del tejido y se cortó con la ayuda de tijeras quirúrgicas.

2. Se agregó el tejido a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se adicionó 300µL de buffer TRK
3. Se añadió 50 µL de proteinasa K y se incubó a 60 °C por 2 horas. Se realizó vortex ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra.
4. Finalizada la incubación, se centrifugó la muestra por 1 minuto y se recuperó el sobrenadante, traspasándolo a un eppendorf nuevo.
5. Se añadió al sobrenadante 1 volumen (350 µL aproximadamente) de etanol al 70%.
6. Luego, se insertó la mini columna HiBind RNA en un tubo colector de 2 mL y se transfirió la muestra (700 µL) a dicha columna.
7. La muestra fue centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto.
8. Luego, se descartó el filtrado y reutilizó el tubo colector.
9. Se repitió paso 7 y 8 si es que aún quedaba muestra en la columna.
10. Se añadió 500 µL de RNA Wash Buffer I a la columna HiBind.
11. Se centrifugó a 10.000 rpm por 30 segundos.
12. Se descartó el filtrado y reutilizó el tubo colector.
13. Se añadieron 500 µL de RNA Wash Buffer II a la columna HiBind.
14. Se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto.
15. Nuevamente se descartó filtrado y reutilizó tubo colector.
16. Se repitieron pasos 13-15 para un segundo paso de lavado.

17. Se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos para permitir que se seque completamente la columna HiBind.
18. Se transfirió la columna HiBind a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
19. Se agregaron Añadir 40-70 μ L de Agua Nuclease-free, procurando agregar esta de manera directa en la matriz de la columna.
20. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

Para la extracción del ADN desde saliva se utilizó el Nucleic Acid Extraction Kit (Zybio Inc., China), el cual se basa en extracción por medio de beads magnéticos. Además, se utilizó el equipo automatizado EXM 6000 (Zybio Inc., China). y el material genético obtenido se almacenó a -80°C hasta análisis posterior.

➤ **Protocolo purificación ADN desde saliva:**

1. Se descongelaron muestras de saliva y se agitaron con vortex hasta homogeneizar.
2. Se añadieron 200 μ L de muestra (directa, sin concentrar ni diluir) más 15 μ L de proteinasa K a la placa de extracción 1.
3. Se encendió el equipo EXM 6000 y cargaron las placas de reactivos y de beads magnéticos en el instrumento automatizado.

4. Una vez preparadas las placas y reactivos, se seleccionó la opción de extracción "ZYBIO-T-200" e iniciar el proceso.
5. Finalizada la extracción, se retiró la placa de elución y se traspasó la solución de ácidos nucleicos en sus respectivos tubos eppendorf.
6. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

7.3 Cuantificación ADN muestras de saliva y biopsias

La cuantificación para todas las muestras (salivas y biopsias) se realizaron a través del equipo FlexA-200HT (Hangzhou AllSheng Instruments Co.,LTD), el cual corresponde a un lector de microplacas basado en un monocromador con un rango de longitud de onda de 200~1000 nm.

Para esto, se utilizaron 2 µL de muestra y como muestra blanco agua Nano Pure, depositando cada muestra en la placa u-Nano Ultra-Micro del equipo. Una vez cargadas las muestras, se introdujo la placa en el equipo y se realizaron las respectivas lecturas de concentración.

7.4 Condiciones para PCR en tiempo real

7.4.1 Protocolo amplificación genes *H. pylori*

Se utilizó un set de partidores específicos 16SHP (**Tabla 1**) para la detección del gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Además, se utilizó como control positivo la cepa de *H. pylori* ATCC 43504.

Tabla 1: Partidores utilizados para estudio de gen *16S rRNA* de *H. pylori* por qPCR.

| Partidor | Secuencia primers | Referencia |
|----------|----------------------------|------------|
| 16SHP-F | 5'-TGCGAAGTGGAGCCAATCTT-3' | [46] |
| 16SHP-R | 5'-GGAACGTATTCACCGCAACA-3' | |

- 1. Preparación de la mezcla de qPCR:** Se utilizó Brilliant II SYBR Green 2X QPCR Master Mix, partidor forward, partidor reverse, muestra control positivo y agua grado molecular (**Tabla 2**).

Tabla 2: Preparación mezcla de qPCR. Adaptado de manual de información de producto Brilliant II SYBR Green 2X QPCR Master Mix.

| Reactivos | Cantidad (µL) |
|------------------|-----------------|
| Master Mix | 25 |
| Partidor F | 1 |
| Partidor R | 1 |
| ADN | 1 |
| H ₂ O | 2 (3 para NTC*) |
| Volumen final | 10 |

Abreviaciones: NTC, No template control.

2. **Programa de amplificación:** Se utilizó el protocolo Three-step Fast Cycling señalado en el manual de información de producto para Brilliant II SYBR Green 2X QPCR Master Mix. El termociclador se programó de la siguiente manera:

Tabla 3: Protocolo Three-Step Fast. Adaptado desde manual de información de producto Brilliant II SYBR Green 2X QPCR Master Mix.

| Paso ciclador | T (°C) | Tiempo | Ciclos |
|---------------|--------|--------|--------|
| Activación | 95 | 10 min | 1 |
| Denaturación | 95 | 30 seg | 40 |
| Alineamiento | 50-65 | 60 seg | |
| Extensión | 72 | 30 seg | |

7.4.2 Elaboración de curva de calibrado

Se prepararon una serie de diluciones 1:10 a partir de una muestra concentrada, en este caso una desde control positivo de *H. pylori* cepa ATCC 43504. Cada dilución se amplificó por qPCR con los protocolos previamente mencionados. A partir de los valores Ct obtenidos se elaboró la curva de calibrado, permitiendo así calcular la eficiencia de reacción.

Durante la realización de este análisis, se planteó la implementación de otra técnica molecular que permitiese obtener resultados con mayor sensibilidad y especificidad, por lo que se añadió a la metodología del presente estudio la realización de Nested PCR tanto para las muestras de saliva como las de biopsia.

7.5 Condiciones para Nested PCR

7.5.1 Protocolo amplificación gen 16S rRNA *H. pylori*

Se utilizaron los siguientes set de partidores: HeliS-HeliN para la primera amplificación y Hpup-Hpdown para la segunda amplificación interna (**Tabla 4**). Además, se utilizará como control positivo la cepa de *H. pylori* ATCC 43504.

Tabla 4: Partidores utilizados para estudio de genes de *H. pylori* por Nested PCR.

| Partidor | Secuencia primers | Tamaño amplicon (bp) | Referencia |
|-----------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| HeliS | 5'-AAGAACCTTACCTAGGCTTGACATTG-3' | 497 | [45] |
| HeliN | 5'-CCGTGGGCAGTAGCCAATT-3' | | |
| Hpup | 5'-TGAGAGAATCCGCTAGAAATAGTGG-3' | 454 | |
| Hpdown | 5'-TAGCATCCTGACTTAAGGCAAACA-3'. | | |

1. **Preparación de la mezcla de PCR:** Se utilizó SapphireAmp Fast PCR Master Mix, junto con los set de partidores previamente mencionados, ADN (muestra biológica a analizar y control positivo de *H. pylori*) y agua grado molecular (**Tabla 5 y 6**).

Tabla 5: Preparación mezcla de Nested PCR (Primera amplificación). Adaptado de manual de información de producto SapphireAmp Fast PCR Master Mix.

| Reactivos | Cantidad (µL) |
|------------------|----------------------|
| Master Mix | 25 |
| Partidor F | 1 |
| Partidor R | 1 |
| ADN | 5 |
| H ₂ O | 18 (23 para NTC*) |
| Volumen final | 50 |

Abreviaciones: NTC, No template control.

Tabla 6: Preparación mezcla de Nested PCR (Segunda amplificación interna). Adaptado de manual de información de producto SapphireAmp Fast PCR Master Mix.

| Reactivos | Cantidad (µL) |
|------------------|----------------------|
| Master Mix | 25 |
| Partidor F | 1 |
| Partidor R | 1 |
| ADN | 1 |
| H ₂ O | 22 |
| Volumen final | 50 |

- Programa de amplificación:** Se utilizó el protocolo 3 step PCR señalado en el manual de información de producto SapphireAmp Fast PCR Master Mix (**Tabla 7 y 8**). El número de ciclos se modificó, utilizando el mencionado por Šeligová *et al.* en su protocolo [45].

Tabla 7: Protocolo 3-step PCR para la primera amplificación. Adaptado desde manual de información de producto SapphireAmp Fast PCR Master Mix.

| Paso ciclador | T (°C) | Tiempo | Ciclos |
|---------------|--------|--------|--------|
| Activación | 95 | 1 min | 1 |
| Denaturación | 98 | 5 seg | 37 |
| Alineamiento | 55 | 5 seg | |
| Extensión | 72 | 10 seg | |

Tabla 8: Protocolo 3-step PCR para la segunda amplificación interna. Adaptado desde manual de información de producto SapphireAmp Fast PCR Master Mix.

| Paso ciclador | T (°C) | Tiempo | Ciclos |
|---------------|--------|--------|--------|
| Activación | 95 | 1 min | 1 |
| Denaturación | 98 | 5 seg | 25 |
| Alineamiento | 55 | 5 seg | |
| Extensión | 72 | 10 seg | |

7.5.2 Protocolo amplificación genes de virulencia *H. pylori*

Se utilizaron los siguientes set de partidores: HeliS-HeliN para la primera amplificación y Hpup-Hpdown para la segunda amplificación interna (**Tabla 9**).

Además, se utilizó como control positivo la cepa de *H. pylori* ATCC 43504.

Tabla 9: Partidores utilizados para estudio de genes de *H. pylori* para PCR convencional.

| Gen | Región o alelo | Secuencia primers (5'-3') | Tamaño amplicon (bp) | Ref |
|-------------|----------------|--|----------------------|------|
| <i>cagA</i> | Constant 5' | F: TTGACC AACACCACAAACCGAAG R: CTTCCCTTAATTGCGAGATTCC | 183 | [47] |
| <i>vacA</i> | Signal | F: ATGGAAATACAACAAACACAC R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC | 259 (s1) 286 (s2) | |
| | Middle | F: CCATCTGTCCAATCAAGCGAG R: GCGTCTAAATAATTCCAAGG | 570 (m1) 645 (m2) | |

- 1. Preparación de la mezcla de PCR:** Se utilizó SapphireAmp Fast PCR Master Mix, junto con los set de partidores previamente mencionados, ADN (muestra biológica a analizar y control positivo de *H. pylori*) y agua grado molecular (**Tabla 10**).

Tabla 10: Preparación mezcla de PCR convencional. Adaptado de manual de información de producto SapphireAmp Fast PCR Master Mix

| Reactivos | Cantidad (µL) |
|------------------|----------------|
| Master Mix | 25 |
| Partidor F | 1 |
| Partidor R | 1 |
| ADN | 1-5 |
| H ₂ O | Completar a 50 |

2. **Programa de amplificación:** Se utilizó el protocolo 3 step PCR señalado en el manual de información de producto SapphireAmp Fast PCR Master Mix (**Tabla 11**).

Tabla 11: Protocolo 3-step PCR para reacción de PCR convencional. Adaptado desde manual de información de producto SapphireAmp Fast PCR Master Mix.

| Paso ciclador | T (°C) | Tiempo | Ciclos |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| Activación | 95 | 1 min | 1 |
| Denaturación | 98 | 5 seg | 30 |
| Alineamiento | 50-55 | 5 seg | |
| Extensión | 72 | 10 seg | |

7.6 Validación Metodología

El desempeño de la detección de *H. pylori* en saliva será comparado por el método gold standard (test de ureasa en biopsia gástrica) en cuanto a su sensibilidad y especificidad.

Los criterios de aceptabilidad para resultados de validación, definidos por el ISP, corresponden a una sensibilidad diagnóstica mayor o igual al 90% y especificidad diagnóstica mayor o igual a un 95%. La comparación del test candidato con el método de referencia se realizará usando una tabla 2x2, que presenta la clasificación de las muestras por cada test.

Para realizar una validación, el ISP recomienda utilizar lo indicado por la normativa del CLSI (un mínimo de 50 muestras VP y 50 negativas detectadas por el método de referencia) (**Tabla 12**).

