

# EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DEL GÉNERO *Passiflora* Y BÚSQUEDA DE BACTERIOFAGOS CON ACTIVIDAD LÍTICA FRENTE A *Helicobacter pylori*

Acosta CR, Muñoz A, Modesti G, Stepanian J, Reyes JJ, Saenz AF, Trespalacios AA  
Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias, Bogotá, Colombia

## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es una bacteria que presenta tropismo por las células del epitelio gástrico, se estima que el 60% de la población mundial está infectada por este microorganismo y en Colombia se presenta una prevalencia entre 70-78%. En el 100% de los infectados produce gastritis crónica y solo el 20% de estos progresará a patologías como úlceras gástricas, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT) y adenocarcinoma gástrico. Cerca de un 95% de los casos de cáncer gástrico se han asociado a la infección por *H. pylori*; motivo por el cual fue clasificado como un carcinógeno tipo 1 y se declaró que la erradicación de esta bacteria es la mejor estrategia en la prevención del cáncer gástrico. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos se ha convertido en la principal causa del fracaso en el tratamiento y en el 2017 la Organización mundial de la salud declaró a *H. pylori* como una bacteria de alta prioridad para el desarrollo de nuevos tratamientos. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos hidroetanólicos y acuosos, obtenidos de tres especies del género *Passiflora* (*P. edulis* var. *edulis*, *P. tarminiana* y *P. tripartita* var. *mollissima*) frente a *H. pylori*, adicional a esto se realizó la búsqueda de bacteriófagos con actividad lítica en muestras ambientales (agua residual) y biológicas (heces y biopsias gástricas).

En este estudio se determinó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1000 µg/ml para los extractos hidroetanólicos de *P. tripartita* var. *mollissima* y *P. tarminiana*. En cuanto a la evaluación de bacteriófagos, se identificaron placas de lisis en los cultivos de las cepas control de *H. pylori* que fueron enfrentados a los filtrados obtenidos a partir de una muestra del río Bogotá y dos del río Arzobispo; sin embargo, no se logró el aislamiento de ningún fago.

Los resultados de este estudio aportan al conocimiento de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas y búsqueda de bacteriófagos frente a *H. pylori*. Este estudio abre el camino para futuras investigaciones relacionadas con la evaluación de diferentes extractos de especies del género *Passiflora* y evidencia la necesidad de realizar el análisis químico y el fraccionamiento de los extractos activos. Por otro lado, los resultados de este estudio evidencian la dificultad que existe en el aislamiento de bacteriófagos líticos de *H. pylori*; aunque la fagoterapia es una alternativa terapéutica que ha sido exitosa en diferentes modelos bacterianos, para *H. pylori* se requiere una evaluación más amplia de las condiciones requeridas para el aislamiento de bacteriófagos.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un bacilo Gramnegativo, microaerófilico, con tropismo por las células del epitelio gástrico, se ha descrito que más del 60% de la población mundial está infectada por esta bacteria [1]. La alta prevalencia de esta infección a nivel global ha generado un gran impacto en la presentación de cáncer gástrico, ya que más del 95% de los casos se han relacionado con la presencia de *H. pylori* [2, 3]. En todos los infectados se produce gastritis crónica; la progresión a ulcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) se da en el 10-20% , 1-3% y < 0.1% de los pacientes respectivamente [4, 5, 6, 7]. Debido a esta problemática, la Organización mundial de la salud (OMS) ha clasificado a *H. pylori* como un carcinógeno tipo 1 y se ha declarado la importancia de

la erradicación de esta bacteria como la mejor estrategia en la prevención del cáncer gástrico [8].

El tratamiento de primera línea para tratar la infección por *H. pylori* se basa principalmente en el uso de antibióticos como amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol en combinación con un inhibidor de la bomba de protones (IBP); actualmente, estos esquemas de tratamiento presentan una eficacia entre el 60-70% [4], una cifra muy baja teniendo en cuenta que una terapia empírica aceptable debería presentar cifras superiores al 90% [4, 7]. La resistencia primaria y secundaria a claritromicina, levofloxacina, metronidazol y la aparición de cepas multiresistentes a estos tres antibióticos [7], ha llevado a la optimización de los esquemas de tratamiento mediante la adición de subsalicilato de bismuto a la terapia cuádruple, logrando aumentar la eficacia un 30-40% cuando se administra por 14 días [4]. Adicionalmente, en el informe del consenso Maastricht V/Florence (*Maastricht V/Florence Consensus Report*), no se recomienda el uso de metronidazol, claritromicina y levofloxacina cuando los índices de resistencia superan el 40%, 15% y 20% respectivamente [2, 4]; lo cual, tiene repercusión en muchas áreas geográficas al reducir significativamente las opciones terapéuticas para el tratamiento de la infección. Debido a esta problemática la OMS en el 2017, declaró a *H. pylori* como una de las bacterias que representan mayor amenaza para la salud humana, debido a la resistencia bacteriana que expresa. Así mismo, *H. pylori* fue clasificado como una bacteria de alta prioridad para el desarrollo de nuevos tratamientos [9, 10].

Diversos estudios se han enfocado en la búsqueda de nuevas alternativas para prevenir o erradicar la infección por *H. pylori*; dentro de estas opciones, se ha contemplado el desarrollo de vacunas, el uso de probióticos, extractos de plantas y la búsqueda de bacteriófagos con actividad lítica [11, 12, 13, 14]. La amplia diversidad de plantas y bacteriófagos en la tierra, aproximadamente 500.000 especies y  $4.8 \times 10^{31}$  partículas virales respectivamente [15, 16], hace de estos recursos una alternativa prometedora para la búsqueda de nuevas opciones en la erradicación de infecciones bacterianas multiresistentes [15, 16]. En el caso de *H. pylori* se han evaluado múltiples extractos derivados de plantas usadas tradicionalmente en el tratamiento de síntomas y patologías asociadas al sistema gastrointestinal [17, 18], dentro de estos se destaca *Passiflora incarnata* con una concentración mínima inhibitoria de 50  $\mu\text{g/mL}$  [18]. Se estima que existen alrededor de 500 especies del género *Passiflora* y en Colombia se han identificado cerca de 137 especies; las cuales, se encuentran distribuidas en la región andina, destacándose *P. tripartita* var. *mollissima* (curuba), *P. tarminiana* (curuba-de-indio), *P. edulis* var. *edulis* (gulupa), *P. edulis* var. *flavicarpa* (maracuyá); para las cuales los estudios en su actividad antimicrobiana son limitados [19].

Por otro lado; la fagoterapia, que se basa en la administración de bacteriófagos (fagos) virulentos que generan la lisis de su hospedero bacteriano; ha existido durante casi un siglo y desde entonces ha sido una práctica común en Europa del Este para el tratamiento de infecciones bacterianas [16, 20, 21]. En la actualidad, el uso de fagos también ha sido aplicado en bioingeniería, procesos biotecnológicos en alimentos, agricultura, control biológico en aguas y su aplicación clínica es considerada una alternativa a los antibióticos en bacterias multiresistentes [21, 22, 23]. La fagoterapia se ha administrado como tratamiento experimental en infecciones bacterianas por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., entre otros; obteniendo buenos resultados [20]. Sin embargo, la fagoterapia aún no se ha considerado para el tratamiento de la infección por *H. pylori*, esto debido principalmente a que el conocimiento de bacteriófagos líticos específicos para esta bacteria es aún muy limitado [22, 23].

Teniendo en cuenta los antecedentes, este estudio evaluó dos posibles alternativas con capacidad de inhibir *H. pylori*. En primer lugar, se determinó la actividad antimicrobiana de extractos de tres

especies del género *Passiflora* y se buscaron fagos con actividad lítica frente a esta bacteria en muestras de agua residual, heces y biopsias gástricas.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, resistencia antibiótica, alternativas terapéuticas, bacteriófagos, extractos vegetales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cepas bacterianas

Para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales y la presencia de bacteriófagos en muestras ambientales (agua residual) y biológicas (heces y biopsias), en este estudio se emplearon un total de ocho (8) cepas (Tabla 1); cinco (5) cepas de *Helicobacter pylori*, de las cuales dos (2) son cepas de referencia de la colección NCTC (The National Collection of Type Cultures) y tres (3) son cepas clínicas previamente aisladas y caracterizadas en el Grupo de Enfermedades Infecciosas en la línea de investigación: Caracterización molecular de *Helicobacter pylori* de la Pontificia Universidad Javeriana; adicionalmente, se usaron como controles una (1) cepa de *Campylobacter coli* y dos (2) de *Escherichia coli*; las cuales fueron obtenidas de la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ) y del Laboratorio de Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos de la Universidad Javeriana. Los controles de *Campylobacter coli* y *Escherichia coli* fueron empleados con base en reportes que involucran estas dos bacterias en brotes asociados con agua contaminada [24].

