

## DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *LACTOBACILLUS SPP* CON ACCIÓN ANTI *HELICOBACTER PYLORI*

Dra. Espinoza Carrasco Hedy <sup>(1)</sup>, Dra. Flores Calderón Dariela <sup>(1)</sup>, Dr. Cazorla Cornejo Ernesto <sup>(1)</sup>, Dra. García Cancino Apolinaria Del Rosario <sup>(2)</sup> Blga. Sánchez Huamán Catherine <sup>(1)</sup>, Br. Latorre Farfan Libio

<sup>(1)</sup> [hedyiyi@hotmail.com](mailto:hedyiyi@hotmail.com)

<sup>(1)</sup> Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

<sup>(2)</sup> Universidad de Concepción Chile.

### RESUMEN

*Helicobacter pylori* es una bacteria que coloniza la superficie de la mucosa gástrica, induciendo, en la mayoría de las personas una inflamación crónica asintomática. Es considerado el más frecuente agente etiológico de la úlcera gastroduodenal y como un factor de riesgo para el desarrollo a largo plazo de cáncer gástrico. Estudios epidemiológicos han mostrado que la colonización por *Helicobacter pylori* ocurre en forma más temprana, frecuente e intensa en individuos que viven en países en desarrollo que en aquellos de países industrializados que tienen mejores condiciones de higiene. El cáncer gástrico es un importante problema de salud que se relaciona con alta morbilidad y mortalidad, representa la segunda causa de muerte relacionada con cáncer.

El objetivo del estudio fue determinar si las cepas de *Lactobacillus spp.* son capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *Helicobacter pylori* procedentes de biopsias gástricas

de pacientes. La metodología utilizada fue aislamiento, cultivo e identificación de *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus spp* y la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* mediada por cepas de *Lactobacillus spp.*, se muestreó un total de 200 pacientes de los cuales 135 fueron HP+ (*Helicobacter pylori* positivos). No se encontraron diferencias significativas entre factores como la edad, sexo y procedencia geográfica con la infección por esta bacteria. Se logró aislar un total de 47 cepas de *Lactobacillus spp* de un total de 200 pacientes de los cuales 31 cepas pertenecían a pacientes que presentaban también a *Helicobacter pylori*. Sin embargo no se encontró relación a nivel estadístico por la prueba del Chi-cuadrado entre ambos grupos.

*Lactobacillus spp.* mostró acción inhibitoria frente a *Helicobacter pylori* en un 89.4% y el espectro de inhibición microbiana producida por *Lactobacillus spp.* osciló entre 1.0 y 2.5 cm.

**PALABRAS CLAVES:** *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus spp*, microaerofílico

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a bacterium that colonizes the gastric mucosa surface, leading in most individuals an asymptomatic chronic inflammation. It is considered the most common etiologic of gastroduodenal ulcer and a risk factor for gastric cancer. Epidemiological studies have shown that *Helicobacter pylori* colonization occurs early and frequently in individuals who live in developing countries than in those who lives in industrialized countries. Gastric cancer is a great health problem that is associated with high morbidity and mortality. It represents the second cause of death related to cancer. The objective of the present study was to determine if the strains of *Lactobacillus spp.* are able to inhibit the growth of

*Helicobacter pylori* strains from patients gastric biopsy. The methodology used is the isolation, culture and identification of *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus spp* and growth inhibition of *Helicobacter pylori* mediated to *Lactobacillus spp.*, were studied 200 patients, 135 were HP + (*Helicobacter pylori* positive). No significant differences between factors such as age, sex and geographical origin with infection by this bacterium was found. Have been isolated 47 of 200 patients strains of *Lactobacillus spp* which 31 strains belonged to patients who also had *Helicobacter pylori*. However no relationship was found statistically by the Chi - square test between groups.

*Lactobacillus spp.* showed inhibitory activity against *Helicobacter pylori* in 89.4 % and microbial inhibition spectrum produced by *Lactobacillus spp.* ranged from 1.0 to 2.5 cm.