Tabla 12: Tabla 2x2 para validar un test candidato según estándar CLSI

| | | Test Referencia | | |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| | | Muestras positivas (+) | Muestras negativas (-) | Total |
| Test candidato | Muestras positivas (+) | VP ≥ 50 | FP | VP + FP |
| | Muestras negativas (-) | FN | VN | FN + VN |
| | Total | VP + FN | FP + VN ≥ 50 | VP + FN + FP + VN |

Abreviaciones: VP, Verdaderos Positivos; FN, Falsos Negativos; FP, Falsos Positivos; VN, Verdaderos Negativos

8. RESULTADOS

8.1 Pacientes y resultados test de ureasa.

El reclutamiento de pacientes se realizó en la unidad de Gastroenterología entre diciembre de 2023 y mayo de 2024 (excepto febrero). Durante este periodo, 77 pacientes participaron en el estudio para analizar la presencia de *H. pylori* y sus genes de virulencia en saliva y biopsia gástrica.

De los 77 pacientes, a 63 (82%) se les realizó el test de ureasa, mientras que en 14 casos (18%) no se realizó este análisis. Es importante mencionar que los test de ureasa se realizan según el criterio del gastroenterólogo encargado del procedimiento, ya que en algunos casos por ejemplo la presencia de numerosos pólipos, úlceras o hallazgos similares indicaban un nivel de daño más avanzado, por lo que no era necesario realizar test de ureasa y solo se extraía una muestra de biopsia gástrica para enviar directamente al laboratorio clínico para un análisis histológico.

Dentro de los pacientes con test de ureasa, se pudo observar que el 26 (41%) de ellos fueron positivos a la bacteria *H. pylori*, mientras que 37 (59%) dieron un

resultado negativo a este patógeno. Además, de este universo de pacientes infectados, se observó que un 69% corresponden a mujeres y un 31% hombres **(Tabla 13)**.

Tabla 13: Características de pacientes reclutados.

| Características | Positivo T.U | Negativo T.U | Sin T.U |
|-----------------|--------------|--------------|----------|
| Total (%) | 26 (34%) | 37 (48%) | 14 (18%) |
| Edad media | 53 | 53 | 55 |
| Género | | | |
| Femenino | 18 (69%) | 26 (70%) | 8 (57%) |
| Masculino | 8 (31%) | 11 (30%) | 6 (43%) |
| Sintomatología | | | |
| Reflujo | 11 | 11 | 0 |
| Dolor abdominal | 8 | 12 | 0 |
| Acidez | 7 | 3 | 0 |
| Ninguna | 5 | 10 | 6 |

Abreviaciones: T.U, test de ureasa; EDA, Endoscopia digestiva alta.

8.2 Cuantificación de ADN de muestras de saliva y biopsia

A continuación, se tabularon los resultados obtenidos de la cuantificación de ADN para cada muestra biológica recolectada **(Tabla 14)**:

Tabla 14: Cuantificación de ADN de muestras de saliva y biopsia.

| Paciente | Tipo de Muestra | A260/280 | Concentración (ng/ μ L) |
|----------|-----------------|----------|-----------------------------|
| P1 | Saliva | 1.729 | 121 |
| | Biopsia | 1.738 | 22 |
| P2 | Saliva | 1.241 | 126 |
| | Biopsia | 1.937 | 147 |
| P3 | Saliva | 1.649 | 540 |
| | Biopsia | 1.804 | 39 |
| P4 | Saliva | 1.682 | 79 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P5 | Saliva | 1.797 | 117 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P6 | Saliva | 1.665 | 263 |
| | Biopsia | 1.884 | 56 |
| P7 | Saliva | 1.764 | 120 |
| | Biopsia | 1.863 | 36 |
| P8 | Saliva | 1.698 | 133 |
| | Biopsia | 1.901 | 84 |
| P9 | Saliva | 1.718 | 238 |
| | Biopsia | 1.858 | 3 |
| P10 | Saliva | 1.651 | 101 |
| | Biopsia | 2.014 | 28 |
| P11 | Saliva | 1.405 | 140 |
| | Biopsia | 1.937 | 11 |
| P12 | Saliva | 1.697 | 135 |
| | Biopsia | 1.957 | 69 |
| P13 | Saliva | 1.25 | 208 |
| | Biopsia | 1.971 | 69 |
| P14 | Saliva | 1.93 | 155 |
| | Biopsia | 1.963 | 129 |

Abreviación: N/A, No aplica

Continuación Tabla 14

| Paciente | Tipo de Muestra | A260/280 | Concentración (ng/μL) |
|----------|-----------------|----------|-----------------------|
| P15 | Saliva | 1.77 | 167 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P16 | Saliva | 1.419 | 72 |
| | Biopsia | 1.97 | 120 |
| P17 | Saliva | 1.276 | 82 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P18 | Saliva | 1.646 | 198 |
| | Biopsia | 1.978 | 127 |
| P19 | Saliva | 1.649 | 401 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P20 | Saliva | 1.486 | 263 |
| | Biopsia | 1.98 | 63 |
| P21 | Saliva | 1.211 | 325 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P22 | Saliva | 1.256 | 610 |
| | Biopsia | 1.963 | 142 |
| P23 | Saliva | 1.64 | 226 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P24 | Saliva | 1.612 | 251 |
| | Biopsia | 1.929 | 64 |
| P25 | Saliva | 1.571 | 182 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P26 | Saliva | 1.76 | 305 |
| | Biopsia | 1.869 | 32 |
| P27 | Saliva | 1.458 | 95 |
| | Biopsia | 2.006 | 83 |
| P28 | Saliva | 1.773 | 277 |
| | Biopsia | 1.924 | 90 |
| P29 | Saliva | 1.173 | 442 |
| | Biopsia | 1.724 | 21 |

Continuación Tabla 14

| Paciente | Tipo de Muestra | A260/280 | Concentración (ng/ μ L) |
|----------|-----------------|----------|-----------------------------|
| P30 | Saliva | 1.654 | 149 |
| | Biopsia | 1.909 | 123 |
| P31 | Saliva | 1.69 | 171 |
| | Biopsia | 1.913 | 54 |
| P32 | Saliva | 1.689 | 164 |
| | Biopsia | 1.817 | 29 |
| P33 | Saliva | 1.679 | 301 |
| | Biopsia | 2.009 | 178 |
| P34 | Saliva | 1.505 | 68 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P35 | Saliva | 1.497 | 68 |
| | Biopsia | 1.957 | 45 |
| P36 | Saliva | 1.525 | 172 |
| | Biopsia | 1.969 | 14 |
| P37 | Saliva | 1.65 | 569 |
| | Biopsia | 1.933 | 37 |
| P38 | Saliva | 1.546 | 139 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P39 | Saliva | 1.6 | 281 |
| | Biopsia | 2.006 | 22 |
| P40 | Saliva | 1.014 | 133 |
| | Biopsia | 1.978 | 28 |
| P41 | Saliva | 1.672 | 126 |
| | Biopsia | 1.93 | 28 |
| P42 | Saliva | 1.115 | 213 |
| | Biopsia | 1.999 | 79 |
| P43 | Saliva | 1.755 | 175 |
| | Biopsia | 2.089 | 1 |
| P44 | Saliva | 1.279 | 130 |
| | Biopsia | N/A | N/A |

Continuación Tabla 14

| Paciente | Tipo de Muestra | A260/280 | Concentración (ng/μL) |
|----------|-----------------|----------|-----------------------|
| P45 | Saliva | 1.72 | 383 |
| | Biopsia | 1.497 | 7 |
| P46 | Saliva | 1.696 | 152 |
| | Biopsia | 1.932 | 23 |
| P47 | Saliva | 1.375 | 174 |
| | Biopsia | 2.014 | 40 |
| P48 | Saliva | 1.729 | 156 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P49 | Saliva | 1.606 | 221 |
| | Biopsia | 2.378 | 36 |
| P50 | Saliva | 1.123 | 217 |
| | Biopsia | 1.753 | 4 |
| P51 | Saliva | 1.529 | 238 |
| | Biopsia | 18.897 | 1 |
| P52 | Saliva | 1.278 | 212 |
| | Biopsia | 2.458 | 3 |
| P53 | Saliva | 1.341 | 132 |
| | Biopsia | 1.95 | 126 |
| P54 | Saliva | 1.67 | 128 |
| | Biopsia | 1.929 | 159 |
| P55 | Saliva | 1.932 | 109 |
| | Biopsia | 2.917 | 3 |
| P56 | Saliva | 1.728 | 84 |
| | Biopsia | 1.972 | 6 |
| P57 | Saliva | 1.675 | 114 |
| | Biopsia | 1.956 | 61 |
| P58 | Saliva | 1.767 | 46 |
| | Biopsia | 0.68 | 0.3 |
| P59 | Saliva | 1.728 | 193 |
| | Biopsia | 1.951 | 26 |

Continuación Tabla 14

| Paciente | Tipo de Muestra | A260/280 | Concentración (ng/μL) |
|----------|-----------------|----------|-----------------------|
| P60 | Saliva | 1.686 | 73 |
| | Biopsia | 1.937 | 20 |
| P61 | Saliva | 1.477 | 59 |
| | Biopsia | 2.08 | 29 |
| P62 | Saliva | 1.485 | 146 |
| | Biopsia | 1.98 | 200 |
| P63 | Saliva | 1.831 | 33 |
| | Biopsia | 1.964 | 11 |
| P64 | Saliva | 1.396 | 155 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P65 | Saliva | 1.345 | 383 |
| | Biopsia | 1.739 | 11 |
| P66 | Saliva | 2.059 | 94 |
| | Biopsia | 1.684 | 315 |
| P67 | Saliva | 1.44 | 180 |
| | Biopsia | 2.053 | 51 |
| P68 | Saliva | 1.508 | 260 |
| | Biopsia | 1.522 | 5 |
| P69 | Saliva | 1.887 | 51 |
| | Biopsia | 2.933 | 19 |
| P70 | Saliva | 1.509 | 245 |
| | Biopsia | 1.995 | 10 |
| P71 | Saliva | 1.363 | 478 |
| | Biopsia | 2.244 | 17 |
| P72 | Saliva | 1.614 | 152 |
| | Biopsia | 1.939 | 51 |
| P73 | Saliva | 1.194 | 163 |
| | Biopsia | 1.445 | 6 |
| P74 | Saliva | 1.667 | 326 |
| | Biopsia | 1.912 | 30 |

Continuación Tabla 14

| Paciente | Tipo de Muestra | A260/280 | Concentración (ng/ μ L) |
|----------|-----------------|----------|-----------------------------|
| P75 | Saliva | 1.69 | 128 |
| | Biopsia | N/A | N/A |
| P76 | Saliva | 1.754 | 200 |
| | Biopsia | 2.006 | 124 |
| P77 | Saliva | 1.724 | 123 |
| | Biopsia | 4.263 | 8 |

A través de la cuantificación del ADN extraído, podemos observar que las muestras de saliva en comparación a las muestras de biopsia presentarían una concentración mucho más elevada. Sin embargo, es importante también observar la pureza de la extracción, a través del valor A260/280 de este ensayo. Como se puede apreciar, si bien varias de las muestras presentan un valor de pureza en un valor cercano a 1.8 el cual es considerado generalmente como de “buena pureza” de ADN, existen muchos otros que tienen valores bajo 1.8. Asimismo, se puede sugerir que las muestras que poseen un valor de A260/280 menor a 1.8 podría deberse a una contaminación química residual de los reactivos utilizados para la extracción o también contaminación por presencia de proteínas, pudiendo resultar finalmente en una sobre estimación en los valores de concentración obtenidos. También se puede sugerir que al estar trabajando con muestras en las cuales hay presencia de microorganismos exista por lo tanto la presencia, por ejemplo, de lipopolisacáridos, los cuales van a generar una absorbancia de fondo [48–50].

8.3 Detección gen 16S rRNA de *H. pylori* en muestras de saliva y biopsia a través de PCR en tiempo real.

Inicialmente se realizó una curva de calibrado para verificar la eficiencia de reacción para la amplificación del gen 16S rRNA en el control positivo para *H. pylori*, correspondiente a la cepa ATCC 43504 (**Figura 5**).