**Tabla 1.** Cepas empleadas en el estudio.

ESPECIE	CEPA DE REFERENCIA	CARACTERISTICAS
<i>Helicobacter pylori</i>	NCTC 11637	<i>cag A</i> +/ <i>vac A</i> s1m1
<i>Helicobacter pylori</i>	NCTC 11638	<i>cag A</i> +/ <i>vac A</i> s1m1
<i>Helicobacter pylori</i>	321A (Cepa de biopsia gástrica/CMPUJ)	<i>cag A</i> +/ <i>vac A</i> + Sin profagos
<i>Helicobacter pylori</i>	372C (Cepa de biopsia gástrica/CMPUJ)	<i>cag A</i> +/ <i>vac A</i> + Profago incompleto (Integrasa + / Holin -)
<i>Helicobacter pylori</i>	CYP288C (Cepa de biopsia gástrica/CMPUJ)	<i>cag A</i> +/ <i>vac A</i> + Sin profagos
<i>Campylobacter coli</i>	CMPUJ264	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	

<i>Escherichia coli</i>	WG5  Cepa aportada por el Laboratorio de Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos de la Universidad Javeriana [210].	(Método estándar ISO 10705-2) para la detección de colifagos como indicadores de contaminación fecal en agua).
-------------------------	---	--

CMPUJ: Colección de Microorganismos Pontificia Universidad Javeriana; ATCC: American Type Culture Collection; NCTC: National Collection of Type Cultures

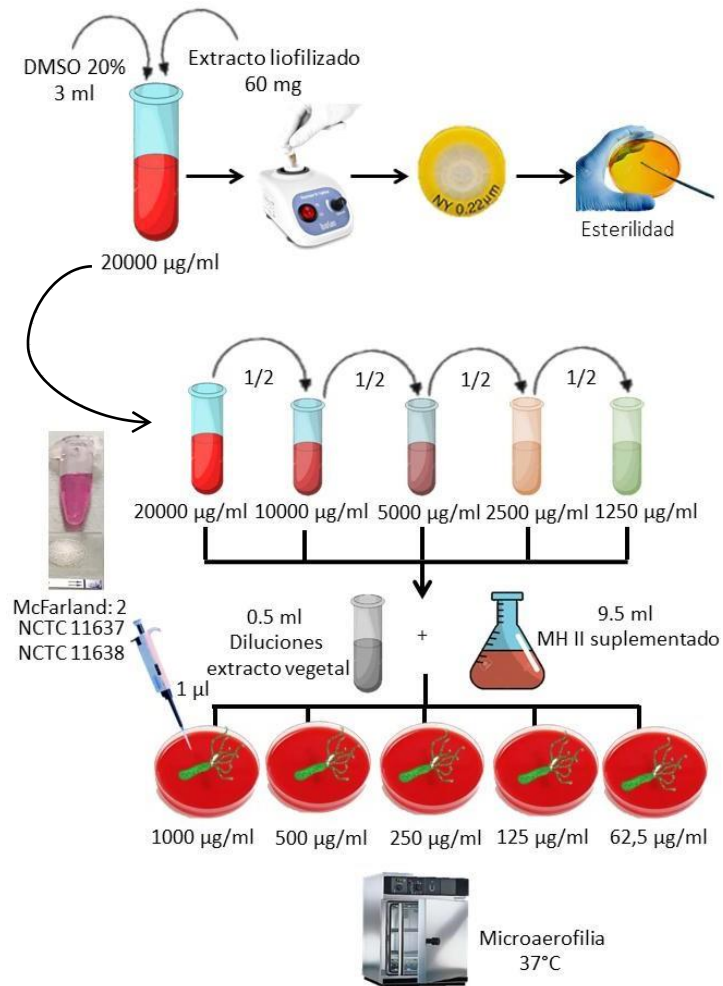
## 2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos del género *Passiflora* frente a *H. pylori*.

La colecta del material vegetal (hojas) de las especies *Passiflora edulis* var. *edulis*, *P. tarminiana* y *P. tripartita* var. *mollissima*, fue realizada por el Grupo de Investigación Fitoquímica Universidad Javeriana (GIFUJ), en los municipios de Nariño, Pasca y Subachoque Cundinamarca (25); la colecta del material vegetal se dio bajo el permiso Marco de Colecta de la Pontificia Universidad Javeriana. Posterior a esto, se realizó un proceso de secado en estufa de aire circulante (35°C/72 horas), molienda y obtención de extractos. Brevemente, se realizó maceración hidroalcohólica con etanol al 50% a una proporción 1:15 (m/v) por un periodo de 48 horas para la obtención de extractos hidroetanólicos, para los cuales se eliminó el etanol mediante el uso de rotaevaporador. Adicionalmente, se realizó infusión acuosa a una proporción 1:10 (m/v) por un periodo de 10 minutos, para la obtención de extractos acuosos. Para ambos extractos el agua se eliminó por liofilización [25].

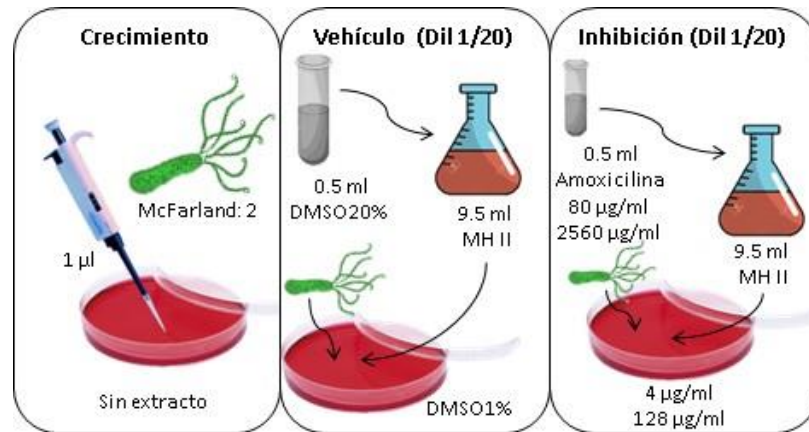
La evaluación de los extractos hidroetanólicos y acuosos de *Passiflora edulis* var. *edulis*, *P. tarminiana* y *P. tripartita* var. *mollissima*, se realizó siguiendo las recomendaciones del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI, 2010). Para esto, 0.5 ml de cada extracto a concentraciones de 1000, 500, 250, 125 y 62.5 µg/ml (obtenidas mediante diluciones seriadas 1/2 en DMSO 20%) se mezclaron con 9.5 ml de agar Mueller Hinton II suplementado y la mezcla fue vertida en caja de Petri, dejando solidificar. Las concentraciones de los extractos empleadas en este estudio fueron adaptadas a partir de un estudio previo realizado con un extracto metanólico de *Passiflora incarnata* frente a *H. pylori* [18]. La inoculación se realizó por triplicado empleando 1 µl de las cepas NCTC11637 y NCTC11638 de *H. pylori* a escala 2 de McFarland y la incubación se realizó por 72 horas a 37°C y 11% CO<sub>2</sub> con posterior evaluación de la Concentración mínima inhibitoria (MIC) [25]. Como controles se empleó: la esterilidad del medio, el crecimiento de las cepas en medio sin extracto, el control del vehículo (DMSO 1%) y el control de inhibición con amoxicilina a concentraciones de 64 y 128 µg/ml. Las concentraciones del control del vehículo y de inhibición fueron adaptadas a partir de estudios previos donde se empleó como control del vehículo DMSO al 2.5% y Amoxicilina a 64 y 128 µg/ml como control de inhibición (Figura 1) [18, 25].

**Figura 1.** Dilución en agar para evaluación de actividad antimicrobiana. **A.** Metodología del ensayo. **B.** Controles del ensayo.

**A.**



**B.**



### 2.3 Búsqueda de bacteriófagos líticos frente a *H. pylori* en muestras ambientales y biológicas

Las muestras fueron recolectadas en el periodo comprendido entre junio 2019 a noviembre de 2020 en la ciudad de Bogotá D.C. Las muestras ambientales (agua residual) fueron recolectadas en frascos estériles de 125 ml, en el río Bogotá: sector puente de guadua con ubicación 4°43'43.8"N 74°07'36.5"W, río Arzobispo: sector Parque Nacional 4°37'30.1"N 74°03'45.1"W, caño Pontevedra con ubicación 4°41'29.7"N 74°04'51.4"W y caño avenida Boyacá con Calle 66; ubicación 4°40'52.0"N 74°05'57.7"W. En cuanto a las muestras biológicas (heces y biopsias gástricas), estas fueron obtenidas de pacientes de gastroenterología del Centro Médico El Virrey; todos los pacientes que participaron en el estudio debían cumplir con criterios de inclusión y exclusión, entre ellos no haber consumido antibióticos 4 meses antes de la toma de las muestras; todos los pacientes fueron invitados a participar previa firma del consentimiento informado. Todas las muestras fueron transportadas en refrigeración (4°C) para su procesamiento; las muestras ambientales (agua residual) fueron clarificadas por centrifugación a 6000 g/20 min, según lo propuesto por Didamony GE. *et al.*, 2015 [26], seguido de la filtración del sobrenadante con dos tipos de membrana: PVDF (Polifluoruro de vinilideno) de 0.22, 0.45 µm y PES (Polietersulfona) de 0.22 µm, con el fin de evaluar la capacidad esterilizante de cada membrana, al reducir la mayor cantidad de carga bacteriana de la muestra; las muestras claras fueron filtradas directamente. En cuanto a las muestras de heces se siguieron las recomendaciones de Chibani-Chennoufi S. *et al.*, 2004 [27] y Born Y. *et al.*, 2019 [28]; en las cuales, aproximadamente 10 gr de cada muestra fueron homogenizados con 20 ml de un compuesto de 10 ml de solución TS (8.5g NaCl, 1g triptona/Litro) y 10 ml de Buffer SM (5.8g NaCl, 2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 7.9g Tris-HCl pH 7.5/Litro); posterior a la homogenización, se realizó centrifugación a 14500 g/15 min/4°C y el sobrenadante fue filtrado con membrana PES 0.22 µm. En el caso de las biopsias gástricas (Antro, cuerpo e incisura /paciente) estas fueron incubadas en 1 ml de caldo Brucella suplementado con suero fetal bovino e isovitalex a 37°C y 11% CO<sub>2</sub> por 48 horas, según recomendaciones de Abdel-Haliem ME. *et al.*, 2013 [29] y Cuomo P. *et al.*, 2020 [30]. Posteriormente se realizó maceración de cada muestra siguiendo el protocolo establecido en el Laboratorio de Bacteriología especial de la Universidad Javeriana (PUJ-FC-001); los macerados de cada muestra fueron centrifugados a 7000 g/5 min y el sobrenadante obtenido fue filtrado con membrana PES 0.22 µm, con el fin de remover la carga bacteriana.

Los filtrados obtenidos a partir de las muestras ambientales y biológicas, fueron empleados en la evaluación de la presencia de bacteriófagos líticos frente a las cepas bacterianas ya mencionadas. Dichos filtrados fueron conservados a -80°C con adición de 10% de glicerol (v/v). Adicional a la obtención de filtrados, se realizó la identificación de *H. pylori* en muestras biológicas (heces y biopsias gástricas), con el fin de determinar la presencia o ausencia de la bacteria y de esta manera poder predecir en cierta forma la presencia o ausencia de bacteriófagos. Para esto, el DNA genómico bacteriano fue extraído mediante la utilización del Kit de extracción “DNeasy Blood & Tissue” (Qiagen, EE.UU.); siguiendo las instrucciones del fabricante. Los eluidos obtenidos fueron analizados por PCR, mediante la amplificación de un fragmento del gen *vacA* (formas alélicas s1/s2).