## INTRODUCCION

*Helicobacter pylori* es una bacteria que coloniza la superficie de la mucosa gástrica, induciendo en la mayoría de las personas una inflamación crónica y asintomática. Es considerado el más frecuente agente etiológico de la úlcera gastroduodenal y como un factor de riesgo para el desarrollo a largo plazo de cáncer gástrico. Estudios epidemiológicos han mostrado que la colonización por *Helicobacter pylori* ocurre en forma más temprana, frecuente e intensa en individuos que viven en países en desarrollo que en aquellos de países industrializados que tienen mejores condiciones de higiene. (Obregón C., y cols. 2003). *Helicobacter pylori* es un patógeno humano con amplia distribución mundial, las tasas de prevalencia encontrados en los países en vías de desarrollo son más altas que en los países desarrollados de allí, que entre las estrategias de control y erradicación de esta bacteria esta el conocimiento de la prevalencia de la infección por este microorganismo y la difusión de medidas preventivas en base a la explicación de los principios y de la causalidad de dicha infección. Se ha demostrado que cepas probióticas de *Lactobacillus* pueden residir temporalmente en el estómago y adherirse a la mucosa gástrica, posiblemente interfiriendo con el desarrollo de *Helicobacter pylori*. Los probióticos pueden modular la colonización

de la mucosa gástrica. Esta actividad puede ser realizada por las bacterias ácido lácticas mediante la producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, estas últimas capaces de afectar la integridad de la membrana por formación de poros. (Contreras F., y cols 2007). Dada la importancia que en la actualidad están tomando los probióticos como alimentos funcionales y en particular las bacteriocinas que producen, resulta interesante conocer algunas características de estas sustancias y sus propiedades antimicrobianas. Es por esta razón que el presente trabajo de investigación tiene por objetivo evaluar si las cepas de *Lactobacillus spp.* son capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de biopsias gástricas de pacientes que acuden al Hospital Regional del Cusco. De allí que el objetivo de esta investigación es determinar si las cepas de *Lactobacillus spp.* son capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *Helicobacter pylori* procedentes de biopsias gástricas de pacientes, y estudiar el espectro de inhibición microbiana de *Lactobacillus spp* frente a las cepas de *Helicobacter pylori* de esta investigación se desarrolla de acuerdo a la metodología planteada por el CLAHP (Centro Latinoamericano de Investigación de *Helicobacter pylori*).



### AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori*

1. Se requirieron cuatro muestras de biopsia gástrica por paciente (2 de antro y 2 de cuerpo) tomadas por el personal responsable del servicio de Endoscopia Digestiva.
2. Una biopsia de antro y otra de cuerpo fue sometida a la prueba de la ureasa rápida en el mismo consultorio de Gastroenterología.
3. Para el cultivo, las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas a temperatura ambiente en un tubo vacuteiner con 0.5 ml de solución fisiológica estéril.
4. En el laboratorio estas muestras se trituraron para lo cual se utilizó un tubo de ensayo de menor diámetro al tubo bacuteiner que se usó como pistilo.
5. Se sembró en Agar Columbia suplementado con sangre de cordero al 5 % más un suplemento selectivo DENT que contiene antibióticos y antifúngicos que impiden el crecimiento de bacterias contaminantes y de algunos hongos (vancomicina 10 mgr/ml, trimetoprim 5 mgr/ml y polimixina B 0,25 mgr/ml).
6. Las placas se incubaron a una temperatura de 37°C por un tiempo de 3-10 días, en jarra de anaerobiosis en un ambiente húmedo y microaerófilo.
7. Al cabo de 3 - 10 días se procedió a la identificación de *Helicobacter pylori*. Para identificar las cepas se utilizaron las siguientes pruebas de diferenciación bioquímica: Ureasa, Catalasa, Oxidasa.
8. Se realizó la tinción GRAM para la visualización microscópica.

### AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE *Lactobacillus spp.*

1. Para el aislamiento de *Lactobacillus spp* se inocularon 0,1 ml del homogeneizado de la biopsia gástrica en 1 ml de caldo MRS (Oxoid)
2. Se incubaron a 37°C en atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub> durante 2 días.
3. Los caldos que resultaron con crecimiento

positivo fueron sembrados en placas de agar MRS e incubados en las condiciones ya descritas.

4. A las colonias sospechosas de *Lactobacillus spp* se les realizó tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa. (Los pacientes colonizados por *Lactobacillus spp* fueron aquellos que presentaron cultivo en agar MRS positivo.)
5. Para realizar los ensayos de propiedades probióticas, las cepas de *Lactobacillus spp* se reactivaron mediante 2 subcultivos consecutivos de 1 día cada uno, en caldo MRS a 37°C.

### INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Helicobacter pylori* MEDIADA POR CEPAS DE *Lactobacillus spp.*

1. Para realizar este proceso se requería de cultivos recientes de *Helicobacter pylori* de no más de tres días y con un cultivo abundante, en aquellos cultivos donde se observó un crecimiento escaso se procedió a multiplicar las cepas reincubando por 2 días mas en las condiciones anteriormente señaladas para el aislamiento.
2. Al obtener un cultivo regular o abundante, se procedió a realizar antibiograma, para esto se recogió con un hisopo estéril las colonias presentes en la placa (si el cultivo era puro) o con una asa de siembra (si el cultivo estaba contaminado).
3. Luego se realizó una emulsión en 0.5ml de solución salina fisiológica, hasta llegar a una densidad equivalente al MF N°2. (10<sup>4</sup> ufc/ml)
4. Por otro lado en placas de agar Müller-Hinton, suplementadas con 5% de sangre de caballo defibrinada, se realizaron orificios de 5 mm de diámetro.
5. Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, se introdujo un hisopo estéril dentro de la suspensión y se inoculó a las placas de Mueller-Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre.
6. Posteriormente en los orificios se inocularon 0,03 ml de *Lactobacillus spp* reactivados como se describió anteriormente.
7. Finalmente, se midieron los halos de inhibición a los 4 días de incubación, los que fueron comparados con los halos producidos por las cepas de referencia utilizadas.

**Estadística.** Los resultados se recolectaron en tablas de contingencia y fueron analizados según test de Chi cuadrado y correlaciones, con intervalos de confianza de 95%.

**RESULTADOS**

**Aislamiento de *Helicobacter pylori*.**

Se muestreó a un total de 200 pacientes de los cuales 135 fueron HP+ (*Helicobacter pylori* positivos), como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1:** Porcentaje de infección por *Helicobacter pylori*.

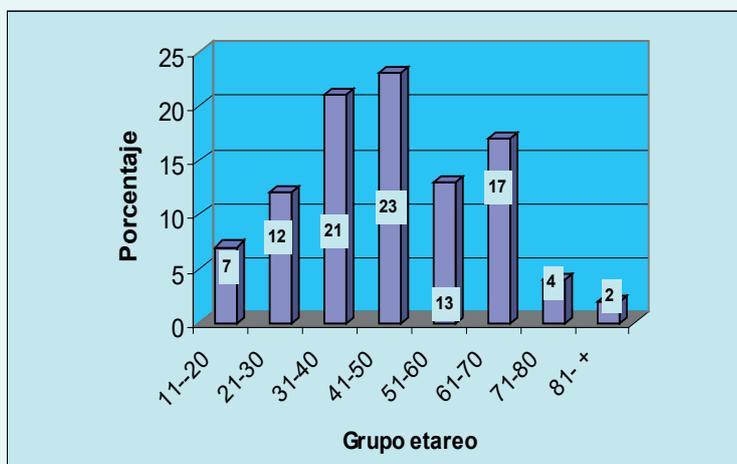
	Nº de pacientes	%
Pacientes HP+	135	67
Pacientes HP-	65	33
Total	200	100

Fuente: Ficha de investigación

**Estudio de la presencia de *Helicobacter pylori* según grupo etareo.**

La distribución por edades en los pacientes HP+ se muestra en la Figura 1. Se observa porcentajes más altos de positividad entre los 31 y 50 años. Los enfermos más jóvenes (entre 11 y 20 años) y los más ancianos (más de 71 años) presentan porcentajes menores de HP+.

**Figura 1:** Pacientes infectados con *Helicobacter pylori* según grupo etareo.



Fuente: Elaboración propia según resultados de laboratorio

**Aislamiento de *Lactobacillus spp.***

Se muestreo a un total de 200 pacientes de los cuales en 47 pacientes se logro aislar cepas de *Lactobacillus spp.*, como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Porcentaje de infección por *Helicobacter pylori*.

	Nº de pacientes	%
Pacientes <i>Lactobacillus</i> +	47	23
Pacientes <i>Lactobacillus</i> -	153	77
	200	100

Fuente: Elaboración propia según resultados muestreados

Según los resultados del 100% de pacientes de los que se logró aislar *Lactobacillus spp.*, el 66% de cepas aisladas de *Lactobacillus* pertenecían a pacientes que eran HP +, y el 34% restante pertenecían a pacientes que no presentaban infección por *Helicobacter pylori*.