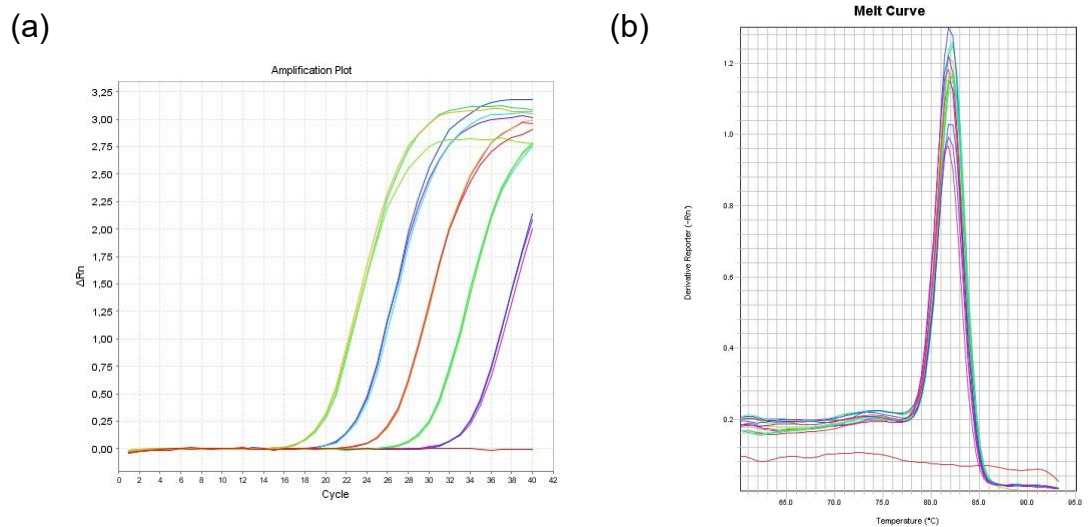


Figura 5: (a) Curvas de amplificación en escala lineal, (b) Curva de melting, qPCR para gen 16S rRNA de *H. pylori* ATCC 43504. Serie de diluciones 1:10.

Para esta amplificación se obtuvieron los siguientes valores de Ct para la muestra original y la serie de diluciones (**Tabla 15**).

Tabla 15: Valores de Ct para muestra concentrada y diluciones 1:10.

| Muestra | Valor Ct | | | Promedio Ct |
|-------------|----------|-------|-------|-------------|
| Concentrado | 20,54 | 20,62 | 20,78 | 20,64 |
| Dilución 1 | 24,09 | 23,97 | 23,91 | 23,99 |
| Dilución 2 | 27,41 | 27,33 | 27,44 | 27,39 |
| Dilución 3 | 31,11 | 30,98 | 31,00 | 31,03 |
| Dilución 4 | 35,00 | 34,92 | 35,20 | 35,04 |

A partir de los valores Ct, se elaboró la curva de calibrado respectiva para esta reacción (**Figura 6**).

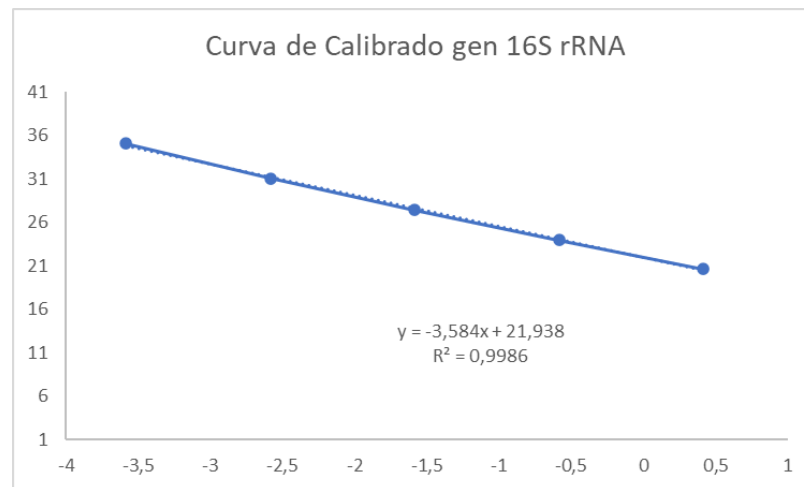


Figura 6: Curva de calibrado serie de diluciones 1:10 control positivo *H. pylori* ATCC 43504.

En base al valor de la pendiente obtenida en la curva de calibrado, se calculó el valor de la eficiencia de reacción:

Cálculo eficiencia de reacción:

$$E = 10 ^ { (-1/\text{pendiente}) - 1}$$

$$E = 10 ^ { (-1/-3,584) - 1}$$

$$E = 0,9012$$

Valor de la eficiencia de reacción en porcentaje:

$$\%E = E \times 100\%$$

$$\%E = 0,9012 \times 100\%$$

$$\%E = \mathbf{90,12\%}$$

Por lo tanto, se concluye que la eficiencia de reacción para el gen *16S rRNA* del control positivo de *H. pylori* ATCC 43504 corresponde a un valor del 90,12%.

Una vez verificada la eficiencia de reacción para el gen de interés, se procedió a realizar PCR en tiempo real para las muestras de saliva y biopsia recolectadas en la Unidad de Endoscopía del Hospital Las Higueras (**Figura 7**).

Los resultados obtenidos a través del qPCR (**Tabla 16**) mostraban la amplificación del gen *16S rRNA* en las muestras de biopsia provenientes de pacientes que tenían un resultado positivo para el test de ureasa realizado en el hospital. Sin embargo, no fue posible la detección de este gen en las muestras

de saliva de estos mismos pacientes, así como también en ninguna de las muestras de pacientes que obtuvieron un resultado negativo para el test de ureasa.

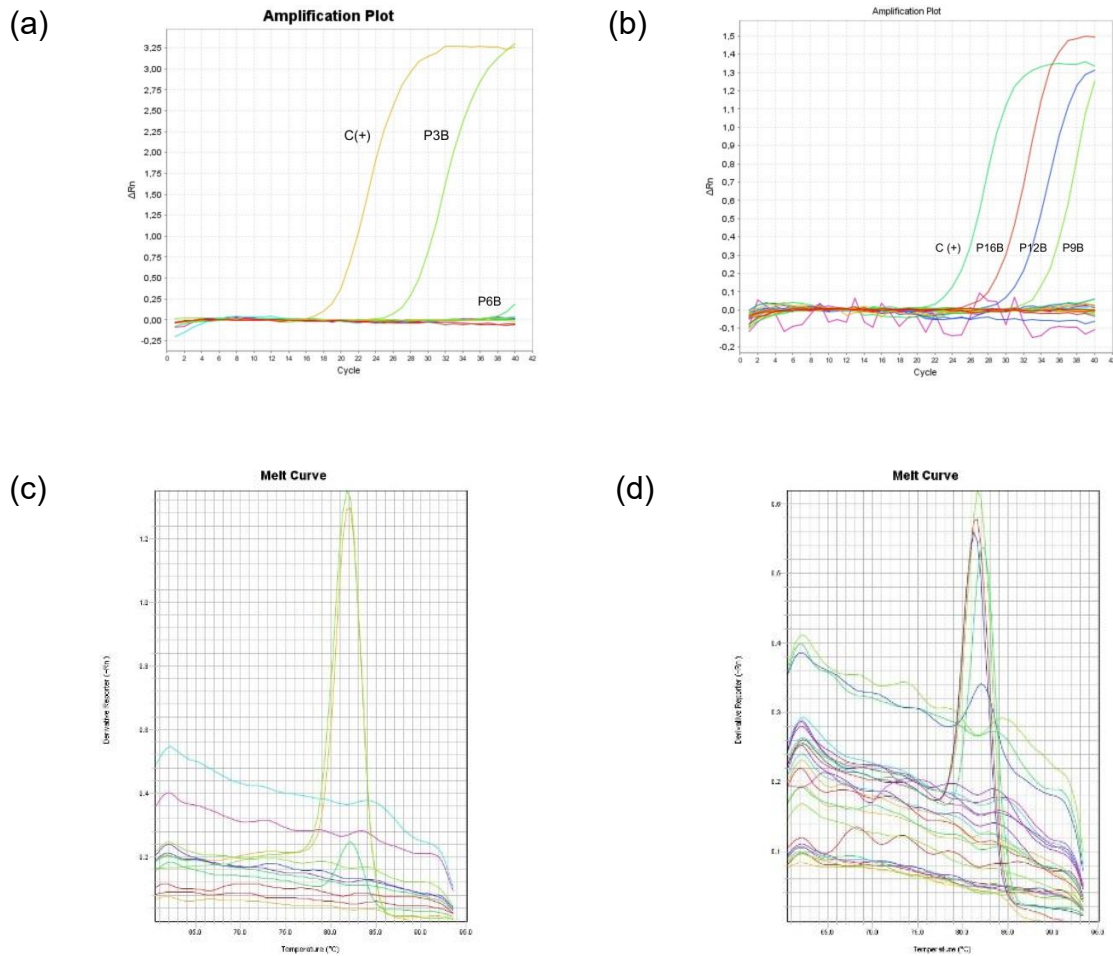


Figura 7: Curvas de amplificación en escala lineal qPCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. (a) muestras P1-P6, (b) muestras P7-P21. Curvas de melting qPCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. (c) muestras P1-P6, (d) muestras P7-P21. Muestras Positivas: P3B (biopsia P3), P9B (biopsia P9), P12B (biopsia P12), P16B (biopsia P16).

Tabla 16: Resultados de test de ureasa y qPCR por paciente para determinar la presencia de *H. pylori*.

| Paciente | Género | Test ureasa | 16sRNA Saliva | 16sRNA Biopsia |
|----------|--------|-------------|---------------|----------------|
| P1 | F | - | - | - |
| P2 | F | - | - | - |
| P3 | M | + | - | + |
| P4 | F | N/A | - | N/A |
| P5 | M | N/A | - | N/A |
| P6 | M | - | - | - |
| P7 | F | - | - | - |
| P8 | F | - | - | - |
| P9 | F | + | - | + |
| P10 | F | - | - | - |
| P11 | F | - | - | - |
| P12 | M | + | - | + |
| P13 | F | - | - | - |
| P14 | F | - | - | - |
| P15 | M | N/A | - | N/A |
| P16 | M | + | - | + |
| P17 | F | N/A | - | N/A |
| P18 | M | - | - | - |
| P19 | F | N/A | - | N/A |
| P20 | F | - | - | - |
| P21 | F | N/A | - | N/A |

Abreviación: N/A, No aplica

Al no obtener resultados positivos para las muestras de saliva a través de qPCR, se propuso cambiar a una técnica distinta de PCR que fuese más sensible y con mayor especificidad. Así mismo, se implementó la técnica de Nested PCR para la amplificación de todos los genes de interés en todas las muestras recolectadas.

8.4 Detección gen 16S rRNA de *H. pylori* en muestras de saliva y biopsia a través de Nested PCR.

Para entender a cabalidad los resultados obtenidos en esta sección, es importante explicar el principio de un Nested PCR y cómo se lleva a cabo. Específicamente, el Nested PCR corresponde a una técnica molecular en la cual su principal característica es realizar 2 rondas de PCR utilizando 2 pares de partidores. La primera ronda de PCR se realiza como cualquier PCR convencional, obteniendo un producto de amplificación respectivo. Para la segunda ronda de PCR se utiliza el amplicón obtenido de la primera reacción, donde el segundo par de partidores se une a la secuencia interna de la secuencia amplificada por el primer par de partidores. La implementación de una segunda reacción de PCR permite que se aumenta la especificidad de la técnica, disminuyendo los posibles productos inespecíficos que pueda poseer el amplicón de la primera reacción (**Figura 8**) [51].

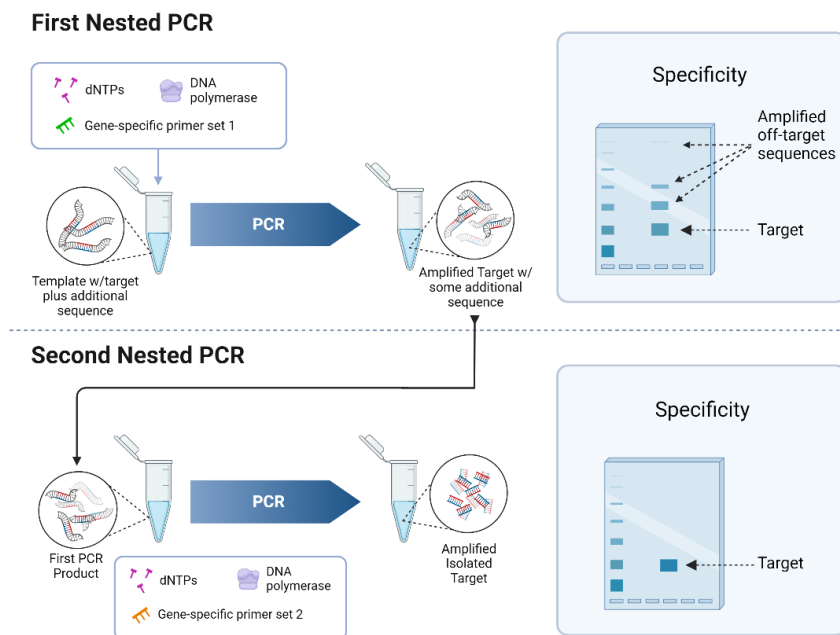


Figura 8: Procedimiento de un Nested PCR, en el cual se realiza una primera amplificación con un determinado set de partidores. A partir del amplicón obtenido, se realiza un segundo Nested PCR con un set diferente de partidores, con el objetivo de disminuir posibles secuencias inespecíficas, aumentando significativamente la especificidad y sensibilidad. Extraído desde AAT Bioquest, Inc.

