UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES

UNIDAD DE GASTROENTEROLOGÍA

POSTGRADO DE GASTROENTEROLOGÍA

"PRESENCIA DE *Helicobacter pylori* EN AGUA DE CONSUMO HUMANO Y EN VEGETALES DE CULTIVO. MUCUCHÍES MUNICIPIO RANGEL. ESTADO MÉRIDA 2012".

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Pablo J. Ramírez R.

Gabriela M. Vera P.

Tutores:

Dr. Gerardo Casanova.

Dr. José Andrés Mendoza.

Asesor:

Lic Ramón Adrián Torres.

MÉRIDA, 2012

C.C. Reconocimiento

PRESENCIA DE *Helicobacter pylori* EN AGUA DE CONSUMO HUMANO Y EN VEGETALES DE CULTIVO. MUCUCHÍES MUNICIPIO RANGEL. ESTADO MÉRIDA 2012.

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

AUTORES:

PABLO JOSÉ RAMÍREZ ROSALES.
GABRIELA MARÍA VERA PRADA.
MÉDICOS CIRUJANOS.
RESIDENTES DE 3º AÑO DEL POSTGRADO DE GASTROENTEROLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.

TUTORES:

GERARDO CASANOVA
MÉDICO ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA Y GASTROENTEROLOGÍA.
PROFESOR TITULAR (JUBILADO ACTIVO) DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.

JOSÉ ANDRÉS MENDOZA.
MÉDICO INMUNÓLOGO Y MICROBIÓLOGO.PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA CLÍNICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, MÉRIDA, VENEZUELA.

www.bdigital.ula.ve

ASESORES:

LIC. RAMÓN ADRIÁN TORRES MORÍGINO.
PROFESOR AGREGADO DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.
LABORATORIO MULTIDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA (Lab. MICE).

C.C. Reconocimiento

ÍNDICE DE CONTENIDO

Portada	ii
Autores	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice de Contenido	vi
Índice de Tablas y Gráficos	vii
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	1
Marco Teórico	4
Antecedentes	8
Objetivos	10
Materiales y Métodos	10
Resultados	17
Discusión	25
Conclusiones y Recomendaciones	30
Anexos	32
Referencias Bibliográficas	38

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Figura 1. . Distribución de frecuencia del modo de uso del agua de consumo en las viviendas encuestadas. Cifras porcentuales.

Figura 2. Distribución de frecuencia del método de desinfección de los vegetales de consumo en las viviendas encuestadas. Cifras porcentuales.

Figura 3. Distribución de frecuencia de la presencia de *H. pylori* en agua de consumo en las casas. Cifras porcentuales.

Figura 4 Demostración de amplicones de 375-pb obtenidos por PCR para la detección de parte del gen que codifica para la adhesina de *Helicobacter pylori*.

Tabla 1. Distribución de frecuencia del consumo de vegetales crudospor los habitantes de las viviendas. Cifras absolutas y porcentajes.

Tabla 2. Distribución de frecuencia del tipo de vegetales que consumenlos habitantes de las viviendas. Cifras absolutas y porcentajes.

Tabla 3. Distribución de frecuencia del antecedente de infección por *H. pylori* en algún miembro del grupo familiar. Cifras absolutas.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 4. Distribución de frecuencia del antecedente de Cáncer Gástrico en algún miembro del grupo familiar. Cifras absolutas y porcentajes.

Tabla 5. Distribución de frecuencia de la presencia de síntomas gastrointestinales en miembros del grupo familiar. Cifras absolutas y porcentajes.

Tabla 6. Distribución de frecuencia de los síntomas gastrointestinales en miembros del grupo familiar. Cifras absolutas y porcentajes.

Tabla 7. Resumen de los resultados del análisis estadístico del cruce de variables con la presencia de *H. pylori* en el agua de consumo en las casas.

C.C. Reconocimiento

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que coloniza el estómago de las dos terceras partes de la población humana, constituyendo un importante factor de riesgo para adenocarcinoma gástrico y linfomas. Los andes venezolanos representan un área endémica de cáncer gástrico, con elevadas tasas de prevalencia de lesiones preneoplásicas en pacientes infectados. En Mucuchíes, estado Mérida, las tasas de prevalencia fueron del 76 % para el 2010 y de reinfección del 76 % en el 2011, siendo un importante problema de salud pública local, lo cual hace imprescindible estudiar la posible fuente de infección, para implementar medidas higiénico-sanitarias adecuadas. La principal fuente de transmisión no está bien definida, siendo propuesta el agua contaminada como vehículo de la ruta fecal-oral.