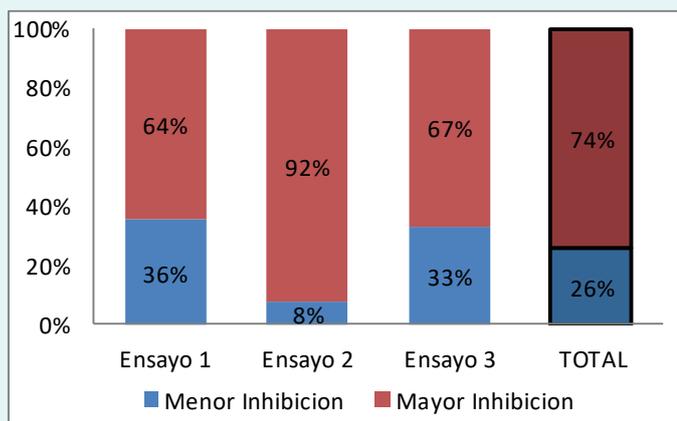
**Tabla 3:** Porcentaje de aislamiento de *Lactobacillus spp.* en pacientes Hp+ por *Helicobacter pylori*.

	Nº de pacientes	<i>Lactobacillus spp.</i> +	%
Pacientes Hp +	135	31	66
Pacientes Hp -	65	16	34
Total	200	47	100

Fuente: Elaboración propia según resultados de muestreo



**Figura 2.** Porcentaje de cepas de *H. pylori* que muestran inhibición frente a *Lactobacillus casei*.



Fuente: Elaboración propia según resultados de laboratorio

En la figura 2 se observa que en el primer ensayo de 14 cepas de *H. pylori* que presentaron inhibición frente a *Lactobacillus casei*, 9 presentaron una mayor inhibición y 5 una menor inhibición, en el segundo ensayo de 13 cepas de *H. pylori*, 12 presentaron una mayor inhibición y 1 presentó una menor inhibición, en el tercer en-

sayo de 9 cepas de *H. pylori*, 6 presentaron una mayor inhibición y 3 una menor inhibición. La interpretación de los datos antes mencionados se da en base a la comparación a los halos de inhibición obtenidas en la Prueba Piloto realizada frente a la Cepa patrón ATCC 43504.

### RESULTADOS

1. Se logró aislar un total de 135 cepas de *Helicobacter pylori* de un total de 200 pacientes. No se encontró diferencias significativas entre factores como edad, sexo y procedencia geográfica con la infección por esta bacteria.
2. Se logró aislar un total de 47 cepas de *Lactobacillus spp*, de un total de 200 pacientes de los cuales 31 cepas pertenecían a pacientes que presentaban también *Helicobacter pylori*.
3. *Lactobacillus spp.* mostró acción inhibitoria frente a *Helicobacter pylori* en un 89.4%.
4. El espectro de inhibición microbiano producidas por *Lactobacillus spp.* osciló entre 1.0 y 2.5 cm.

### BIBLIOGRAFIA

1. Azevedo y cols. 2004 Nutrient shock and incubation atmosphere influence recovery of culturable *Helicobacter pylori* from water. *Appl Environ Microbiol*; 70: 490-493.
2. Contreras F, Gonzales C, Garcia A. 2008 Detección y caracterización parcial de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus spp* con acción anti *Helicobacter pylori*. Universidad Concepcion.
3. Gomez G. Los probióticos. 2009 Una alternativa en el tratamiento de enfermedades UDES-CUCUTA. Colombia.
4. Lazo N., Maco M., Matos Z., Maguiña Y. 2007 Efecto protector del *Lactobacillus acidophilus* en gastritis erosiva inducida por indometacina en ratones. ISSN 1680-8398. CIMEL v.12 n.2 Lima .
5. López-Brea M., Diaz-Regañon J., Domingo D., Alarcón T. 2007 Inhibitory effect of Gram-negative and Gram-positive microorganisms against *Helicobacter pylori* clinical isolates *J Antimicrob Chemother*.
6. Obregón C., Cruchet S., Diaz E., Salazar G., Gotteland M. 2003 El consumo regular de *Lactobacillus johnsonii* interfiere con la colonización gástrica por *Helicobacter pylori*. *Rev. Chil. nutr.* v. 30 n.3 Santiago.
7. Parra T., Carballo F. 2007 Reservorios y vías de transmisión de la infección por *Helicobacter pylori*. *Anales del sistema sanitario de Navarra* . V.15.2
8. Ramírez A., Mendoza D., Leey J., Guerra J. 2002 Estudio del *Helicobacter pylori* en el Perú. *Rev Per Med Exp Salud Pública*. 19 (4) : 209-214
9. Yahav J y cols. 2006 Susceptibility-guided vs empiric retreatment of *Helicobacter pylori* Infection after treatment failure. *Dig Dis Sci*; Nov.
10. Yamanishi y cols. 2006 Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori* urease. *Infect Immun*; 74: 248-256.