En primera instancia, se realizó un Nested PCR de prueba para verificar la correcta amplificación del gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Esta amplificación se realizó utilizando una muestra de biopsia de un paciente (P3) el cual tenía un test de ureasa positivo (**Figura 9**).

El gel de agarosa reveló que efectivamente el paciente 3 posee el gen *16S rRNA* de la bacteria *H. pylori*, al presentar la banda de 454bp correspondiente a este producto de PCR específico.

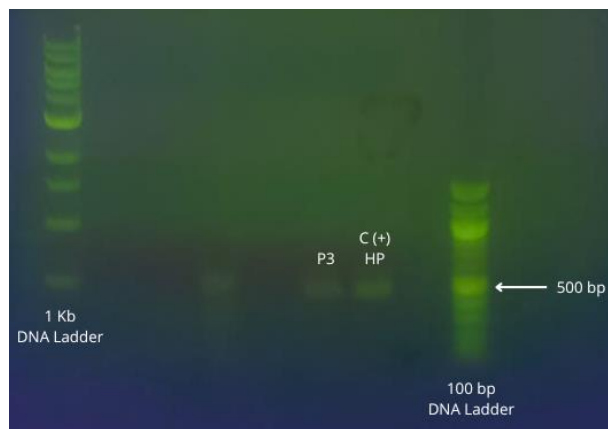


Figura 9: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción ensayo Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*.

Confirmada esta primera amplificación, se procedió un segundo ensayo en el cual se realizó el Nested PCR para una serie de muestras positivas (P3-P9-P12-P16) y negativas (P6) en su test de ureasa, incluyendo sus respectivas muestras de saliva, para así tener un acercamiento a si es posible detectar este patógeno en la saliva de pacientes que arrojaron un resultado positivo en biopsia. Para la muestra P3 solo se utilizó saliva, ya que se confirmó previamente la presencia de *H. pylori* en su respectiva biopsia (**Figura 10**).

Para las muestras P9 a P16 se observa un resultado positivo para las muestras de biopsia, no así en sus respectivas muestras de salivas, siendo un primer indicativo que el patógeno estaría alojado solo en la zona estomacal de los pacientes. En el caso particular para la muestra P6, la biopsia arrojó un resultado negativo, teniendo relación a lo obtenido previamente en su test de ureasa. Sin embargo, se obtuvo un resultado positivo para este patógeno en la muestra de saliva, por lo que este paciente si bien no tenía *Helicobacter* en el estómago, si puede estar presente en la cavidad oral.

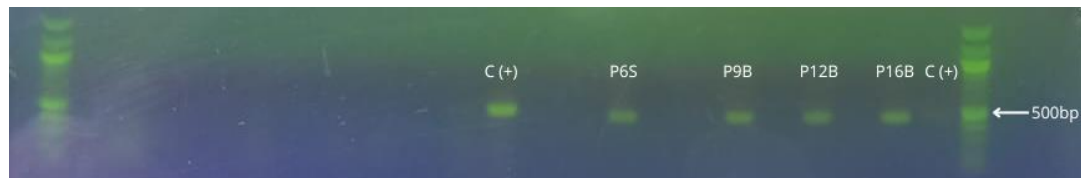


Figura 10: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P3, P6, P9, P12, P16. Muestras positivas: P6S (saliva P6), P9B (biopsia P9), P12B (biopsia P12), P16B (biopsia P16).

Finalizados los ensayos previamente mencionados, se realizó Nested PCR para las demás muestras de los pacientes reclutados (biopsias y salivas) para determinar en estas la presencia o ausencia de este patógeno. (**Figuras 11-22**).



Figura 11: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P1, P2, P7, P8, P9. Muestras positivas: P9B (biopsia P9).

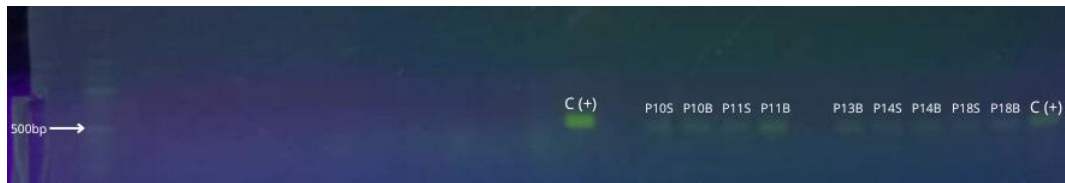


Figura 12: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P10, P11, P13, P14, P18. Muestras positivas: P10S (saliva P10), P10B (biopsia P10), P11S (saliva P11), P11B (biopsia P11), P13B (biopsia P13), P14S (saliva P14), P14B (biopsia P14), P18S (saliva P18), P18B (biopsia P18).



Figura 13: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P20, P22, P24, P26, P27. Muestras positivas: P20S (saliva P20), P24B (biopsia P24), P26B (biopsia P26), P27B (biopsia P27).

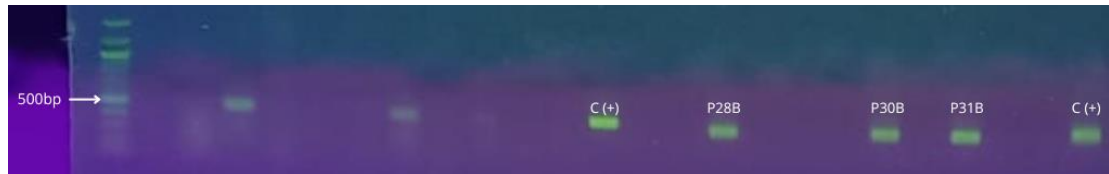


Figura 14: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P28, P29, P30, P31, P32. Muestras positivas: P28B (biopsia P28), P30B (biopsia P30), P31B (biopsia P31).

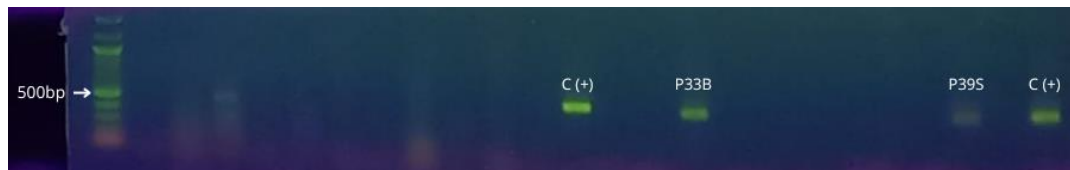


Figura 15: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P33, P35, P36, P37, P39. Muestras positivas: P33B (biopsia P33), P39S (saliva P39).



Figura 16: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P40, P41, P42, P43, P45. Muestras positivas: P42B (biopsia P42), P45B (biopsia P45).

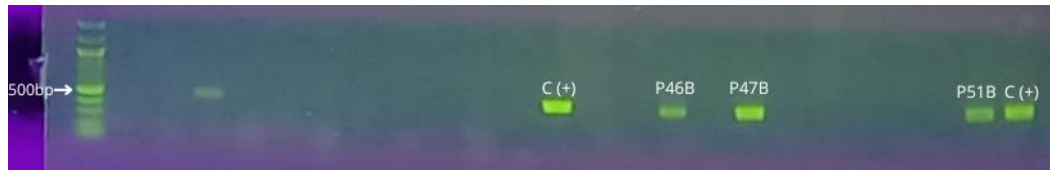


Figura 17: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P46, P47, P49, P50, P51. Muestras positivas: P46B (biopsia P46), P47B (biopsia P47), P51 (biopsia P51).

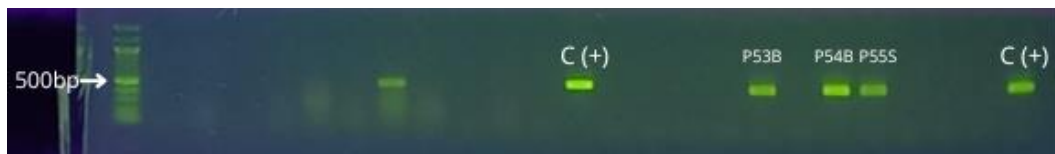


Figura 18: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P52, P53, P54, P55, P56. Muestras positivas: P53B (biopsia P53), P54B (biopsia P54), P55S (saliva P55).

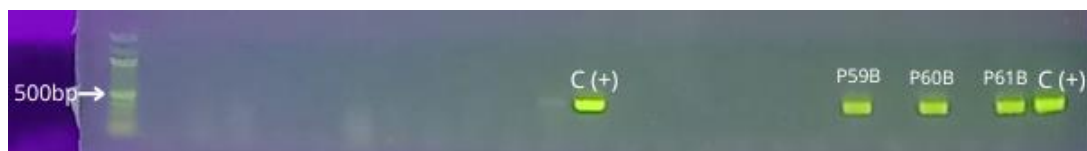


Figura 19: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P57, P58, P59, P60, P61. Muestras positivas: P59B (biopsia P59), P60B (biopsia P60), P61B (biopsia P61).

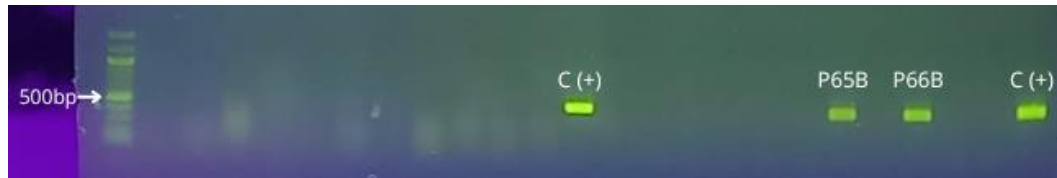


Figura 20: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P62, P63, P65, P66, P67. Muestras positivas: P65B (biopsia P65), P66B (biopsia P66).

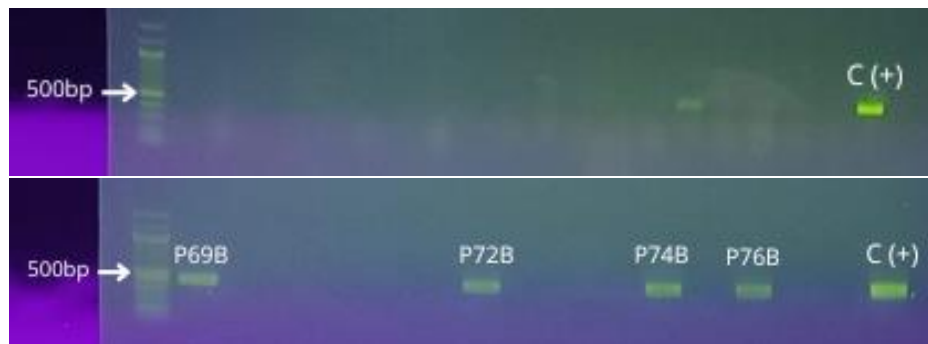


Figura 21: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras P68, P69, P70, P71, P72, P73, P74, P76, P77. Muestras positivas: P69B (biopsia P69), P72B (biopsia P72), P74B (biopsia P74), P76B (biopsia P76).

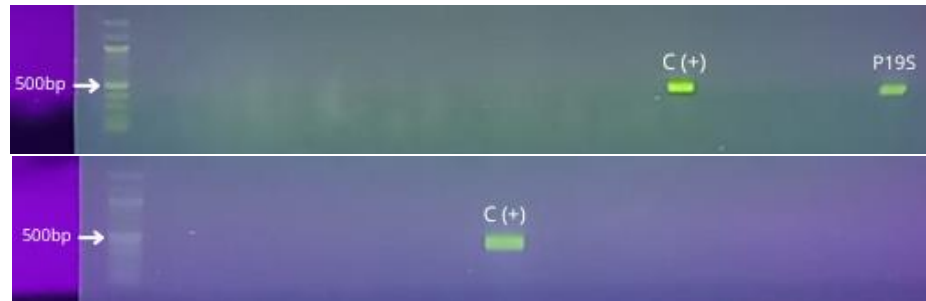


Figura 22: Gel de agarosa (1%) de productos de reacción Nested PCR para gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras de saliva P4, P5, P15, P17, P19, P21, P23, P25, P34, P38, P44, P48, P64, P75.