El principal objetivo del estudio fue determinar la presencia de *H. pylori* en agua de consumo humano y en vegetales cultivados en Mucuchíes, municipio Rangel del estado Mérida, para lo cual se tomaron muestras de agua del grifo de las viviendas, riachuelos, sistemas de riego, tanques de suministro de agua de consumo y cultivos de vegetales, se analizaron con PCR cualitativa la presencia de secuencias que codifican para la adhesina de la bacteria, evidenciándose el ADN de la misma en el 16,66 % de las viviendas, en 1 de los tanques de riego, en 1 de los tanques de consumo y en ninguno de los vegetales. Estos resultados apoyan la hipótesis según la cual *H. pylori* pudiera ser transmitido a través de aguas contaminadas, representando probablemente un vehículo para la ruta fecal-oral.

www.bdigital.ula.ve

Palabras Clave: agua, *Helicobacter pylori*, transmisión, fuente.

C.C. Reconocimiento

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a Gram – negative bacterium that colonizes the stomach of two-thirds of the human population, constituting a major risk factor for gastric adenocarcinoma and lymphoma. The Venezuelan Andes is an endemic area of gastric cancer, with high prevalence rates of preneoplastic lesions in infected patients. In Mucuchíes, Mérida State, prevalence rates were 76 % for 2010 and 76 % of re-infection in 2011, remaining an important local public health problem thus it is essential to study the source of infection, to implement appropriate hygienic measures. The main source of transmission is not well defined, being given contaminated water as a vehicle for the fecal - oral route.

The main aim of this study was to determine the presence of *H. pylori* in drinking water and vegetables grown in Mucuchíes, Rangel county in Mérida State, for which samples of tap water from the homes, streams, irrigation systems, tanks for drinking water and vegetable crops were taken and then analyzed with qualitative PCR for the presence of sequences coding for the bacterial adhesine. The results showed the presence of DNA in 16.66 % of households, in one irrigation tank, and in one drinking water tank but none vegetables. These results support the evidence that *H. pylori* may be transmitted through contaminated water, probably representing a vehicle for fecal-oral route.

Key Words: water, *Helicobacter pylori*, transmission, source.

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La gastritis y la úlcera péptica son enfermedades ampliamente difundidas en el mundo (1).Desde inicios del siglo XX, se trató de identificar sus factores causales. Warren y Marshal en 1982 describieron un microorganismo Gram negativo en forma de espiral, en estrecha asociación con la presencia de gastritis antral, úlcera gástrica y duodenal, llegando a la conclusión que su erradicación eliminaba las recurrencias (1).Esta bacteria, conocida como *H. pylori* también juega un papel importante en la patogénesis del cáncer gástrico y los linfomas asociados a mucosas (Linfoma MALT) (2). La prevalencia de la infección por *H. pylori* en la úlcera duodenal es de 90 a 95%, y en la úlcera gástrica entre el 60% al 80 % (1).

www.bdigital.ula.ve

Estudios de prevalencia realizados, han permitido demostrar que *H. pylori* infecta cerca del 30 % de la población de Europa Occidental y de Estados Unidos y aproximadamente el 80 % de los países en vías de desarrollo (3).En países desarrollados como Francia la prevalencia es del 25 % y en países en vías de desarrollo como Nigeria e India la cifra está por encima del 80%(4). Estas diferencias se deben a que la infección en los países en vías de desarrollo se adquiere durante la infancia (4).

Los estudios epidemiológicos en Latinoamérica sobre la infección por *H. pylori,* han reportado una prevalencia que presenta variaciones de acuerdo a los diferentes países y diferentes metodologías para su detección, que va del 52,7 % al 84,7 % (5).

En Venezuela, Ghose C. y colaboradores (2003) encontraron en poblaciones adultas de estratos socioeconómicos bajos en distintas regiones, una seroprevalencia de 97,1% en la

C.C. Reconocimiento

Región Andina (Mérida), 89,1% en la Región Capital (Caracas) y 96,7% en la Región de Guayana (6)

En Mérida, se señalan cifras del 67% para la población general y del 81,6% para pacientes con patología digestiva; en estos últimos se reporta un 80% de positividad en casos de gastritis y un 100% en úlceras duodenales (7).

Páez V. y colaboradores (2006) encontraron una prevalencia de infección por *H. pylori* de 78,8% en la población infantil de Valencia (8). En Nueva Esparta, Rodríguez S. y colaboradores (2008) demostraron una prevalencia de 82,1 %, en una población adulta de 158 pacientes con trastornos dispépticos (9). Entre los factores que se asocian a una adquisición temprana de la infección, están las pobres condiciones sanitarias como el hacinamiento (10).

La evidencia de que la transmisión ocurre principalmente en la infancia temprana coincide con la vía sugerida fecal–oral (11). Respecto a la ruta oral–oral, la cavidad oral como un posible reservorio del *H.pylori*, ha sido sugerida por el transporte en el jugo gástrico, de organismos viables a la boca durante la regurgitación o también pueden pasar directamente del estómago a la boca, sin la necesidad de un reservorio oral (11).