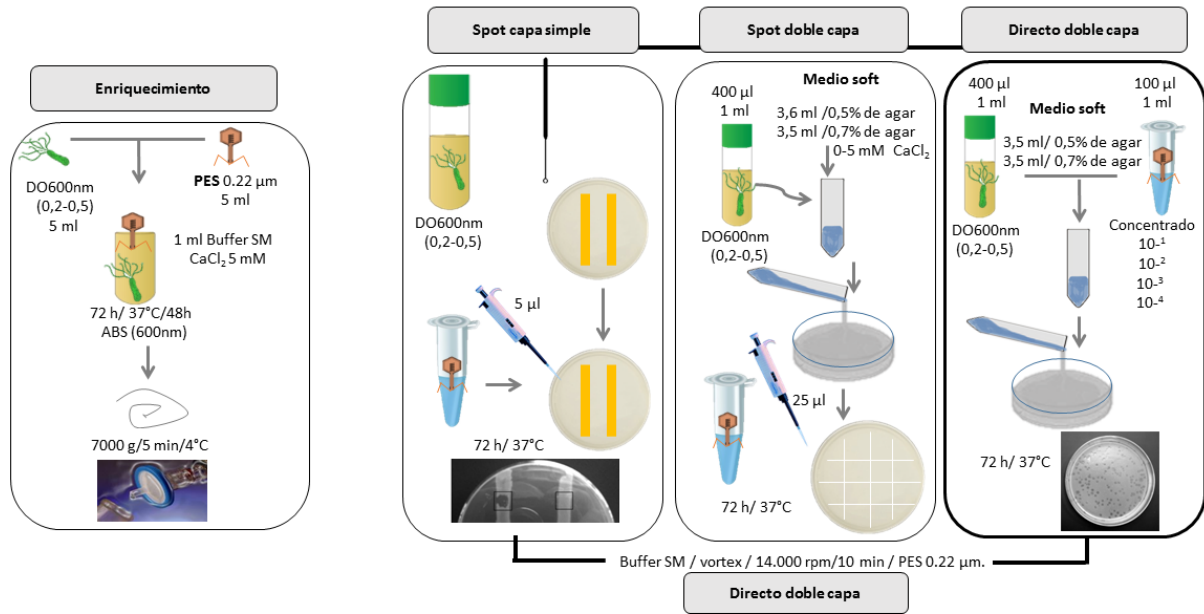
Se realizó cultivo líquido para el crecimiento bacteriano, siguiendo las recomendaciones descritas por Kitsos CM. *et al.*, 1998, Duque-Jamaica R. *et al.*, 2010, Douraghi M. *et al.*, 2010, Joo J. *et al.*, 2010 y Matsuzaki S. *et al.*, 2018. Brevemente, se empleó caldo Brucella suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 0,11% (v/v) de suplemento DENT (Oxoid™) y 0,52% (v/v) de Isovitalex (Becton Dickinson); a este medio se agregó 5.6% (v/v) de inóculo con una DO<sub>600nm</sub>: 0,05 a 0,1, se realizó incubación a 37°C y 11% CO<sub>2</sub> por 72-120 horas. La evaluación del crecimiento de *H. pylori* se realizó mediante curvas de crecimiento con medición de absorbancia

(600nm), siembra en medio sólido Brucella, coloración de Gram y pruebas bioquímicas (Ureasa, catalasa y oxidasa), determinando de esta manera la fase exponencial del cultivo, requerida para los ensayos de aislamiento de bacteriófagos [32–35].

Para el aislamiento de bacteriófagos se emplearon las cepas NCTC 11637, NCTC 11638, 321A, 372C y CYP288C de *H. pylori*, cepa CMPUJ264 de *C. coli* y ATCC 25922 de *E. coli* todas con una DO<sub>600nm</sub>: 0,2 a 0,5. Así mismo, se emplearon controles de esterilidad del medio y de los filtrados, control de crecimiento bacteriano y un control de calidad de los procedimientos, para el cual se realizó un ensayo de inhibición con la cepa WG5 de *E. coli* y un colifago específico de esta cepa; los cuales fueron aportados por el Laboratorio de Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos de la Universidad Javeriana [31]. Los métodos empleados para el aislamiento fueron basados en lo descrito por Twest R. *et al.*, 2009, Abdel-Haliem ME. *et al.*, 2013, Matsuzaki S. *et al.*, 2018 y Zhang K. *et al.*, 2020 [29, 32, 33, 34]. Brevemente; para el método de capa simple, la suspensión bacteriana de cada una de las cepas fue extendida en medio sólido Brucella, mediante siembra masiva con asa plástica, se dejó secar y posteriormente se agregaron por goteo (5 µl) los filtrados obtenidos, posterior a esto se realizó incubación por 72 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Para el método de spot en doble capa se evaluaron tres condiciones; en la primera, se emplearon 400 µl de cada cepa y 3,6 ml de medio soft con 0,5% de agar. En la segunda condición evaluada, se empleó 1 ml de cada cepa y 3,5 ml de medio soft con 0.7% de agar y en la tercera se utilizó 1 ml de cada cepa y 3,5 ml de medio soft con 0.7% de agar y 5 mM de cloruro de calcio CaCl<sub>2</sub>. La mezcla obtenida de las tres condiciones evaluadas fue vertida sobre medio sólido Brucella, se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos hasta solidificación de la capa superior y posteriormente se adicionaron por goteo 25 µl de los filtrados, los medios de cultivo se dejaron a temperatura ambiente hasta el secado completo de los *spot* (goteo) y se incubaron por 72 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Finalmente para el método directo en doble capa se evaluaron dos condiciones, en la primera, se emplearon 400 µl de cada cepa, 100 µl de cada filtrado y 3,5 ml de medio *soft* con 0,5% de agar. En la segunda condición evaluada, se empleó 1 ml de cada cepa, 1 ml de cada filtrado y 3,5 ml de medio *soft* con 0.7% de agar. La mezcla obtenida de las dos condiciones evaluadas fue vertida sobre medio sólido Brucella, se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos hasta solidificación de la capa superior y posteriormente se incubaron por 72 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia (Figura 2).

La extracción de las placas de lisis fue basada en lo descrito por Matsuzaki S. *et al.*, 2018. Para esto se empleó asa estéril y las placas fueron disueltas en buffer SM con ayuda de vortex; posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm/10 min y el sobrenadante fue filtrado con membrana PES 0.22 µm. Los filtrados obtenidos fueron evaluados mediante cultivo líquido de enriquecimiento, en el cual se expone la cepa bacteriana al filtrado, se incubó a 37°C en microaerofilia y se realizan mediciones de absorbancia 600nm, siembra en agar Brucella suplementado y pruebas bioquímicas (Ureasa, catalasa), con el fin de observar el comportamiento bacteriano. Adicionalmente, los filtrados fueron evaluados por el método directo en doble capa con diferentes diluciones: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> (Figura 2).

**Figura 2.** Métodos para el aislamiento de bacteriófagos



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos del género *Passiflora* frente a *H. pylori*.

En los controles de crecimiento y del vehículo (DMSO), se evidenció la presencia de *H. pylori*, por pruebas bioquímicas (ureasa, oxidasa, catalasa); determinando de esta manera, la ausencia de inhibición del crecimiento en el medio de cultivo y del diluyente empleado en los extractos. En cuanto al control de inhibición, se evidenció ausencia en el crecimiento de *H. pylori* para las dos concentraciones de amoxicilina evaluadas (64 y 128 μg/ml), las cuales fueron basadas en el estudio de Mahady GB. *et al.*, 2005.

Se obtuvieron tres extractos hidroetanólicos y tres acuosos para las tres especies de *Passiflora*. La evaluación de la actividad antimicrobiana de estos extractos mostró actividad anti-*H. pylori* en los extractos hidroetanólicos de *P. tripartita* var. *mollissima* y *P. tarminiana* con una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 1000 ug/ml (Tabla 2) (25). Los demás extractos mostraron actividad antimicrobiana débil con CMI >1000 ug/ml, por lo cual no se consideran promisorios en su efecto antimicrobiano (Tabla 2).

**Tabla 2.** Actividad antimicrobiana de extractos del género *Passiflora*.

Cepa	Extractos acuosos (μg/ml)					Extractos hidroetanólicos (μg/ml)				
	1000	500	250	125	62.5	1000	500	250	125	62.5
NCTC 11637	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NCTC 11638	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-




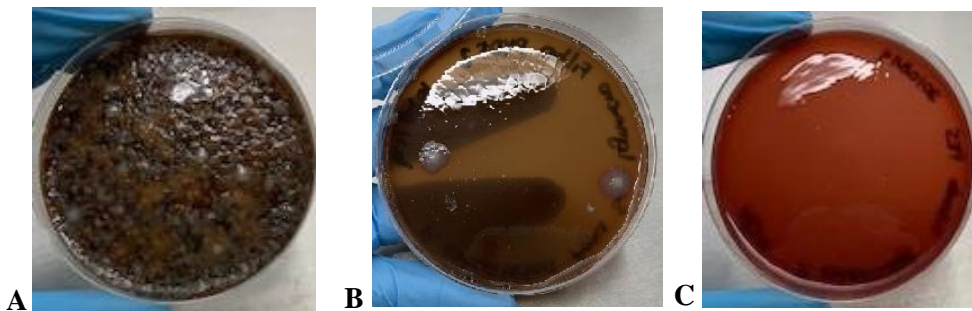
	<i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	-	: No presenta actividad antimicrobiana
	<i>P. tarminiana</i>	+	: Presenta actividad antimicrobiana
	<i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i>		

Tabla modificada de: Reyes JJ & Saenz AF. Tesis pregrado. FOMUCIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. 2017.