A continuación, se tabularon los resultados obtenidos para los Nested PCR para el gen *16S rRNA* de *H. pylori* (**Tabla 17 y 18**):

Tabla 17: Resultados de test de ureasa y Nested PCR por paciente para determinar la presencia de *H. pylori*.

| Paciente | Género | Test ureasa | 16sRNA Saliva | 16sRNA Biopsia |
|----------|--------|-------------|---------------|----------------|
| P1 | F | - | - | - |
| P2 | F | - | - | - |
| P3 | M | + | - | + |
| P4 | F | N/A | - | N/A |
| P5 | M | N/A | - | N/A |
| P6 | M | - | + | - |
| P7 | F | - | - | - |
| P8 | F | - | - | - |

Abreviación: N/A, No aplica

Continuación Tabla 17

| Paciente | Género | Test ureasa | 16sRNA Saliva | 16sRNA Biopsia |
|----------|--------|-------------|------------------|-------------------|
| P9 | F | + | - | + |
| P10 | F | - | + | + |
| P11 | F | - | + | + |
| P12 | M | + | - | + |
| P13 | F | - | - | + |
| P14 | F | - | + | + |
| P15 | M | N/A | - | N/A |
| P16 | M | + | - | + |
| P17 | F | N/A | - | N/A |
| P18 | M | - | + | + |
| P19 | F | N/A | + | N/A |
| P20 | F | - | + | - |
| P21 | F | N/A | - | N/A |
| P22 | F | + | - | + |
| P23 | M | N/A | - | N/A |
| P24 | M | - | - | - |
| P25 | M | N/A | - | N/A |
| P26 | F | + | - | + |
| P27 | M | + | - | + |
| P28 | F | + | - | + |
| P29 | F | - | - | - |
| P30 | F | + | - | + |
| P31 | F | + | - | + |
| P32 | M | - | - | - |

Continuación Tabla 17

| Paciente | Género | Test ureasa | 16sRNA Saliva | 16sRNA Biopsia |
|----------|--------|-------------|------------------|-------------------|
| P33 | F | + | - | + |
| P34 | F | N/A | - | N/A |
| P35 | F | - | - | - |
| P36 | F | - | - | - |
| P37 | M | - | - | - |
| P38 | F | N/A | - | N/A |
| P39 | F | - | + | - |
| P40 | F | - | - | - |
| P41 | M | - | - | - |
| P42 | M | + | - | + |
| P43 | F | - | - | - |
| P44 | F | N/A | - | N/A |
| P45 | F | + | - | + |
| P46 | F | + | - | + |
| P47 | F | + | - | + |
| P48 | F | N/A | - | N/A |
| P49 | F | - | - | - |
| P50 | M | - | - | - |
| P51 | F | - | - | + |
| P52 | M | - | - | - |
| P53 | F | + | - | + |
| P54 | M | - | - | + |

Continuación Tabla 17

| Paciente | Género | Test ureasa | 16sRNA Saliva | 16sRNA Biopsia |
|----------|--------|-------------|------------------|-------------------|
| P55 | F | - | + | - |
| P56 | F | - | - | - |
| P57 | M | - | - | - |
| P58 | F | - | - | - |
| P59 | M | + | - | + |
| P60 | M | + | - | + |
| P61 | F | + | - | + |
| P62 | F | + | - | - |
| P63 | M | - | - | - |
| P64 | M | N/A | - | N/A |
| P65 | F | + | - | + |
| P66 | F | + | - | + |
| P67 | F | - | - | - |
| P68 | F | - | - | - |
| P69 | F | + | - | + |
| P70 | F | - | - | - |
| P71 | F | - | - | - |
| P72 | M | + | - | + |
| P73 | F | - | - | - |
| P74 | F | + | - | + |
| P75 | M | N/A | - | N/A |
| P76 | F | + | - | + |
| P77 | F | - | - | - |

Tabla 18: Frecuencia 16S rRNA+ y 16S rRNA- para *H. pylori* en muestras de saliva y biopsias gástricas.

| | 16S rRNA(+) Saliva | 16S rRNA(+) Biopsia | 16S rRNA(-) |
|--------------------|-----------------------|------------------------|-------------|
| Total (n = 77) | 9 (6,5%) | 32 (41,6%) | 40 (51,9%) |
| Femenino (n = 52) | 8 (7,7%) | 22 (42,3%) | 26 (50%) |
| Masculino (n = 25) | 1 (4%) | 10 (40%) | 14 (56%) |

De los 77 pacientes reclutados, 37 (48,1%) de ellos arrojaron un resultado de PCR positivo para *H. pylori*. Si lo comparamos con los resultados de test de ureasa realizados en el hospital, este último arrojó 26 pacientes positivos (36% del total de pacientes). Por lo tanto, al utilizar Nested PCR fue posible detectar 11 pacientes más que fueron positivos a *H. pylori*. Asimismo, también fue posible observar todos los pacientes positivos al test de ureasa (con excepción de P62) también fueron positivos al PCR de su muestra de biopsia, pero no así en sus muestras de saliva. Sin embargo, existe una población (P10, P11, P14 y P18) quienes si bien tenían un resultado de ureasa negativo, al realizar el PCR de su respectiva muestra de saliva y biopsia ambas dieron un resultado positivo. Finalmente, también se encontró una población (P6, P20, P39 y P55) quienes tenían un resultado negativo para el test de ureasa, pero que al realizar el PCR de sus muestras de saliva arrojaron un resultado positivo, no así en sus muestras de biopsia. También es importante mencionar que existe una muestra de saliva

(P19) que también fue positiva para *H. pylori*, pero para este paciente no se le realizó el test de ureasa.

A partir de estos 37 pacientes positivos al gen *16S rRNA* de *H. pylori*, se realizó amplificación por PCR convencional para los genes de virulencia mencionados en la sección 7.3.2

8.5 Detección de genes de virulencia de *H. pylori* en muestras de saliva y biopsia por PCR convencional

Las muestras de saliva y biopsia que arrojaron un resultado positivo para el gen *16S rRNA* por Nested PCR fueron posteriormente sometidas a amplificación por medio de PCR convencional para los distintos genes de virulencia de interés.

8.5.1 Gen *cagA*

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la amplificación del gen *cagA* (región constante) en las muestras positivas al gen *16S rRNA* de *H. pylori* (**Figura 23**).

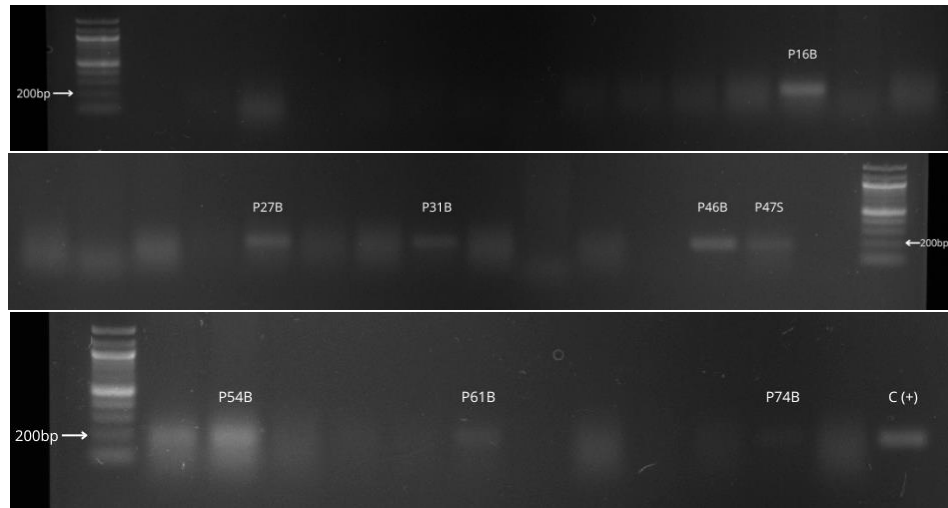


Figura 23: Gel de agarosa (2%) de productos de reacción PCR convencional para gen *cagA* (región constante) para muestras positivas a gen *16S rRNA* de *H. pylori*. Muestras positivas: P16B (biopsia P16), P27B (biopsia P27), P31B (biopsia P31), P46B (biopsia P46), P47S (saliva P47), P54B (biopsia P54), P61B (biopsia P61), P74B (biopsia P74).

En este caso, se puede evidenciar en el gel de agarosa que existe la amplificación de este gen *cagA* por medio del PCR convencional, siendo en su mayoría muestras de biopsia gástrica, pero también contando con una muestra de saliva positiva.

De los 37 pacientes positivos para *H. pylori* por Nested PCR, se consideraron positivos al gen *cagA* un total de 8, 7 provenientes de muestra de biopsia gástrica y 1 de saliva (**Tabla 19**).

Tabla 19: Frecuencia *cagA*+ y *cagA*- para *H. pylori* en muestras de saliva y biopsias gástricas.

| | <i>cagA</i> (+) | <i>cagA</i> (-) |
|--------------------|-----------------|-----------------|
| Total (n = 37) | 8 (21,6%) | 29 (78,4%) |
| Femenino (n = 26) | 5 (19,3%) | 21 (80,7%) |
| Masculino (n = 11) | 3 (27,3%) | 8 (72,7%) |

8.5.2 Gen *vacA* s1

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la amplificación del gen *vacA* (región *s1*) en las muestras positivas al gen *16S rRNA* de *H. pylori* (Figura 24).

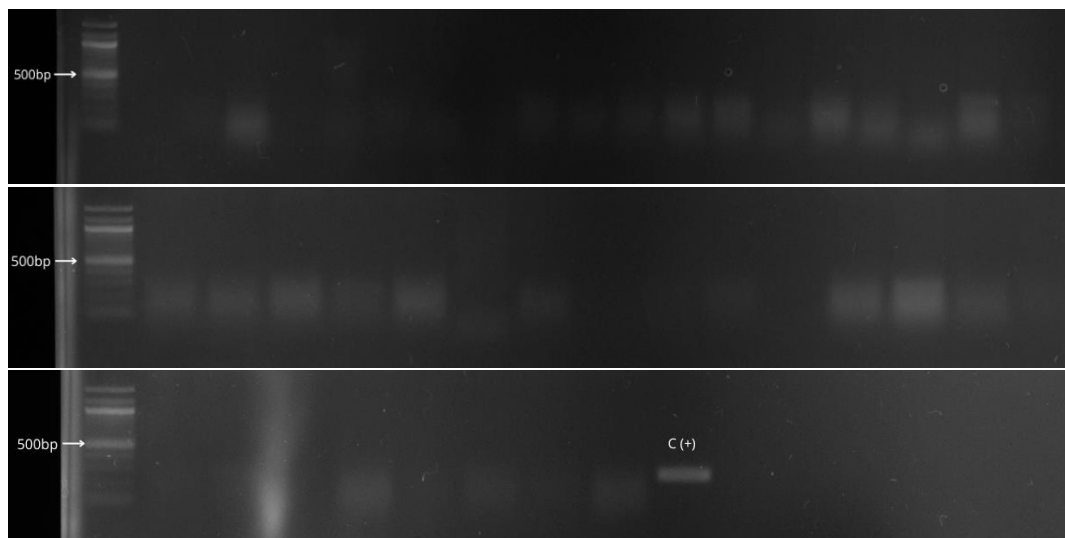


Figura 24: Gel de agarosa (2%) de productos de reacción PCR convencional para gen *vacA* (región *s1*) para muestras positivas a gen *16S rRNA* de *H. pylori*.

En este caso, a diferencia del gen de virulencia analizado anteriormente, no se pudo observar bandas de amplificación para esta región del gen *vacA*.

8.5.3 Gen *vacA m1*

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la amplificación del gen *vacA* (región *m1*) en las muestras positivas al gen *16S rRNA* de *H. pylori* (Figura 25).