El aislamiento del *H.pylori* en el ambiente es difícil, lo cual ha sido asociado con la transformación de este microorganismo en una morfología cocoide cuando se expone al agua, lo cual corresponde a un proceso biológico, activo en la bacteria, como un mecanismo de protección (12). El *H. pylori* es muy exigente, suele crecer sólo bajo condiciones microaerofílicas entre 34 y 40 grados centígrados (13). Se ha propuesto que el cambio morfológico a la forma cocoide o forma viable no cultivable (VNC) es una adaptación transitoria al stress ambiental y puede jugar un papel en su supervivencia y en la transmisión a través del agua (14).

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

La bacteria se ha identificado en el agua potable usando el método de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); la infección a través del agua contaminada ha sido sugerida por evidencia epidemiológica, así como en verduras crudas tratadas con aguas residuales (14).

Métodos moleculares han detectado la presencia de ADN de *H.pylori* en agua de río, agua de pozos y aguas residuales, así como en aguas superficiales y aguas subterráneas poco profundas (15).

Además, ARN mensajeros para VacA, han sido detectados en formas cocoides de *H. pylori*; esto indica que las formas viables no cultivables de la bacteria pueden ser infecciosas y por ende tienen implicaciones importantes en la epidemiología y prevención de la enfermedad (15).

Si bien la investigación de *H. pylori* en el área médica ha evolucionado a un ritmo acelerado durante los últimos 20 años, es sorprendente que hay pocos estudios sobre los aspectos ecológicos de la bacteria fuera del hospedero humano (12).En consecuencia, la comunidad científica todavía está luchando para entender cómo la bacteria se transmite, ya que provoca retrasos en el diseño de medidas profilácticas para contrarrestar la alta prevalencia en algunas poblaciones humanas en todo el mundo, en las que hasta el 90% de los individuos pueden estar infectados (12).

www.bdigital.ula.ve

En el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Gemmato y colaboradores estudiaron la presencia de *H. pylori* en lesiones preneoplásicas gástricas, y encontraron una relación estadísticamente significativa entre la presencia de éstas lesiones y la infección por *H. pylori* (16).Además en esta misma Institución; Villarreal y colaboradores en el 2011, encontraron tasas de reinfección del 76 % en pacientes tratados 30 meses antes, con una

C.C. Reconocimiento

terapia que se corroboró fue altamente efectiva (17).Estas tasas de prevalencia de lesiones preneoplásicas en pacientes infectados con la bacteria aunado a las altas tasas de reinfección convierten al *H. pylori* en un problema de salud pública para esta población, por lo que es imprescindible el estudio de la fuente de infección de la bacteria y de esta manera permitir implementar las medidas higiénico sanitarias necesarias para evitar la continuación de la transmisión y así disminuir el riesgo de desarrollo de cáncer gástrico.

En esta investigación se estudió la presencia de *H. pylori* mediante PCRen el agua de consumo humano y en vegetales de cultivo en la población de Mucuchíes del estado Mérida.

MARCO TEÓRICO

El *H. pylori* es una bacteria Gram negativa que coloniza el estómago de aproximadamente las dos terceras partes de la población humana mundial y está involucrada en la patogénesis de enfermedades gastroduodenales (2). Su importancia real empieza a tenerse en cuenta cuando Warren y Marshal en 1982 notaron su presencia en la mucosa gástrica y cultivaron por primera vez al microorganismo(18).

La mayoría de los individuos infectados son asintomáticos, pero de 10 a 20% pueden desarrollar gastritis atrófica, úlcera péptica, linfoma asociado a mucosa (linfoma MALT), y alrededor de 3% cáncer gástrico (19). La infección por *H. pylori* puede adquirirse durante la infancia, siendo mayor su prevalencia en grupos familiares grandes, con alto hacinamiento y bajos niveles socioeconómicos y educacionales (20)

La bacteria coloniza la mucosa gástrica, se adhiere y penetra la capa de moco que recubre el epitelio gástrico (14). La adherencia de la bacteria a la mucosa gástrica es uno de los pasos iniciales de la infección por *H. pylori* y es un importante factor de virulencia (14).

www.bdigital.ula.ve
C.C. Reconocimiento

Además, la bacteria tiene diversos mecanismos para eludir las defensas del hospedero primario y así establecer una infección persistente (21).