### 3.2 Búsqueda de bacteriófagos líticos frente a *H. pylori* en muestras ambientales y biológicas

Se recolectaron un total de 36 muestras de agua residual que corresponden al río Bogotá (n=30), río Arzobispo (n=2), caño Ponteviedra (n=1) y caño avenida Boyacá con Calle 66 (n=3); adicionalmente, se recolectaron muestras de heces de 31 pacientes y biopsias gástricas de 31 pacientes con muestras de cuerpo, antro e incisura de cada uno, obteniendo 36 filtrados de agua residual, 31 filtrados de heces y 93 filtrados de biopsias gástricas. Durante el procesamiento de las primeras muestras ambientales, se realizó la evaluación de dos membranas de filtración: PVDF (Polifluoruro de vinilideno) de 0.22, 0.45  $\mu\text{m}$  y PES (Polietersulfona) de 0.22  $\mu\text{m}$ , encontrándose una mayor capacidad de filtración en la membrana PES (Figura 3).

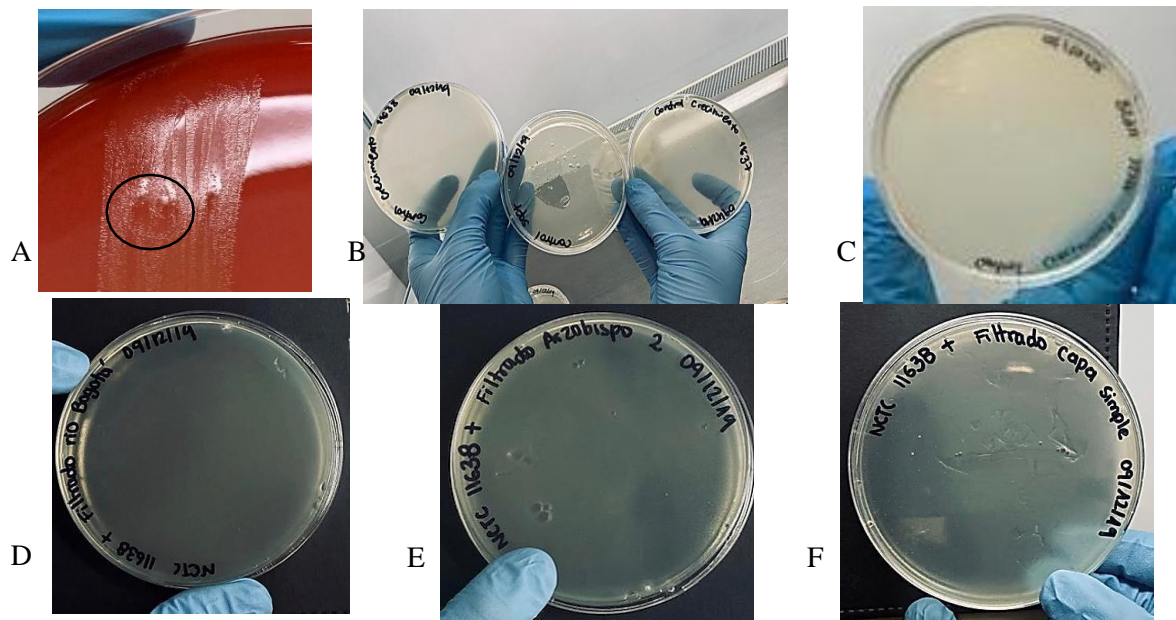
**Figura 3.** Evaluación de membranas de filtración. **A.** Filtración directa con membrana PVDF de 0.22  $\mu\text{m}$  **B.** Clarificación con centrifugación y filtración con membrana PVDF de 0.22  $\mu\text{m}$  **C.** Filtración directa con membrana PES de 0.22  $\mu\text{m}$ .



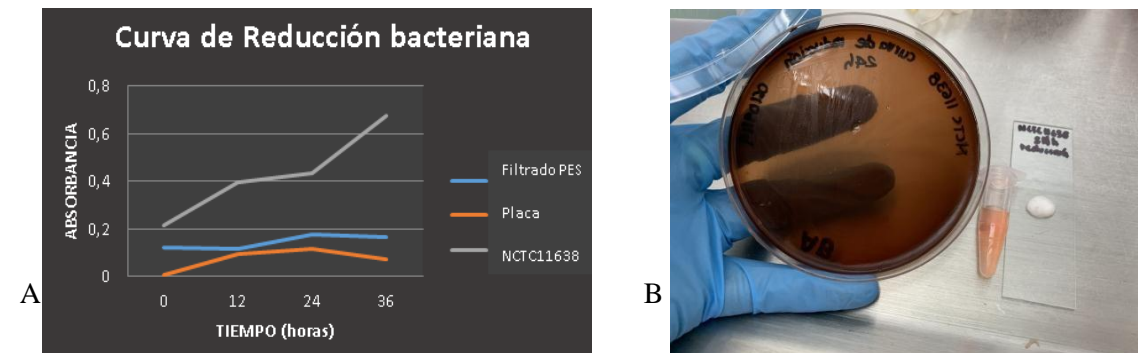
La evaluación de la presencia de bacteriófagos en muestras de agua residual, heces y biopsias gástricas, solo permitió la obtención de zonas de inhibición del crecimiento (placas de lisis) en una muestra del río Bogotá y dos del río Arzobispo (Figura 4). Las zonas de inhibición fueron extraídas y evaluadas mediante cultivo líquido de enriquecimiento, a partir de este cultivo se evaluó la D.O para la obtención de una curva de crecimiento bacteriano (Figura 5). El análisis de estas curvas permitió evidenciar restricción de crecimiento solamente en la cepa NCTC 11638 enfrentada con la placa de lisis obtenida por el método de capa simple (Figura 4A y Figura 5A) y el filtrado inicial. Los cultivos en los cuales se encontró actividad lítica, fueron filtrados y fueron enfrentados nuevamente con todas las cepas de *H. pylori* seleccionadas, empleando el método

directo en doble capa con diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ; sin embargo, en estos ensayos, no se obtuvo inhibición del crecimiento ni se evidenció actividad lítica. Razón por la cual, en este estudio no se lograron aislar bacteriófagos. En el control de calidad de los procedimientos, realizado con la cepa WG5 de *E. coli* y un colifago específico de esta cepa se evidenció la presencia de placas de lisis indicando la viabilidad de los medios de cultivo para el aislamiento de bacteriófagos.

**Figura 4.** Zonas de inhibición del crecimiento de *H. pylori*. **A.** Río Bogotá por método de spot en capa simple **B.** Controles de crecimiento y esterilidad del medio **C.** Control de crecimiento NCTC 11638 **D.** Río Bogotá por método directo en doble capa **E.** Río Arzobispo por método directo en doble capa **F.** Evaluación de placa del río Bogotá (Figura 9A) por el método directo en doble capa.



**Figura 5.** Cultivo de enriquecimiento. **A.** Curva de reducción bacteriana NCTC 11638 confiltrado y UFP. **B.** Identificación *H. pylori*.



#### 4. DISCUSIÓN

En los controles empleados para la evaluación de los extractos vegetales, el control de crecimiento y del vehículo permitieron determinar que el diluyente no presentó toxicidad en la concentración evaluada (1%), lo cual es concordante con estudios que han asociado características bacteriostáticas a concentraciones entre el 5-10% o  $\geq 20\%$  [35, 36, 37]. Adicionalmente, el DMSO presenta propiedades solventes de compuestos orgánicos e inorgánicos, permitiendo de esta manera una adecuada reconstitución del extracto liofilizado y gracias a su polaridad permite mantener los compuestos extraídos frecuentemente mediante solventes como el agua, etanol y metanol entre otros [38]. En cuanto al control de inhibición, se evidenció ausencia en el crecimiento de *H. pylori* para las dos concentraciones de amoxicilina evaluadas (64 y 128  $\mu\text{g/ml}$ ), las cuales fueron basadas en el estudio de Mahady GB. *et al.*, 2005. Teniendo en cuenta que el punto de corte para este antibiótico según el CLSI, 2010 es  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  (empleando como control de calidad cepas NCTC de *H. pylori*) [7, 39, 40]; las concentraciones evaluadas en este estudio fueron lo suficientemente altas para inhibir el crecimiento de las dos cepas NCTC empleadas.

De los 6 extractos evaluados se evidenció actividad antimicrobiana en los extractos hidroetanólicos de *P. tarminiana* y *P. tripartita var. mollissima* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , esta es considerada una eficiencia moderada débil en cuanto a su actividad antimicrobiana [41]; lo cual contrasta con lo encontrado por Mahady GB y colaboradores para *Passiflora incarnata* (CMI 50  $\mu\text{g/mL}$ ) por el método de dilución en agar [18]. Estas diferencias en la CMI pueden estar relacionadas con la especie de *Passiflora*, ya que se ha descrito que la composición química puede variar entre especies [42]; otro factor involucrado es el método de extracción, que para *P. incarnata* fue maceración con metanol al 95%, lo cual puede favorecer la extracción de compuestos diferentes; ya que el metanol facilita la obtención de una mayor cantidad de compuestos polifenólicos y de menor polaridad [43]. Adicionalmente, se ha reportado que los extractos metanólicos presentan una alta citotoxicidad, seguido por los extractos de cloroformo, hexano, acetato etílico, agua y butanol [38]; esto es de trascendencia teniendo en cuenta que la extracción y reconstitución de los liofilizados en el estudio de Mahady GB y colaboradores, fue realizada con metanol [18]. Por último se encontraron diferencias en la concentración del inóculo; que para el estudio de Mahady GB., *et al.* fue de 8  $\mu\text{l}$  que equivalía aprox.  $1 \times 10^6$  UFC/ml y en el presente estudio se realizó el spot (goteo) de 1  $\mu\text{l}$  del inóculo a escala 2 de McFarland que equivale aprox.  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  UFC/ml, siguiendo las recomendaciones del CLSI, 2010 para la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a bacterias fastidiosas o de aislamiento infrecuente [40]. En cuanto a la evaluación de actividad antimicrobiana de especies del género *Passiflora* frente a *H. pylori*, en la actualidad solo se reporta el estudio realizado por Mahady GB. *et al.*, 2005 y otro realizado por Masadeh MM. *et al.*, 2014 [44]; sin embargo, en este último se realizó la evaluación por difusión en disco impregnado con concentraciones entre 100000  $\mu\text{g/mL}$  y 1582.5  $\mu\text{g/mL}$  de un extracto de *P. incarnata*, obtenido por percolación en etanol al 95%; estos resultados no son comparables a los obtenidos en el presente estudio, ya que el estándar de oro para la evaluación de actividad antimicrobiana en *H. pylori* es la dilución en agar [40] y las concentraciones empleadas por Masadeh MM y colaboradores son consideradas con actividad débil (MIC: $> 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) [41, 45].