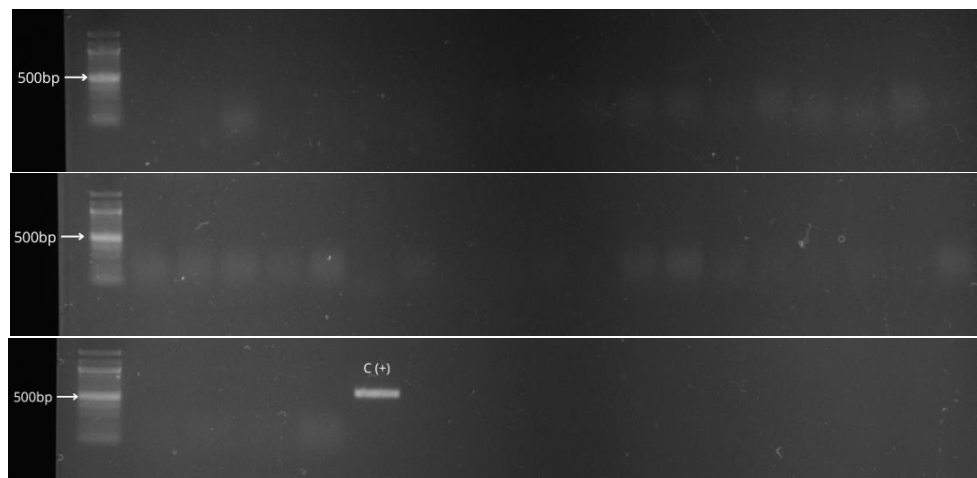


Figura 25: Gel de agarosa (2%) de productos de reacción PCR convencional para gen *vacA* (región *m1*) para muestras positivas a gen *16S rRNA* de *H. pylori*.

De igual manera que en el caso anterior, esta región *m1* del gen *vacA* tampoco se encontraría presente en las muestras de saliva y biopsia analizadas.

A modo de resumen, se pudo visualizar resultados positivos tanto para el gen *16S rRNA* de *H. pylori* (37 pacientes) como para la región constante del gen *cagA* (8 pacientes), no así para la región *s1m1* del gen *vacA*.

9. DISCUSIÓN

El presente estudio buscaba determinar la presencia de *H. pylori* en saliva por medio qPCR. Asimismo, a partir de este objetivo se buscaba validar este tipo de técnica molecular como posible método diagnóstico para *H. pylori*. Como se mostró en esta investigación, en primera instancia no fue posible detectar el gen *16S rRNA* en muestras de saliva mediante qPCR, por lo que se incorporó la técnica de Nested PCR al estudio. El cambio de la técnica de PCR permitió obtener resultados con más especificidad y sensibilidad.

Concretamente, del total de 77 pacientes que fueron reclutados, 37 de ellos dieron un resultado positivo a la presencia del gen *16S rRNA* ya sea en muestra de saliva, biopsia e incluso en algunos casos en ambas muestras. Específicamente, fueron 4 pacientes (P10, P11, P14 y P18) quienes presentaron presencia de *H. pylori* en ambas muestras, siendo lo más relevante de estos pacientes es que presentaban un test de ureasa negativo, además de no manifestar ninguna molestia gastrointestinal (reflujo, acidez, dolor abdominal) el día que se les realizó el examen EDA.

Por lo tanto, dentro de los hallazgos importantes que podemos destacar de esta investigación corresponde a que existe un porcentaje de pacientes los cuales no presentan ninguna sintomatología o malestar, como tampoco se les detectaba ninguna anomalía durante la exploración en el examen, que pueden presentar este patógeno probablemente a una concentración muy baja que el test de ureasa no es capaz de detectar.

También es importante mencionar que existe otro universo de pacientes quienes presentaron un test de ureasa negativo (P6, P20, P39, P55) o que no se le realizó este test (P19) que si fue posible detectar la presencia del patógeno en sus respectivas muestras de saliva. Esto permite sugerir que existe un porcentaje de pacientes que asisten a su examen EDA, el cual no evidencia lesiones o anomalías en el estómago, pero aun así tienen presente la bacteria en su organismo.

Es relevante mencionar que el test de ureasa que se utiliza en el hospital (HelicotecUT® Plus) se ha reportado que tiene un porcentaje de sensibilidad del 98,5% y de especificidad de 92,5% [52]. Sin embargo, un estudio comparativo entre los diferentes métodos gold standard para *H. pylori* y Nested PCR en muestras de biopsia y heces[45], señala que los test rápido de ureasa tendrían una sensibilidad del 46,9% y especificidad del 100% en muestras de biopsia,

mientras que el Nested PCR tendría un 100% de sensibilidad y 95,6% de especificidad. Esto permite sugerir que si bien el test de ureasa tiene alta especificidad, la baja en sensibilidad puede permitir que existan casos de falsos negativos. También pudiese influir la cantidad de biopsia que se coloca en el test, ya que el manual de producto indica agregar 2-3 muestras de biopsia en un mismo test, ojalá tomando las muestras tanto del antro como de la curvatura del estómago y en algunos casos solo se colocaba 1 muestra de biopsia proveniente del antro.

También es importante señalar que se les consultó a los pacientes si presentan algún malestar o síntoma, en donde esta población negativa al test de ureasa pero positiva al Nested PCR señalaron tener reflujos y dolor abdominal. Esto último nos permite sugerir que si bien el patógeno no ha causado un daño importante en el estómago, si pudiese estar colonizando este órgano, debido a los malestares que mencionaron los pacientes lo cuales son parte de la sintomatología clásica de infección por *H. pylori*.

El Nested PCR es una técnica molecular que nos permitió identificar la presencia de *H. pylori* en muestras de saliva y biopsia, habiendo algunas de ellas las cuales el test de ureasa no fue capaz de detectar. La data obtenida por medio de este tipo de PCR permite evidenciar la alta especificidad que posee la técnica.

En el caso de la detección del gen *cagA*, por medio de PCR convencional, también fue posible identificar su presencia en 8 muestras positivas para el gen *16S rRNA*, aunque este porcentaje fue mucho menor (21,6%). En este sentido, no hay que olvidar que en este caso no se realizó Nested PCR sino PCR convencional, pudiendo existir una disminución en la especificidad de detección del gen de interés. Para investigaciones futuras, lo ideal sería implementar la misma técnica de PCR para todas las muestras, para así mantener la misma sensibilidad y especificidad.

Aun así, un estudio presentó un porcentaje similar de prevalencia del gen *cagA* en muestras fecales analizadas por Nested PCR en una población de la ciudad de Coquimbo, obteniendo 33 pacientes (25,4%) positivos a *cagA* entre un total de 122 positivos para *H. pylori* [53]. Otro estudio obtuvo un porcentaje más elevado, al encontrarse un 38% de positividad en muestras de biopsia gástrica de un total de 50 pacientes que se realizaron una EDA en la ciudad de Concepción [54].

Se considera relevante la identificación de este gen en pacientes en donde se sepa que presentan *H. pylori*, ya que *cagA* se ha visto asociado a formas más agresivas de esta infección. En este sentido, un estudio señala que este gen posee la capacidad de generar una respuesta pro inflamatoria al activar la vía

ALPK1-TIFA [35], así como también aumentar la proliferación de las células endoteliales gástricas a través de la unión a Sh2 [33, 34]. En este sentido, se ha visto que en pacientes con genotipo *cagA+* *vacAs1a+* se vio un aumento de la proliferación de la mucosa gástrica la cual se correlacionó significativamente con la severidad de gastritis aguda [55].

Finalmente, cuando se realizó la amplificación para los genes *s1m1* de *vacA* no se pudo visualizar la presencia de estos genes en ninguna de las 37 muestras analizadas. Tal como se mencionó anteriormente, se sugiere que puede deberse al haber realizado esto por PCR convencional, como también que los pacientes podrían simplemente no presentar estos genes.

No obstante, existen estudios en los cuales se han detectados genotipos de *vacA* en la población chilena. Un estudio de Faundez *et al.* [56] señala que existe una prevalencia de la combinación alélicas del genotipo *s1m1* de *vacA*, siendo mayor en cepas obtenidas de pacientes con úlceras pépticas (52%) que en pacientes con dispepsia no ulcerosa (40%). En este mismo sentido, Díaz *et al.* [57] obtuvieron resultados similares en un estudio hecho en población chilena, teniendo como genotipos más prevalentes *vacA s1bm1* con un 76% y *vacA s1am1* con un 21%.

Se ha mencionado que los genes *cagA* y *vacA* por si solos no representan un valor predictivo como marcador de riesgo para el desarrollo de enfermedades pépticas ulcerosas en la población chilena. Sin embargo, una infección con una cepa que presente el genotipo *cagA+/vacAs1m1+* pueden aumentar el riesgo de adquirir una enfermedad péptica ulcerosa [56].

Es necesario realizar más experimentos para estos marcadores genéticos, e incluso ampliar los genes de interés ya que existen otros genes como por ejemplo el gen *dupA*, que se ha reportado que la presencia de este gen en conjunto con otros genes de virulencia como *vacAi* conduciría a un aumento en la probabilidad de severidad de las patologías gastroduodenales [58].

También es importante mencionar que a los pacientes no se les consultó por hábitos que puedan influir en la colonización de la bacteria, como lo es la ingesta de alcohol o el consumo de tabaco. Tampoco era posible establecer condiciones de higiene bucal previa toma de muestra de saliva, como por ejemplo solicitar un previo cepillado de dientes antes de la recolección. Solo estaba asegurado que el paciente no había ingerido alimentos previamente, ya que esto era requisito para la realización del examen EDA.

En este sentido, una investigación realizó un estudio de caso a una paciente que presentaba linfoma de MALT y prueba de aliento con urea positivo (indicativo de infección por *H. pylori*) [59]. Una vez realizado su tratamiento antibiótico, se hizo seguimiento histológico cada 3-6 meses aproximadamente, en el cual en su control 2 años después del diagnóstico de linfoma se presentó una re-recurrencia de este, junto con una re-infección por *H. pylori*. Nuevamente se le realizó un tratamiento antibiótico, logrando nuevamente la erradicación de la bacteria. Sin embargo, 2 años después en su respectivo control, nuevamente presenta el linfoma de MALT junto con una tercera infección de *H. pylori*. Estas constantes re-infecciones se debían a que la paciente trabajaba con pacientes adultos mayores encargándose de la higiene de ellos, mencionando que tenía contacto frecuente con heces y vómitos de ellos. Esto último es una vía clásica de infección de la bacteria, por lo que la higiene corresponde una medida preventiva importante tanto para prevenir esta infección como también para evitar una re-infección de este patógeno. Esto se relaciona al hecho de que la incidencia por infección de este patógeno se ve afectada por las medidas de higiene que implementan las personas [3].

Actualmente, la prevalencia de infección por *H. pylori* corresponde a un valor que varía entre 60-70% en la población chilena actual. Durante los periodos de recolección de muestra en las dependencias del Hospital Las Higueras, fue

posible observar que la cantidad de pacientes que asistía a realizarse un examen EDA podía llegar, en flujos altos de gente, a 10 pacientes por semana, siendo casi 40 pacientes al mes que asisten a realizarse este examen. Sin embargo, también fue posible evidenciar que la gente que asistía este año al examen se encontraba en lista de espera desde el 2019 aproximadamente, dejando en evidencia que pueden existir casos en que el paciente podría presentar síntomas o malestares gastrointestinales atribuibles a *H. pylori*, pero que deben esperar muchos años para hacerse un examen, favoreciendo la colonización del patógeno y realizando un diagnóstico o tratamiento más tardío en el paciente.

Es de vital importancia, tanto a nivel de investigación como de salud pública nacional, poner en discusión la implementación de otros métodos diagnóstico que puedan ser aplicados de manera masiva en la población, pero que también sean no invasivos. La implementación de técnicas moleculares permite ampliar las herramientas disponibles en el diagnóstico clínico, sirviendo de ayuda también en la medicina preventiva, permitiendo tratar de manera más temprana a las personas y evitar el desarrollo de enfermedad crónicas.

Los estudios en el área del diagnóstico molecular, y en particular el análisis de marcadores genéticos en muestras biológicas (como la saliva) como parte de la medicina personalizada y preventiva, son de vital importancia para mejorar la

atención al paciente y a la población en general, por lo que es relevante seguir y ampliar estas líneas de investigación.