Las vías de transmisión de la bacteria no están plenamente identificadas aún (22). La vía fecal-oraly oral-oral han sido las rutas definidas en la transmisión de persona a persona. Rutas iatrogénicas, así como la propagación vectorial mecánica por las moscas también se han propuesto (14).Algunos autores han sugerido que la transmisión fecal-oral podría ocurrir a través de agua contaminada (22).También la transmisión por el agua potable se ha sugerido como explicación de la vía fecal-oral ya que se ha detectado la presencia deADN de *H.pylori* en los sistemas de agua potablede los Estados Unidos, Inglaterra, Alemania, Japón, Suecia,México, Gambia, y Perú (14).

Las primeras evidencias sobre la ruta de transmisión acuática de este microorganismo a humanos fueron aportados por estudios epidemiológicos realizados en algunos países en vías de desarrollo (20). Goodman y colaboradores (1996) en Colombia evidenciaron que nadar enríos, arroyos y piscinas se asociaba con mayores probabilidadesde infección; así como el uso de agua corriente para consumo (23).Además los niñosque consumen frecuentementeverduras crudasteníanmásprobabilidades de presentarla infección por el microorganismo (23).

En Lima-Perú, Klein y colaboradores (1991), demostraron la asociación entre la prevalencia del *H. pylori* en niños (48%) y el consumo de fuentes externas de agua (20). En Venezuela, Domínguez –Bello y colaboradores (2002), encontraron que la frecuencia de la infección por *H.pylori* es significativamente más alta (96%) durante los meses de lluvia,

www.bdigital.ula.ve
C.C. Reconocimiento

sugiriendo que esto podría deberse a un aumento en la densidad bacteriana y/o cambios de formas cocoides en estado de latencia a formas bacilares en división celular (24).

La sospecha de que el agua podría ser uno de los vehículos de la infección se mantiene, aún más por varios estudios recientes que han utilizado la detección del ADN bacteriano por técnicas como la PCR para identificar el patógeno en agua potable y biopelículas asociadas (25).

Los métodos moleculares, basados en PCR principalmente, fueron capaces de detectar la presencia de la bacteria en biopelículas y agua de pozos, ríos y redes de distribución, mediante la confirmación de la secuencia del gen 16S del ARNr. (20, 26).

Trabajos realizados en laboratorios han puesto de manifiesto alguna información sobre el comportamiento de *H. pylori* en el medio acuoso. El tiempo de supervivencia, que ha sido reportado en agua destilada es de 20 días. Un aumento de la supervivencia está asociado con temperaturas más bajas y niveles de pH entre 5.8 y 7.0 (27).

www.bdigital.ula.ve

La supervivencia puede ser dependiente de las condiciones específicas del entorno acuoso, incluyendo la presencia de otros microorganismos como el zooplancton y las amebas de vida libre (27).

La capacidad de supervivencia de *H. pylori* en sistemas de aguas tratadas fue cuestionado, con la sugerencia de que este microorganismo es muy sensible al cloro utilizado en las plantas de tratamiento (25).Sin embargo, Baker y colaboradores sostuvieron más tarde que *H. pylori* podía tolerar mejor los desinfectantes que *Escherichia coli* (25).

C.C. Reconocimiento

Se ha demostrado que el *H. pylori* presente en el agua es difícil de cultivar comparado con otros patógenos (28).

En respuesta a condiciones de estrés ambiental, algunas bacterias adoptan un estado que se ha definido como viable no cultivable (VNC); viable porque mantiene la capacidad de realizar funciones metabólicas, y no cultivable porque no puede aislarse mediante métodos tradicionales de cultivo en el laboratorio. Si las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, el microorganismo puede retornar al estado cultivable (20). Al entrar en contacto con el agua, *H. pylori* es capaz de adoptar el estado VNC, transformándose de la forma típica espiral a una forma cocoide que probablemente dificulta su cultivo (20).

Desde un punto de vista más amplio, se acepta que lo que ocurre es que estas bacterias no se logran cultivar bajo métodos rutinarios y convencionales de laboratorio, sin embargo se ha demostrado que formas cocoides de *H. pylori* son capaces de colonizar la mucosa gástrica y causar gastritis en ratones (29).

www.bdigital.ula.ve

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar las estrategias de supervivencia de las bacterias patógenas como *H. pylori* en ambientes acuáticos: la formación de biopelículas, la asociación al plancton y el estado viable no cultivable (20).

Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos adheridas a superficies o asociadas a interfaces (20).La supervivencia del *H. pylori* puede ser prolongada por la colonización activa de estas, como las encontradas en los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable (20).

Giao y colaboradores en Portugal (2009), apoyan la idea deque el cloro en el aguapuedeinhibir la actividadde *H.pylori*, peronoeliminaal patógeno debiopelículas en los sistemas de distribución de agua donde puede sobreviviren el estadoVNC (30).

C.C. Reconocimiento

El ADN del *H. pylori* ha sido detectado en el agua de vasijas y tuberías de hierro en sistemas de agua potable, lo cual sugiere que las biopelículas pueden jugar un rol en la transmisión (27).