El análisis químico de los compuestos presentes en las tres especies del género *Passiflora* evaluadas en este estudio, ha sido reportado por Reyes JJ & Saenz AF. 2019; quienes identificaron la presencia de saponinas y flavonoides, mediante Cromatografía en Capa Delgada de Alta Eficiencia (HPTLC) y Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia (UHPLC) (25). La presencia de estos compuestos fue diferente entre especies, encontrándose una mayor cantidad de saponinas en los extractos de *P. edulis var edulis* y *P. tripartita var mollissima* y de flavonoides en *P. tarminiana* y *P. tripartita var mollissima*; adicionalmente en este estudio se determinó que la extracción hidroetanólica es más eficiente en la obtención de estos dos compuestos [25], lo cual puede estar relacionado con la actividad antimicrobiana de los extractos hidroetanólicos de *P. tarminiana* y *P. tripartita var. mollissima* (CMI 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) y teniendo en cuenta que se ha reportado previamente que estos compuestos presentan

actividad antimicrobiana [46].

La evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos del género *Passiflora* es un poco más amplia en otros modelos bacterianos como *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus gallolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*; para los cuales se han analizado extractos de éter de petróleo, metanol y acetona de *P. quadrangularis*, *P. maliformis* y *P. edulis* [47]. En el estudio de Ramaiya., *et al.*, se determinó una actividad antimicrobiana disminuida de los extractos de *Passiflora* frente a bacterias Gramnegativas, excepto *K. oxytoca* que fue sensible al extracto de acetona obtenido de *P. maliformis* (hojas); adicionalmente, presento una sensibilidad intermedia frente a este mismo extracto obtenido de *P. edulis* (hojas) y frente a los extractos de éter de petróleo y metanol de *P. maliformis* (hojas); en el caso de *P. vulgaris*, este solo presento una sensibilidad intermedia a los extractos de metanol de *P. maliformis* y *P. quadrangularis* (hojas) [47]. La disminuida actividad antimicrobiana frente a bacterias Gramnegativas, encontrada por Ramaiya., *et al.*, se puede asociar a la bicapa lipídica que conforma a estos microorganismos, ya que esta es una barrera eficaz para moléculas polares [48]; las cuales son principalmente extraídas con solventes como el agua, metanol y etanol [38]. Se ha descrito que las variaciones en la actividad de extractos vegetales, puede estar relacionada con la presencia de compuestos antimicrobianos en diferentes partes y especies de plantas, adicionalmente se ha sugerido que los extractos de metanol presentan una mayor actividad antimicrobiana gracias a su alto contenido de compuestos fenólicos [47]; sin embargo a estos extractos también se les ha atribuido actividad citotóxica [38], la cual podría interferir en la interpretación de resultados; por lo tanto es importante evaluar la citotoxicidad de los solventes empleados.

Al analizar estos resultados y según lo propuesto por Scorciapino MA., *et al.* 2017 [48], se puede inferir que el uso de solventes con menor polaridad favorece la obtención de extractos con mayor actividad antimicrobiana frente a bacterias Gramnegativas. Por tal motivo, se requiere de análisis posteriores de los extractos que presentaron actividad en este estudio, con el fin de determinar que metabolitos pueden estar generando la actividad antimicrobiana; adicionalmente, se requiere evaluar extractos obtenidos con solventes de menor polaridad para determinar si este factor tiene efecto en la actividad antimicrobiana; esta información ampliaría el conocimiento frente al posible uso de especies del género *Passiflora* como agentes antimicrobianos frente a *H. pylori*, aprovechando la gran diversidad de estas plantas en el territorio Colombiano.

Por otro lado, en la búsqueda de bacteriófagos líticos específicos de *H. pylori*, se determinó una mayor capacidad de filtración en la membrana PES, lo cual se ajusta a las recomendaciones de diversos autores que sugieren que la filtración debe excluir la mayoría de partículas no virales, por lo que se ha propuesto el uso de un poro de 0,22  $\mu\text{m}$  [50]. Según el estudio de Mocé-Llivina, L. *et al.* 2003; en el que se compararon las membranas de polifluoruro de vinilideno y poliétersulfona en suspensiones virales y agua residual; la membrana PES es recomendada debido a la baja adsorción de partículas virales y la capacidad de filtración de grandes volúmenes, lo que permite una buena recuperación de virus en muestras ambientales [50].

En este estudio no se logró el aislamiento de ningún bacteriófago en las muestras analizadas, lo cual puede estar relacionado con múltiples factores descritos, que intervienen en una infección viral productiva y el consecuente aislamiento exitoso de bacteriófagos; dentro de estos, se destacan las condiciones del cultivo, basadas en el pH (7.2) y la biodisponibilidad de iones calcio y magnesio, necesarios para la adsorción viral, al favorecer interacciones electrostáticas que son importantes en la unión del fago al receptor bacteriano [51, 52]. En el presente estudio se empleó como control de infección, la cepa WG5 de *E. coli* y un colifago específico de esta; con el fin de garantizar que el medio de cultivo y las condiciones de incubación permitían la infección; la obtención de placas de lisis permitió establecer que las condiciones de cultivo eran adecuadas para el aislamiento de bacteriófagos tanto en ausencia o presencia de cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$ . En cuanto a las cepas de *H. pylori*, las placas de lisis fueron obtenidas a partir de medios de cultivo sin adición de  $\text{CaCl}_2$ , lo cual concuerda con la metodología reportada para el aislamiento de fagos en esta bacteria [29, 32]. Es importante tener en

cuenta que *H. pylori* es una bacteria de difícil crecimiento, nutricionalmente exigente y microaerofílica, lo cual conlleva a la utilización de medios altamente enriquecidos, a tiempos y atmosferas de incubación diferentes, que pueden modificar considerablemente la concentración de iones, así como el pH final de los medios de cultivo. *H. pylori* tiene características especiales de crecimiento y probablemente los bacteriófagos capaces de infectar esta bacteria también los tengan; sin embargo, son necesarios más ensayos para lograr definir unas condiciones más estables y óptimas para lograr el aislamiento de estos bacteriófagos.

Dentro de las condiciones a evaluar, sería relevante incluir diferentes concentraciones de sales como lo realizó Zhang K. *et al.*, 2020, encontrando porcentajes de adsorción del fago P1 en *E. coli* cercanos a 100, en la concentración de 5 mM de CaCl<sub>2</sub> [33]; o como lo realizado por Moldovan R. *et al.*, 2007, donde encontraron un mayor porcentaje de adsorción del fago λ en *E. coli* a concentraciones de 10<sup>-2</sup> M de sulfato de magnesio MgSO<sub>4</sub> [52]; o en el caso de Chen X. *et al.*, 2016, quienes encontraron que la lisis de *Lactobacillus plantarum* por el fago P1 ocurrió sin presencia de cationes divalentes [53]. Sin embargo, ellos encontraron que la lisis con formación de placas claras fue más rápida en presencia de Ca<sup>2+</sup>; contrario a la presencia de Mg<sup>2+</sup> o ausencia de cationes, donde las placas se difundieron o no se aclararon [53]. Adicionalmente, se requeriría evaluar diferentes condiciones de pH y temperatura basados en lo encontrado Chen X. *et al.*, 2016 para el fago P1 en *Lactobacillus plantarum*, donde el porcentaje de adsorción fue mayor al 90% en un rango de pH 4-8 siendo más alto a pH 7 y cercano al 100% en un rango de temperatura 30-42°C, lo cual concuerda con el rango óptimo de crecimiento de esta bacteria [53]. Para evaluar estas condiciones, es importante tener en cuenta que *H. pylori* crece entre 30 a 37° C con tiempos de generación de 4.6 h a 30°C, 3.2 h a 34°C y 2.0 h a 37 °C, según lo descrito por Jiang X & Doyle MP., 1998; quienes igualmente reportaron el crecimiento de esta bacteria a pH de 7.3, 5.5 y 4.5 con tiempos de generación de 4.7 h, 3.6 h y 2.3 h respectivamente [54]. La concentración y viabilidad bacteriana, es otro factor involucrado en una infección productiva [51]; para la cual se requiere que el hospedero se encuentre en fase exponencial. En este estudio se evaluaron dos condiciones de incubación para el crecimiento de *H. pylori* en cultivo líquido y en las curvas de crecimiento obtenidas se determinó la fase exponencial entre 0,2 a 0,5 a una DO<sub>600nm</sub>, la cual fue alcanzada entre las 48-72 horas de incubación con agitación y entre las 120-168 horas sin agitación. Estos datos concuerdan con lo expuesto por Kitsos, C. M., *et al.* 1998, donde la incubación con agitación aumentó significativamente el crecimiento pero la muerte fue más rápida, contrario a los cultivos sin agitación donde el crecimiento se mantiene por largos periodos de tiempo [55], haciendo de este un método costo-efectivo para el crecimiento de *H. pylori*. Teniendo en cuenta que la concentración y viabilidad bacteriana son necesarias para el aislamiento de bacteriófagos, se puede inferir que la presencia o ausencia de agitación en el cultivo de *H. pylori*, no influye en el aislamiento de estos virus; ya que bajo las dos condiciones se llega a una fase de crecimiento exponencial de la bacteria, necesaria para la evaluación de filtrados por el método de spot o directo [32, 51].

