

RÁPIDO PROTOCOLO DE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EVALUAR LA VIABILIDAD DE *HELICOBACTER PYLORI*

Claudio Alba, Alicia C. Marin, Adrian G. McNicholl, Ana Montalban-Arques, Irene Mora-Gutierrez, Antonio Jose Sanchez-Arroyo, Tamara Soler, David García-Fresnadillo, Javier P. Gisbert, Teresa Alarcón, David Bernardo
Realizado por: Laura Cáceres Mayordomo

INTRODUCCIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* es una de las causas principales de gastritis, úlceras pépticas y cáncer gástrico, en otras enfermedades digestivas. Es necesario diseñar métodos para diagnosticar eficientemente infecciones provocadas por dicha bacteria.

OBJETIVO

Diseñar un nuevo protocolo de citometría de flujo para evaluar la viabilidad de *Helicobacter pylori*.

MÉTODO

Se cultivó la cepa TIGR-26695 en Agar Columbia con sangre. En su fase estacionaria se resuspende en una solución con 0,9% NaCl (NCS). Se toman 3 alícuotas, se centrifugan y se resuspenden en diferentes condiciones:

- en solución salina (NCS) junto con calentamiento (100°C, 3 min), lo que provoca la muerte bacteriana
- en 70% de isopropanol (25°C, 45 min) que supone la muerte de las bacterias,
- únicamente con NCS (25°C, 45 min).

Bacterias vivas

Se realizaron mezclas de entre 0% y 100% de bacterias vivas

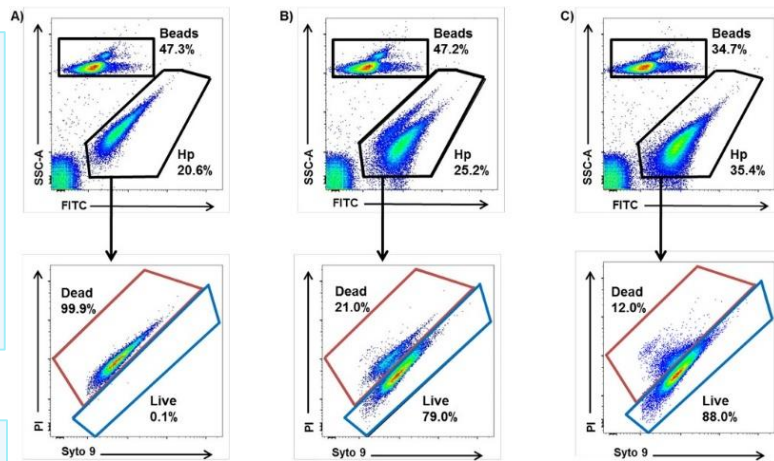


Fig 1. Resultados de la citometría de flujo

RESULTADOS

La citometría de flujo se llevó a cabo utilizando Syto 9, yoduro de propidio y microesferas.

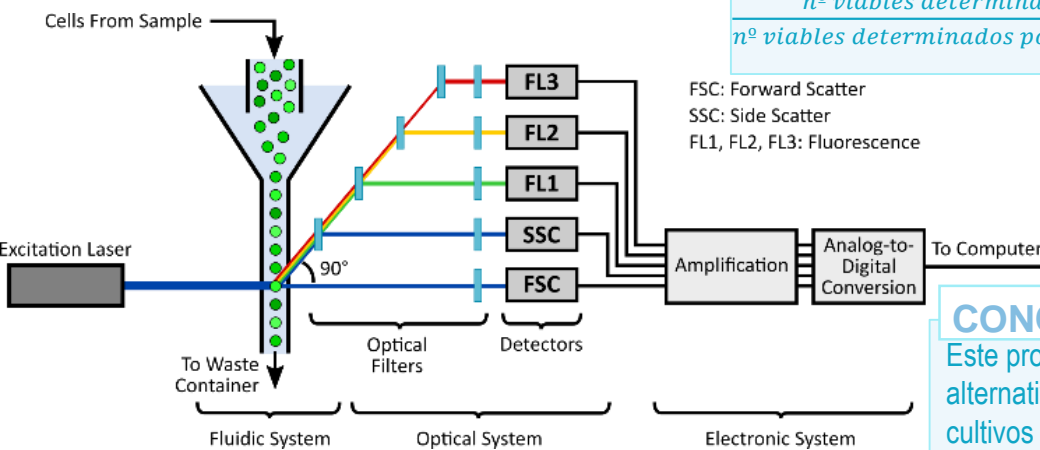
La distinción entre las microesferas y las bacterias se basa en Syto 9 (canal denominado FITC) y la dispersión lateral (SSC-A) (Fig 1).

La distinción entre bacterias vivas y muertas se realizó a través de Syto 9 y de yoduro de propidio (canal PE).

- En las bacterias con membranas dañadas difunde el yoduro de propidio (Fig 1A).
- Las bacterias vivas emiten más señal Syto 9 (Fig 1B).
- El análisis de una suspensión formada 100% por células vivas obtenidas a partir de un cultivo mostró una proporción de células muertas, este resultado probablemente sea debido a las condiciones de cultivo (Fig 1C).

Para poder expresar el número de células viables :

$$\frac{n^{\circ} \text{ viables determinados por citometría}}{n^{\circ} \text{ viables determinados por suspensión 100\% vivas}} \cdot 100$$



CONCLUSIÓN

Este protocolo podría ser una alternativa al diagnóstico a través de cultivos siendo sus principales ventajas la rapidez y la elevada sensibilidad incluso a poblaciones bacterianas de bajas densidades

BIBLIOGRAFÍA

1. Ambriz-Aviña V, Contreras-Garduño JA, Pedraza-Reyes M. Applications of Flow Cytometry to Characterize Bacterial Physiological Responses. *BioMed Research International*. 2014; 2014:1-14.
2. Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol*. 2015;15(1):36.