Las evidencias epidemiológicas y microbiológicas indican la posibilidad de que el agua actúe como un reservorio en la trasmisión fecal-oral de *H. pylori* (20).

Algunos estudios sugieren que también pueden participar otros vehículos relacionados con el agua en la transmisión de *H.pylori (*27).Por ejemplo, el consumo de hortalizas crudas ha sido identificado como un factor de riesgo. La contaminación bacteriana puede ser originada a partir del agua de riego que contiene materia fecal (27).

En un estudio realizado en Chile por Hopkins y colaboradores, se encontró que la seropositividad para *H.pylori* fue > 60% en grupos socioeconómicos más bajos y que la misma se correlacionaba con el consumo de vegetales y legumbres crudas (31).

www.bdigital.ula.ve

ANTECEDENTES

1. **Adams B. y colaboradores (2003),** publicaron los resultados de su investigación sobre la supervivencia del *H. pylori* en un ambiente natural de agua dulce, encontrando que la exposición al ambiente puede inducir a que la bacteria ingrese al estado viable no cultivable y que permanezca así, hasta que acceda a un huésped susceptible, representando estas formas cocoides de la bacteria una amenaza para la salud pública (15).
2. **Shahamat M. y colaboradores (2004)** Desarrollaron dos técnicas basadas en PCR para la detección de formas cocoides y helicoidales de *H .pylori*, encontrando que ambas son complementarias: Los “primers” para detectar el gen glmM permiten

C.C. Reconocimiento

una determinación rápida y sensible de la presencia de *H. pylori* y otras especies de *Helicobacter*, mientras que los primers para las secuencias del gen 16S rRNA confirma la presencia de *H. pylori* específicamente (32).

3. **Sen K. y colaboradores (2007)**, desarrollaron y estandarizaron una prueba de PCR Cuantitativa para la detección de *H.pylori* en agua potable que permite la detección del ADN del *H. pylori* en agua, en niveles tan bajos como 5 a 10 células por litro de agua (14).
4. **Azevedo N. y colaboradores (2008)**, en la investigación sobre supervivencia de las formas gástrica y enterohepática de *Helicobacter* en el agua: implicaciones para la transmisión, evaluaron la influencia de diferentes temperaturas y la presencia de luz, observando que el *H.pylori* fue la especie que sobrevivió más tiempo en el agua (mas de 96 horas en la oscuridad a 25 grados centígrados) por lo que el agua puede jugar un papel en su transmisión (12) .
5. **Janzon A. y colaboradores (2009)**, no logran detectar ADN de *H. pylori* en agua potable y en el ambiente en Dhaka, Bangladesh, procedieron a desarrollar dos (02) pruebas de PCR en tiempo real específicas para el microorganismo a fin de cuantificar el ADN de la bacteria en el agua, no pudiendo identificar ADN en ninguna de las muestras tomadas, lo cual sugiere que en el área estudiada, es poco probable que la ruta predominante de transmisión del *Helicobacter* sea a través del agua (13).
6. **Khan A. y colaboradores (2012**), Karashi, Pakistán detectaron por PCR el ADN de *H. pylori* en 2 de 50 muestras de agua potable (4%) (33).

www.bdigital.ula.ve
C.C. Reconocimiento

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *H. pylori* en el agua de consumo humano y en los vegetales cultivados en la localidad de Mucuchíes - Municipio Rangel - Estado Mérida durante el año 2012.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de *H. pylori* mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) en el agua de los grifos de las casas del casco central de Mucuchíes.
2. Determinar la presencia de *H. pylori* mediante PCR en los dos (02) tanques principales de abastecimiento de agua del casco central de Mucuchíes y en el tanque que surte a la zona de Misintá Municipio Rangel– Estado Mérida.
3. Determinar la presencia de *H. pylori* mediante PCR en algunos tanques de riego del sector Misintá, Mucuchíes – Estado Mérida.
4. Determinar la presencia de *H. pylori* mediante PCR en algunos riachuelos en Mucuchíes – Estado Mérida.
5. Determinar la presencia de *H. pylori* mediante PCR en algunos de los vegetales cultivados en Mucuchíes – Estado Mérida.

www.bdigital.ula.ve

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de una investigación observacional, descriptiva, de corte transversal, para determinar la presencia de *H. pylori* en el agua de consumo humano y en los cultivos de vegetales de Mucuchíes – Estado Mérida durante el año 2012.