La evaluación microbiológica durante las curvas de crecimiento permitió evidenciar el cambio progresivo de la morfología de *H. pylori* de forma bacilar a cocoide, lo cual ocurrió posterior a las 72 horas en los cultivos con agitación y 168 horas en los cultivos sin agitación; esto se relaciona principalmente con el agotamiento de nutrientes como la glucosa y aminoácidos, necesarios para el metabolismo de la bacteria [56, 57]. Debido a los largos periodos de incubación, la transición a forma cocoide es frecuente; según Douraghi M., *et al.* 2009, la presencia de formas cocoides en medios líquidos con agitación se evidencia a partir de las 24 horas de incubación (17-21% cocos) y aumenta a las 72 horas (38-48 %) [58], en cultivos sin agitación aún no se ha determinado. Se ha descrito que las formas cocoides son viables pero no cultivables [59, 60, 61, 62, 63]; lo cual puede interferir en la infección por fagos y posterior lisis bacteriana; teniendo en cuenta esto, es importante un adecuado aporte nutricional, el cual se basa en la utilización de medios como Brucella, Mueller-Hinton e infusión cerebro corazón (BHI) con adición de sangre de caballo, suero fetal bovino (FBS) o equino y suplementos que aporten aminoácidos y vitaminas (B-ciclodextrina, Vitox e Isovitalex) [55, 58, 64, 65, 66]; así mismo se ha recomendado la adición de suplementos antibióticos que proporcionen selectividad en el cultivo (Vancomicina, Cefsulodin, Polimixina B, Trimetoprin y Anfotericina B) [67]. Estas condiciones de cultivo garantizan el crecimiento de *H. pylori* y prolongan la transformación a formas

cocoides pero no la evitan [55, 58, 64, 65, 66]; por lo tanto, se recomienda realizar centrifugación del cultivo y resuspensión celular en medio de cultivo fresco, ya que los cultivos prolongados favorecen la formación de cocos [56, 57].

Otro factor que frecuentemente se ha relacionado con una obtención exitosa de bacteriófagos es la concentración de estos virus, ya que la interacción fago-hospedero es un proceso aleatorio, dado por la presencia del fago y su hospedero en un mismo nicho [51]. Tratando de garantizar una buena concentración de bacteriófagos en las muestras analizadas, en el presente estudio se realizó la identificación molecular de *H. pylori* en 31 muestras de heces y 93 muestras de biopsias gástricas; empleando la técnica de PCR con la identificación del gen *vacA*, que es constitutivo de esta bacteria; lo cual, permitió confirmar su presencia en dichas muestras. El gen *vacA* fue positivo en el 32.2% de las muestras de heces (10/31) y el 64.5% de las muestras de biopsia gástrica (60/93); antro 58% (18/31), incisura 67.7% (21/31) y cuerpo 67.7% (21/31). A pesar de que estos resultados sugieren que la bacteria estaba presente en la mayoría de la muestras, los ensayos realizados para el aislamiento de bacteriófagos no lograron su objetivo, esto puede estar relacionado la presencia y concentración de estos virus en las muestras analizadas, por lo cual se recomienda ampliar el número de muestras en diferentes fuentes, así como la utilización de métodos de concentración como los reportados por Sanchez AC., *et al.* 2020 o Vale FF *et al.*, 2008 [68, 69].

Hasta la fecha, los reportes de Cuomo P. *et al.* 2020, Vale FF *et al.* 2008 y Mahmoud EF Abdel-Haliem & Ahmed Askora. 2013; son los únicos para el aislamiento de bacteriófagos con actividad lítica frente a *H. pylori* en muestras de biopsias gástricas, heces, y agua residual [29, 30, 69]. Al analizar los aspectos que pudieron haber influenciado en los resultados obtenidos en este estudio, se identificó que Cuomo y Vale emplearon el medio BHI (Brain Heart Infusion) y Abdel-Haliem empleó el medio LB (Luria Bertani) para el cultivo bacteriano; sin embargo, esto no debería tener ninguna influencia ya que se ha descrito que medios como el BHI, Mueller Hinton (MH), Trypticase soya (TS), Ham's F-12 (F-12), Brucella (empleado en el presente estudio) entre otros medios nutritivos, permiten un crecimiento óptimo de la bacteria [67]. En cuanto a las condiciones de cultivo, solo el estudio de Cuomo y colaboradores especifica la adición de 10% de suero equino como suplemento del medio; en este aspecto, diversos estudios han recomendado la suplementación con suero fetal bovino o equino y la adición de productos que aporten vitaminas y aminoácidos [55, 58, 64, 65]; así como antibióticos que proporcionen selectividad en el cultivo [67]. Con el fin de garantizar un adecuado crecimiento de *H. pylori* y la disminución en la transformación a formas cocoides, se recomienda el uso de  $\beta$ -Ciclodextrina como suplemento del medio de cultivo, ya que según lo encontrado por Douraghi M., *et al.* 2009, este suplemento tiene la capacidad de neutralizar compuestos tóxicos favoreciendo el crecimiento y viabilidad de esta bacteria [58].

El estudio de Cuomo y colaboradores determinó la fase exponencial de crecimiento entre 0.6-0.8 (OD600) y en el presente estudio se definió entre 0.2-0.5 (OD600), en absorbancias superiores se evidenciaron formas cocoides indicando el comienzo de la fase estacionaria, lo cual concuerda con lo descrito por Kitsos CM. *et al.*, 1998 y Benaissa M. *et al.*, 1996. Las diferencias encontradas en los rangos de absorbancia de los dos estudios puede estar relacionada con la cantidad del inóculo, según Shahamat M., *et al.* 1991, el tamaño del inóculo genera diferencias significativas en el crecimiento entre las 0-24 h, siendo más abundante en la concentración de  $1 \times 10^5$  comparado con  $1 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  UFC que fueron las concentraciones evaluadas [70]. Por lo tanto, se recomienda la evaluación de diferentes concentraciones de inóculo, con el fin de determinar la variación en la concentración bacteriana de la fase exponencial y si esto tiene influencia en el aislamiento de bacteriófagos.

Otra diferencia importante, está dada por el tamaño de la membrana de filtración empleada por Cuomo y Abdel-Haliem (0.45  $\mu\text{m}$ ) y la empleada en el presente estudio (0.22  $\mu\text{m}$ ), este tamaño fue seleccionado con el fin de excluir la mayoría de partículas no virales mediante la filtración y teniendo en cuenta que el diámetro de los fagos líticos reportados para *H. pylori* esta entre 62 – 92.5 nm para la cabeza y 12-180 nm para la cola [29, 69], el filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  no debería restringir su obtención; sin embargo, se recomendaría que en futuros estudios se analice la posibilidad de incluir ensayos con filtros de mayor

tamaño de poro.

Se ha descrito que las muestras de agua residual, son una fuente potencial para el aislamiento de bacteriófagos y como se mencionó previamente, la presencia del hospedero en la muestra aumenta la posibilidad del aislamiento [71, 72]. Es por ello, que en los ensayos del presente estudio se empleó agua residual del río Arzobispo y Bogotá, teniendo en cuenta que en estudios previos se ha reportado la presencia de *H. pylori* en estas fuentes [63, 73]. A partir de algunas de estas muestras se lograron obtener placas de lisis; sin embargo, no se lograron replicar y no se obtuvo el aislamiento de ningún fago. Es importante tener en cuenta que las formas cocoides de *H. pylori* son generalmente encontradas en el ambiente [74], lo cual puede dificultar la infección por parte de bacteriófagos y llevar a una disminución en la cantidad de fagos disponibles en estas fuentes ambientales. A pesar de esto, el presente estudio brinda información acerca de las fuentes potenciales para el aislamiento de bacteriófagos específicos de *H. pylori* y de los factores a tener en cuenta para el aislamiento efectivo de estos fagos en estudios posteriores.

Adicional a los múltiples factores que se analizaron en este documento, es importante mencionar que los estudios de Cuomo P. *et al.* 2020, Vale FF *et al.* 2008 y Mahmoud EF Abdel-Haliem & Ahmed Askora. 2013, fueron realizados en Naples, Italia; Lisboa, Portugal y Zagazig, Egipto, empleando un número indeterminado de muestras de biopsias gástricas, heces y agua residual provenientes de estas áreas geográficas [29, 30, 69]. Teniendo en cuenta que son áreas geográficas diferentes, las condiciones ambientales, sanitarias y prevalencia de la infección por *H. pylori* pueden variar; lo cual también podría influir en el aislamiento de bacteriófagos. Así mismo, estudios reportados en Europa, Asia y Africa, relacionados con la presencia de bacteriófagos insertados en el genoma de *H. pylori* han reportado la presencia de estos elementos en aproximadamente el 20% de las cepas, sin embargo, un estudio reciente publicado por Muñoz AB., *et al.* 2021, reporta por primera vez la presencia de bacteriófagos en el genoma en cepas del continente americano y la frecuencia reportada de estos elementos fue de tan solo el 12.6% (75)]. Estos resultados sugieren una menor prevalencia de profagos en aislamientos americanos de *H. pylori* comparado con lo reportado en aislamientos de otras localizaciones geográficas (75), posiblemente, este hallazgo pueda estar relacionado con la baja frecuencia de bacteriófagos disponibles en fuentes ambientales o clínicas en nuestro país e indicaría que probablemente las cepas colombianas tienen menor susceptibilidad a la infección por bacteriófagos.

A pesar de que en este estudio no se logró el aislamiento de bacteriófagos líticos de *H. pylori*, es importante tener en cuenta que este es un tema aún en construcción y aunque para muchas otras bacterias se han logrado aislar diferentes bacteriófagos y se han logrado implementar como alternativas terapéuticas [23], para *H. pylori*, las publicaciones relacionadas son escasas [29, 30, 76, 77, 78], y la caracterización que se ha logrado hacer hasta el momento aún no ha descrito la totalidad de factores necesarios para poder considerar la fagoterapia como una alternativa terapéutica viable para el tratamiento de erradicación para *H. pylori*. En los estudios realizados hasta el momento, se ha analizado la estabilidad a condiciones físico-químicas como la temperatura y pH; datos importantes, teniendo en cuenta las difíciles condiciones de la mucosa gástrica, sitio en el cual los bacteriófagos deberían infectar y lisar la bacteria; adicionalmente, la estructura biológica de los bacteriófagos está dada por la presencia de ácidos nucleicos (DNA o RNA) y cápsides proteicas [79, 80, 81, 82]; las cuales, pueden verse afectadas en los procesos de producción a nivel industrial, si se escala en un futuro el uso de fagos de esta bacteria como terapia alternativa para la infección [81]. En la actualidad, ningún ensayo de bacteriófagos con actividad lítica frente a *H. pylori* ha llegado a la experimentación en un modelo *in vivo* que permita verificar si efectivamente los fagos pueden ser considerados como una opción terapéutica.