10. CONCLUSIÓN

El presente trabajo de investigación demostró que es posible detectar marcadores genéticos de *H. pylori* en muestras biológicas como la saliva a través de técnicas moleculares como lo es el Nested PCR y también PCR convencional, sugiriendo que la saliva podría servir como un tipo de muestra no invasiva en técnicas de diagnóstico molecular. También se puede sugerir que el Nested PCR podría ser una opción como método de detección de este patógeno, pudiendo utilizarse como primer diagnóstico o como acompañamiento de un tratamiento antibiótico cuando se debe verificar la erradicación de la bacteria.

Dentro de las fortalezas del Nested PCR, podemos decir que esta técnica es de una alta especificidad y sensibilidad, destacando que al realizar 2 rondas de PCR permite minimizar la presencia de productos inespecíficos, disminuyendo el riesgo de falsos positivos. Sin embargo, también posee sus limitaciones, como por ejemplo corresponde a un proceso más laborioso al ser necesario estas 2 rondas de PCR. Esto último da a entender que requiere de un manejo cuidadoso para así evitar contaminación cruzada.

Es importante realizar más estudios como los que se hicieron en esta investigación, mejorando aspectos de éstos como por ejemplo ampliar los grupos de estudio, los marcadores genéticos y aumentar tanto la sensibilidad como especificidad de las técnicas moleculares que se quieran validar como posibles métodos diagnósticos. Esto permitirá a largo plazo evaluar de mejorar manera los diagnósticos asociados a este microorganismo y posiblemente establecer estudios de correlación entre *H. pylori* que esté presente en la cavidad oral y en muestras gástricas, para así evaluar de mejorar manera el perfil genético de este patógeno.

11. REFERENCIAS

1. Robin Warren, J., Marshall, B.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, (1983)
2. Goodwin, C.S., Armstrong, J.A.: Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*), (1990)
3. Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D.Y., Wong, V.W.S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., Ng, S.C.: Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*.153, (2017). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
4. Malfertheiner, P., Camargo, M.C., El-Omar, E., Liou, J.M., Peek, R., Schulz, C., Smith, S.I., Suerbaum, S.: *Helicobacter pylori* infection. *Nat Rev Dis Primers*. 9, (2023). <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00431-8>
5. Amieva, M., *Gastroenterology*, E.E.-, 2008, undefined: Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Elsevier.
6. Oporto, M., Pavez, M., Troncoso, C., Cerda, A., Hofmann, E., Sierralta, A., Rios, E., Coppelli, L., Barrientos, L.: Prevalence of infection and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori*: An evaluation in public and private health systems of Southern Chile. *Pathogens*. 8, (2019). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040226>
7. Anand, P.S., Kamath, K.P., Anil, S.: Role of dental plaque, saliva and periodontal disease in *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 20, (2014). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5639>
8. Wroblewski, L.E., Peek, R.M., Wilson, K.T.: *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk, (2010)
9. Chauhan, N., Tay, A.C.Y., Marshall, B.J., Jain, U.: *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview, (2019)
10. Hage, N., Howard, T., Phillips, C., Brassington, C., Overman, R., Debreczeni, J., Gellert, P., Stolnik, S., Winkler, G.S., Falcone, F.H.: Structural basis of Lewisb antigen binding by the *Helicobacter pylori* adhesin BabA. *Sci Adv*. 1, (2015). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500315>

11. Ilver, D., Arnqvist, A., Ögren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., Borén, T.: *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* (1979). 279, (1998). <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.373>
12. Magalhães, A., Reis, C.A.: *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors, (2010)
13. Hatakeyama, M., Higashi, H.: *Helicobacter pylori* CagA: A new paradigm for bacterial carcinogenesis, (2005)
14. keshavarzi, F., Mirzaei, S., Karami, P.: The Prevalence of *H. Pylori cagA* Gene in Patients with Gastric Ulcer. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 15, (2021). <https://doi.org/10.30699/ijmm.15.3.345>
15. Pachathundikandi, S.K., Tegtmeyer, N., Arnold, I.C., Lind, J., Neddermann, M., Falkeis-Veits, C., Chattopadhyay, S., Brönstrup, M., Tegge, W., Hong, M., Sticht, H., Vieth, M., Müller, A., Backert, S.: T4SS-dependent TLR5 activation by *Helicobacter pylori* infection. *Nat Commun*. 10, (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13506-6>
16. Hatakeyama, M.: Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein, (2011)
17. Kim, S.S., Ruiz, V.E., Carroll, J.D., Moss, S.F.: *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma, (2011)
18. Hatakeyama, M.: *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: A paradigm for hit-and-run carcinogenesis, (2014)
19. McClain, M.S., Beckett, A.C., Cover, T.L.: *Helicobacter pylori* vacuolating toxin and gastric cancer, (2017)
20. Boquet, P., Ricci, V.: Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin, (2012)
21. Sewald, X., Gebert-Vogl, B., Prassl, S., Barwig, I., Weiss, E., Fabbri, M., Osicka, R., Schiemann, M., Busch, D.H., Semmrich, M., Holzmann, B., Sebo, P., Haas, R.: Integrin Subunit CD18 Is the T-Lymphocyte Receptor for the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. *Cell Host Microbe*. 3, (2008). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.11.003>

22. Junaid, M., Linn, A.K., Javadi, M.B., Al-Gubare, S., Ali, N., Katzenmeier, G.: Vacuolating cytotoxin A (VacA) - A multi-talented pore-forming toxin from *Helicobacter pylori*, (2016)
23. Kim, I.J., Blanke, S.R.: Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA)., (2012)
24. Inagaki, T., Nishiumi, S., Ito, Y., Yamakawa, A., Yamazaki, Y., Yoshida, M., Azuma, T.: Associations between *cagA*, *vacA*, and the clinical outcomes of *Helicobacter pylori* infections in Okinawa, Japan. *Kobe Journal of Medical Sciences*. 63, (2017)
25. Ogiwara, H., Sugimoto, M., Ohno, T., Vilaichone, R.K., Mahachai, V., Graham, D.Y., Yamaoka, Y.: Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the *Helicobacter pylori vacA* gene in cases of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol*. 47, (2009). <https://doi.org/10.1128/JCM.00887-09>
26. Sharndama, H.C., Mba, I.E.: *Helicobacter pylori*: an up-to-date overview on the virulence and pathogenesis mechanisms, (2022)
27. Montecucco, C., Rappuoli, R.: Living dangerously: How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach, (2001)
28. de Jesus Souza, M., de Moraes, J.A., Da Silva, V.N., Helal-Neto, E., Uberti, A.F., Scopel-Guerra, A., Olivera-Severo, D., Carlini, C.R., Barja-Fidalgo, C.: *Helicobacter pylori* urease induces pro-inflammatory effects and differentiation of human endothelial cells: Cellular and molecular mechanism. *Helicobacter*. 24, (2019). <https://doi.org/10.1111/hel.12573>
29. Luo, Q., Liu, N., Pu, S., Zhuang, Z., Gong, H., Zhang, D.: A review on the research progress on non-pharmacological therapy of *Helicobacter pylori*, (2023)
30. Camilo, V., Sugiyama, T., Touati, E.: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, (2017)
31. Satin, B., Del Giudice, G., Della Bianca, V., Dusi, S., Laudanna, C., Tonello, F., Kelleher, D., Rappuoli, R., Montecucco, C., Rossi, F.: The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *Journal of Experimental Medicine*. 191, (2000). <https://doi.org/10.1084/jem.191.9.1467>

32. Sun, Q., Yuan, C., Zhou, S., Lu, J., Zeng, M., Cai, X., Song, H.: *Helicobacter pylori* infection: a dynamic process from diagnosis to treatment, (2023)
33. Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., Hatakeyama, M.: SHP-2 Tyrosine Phosphatase as an Intracellular Target of *Helicobacter pylori* CagA Protein.
34. Fujii, Y., Murata-Kamiya, N., Hatakeyama, M.: *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein interacts with SHIP2 to increase its delivery into gastric epithelial cells. *Cancer Sci.* 111, 1596–1606 (2020). <https://doi.org/10.1111/cas.14391>
35. Bauer, M., Nascakova, Z., Mihai, A.I., Cheng, P.F., Levesque, M.P., Lampart, S., Hurwitz, R., Pfannkuch, L., Dobrovolna, J., Jacobs, M., Bartfeld, S., Dohlman, A., Shen, X., Gall, A.A., Salama, N.R., Töpfer, A., Weber, A., Meyer, T.F., Janscak, P., Müller, A.: The ALPK1/TIFA/NF- κ B axis links a bacterial carcinogen to R-loop-induced replication stress. *Nat Commun.* 11, (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18857-z>
36. Chahuan, J., Pizarro, M., Riquelme, A.: Métodos diagnósticos para la detección de infección por *Helicobacter pylori*. ¿Cuál y cuándo deben solicitarse? *Acta Gastroenterol Latinoam.* 52, (2022). <https://doi.org/10.52787/agl.v52i1.176>
37. Bermúdez Díaz, L., Ernesto Torres Domínguez, L., Rodríguez González, B.L.: Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Cubana Med.* 48, (2009)
38. Wang, Y.K., Kuo, F.C., Liu, C.J., Wu, M.C., Shih, H.Y., Wang, S.S.W., Wu, J.Y., Kuo, C.H., Huang, Y.K., Wu, D.C.: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol.* 21, (2015). <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221>
39. Chahuán A., J., Pizarro R., M., Díaz P., L.A., Villalón F., A., Riquelme P., A.: Métodos de diagnóstico para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Gastroenterología Latinoamericana.* 31, (2020). <https://doi.org/10.46613/gastrolat202002-08>
40. Li, C., Musich, P.R., Ha, T., Ferguson, D.A., Patel, N.R., Chi, D.S., Thomas, E.: High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J Clin Pathol.* 48, (1995). <https://doi.org/10.1136/jcp.48.7.662>
41. Wongsuwanlert, M., Teanpaisan, R., Pahumunto, N., Kaewdech, A., Ruangsri, P., Sunpaweravong, S.: Prevalence and virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from oral cavity of non-disease, gastritis, and

- gastric cancer patients. *J Dent Sci.* 19, (2024).
<https://doi.org/10.1016/j.jds.2023.06.024>
42. Sepúlveda Tebache, E., Moreno, J., Spencer, M.L., Quilodrán, S., Brethauer, U., Briceño, C., García, A.: Comparación de *Helicobacter pylori* en cavidad oral y mucosa gástrica de acuerdo a genotipo de virulencia (*cagA* y *vacAm1*). *Revista Chilena de Infectología.* 29, (2012).
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000300005>
 43. Wang, X.M., Yee, K.C., Hazeki-Taylor, N., Li, J., Fu, H.Y., Huang, M.L., Zhang, G.Y.: Oral *Helicobacter pylori*, its relationship to successful eradication of gastric H. pylori and saliva culture confirmation. *Journal of Physiology and Pharmacology.* 65, (2014)
 44. Sepúlveda T., E., Briceño Casas, C., Spencer L., M.L., Quilodrán V., S., Brethauer M., U., Moreno H., J., García C., A.: Detección de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica y cavidad oral TT - *Helicobacter pylori* detection in gastric and oral mucosa. *Gastroenterol. latinoam.* 19, (2008)
 45. Šeligová, B., Lukáč, L., Bábelová, M., Vávrová, S., Sulo, P.: Diagnostic reliability of nested PCR depends on the primer design and threshold abundance of *Helicobacter pylori* in biopsy, stool, and saliva samples. *Helicobacter.* 25, (2020). <https://doi.org/10.1111/hel.12680>
 46. Böckelmann, U., Dörries, H.H., Ayuso-Gabella, M.N., De Marçay, M.S., Tandoi, V., Levantesi, C., Masciopinto, C., Houtte, E. Van, Szewzyk, U., Wintgens, T., Grohmann, E.: Quantitative PCR monitoring of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in three european artificial groundwater recharge systems. *Appl Environ Microbiol.* 75, (2009).
<https://doi.org/10.1128/AEM.01649-08>
 47. Guzmán, J., Castillo, D., González-Siccha, A.D., Bussalleu, A., Trespalcios-Rangel, A.A., Lescano, A.G., Sauvain, M.: *Helicobacter pylori cagA, vacA, iceA* and *babA* Genotypes from Peruvian Patients with Gastric Intestinal Metaplasia. *Cancers (Basel).* 16, (2024).
<https://doi.org/10.3390/cancers16081476>
 48. Matlock, B.: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Thermoscientific Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers.* (2015)
 49. ThermoScientific: NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Protocols and Product Manuals.* (2011)