C.C. Reconocimiento

MUESTRA

Se tomaron las siguientes muestras :

1. 1 muestra de agua del tanque que abastece al Sector de Misintá.
2. 1 muestra de agua del tanque número 1 que abastece al casco central de Mucuchíes, ubicado en el sector Misintá.
3. 1 muestra de agua del tanque de riego número 1 del Sector de Misintá.
4. 1 muestra de agua del riachuelo número 1 que forma parte de la microcuenca que desemboca en el Río Chama.
5. 1 muestra de agua del tanque número 2 que abastece al casco central de Mucuchíes.
6. 1 muestra de agua del riachuelo número 2 que forma parte de la microcuenca que desemboca en el Río Chama.
7. 1 muestra de agua del tanque de riego número 2 del Sector de Misintá.
8. 30 muestras de los grifos de la cocina en las casas del casco central de Mucuchíes, seleccionadas por muestreo aleatorio estratificado, con la ayuda de una tabla de números aleatorios.
9. Se tomaron muestras de algunos cultivos de vegetales de la zona de Misintá y vegetales de algunas de las viviendas encuestadas (zanahoria, fresa, ajo, cebollin).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Viviendas pertenecientes al casco central de Mucuchíes.
- Cultivos de vegetales de la zona de Misintá y sus sistemas de riego.
- Tanques de agua de consumo de las viviendas de la zona del casco central de Mucuchíes y del Sector Misintá.

www.bdigital.ula.ve
C.C. Reconocimiento

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Viviendas cuyos jefes de familia no quisieron participar voluntariamente en el estudio.
- Cultivos de vegetales cuyos propietarios no desearon participar voluntariamente en el estudio.

PROCEDIMIENTOS:

Se tomaron las muestras de agua de los tanques con asesoría y consentimiento de los Comités de Riego y voceros de la comunidad, con quienes se realizó previamente una reunión explicándoles los objetivos e importancia de la realización del trabajo de investigación.

www.bdigital.ula.ve

Para la toma de muestras en las viviendas, se utilizó en primer lugar, un mapa del casco central de Mucuchíes dividido en sectores, se enumeraron las casas de cada sector, y posteriormente se empleó una tabla de números aleatorios, escogiéndose de esta manera 3 casas de cada sector (muestreo aleatorio estratificado) (ver anexos 1 y 2)

Antes de la toma de muestra de agua en las casas, se hizo una explicación breve del proyecto y de los objetivos del mismo al grupo familiar visitado, el jefe de la familia firmó el consentimiento informado de participación en la investigación y posteriormente se realizó una encuesta en la que éste informó sobre datos clínicos e higiénico-sanitarios de

Recolección y procesamiento de las muestras:

A. Las muestras de agua fueron tomadas como se explica a continuación:

1. Se emplearon bolsas plásticas estériles para la recolección del agua de las casas, tanques

C.C. Reconocimiento

y riachuelos.

2. Se recolectó 1 litro de agua en cada caso.
3. Las bolsas de agua fueron transportadas al laboratorio a temperatura ambiente.
4. Se procedió a filtrar el agua con membranas *Millipore* de 0,45µm (Millipore, USA), con jeringas de 60 mL para cada muestra. De dos a cuatro de estas membranas fueron empleadas para filtrar cada muestra dependiendo de la turbidéz observada del agua. Las membranas de cada muestra fueron sumergidas en 5 ml de agua estéril *Milli-Q* (Millipore, USA) durante 1 hora y sometidas a agitación en plataforma de agitación (Thermo, USA) a 1200 rpm, y luego centrifugadas durante 10 minutos a 9000 rpm (33).
5. Los sobrenadantes fueron descartados mientras que el sedimento fue resuspendido en 200 µl de agua estéril *Milli-Q* y almacenado a -80ºC hasta la extracción del ADN (33).

www.bdigital.ula.ve

B. Las muestras de vegetales de cultivo y consumo local fueron tomadas y procesadas de la siguiente manera:

1. Se emplearon bolsas plásticas estériles para la recolección de vegetales de algunas casas y sembradíos aledaños a los tanques y riachuelos antes citados.
2. Las bolsas con los vegetales fueron transportadas al laboratorio a temperatura ambiente.
3. Se procedió a lavar el exceso de tierra y desechos orgánicos de cada vegetal con agua estéril *Milli-Q* y se incubaron los vegetales con 1 litro de agua estéril por 6 horas con agitación (plataforma de agitación Thermo, USA) a 1200 rpm, a temperatura ambiente. Los vegetales fueron descartados y el agua restante se filtró con membranas *Millipore* de 0,45µm y jeringas de 60 ml. De igual forma que el procedimiento para las muestras de agua, las membranas de filtro fueron sumergidas en 5 ml de agua estéril *Milli-Q* durante 1 hora, sometidas a agitación y centrifugadas durante 10 minutos a 9000 rpm.

C.C. Reconocimiento

4. Los sobrenadantes fueron descartados mientras que el sedimento fue resuspendido en 200 µl de agua estéril *Milli-Q* y almacenado a -80ºC hasta el momento de la extracción del ADN.