En los estudios de fagos líticos de *H. pylori* también se ha reportado la especificidad de hospedero con cepas clínicas de esta bacteria y cepas de *Campylobacter coli*, lo cual descartaría posibles repercusiones en la microbiota [81]; sin embargo, en ningún estudio ha analizado la afectación real que podría tener el uso de alguno de estos bacteriófagos en la microbiota gástrica. Por último, recientemente se determinó la tasa de adsorción ( $1.89 \times 10^9$  mL/min), periodo de latencia (45 min) y tamaño de explosión (80 UFP) del fago Hpφ aislado a partir de biopsias gástricas; para el cual, se evaluó la actividad *in-vitro* en

combinación con lactoferrina y nanopartículas de hidroxiapatita para el tratamiento de células gástricas infectadas, obteniendo reducción bacteriana de una concentración inicial de  $10^4$  a aprox.  $10^1$  UFC y actividad anti-inflamatoria con una expresión relativa de los genes TNF- $\alpha$  e IFN- $\beta$  disminuida [30], a pesar de que esta descripción es un poco más completa que los reportes previos, aún existen aspectos desconocidos, el genoma de los fagos reportados no se conoce y este es un aspecto importante para determinar si existen genes involucrados en lisogénia, producción de toxinas o resistencia antimicrobiana [83]. De igual manera no existe información sobre los mecanismos de resistencia que pueda tener *H. pylori* frente a la infección por bacteriófagos y aún no se conocen los receptores involucrados en la interacción fago-hospedero. Lo que se conoce hasta ahora ha brindado una expectativa positiva frente a la utilización de estas partículas virales como alternativa terapéutica frente a la infección por *H. pylori*; sin embargo, muchos más estudios son necesarios para tratar de abarcar los vacíos de conocimiento que aún existen y superar los retos metodológicos que fueron evidentes en el desarrollo de este estudio y que sin lugar a duda plantean un desafío importante para el planteamiento de futuros estudios relacionados.

## 5. CONCLUSIONES

En este estudio se encontró actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* con una CMI de 1000  $\mu\text{g/ml}$  para los extractos hidroetanólicos de *P. tripartita* var *mollissima* y *P. tarminiana*, por el método de dilución en agar; avalado por las normas del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI). Este es el primer estudio que brinda información acerca de la actividad biológica de estas especies de *Passiflora* frente a *H. pylori*; sin embargo, se recomienda realizar ensayos con cepas clínicas de *H. pylori* con el fin de determinar la actividad antimicrobiana de los extractos teniendo en cuenta la variabilidad biológica y de susceptibilidad de las diferentes cepas, adicional e esto se recomienda la evaluación de más especies de *Passiflora*, aprovechando la amplia diversidad de este género en el territorio Colombiano y de más extractos obtenidos a partir de solventes de menor polaridad, con el fin de determinar si presentan mayor actividad antimicrobiana. El fraccionamiento de los extractos activos es otro punto clave en la ampliación de estos resultados en futuros estudios, con el fin de purificar los compuestos con mayor actividad inhibitoria, esto adicional a la evaluación de la citotoxicidad de los extractos o fracciones activas, con el fin de evaluar su uso en ensayos posteriores.

En este estudio no se logró el aislamiento de bacteriófagos con actividad frente a *H. pylori* a partir de muestras ambientales y biológicas por los métodos de doble capa y capa simple reportados en la literatura. Sin embargo, se brinda información acerca de las fuentes potenciales para el aislamiento de bacteriófagos y los aspectos o condiciones a tener en cuenta para un aislamiento exitoso de estos virus. Para futuros estudios se recomienda realizar el aislamiento de cepas de *H. pylori* a partir de las muestras en las que se va a evaluar la presencia de fagos; potenciando de esta manera, el aislamiento de bacteriófagos al enfrentarlos con la bacteria presente en el mismo nicho y se sugiere la utilización de métodos de concentración de bacteriófagos como los basados en gradientes de densidad o precipitación y el análisis de diferentes concentraciones de iones, diferentes pH y temperatura, así como la evaluación de diferentes concentraciones de inóculo para la obtención de fase exponencial, con el fin de identificar las condiciones requeridas para un aislamiento exitoso de bacteriófagos.

Adicional a esto, Se sugiere ampliar los estudios de bacteriófagos, encaminados a la comprensión de las interacciones entre fagos y *H. pylori*, incluyendo caracterización de receptores asociados a la adsorción y el ciclo de infección y la caracterización genotípica de bacteriófagos líticos con el fin de evaluar la ausencia de genes de lisogénia, producción de toxinas y resistencia antimicrobiana.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev. 1997;10(4):720-41.
2. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut. 2017 Jan;66(1):6–30.
3. Dang BN, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance: a WHO high priority? Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017 Jul;14(7):383–4.
4. Otero W, Gómez M, Otero L, Trespalacios A. *Helicobacter pylori*: ¿cómo se trata cómo se trata en el 2018?. Rev Gastroente.
5. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterology. 2017 Aug;153(2):420–9.
6. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. Clin Microbiol Rev. 2010 Oct;23(4):713–39.
7. Arévalo A, Otero WA, Trespalacios AA. *Helicobacter pylori*: resistencia múltiple en pacientes de Bogotá, Colombia. Biomédica. 2019 May 1;39:125–34.
8. IARC *Helicobacter pylori* Working Group. *Helicobacter pylori* Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer [Int.
9. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. Gastroenterology. 2018 Nov;155(5):1372-1382.e17.
10. Otero W, Trespalacios AA, Otero L, Vallejo M, Torres M, Pardo R, et al. Guía práctica para el diagnóstico y tratamiento .
11. Qadir MI. Phage therapy: A modern tool to control bacterial infections. Pak J Pharm Sci. 2015;7.
12. Prada-Peñaranda C, Holguin-Moreno A-V, González-Barríos A-F, Vives-Florez M-J. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. Univ Sci. 2014 Aug 14;20(1):43.
13. Ayala G. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. World J Gastroenterol. 2014;20(6):1450.
14. Vitor JMB, Vale FF. Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytomedicine. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011 Nov;63(2):153–64.
15. Subramani R, Narayanasamy M, Feussner K-D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. 3 Biotech. 2017 Jul;7(3):172.
16. Stone E, Campbell K, Grant I, McAuliffe O. Understanding and Exploiting Phage–Host Interactions. Viruses. 2019 Jun 18;11(6):567.

17. Cogo LL, Monteiro CLB, Miguel MD, Miguel OG, Cunico MM, Ribeiro ML, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *Braz J Microbiol.* 2010 Jun;41(2):304–9.
18. Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, Hamill FA, Fabricant D, Dietz BM, et al. In Vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytother Res.* 2005 Nov;19(11):988–91.
19. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol.* 2004 Sep;94(1):1–23.
20. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2017;8(3):162.
21. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev.* 2019 Jan 16;32(2):e00066-18, /cmr/32/2/CMR.00066-18.atom.
22. Sharma S, Chatterjee S, Datta S, Prasad R, Dubey D, Prasad RK, et al. Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiol (Praha).* 2017 Jan;62(1):17–55.
23. Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Curr Microbiol.* 2017 Feb;74(2):277–83.
24. Clark, C. G., Price, L., Ahmed, R., Woodward, D. L., Melito, P. L., Rodgers, F. G....Ellis, A. (2003). Characterization of Waterborne Outbreak–associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerging Infectious Diseases*, 9(10), 1232-1241.
25. Reyes JJ & Sáenz AF. Propiedades Antimicrobianas de Extractos de Hojas de Especies de *Passiflora* frente a *Helicobacter pylori* [Pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana; 2019.
26. Didamony GE, Askora A, Shehata AA. Isolation and Characterization of T7-Like Lytic Bacteriophages Infecting Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Egypt. *Curr Microbiol.* 2015 Jun;70(6):786–91.
27. Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Dillmann M-L, Kutter E, Qadri F, et al. Isolation of *Escherichia coli* Bacteriophages from the Stool of Pediatric Diarrhea Patients in Bangladesh. *J Bacteriol.* 2004 Dec 15;186(24):8287–94.
28. Born Y, Knecht LE, Eigenmann M, Bolliger M, Klumpp J, Fieseler L. A major-capsid-protein-based multiplex PCR assay for rapid identification of selected virulent bacteriophage types. *Arch Virol.* 2019 Mar;164(3):819–30.
29. Abdel-Haliem ME, Askora A. Isolation and characterization of bacteriophages of *Helicobacter pylori* isolated from Egypt. *Future Virol.* 2013 Aug;8(8):821–6.
30. Cuomo P, Papaianni M, Fulgione A, Guerra F, Capparelli R, Medaglia C. An Innovative Approach to Control *H. pylori*-Induced Persistent Inflammation and Colonization. *Microorganisms.* 2020 Aug 10;8(8):1214.
31. Campos C, Méndez J, Venegas C, Riaño LF, Castaño P, Leiton N, et al. Aptness of *Escherichia coli* host strain CB390 to detect total coliphages in Colombia. *Sci Rep.* 2019 Dec;9(1):9246.

32. Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M. Isolation of Bacteriophages for Fastidious Bacteria. In: Azeredo J, Sillankorva S, editors. Bacteriophage Therapy [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [cited 2020 Jan 19]. p. 3–10. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7395-8\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7395-8_1)
33. Zhang K, Young R, Zeng L. Bacteriophage P1 does not show spatial preference when infecting *Escherichia coli*. *Virology*. 2020 Mar;542:1–7.
34. Twest R, Kropinski AM. Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. Bacteriophages [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [cited 2020 Sep 23]. p. 15–21. (Walker JM, editor. *Methods in Molecular Biology*; vol. 501). Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-164-6\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-164-6_2)
35. Howard CA., Norred WP & Roth IL. Antimicrobial activity of Dimethyl Sulfoxide against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus megaterium*. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1969. Vol. 58, No. 7; 836-839.
36. Wadhvani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D., Bahaley, P., & Joshi, P. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *The Internet Journal Of Microbiology*. 2009; 7(1). doi: 10.5580/b43.
37. Ndip, R., Malange Tarkang, A., Mbullah, S., Luma, H., Malongue, A., & Ndip, L. et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *Journal Of Ethnopharmacology*. 2007; 114(3), 452-457. doi: 10.1016/j.jep.2007.08.037.
38. Al-Hadhrami RMS, Al Muniri RMS, Hossain MA. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of polar solvent extracts from leaves of *Ammi majus* used by the Omanis. *Pac Sci Rev Nat Sci Eng*. 2016 Jan;18(1):62–5.
39. Díaz-Regañón J, Alarcón T. Sensibilidad de 36 aislamientos de *Helicobacter pylori* a cuatro antibióticos de primera línea y características de virulencia. 19:6.
40. CLSI. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
41. Silva AC, Santana EF, Saraiva AM, Coutinho FN, Castro RH, Pisciotto MN, Amorim EL, Albuquerque UP. Which approach is more effective in the selection of plants with antimicrobial activity? *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:308980. doi: 10.1155/2013/308980. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23878595; PMCID: PMC3710641.
42. Conde NE. Estudio químico del aroma de dos especies del género *Passiflora*; *gulupa* (*Passiflora edulis* f. *edulis*) y *curuba de castilla* (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*). [Posgrado]. Universidad Nacional de Colombia; 2013. In.
43. Gruszycki Mabel Rosalía, Valenzuela Gabriela Malena, Báez Margarita, Leguiza Pedro Daniel, Gruszycki Ana Elena, Alba Daniel Andrés. Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de *Portulaca oleracea* L. *Rev. colomb. cienc. quim. farm.* [Internet]. 2019 Aug [cited 2020 Dec 06]; 48( 2 ): 425-435. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74182019000200425&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182019000200425&lng=en). <http://dx.doi.org/10.1544/rcciquifa.v48n2.82720>.

44. Masadeh MM, Alkofahi AS, Alzoubi KH, Tumah HN, Bani-Hani K. Anti- *Helicobacter pylori* activity of some Jordanian medicinal plants. *Pharm Biol.* 2014 May;52(5):566–9.
45. Wang Y-C. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(30):10368.
46. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Oct 1;12(4):564–82.
47. Ramaiya SD, Bujang JS, Zakaria MH. Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. *Sci World J.* 2014;2014:1–10.
48. Scorciapino MA, Acosta-Gutierrez S, Benkerrou D, D'Agostino T, Mallocci G, Samanta S, et al. Rationalizing the permeation of polar antibiotics into Gram-negative bacteria. *J Phys Condens Matter.* 2017 Mar 22;29(11):113001.
49. Aernan PT, Aondofa TJ, Angbian TT. In-vitro bacterial activity of leaf and stem extract of *Passiflora edulis* (Passion fruit) planted in Federal University of Agriculture Makurdi, Central Nigeria. *International Journal of Science and Research (IJSR).* 2016; volume 5 Issue 9.
50. Mocé-Llivina L, Jofre J, Muniesa M. Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulfone membranes in filtering viral suspensions. *J Virol Methods.* 2003 Apr;109(1):99–101.
51. Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, Novik GI. Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Pol J Microbiol.* 2010;59(3):145–55.
52. Moldovan R, Chapman-McQuiston E, Wu XL. On Kinetics of Phage Adsorption. *Biophys J.* 2007 Jul;93(1):303–15.
53. Chen X, Xi Y, Zhang H, Wang Z, Fan M, Liu Y, et al. Characterization and adsorption of *Lactobacillus virulent phage P1*. *J Dairy Sci.* 2016 Sep;99(9):6995–7001.
54. Jiang X, Doyle MP. Effect of Environmental and Substrate Factors on Survival and Growth of *Helicobacter pylori*. *J Food Prot.* 1998 Aug 1;61(8):929–33.
55. Kitsos CM, Stadtländer\* CTK-H. *Helicobacter pylori* in Liquid Culture: Evaluation of Growth Rates and Ultrastructure. *Curr Microbiol.* 1998 Aug 1;37(2):88–93.
56. Hirukawa S, Sagara H, Kaneto S, Kondo T, Kiga K, Sanada T, et al. Characterization of morphological conversion of *Helicobacter pylori* under anaerobic conditions: Anaerobiosis-induced *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol.* 2018 Apr;62(4):221–8.
57. Reynolds DJ, Penn CW. Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology.* 1994 Oct 1;140(10):2649–56.
58. Douraghi M, Saberi Kashani S, Zeraati H, Esmaili M, Oghalaie A, Mohammadi M. Comparative Evaluation of Three Supplements for *Helicobacter pylori* Growth in Liquid Culture. *Curr Microbiol.* 2010 Apr;60(4):254–62.
59. Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and Genotyping of *Helicobacter pylori* from Untreated Municipal Wastewater. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Mar;68(3):1436–9.
60. Degan AJ, Sonzogni WC, Standridge JH. Development of a Plating Medium for Selection of

- Helicobacter pylori* from Water Samples. *Appl Environ Microbiol.* 2003 May;69(5):2914–8.
61. Al-Sulami AA, Al-Edani TAA, Al-Abdula AA. Culture Method and PCR for the Detection of *Helicobacter pylori* in Drinking Water in Basrah Governorate Iraq. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:1–5.
  62. Moreno Y, Ferrús MA. Specific Detection of Cultivable *Helicobacter pylori* Cells from Wastewater Treatment Plants. *Helicobacter.* 2012 Oct;17(5):327–32.
  63. Vesga F-J, Moreno Y, Ferrús MA, Campos C, Trespalacios AA. Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants in Bogotá, Colombia, using cultural and molecular techniques. *Int J Hyg Environ Health.* 2018 May;221(4):595–601.
  64. Duque-Jamaica R, Arévalo-Galvis A, Poutou-Piñales RA, Trespalacios AA. Sequential Statistical Improvement of the Liquid Cultivation of *Helicobacter pylori*: Improvement of *H. pylori* Liquid Culture. *Helicobacter.* 2010 Jul 16;15(4):303–12.
  65. Morgan DR, Freedman R, Depew CE, Kraft WG. Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. *J Clin Microbiol.* 1987;25(11):2123–5.
  66. Bayona MA. Microbiological conditions for culturing *Helicobacter Pylori*. *Rev Col Gastroenterol.* 2013 ; 28( 2 ): 94-99.
  67. Sainsus N, Cattori V, Lepadatu C, Hofmann-Lehmann R. Liquid culture medium for the rapid cultivation of *Helicobacter pylori* from biopsy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008 Dec;27(12):1209–17.
  68. Sánchez-Alfonso AC, Venegas C, Díez H, Méndez J, Blanch AR, Jofre J, et al. Microbial indicators and molecular markers used to differentiate the source of faecal pollution in the Bogotá River (Colombia). *Int J Hyg Environ Health.* 2020 Apr;225:113450.
  69. Vale FF, Matos APA, Carvalho P, Vítor JMB. *Helicobacter pylori* Phage Screening. *Microsc Microanal.* 2008 Sep;14(S3):150–1.
  70. Shahamat M, Mai UE, Paszko-Kolva C, Yamamoto H, Colwell RR. Evaluation of liquid media for growth of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1991;29(12):2835–7.
  71. Gill J, Hyman P. Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010 Jan 1;11(1):2–14.
  72. Weber-Dąbrowska B, Jończyk-Matysiak E, Żaczek M, Łobocka M, Łusiak-Szelachowska M, Górski A. Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Aug 12 [cited 2020 Apr 15];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01177/abstract>
  73. Alvarado LV & Bustos SM. Identificación de *Helicobacter pylori* en aguas residuales del río Arzobispo. [Pregrado].Pontifi.
  74. Mazaheri Assadi M, Chamanrokh P, Whitehouse CA, Huq A. Methods for Detecting the Environmental Coccoid Form of *Helicobacter pylori*. *Front Public Health* [Internet]. 2015 May 28 [cited 2020 Apr 25];3. Available from: [http://www.frontiersin.org/Environmental\\_Health/10.3389/fpubh.2015.00147/abstract](http://www.frontiersin.org/Environmental_Health/10.3389/fpubh.2015.00147/abstract)

75. Muñoz AB, Trespalacios-Rangel AA, Vale FF. An American lineage of *Helicobacter pylori* prophages found in Colombia. *Helicobacter* [Internet]. 2021 Jan 5 [cited 2021 Jan 14]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hel.12779>
76. Wan XQ, Tang DS, Liu AP, Tan SY, Li WK, Kuang J, Li HM. Isolation of a wild-type virulent phage of *Helicobacter pylori* and its simulated treatments of gastrointestinal Hp in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2011 ;31(2):304-7.
77. Vale FF, Alves Matos AP, Vitor JMB. Search for pylori bacteriophages. *Microse microanal* 14 (supp3) 2008.
78. Morton D, Bardhan KD. Bacteriophages active against *Helicobacter pylori* in UK sewage: Natural born killers? *Gastroenterology*. 2000 Apr;118(4):A880.
79. Hatfull GF, Hendrix RW. Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol*. 2011 Oct;1(4):298–303.
80. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*. 2011;1(1):31-45.
81. Fernández L, Gutiérrez D, García P, Rodríguez A. The Perfect Bacteriophage for Therapeutic Applications—A Quick Guide. *Antibiotics*. 2019 Aug 23;8(3):126.
82. Ackermann H-W, Tremblay D, Moineau S. Long-Term Bacteriophage Preservation. :7.
83. Muñoz AB, Stepanian J, Trespalacios AA and Vale FF (2020) Bacteriophages of *Helicobacter pylori*. *Front. Microbiol*. 11:549084.