50. Koetsier, G., Cantor, E.: A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. New England Biolabs. 1, (2019)
51. Shen, C.-H.: Amplification of Nucleic Acids. In: Diagnostic Molecular Biology. pp. 215–247. Elsevier (2019)
52. Hsu, W.H., Wang, S.S.W., Kuo, C.H., Chen, C.Y., Chang, C.W., Hu, H.M., Wang, J.Y., Yang, Y.C., Lin, Y.C., Wang, W.M., Wu, D.C., Wu, M.T., Kuo, F.C.: Dual specimens increase the diagnostic accuracy and reduce the reaction duration of rapid urease test. World J Gastroenterol. 16, (2010). <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i23.2926>
53. Wormwood, T., Parra, Á., Bresky, G., Madariaga, J.A., Häberle, S., Flores, J., Bernal, G.: Frequency of *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains in 160 patients subjected to endoscopy. Rev Med Chil. 146, (2018). <https://doi.org/10.4067/s0034-98872018000500596>
54. Martínez T, A., González C, C., Kawaguchi P, F., Montoya, R., Corvalán, A., Madariaga B, J., Roa S, J., García C, A., Salgado, F., Solar, H., Palma, M.: *Helicobacter pylori*: *cagA* status and *vaca* genotyping in Chile. Detection of a *s2/m1* strain. Rev Med Chil. 129, (2001)
55. Peek, R.M., Moss, S.F., Tham, K.T., Pérez-Pérez, G.I., Wang, S., Miller, G.G., Atherton, J.C., Holt, P.R., Blaser, M.J.: *Helicobacter pylori cagA+* strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. J Natl Cancer Inst. 89, (1997). <https://doi.org/10.1093/jnci/89.12.863>
56. Faundez, G., Troncoso, M., Figueroa, G.: *cagA* and *vacA* in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer and non-ulcerative dyspepsia patients. BMC Gastroenterol. 2, (2002). <https://doi.org/10.1186/1471-230X-2-20>
57. Díaz, M.I., Valdivia, A., Martínez, P., Palacios, J.L., Harris, P., Novales, J., Garrido, E., Valderrama, D., Shilling, C., Kirberg, A., Hebel, E., Fierro, J., Bravo, R., Siegel, F., Leon, G., Klapp, G., Venegas, A.: *Helicobacter pylori vacA s1a* and *s1b* alleles from clinical isolates from different regions of Chile show a distinct geographic distribution. World J Gastroenterol. 11, (2005). <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i40.6366>
58. Paredes-Osses, E., Sáez, K., Sanhueza, E., Hebel, S., González, C., Briceño, C., García Cancino, A.: Association between *cagA*, *vacAi*, and *dupA* genes of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathologies in Chilean patients. Folia Microbiol (Praha). 62, 437–444 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0514-y>

59. Sugiyama, T., Nanjo, S., Nakajima, T., Kato, C.: *Helicobacter pylori* Reinfection Diagnosed by Endoscopic and Histologic Recurrence in a Patient with Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Case Rep Gastroenterol.* 17, (2023). <https://doi.org/10.1159/000528309>

12. ANEXOS

12.1 Sobre consentimiento Informado para investigación seres humanos






El presente proyecto de tesis se encuentra bajo la tutela del profesor Dr. Felipe Zúñiga Arbalti, perteneciente al departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de La Universidad de Concepción. Además, este proyecto es en colaboración con el Hospital Las Higueras de Talcahuano, por lo cual se también se cuenta con el apoyo de un Gastroenterólogo, Dr. Carlos Valenzuela, perteneciente a la Unidad de Endoscopia del Hospital.

Este consentimiento informado (Anexo 12.3) se encuentra aprobado por el comité de ética, bioética y bioseguridad de la Universidad de Concepción y por el comité ético científico del Servicio de Salud Talcahuano.

12.2 Protocolo manejo y desecho residuos biológicos

El presente proyecto utilizará como protocolo de manejo y desecho de residuos biológicos el designado por la entidad MATPEL (**Tabla 20**), perteneciente a la Universidad de Concepción, la cual tiene como normativa el decreto supremo N°148/2003 Reglamento sanitario sobre manejo de residuos peligrosos.

Tabla 20: Clasificación y manejo de residuos biológicos. Extraído desde manual MATPEL (2016).

| Tipo de Residuo | Definición | Almacenamiento y Retiro | Contenedor o bolsa | |
|---|--|--|--|---|
| Residuos biológicos (tipo 1) | Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos. | Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*. | Bolsa de autoclave amarilla |  |
| Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2) | Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos. | Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*. | Caja cortopunzante amarilla |  |
| Residuos bio-inertes (tipo 3) | Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que NO están contaminados con bacterias o virus patógenos u otras sustancias peligrosas. | Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico. | Bolsa para residuos inertes color negro |  |
| Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4) | Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que NO han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos. | Deben ser almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como "Cortopunzante inerte", hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final | Contenedor plástico 4 u 8 kg |  |
| Residuos microbiológicos (tipo 5) | Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por desinfección en un baño con solución de hipoclorito de sodio. | Deben ser entregados a la unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación. | Bolsa de autoclave transparente o blanca (solo para autoclave) |  |

(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y la unidad RESPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la unidad RESPEL.

Instructivo elaborado en colaboración con la Facultad de Ciencias Biológicas.

Revisado 15-01-2016

12.3 Consentimiento Informado

INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO: “VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* EN MUESTRAS DE SALIVA”

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

Investigador Responsable: Dr. Carlos Valenzuela Valenzuela, Gastroenterólogo

Investigador Principal: Dr. Felipe Zúñiga Arbalti, PhD (Bioquímico), UdeC

Investigador Alterno: Dra. Apolinaria García Cancino, PhD (Bioquímica), UdeC

Alumna de Postgrado: Michelle Anaís Cordonier Tello, Bioquímica

Estimado/a:

Junto con saludar cordialmente y esperando que se encuentre bien, el presente equipo de investigación le hace entrega de la siguiente información del estudio de investigación y consentimiento informado.

PROPÓSITO

El propósito de este documento es invitarlo/a participar en un estudio de investigación y entregarle toda la información necesaria para que Ud. pueda decidir libre y voluntariamente si desea participar en la investigación que se le ha explicado verbalmente y que a continuación se describe en forma resumida.

Por favor, tómese el tiempo necesario para leerlo atentamente y asegurarse de que todas sus preguntas y preocupaciones sean abordadas antes de otorgar su consentimiento.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Determinar la presencia de *Helicobacter pylori* en muestras de saliva mediante técnicas de diagnóstico molecular.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Helicobacter pylori (*H. pylori*) corresponde a una bacteria capaz de colonizar principalmente el estómago. En Chile, la prevalencia de infecciones causadas por *H. pylori* varía entre el 40% al 70% según la Organización Mundial de Gastroenterología. Las infecciones causadas por esta bacteria generalmente no presentan síntomas, pero cuando esto es sostenido en el tiempo se ha asociado a patologías como el cáncer gástrico, gastritis crónica y úlcera péptica. Existen estudios que señalan que *H. pylori* puede ser encontrada al interior de la boca, actuando como una reserva de dicha bacteria en esta zona, pudiendo causar nuevamente la aparición de patologías gástricas. En esta investigación queremos estudiar la presencia de *H. pylori* en la saliva utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Además, queremos analizar si existe

una relación entre la presencia o no de *H. pylori* en saliva con el resultado de la biopsia realizada durante la endoscopia digestiva alta realizada por el médico especialista.

Participar en este estudio no le generará riesgos ni consecuencias para su salud física.

TIPO DE INTERVENCIÓN

Si acepta participar, se le solicita:

1. **Conceder una Muestra de Saliva de 5 ml aproximadamente.** La muestra se tomará mediante un tubo estéril y se le dará las instrucciones para hacerlo de manera correcta. Esto será realizado en pabellón de la Unidad de Endoscopia, previo al examen de endoscopia digestiva alta y por personal de salud calificado.
2. **Compartir el resultado de test de ureasa con biopsia realizado por el médico especialista,** con el equipo de investigación.
3. **Permitir utilizar la muestra de test de ureasa con biopsia realizada por el médico especialista.** Esta muestra corresponde a la obtenida en el examen de endoscopia digestiva alta, en pabellón de la Unidad de Endoscopia, realizada por el Médico Especialista la cual, una vez finalizado el examen, es desechada.

SELECCIÓN DE PARTICIPANTES

Cualquier persona, mayor de edad, que asista a realizarse una endoscopia digestiva alta con un Médico Gastroenterólogo del equipo del Hospital Las Higueras de Talcahuano, puede participar en este estudio de investigación. El estudio requiere reclutar aproximadamente 300 personas.

BENEFICIOS

Su participación en esta investigación científica permitirá obtener datos que posibiliten mejorar el diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante un método mínimamente invasivo, rápido y confiable, aplicable a una gran población.

El participar en este estudio no tiene costos para usted y no recibirá ningún pago por estar en este estudio.

CONFIDENCIALIDAD

Es importante señalar que todos los datos personales obtenidos son confidenciales y la información obtenida será utilizada exclusivamente para fines científicos. Esta información será custodiada por el **Investigador Responsable, Dr. Carlos Valenzuela Valenzuela**, quien mantendrá los registros de datos almacenados en el computador del investigador responsable. El anonimato será resguardado entregando un número correlativo a su nombre.

Los resultados estarán disponibles para usted, y para ello debe comunicarse con el investigador responsable.

Usted no tiene por qué tomar parte en esta investigación si no desea hacerlo. Su participación es completamente libre y voluntaria. Si no desea participar del presente proyecto de investigación su negativa no traerá ninguna consecuencia para usted. De

la misma manera si lo estima conveniente usted puede dejar de participar en el estudio en cualquier momento de éste.

SEGUROS

No existe mayor riesgo en la toma de muestra de saliva ni en la utilización de la muestra de biopsia desechada, por lo cual no se considerará ningún tipo de seguros asociados al estudio.

El Investigador Principal, **Dr. Felipe Zúñiga Arbalti**, correo electrónico **fzuniga@udec.cl** y número de contacto **+56 975196091**, le manifiesta su voluntad a aclarar cualquier duda que surja sobre su participación en la actividad realizada.

Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el **Comité Ético Científico del Servicio de Salud de Talcahuano**, que es un comité cuya tarea es asegurarse de que se protege de daños a los participantes en la investigación. Si usted desea averiguar más sobre este comité, el número de contacto es **(41) 2722150** y correo electrónico **etica.sst@redsalud.gob.cl**.

Si usted acepta participar del estudio, ruego firmar el Acta de Consentimiento que sigue:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a participar en la investigación que lleva como título:

“VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* EN MUESTRAS DE SALIVA”.

1. Confirmando que leí y entendí toda información detallada en el folleto informativo que explica el estudio y tuve la oportunidad de hacer todas las preguntas necesarias y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado.
2. Autorizo y doy mi consentimiento para la toma de muestra de saliva y muestra desechada de biopsia gástrica.
3. Entiendo y estoy de acuerdo que se estudiarán varios parámetros desde el material obtenido de la muestra de saliva y muestra desechada de biopsia gástrica.
4. Entiendo que la decisión de participar en esta investigación es absolutamente libre y voluntaria. Si no deseo participar en ella o, una vez iniciada la investigación, no deseo proseguir colaborando, puedo hacerlo sin problemas. En ambos casos, se me asegura que mi negativa no implicará ninguna consecuencia negativa para mí.
5. Estoy de acuerdo con ser parte del estudio y entiendo que mis muestras serán usadas solamente para la investigación en curso y que serán destruidas cuando la investigación se haya completado.
6. La firma de este consentimiento informado no reemplaza la autorización del consentimiento para efectuar el procedimiento de endoscopia digestiva.

Nombre del participante

Firma del participante

Fecha

Yo, el que suscribe, investigador, confirmo que he entregado verbalmente la información necesaria acerca del estudio, que he contestado toda duda adicional y que no ejercí presión alguna para que el participante ingrese al estudio.

Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las Directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes.

Se le proporcionará al paciente una copia de esta información escrita para el participante y formulario de consentimiento firmado.

Nombre investigador responsable clínico Firma investigador responsable clínico Fecha

Nombre Director institución/Ministro de fe Firma Director institución/ministro de fe Fecha

ACTA DE RECHAZO O RETIRO

He decidido libre y voluntariamente no participar o abandonar la investigación, haciendo uso de mi derecho a retirarme en el momento que lo estime conveniente, sin que ello pueda ocasionarme ningún perjuicio:

Nombre del participante Firma del participante Fecha