Extracción de ADN.

1. La extracción del ADN total se realizó mediante el empleo de columnas cromatográficas de purificación de ácidos nucleicos del estuche comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante.

2. Se añadió un total de 200 µl de cada muestra de agua a los tubos que contenía 20 µl de proteasas (proteinasa K), y se adicionaron 200 µl de solución tamponada (buffer de captura) y se obtuvo ADN total.

3. Luego de 10 minutos de incubación a 60°C, las mezclas fueron cuidadosamente vertidas en las columnas *QIAamp Mini Spin Column* (Qiagen, USA) para los subsiguientes pasos de lavado, enjuagado y elución del ADN.

www.bdigital.ula.ve

4. La elución del ADN se efectuó con 100µl de agua *Milli-Q* estéril y el ADN así purificado se almacenó a -20ºC hasta su procesamiento por PCR (14).

Detección de *H. pylori* mediante PCR.

Las muestras de ADN purificado fueron sometidas a Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar la presencia de *H. pylori*, para amplificar un segmento de 375-pb (pares de bases) del gen que codifica para una adhesina bacteriana propia de la especie (34) ,empleando para ello la pareja de cebadores específicos ("*primers*") de 20 bases cada uno: Hp A (5'-GAA-TTA-CCA-TCC-AGC-TAG-CG-3') y Hp B (5'-GTA-ACC-TTG-ACA-AAA-CCG-GC-3'). Estos cebadores se utilizaron en una mezcla de PCR de 50 µl a una concentración final de 0,4 µM; junto con 1,5 mM de $MgCl_2$; 1 U de Taq polimerasa, 2,5 µl

C.C. Reconocimiento

de tampón para PCR; 200 µM de cada dNTP y 10 µl del ADN purificado como molde para la amplificación. La PCR se realizó en un termociclador estándar modelo AB 2700 de la casa *Applied Biosystems* (USA) con las siguientes condiciones de amplificación: paso inicial de denaturación del ADN a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 1 minuto cada uno de 94°C; 2 minutos de hibridación a 55°C; y temperatura de extensión de 72°C de 2 minutos; paso final de extensión a 72°C por 10 minutos. Los productos de la PCR (amplicones) se mantuvieron a 4°C hasta que fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (peso/volumen) con los respectivos controles positivos y negativos, visualizados todos con un trans-iluminador UV. Las muestras se registraron como positivas si una banda de 375-pb se detectaba en el gel.

SISTEMA DE VARIABLES:

www.bdigital.ula.ve

1. Variable Principal: presencia o ausencia de *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y en vegetales.
2. Variables Clínicas:
    - Síntomas Gastrointestinales: presentes-ausentes.
    - Antecedentes de Cáncer Gástrico familiar de 1er grado: presente-ausente.
    - Antecedente de infección por *H. pylori* en algún miembro del grupo familiar.
3. Variables Higiénico-sanitarias:

    Modo de uso del agua de consumo: filtrada, hervida, directa del tubo, envasada, filtrada + hervida.

    Ingestión de vegetales crudos: Sí-No

C.C. Reconocimiento

Método de desinfección de los vegetales: agua directa del tubo, agua directa del tubo + vinagre, agua hervida, ninguno.

RECOLECCIÓN DE DATOS:

Se realizó la recolección de datos clínicos e higiénico-sanitarios aportados por el jefe familiar, de las viviendas seleccionadas del casco central de Mucuchíes. Los resultados obtenidos se registraron en un formato Ad-Hoc (ver anexo 4) y posteriormente fueron analizados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para realizar el análisis de los datos recogidos, se utilizó el paquete estadístico programa Stadistical Package for the Social Science (SPSS) versión 15.0 para Windows. Se realizó un análisis univariable, y los resultados de variables cualitativas se presentan en tablas de frecuencias absolutas y relativas o gráficos.

www.bdigital.ula.ve

RECURSOS:

1.- Recursos Humanos:

- Habitantes del casco central de Mucuchíes.
- Tutores y Asesores.
- Personal del Laboratorio de Microbiología y Salud Pública del Estado Mérida: Departamento de Microbiología y Parasitología Clínica.
- Licenciado en Estadística.

C.C. Reconocimiento

2.- Recursos Institucionales:

- Laboratorio de Salud Pública del Estado Mérida: Departamento de Microbiología y Parasitología Clínica.

- Universidad de Los Andes y sus dependencias:

- Biblioteca del IAHULA:

- Recursos bibliográficos y hemerográficos locales, nacionales e internacionales.

- Internet.

RESULTADOS

En este estudio observacional, de corte transversal, en donde se aplicó una encuesta a los jefes de familia de casas seleccionadas al azar, en el casco central de Mucuchíes, además de recolectar muestras de las fuentes de agua de consumo de esta población del municipio Rangel, en las mismas casas en donde se aplicó la encuesta, se obtuvieron resultados que a continuación se describen de manera secuencial, iniciando por los datos clínicos e higiénico-sanitarios y finalmente la presentación de resultados concernientes a la detección de *Helicobacter pylori* por PCR en aguas y vegetales de consumo en la citada localidad.

www.bdigital.ula.ve

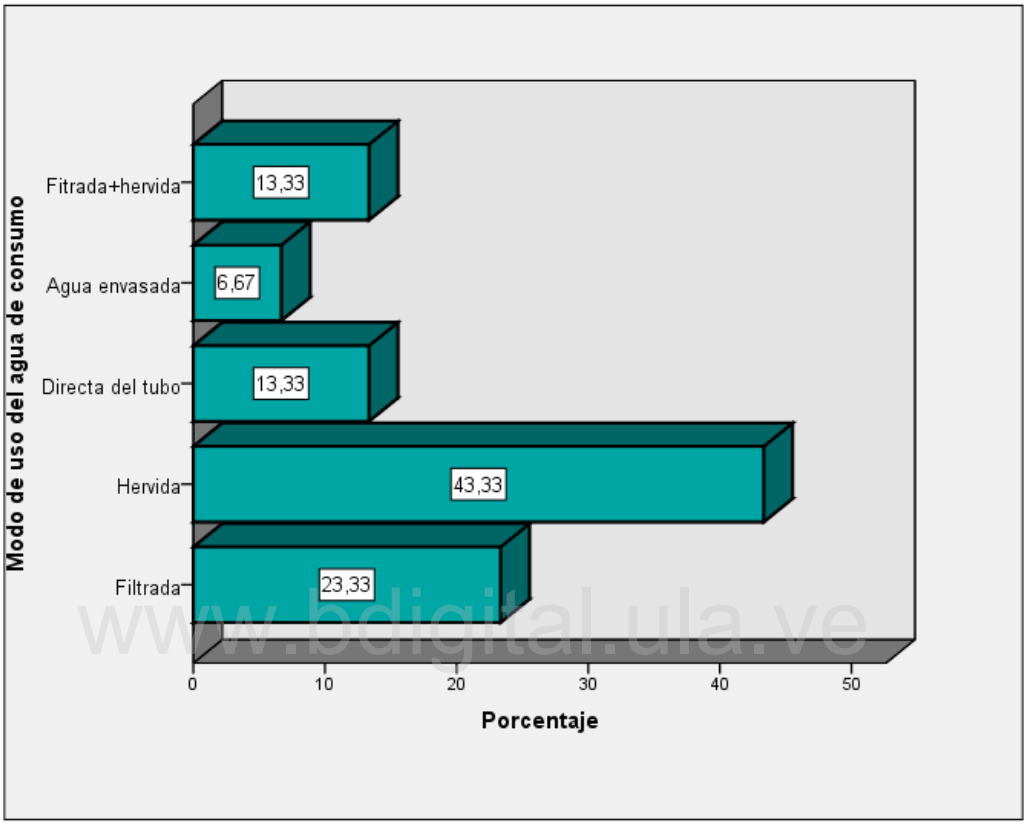
Datos Higiénico-Sanitarios.

Modo de Uso del Agua.

En el 43,3 % (13) de las viviendas, sus habitantes hierven el agua para el consumo diario, mientras que en el 13,3 % (4) utilizan el agua directamente del tubo para su consumo y en igual porcentaje el agua es filtrada y hervida (Fig- 1).

C.C. Reconocimiento

Figura 1. Distribución de frecuencia del modo de uso del agua de consumo en las viviendas encuestadas. Cifras porcentuales.



www.bdigital.ula.ve

Fuente: Datos de la encuesta.

Consumo de Vegetales crudos y modo de desinfección.

En un 93,3 % (28)de las viviendas evaluadas, los habitantes refirieron el consumo de vegetales crudos (Tabla 1) y los más frecuentemente consumidos están resumidos en la Tabla 2.

C.C. Reconocimiento

Tabla 1. Distribución de frecuencia del consumo de vegetales crudos por los habitantes de las viviendas. Cifras absolutas y porcentajes.

	Frecuencia	Porcentaje
Si	28	93,3
No	2	6,7
Total	30	100,0

Fuente: Datos de la encuesta.

Tabla 2. Distribución de frecuencia del tipo de vegetales que consumen los habitantes de las viviendas. Cifras absolutas y porcentajes.

Variables	Frecuencia	Porcentaje
1. Lechuga		
Si	29	97%
No	1	3%
2. Zanahoria		
Si	21	70 %
No	9	30 %
3. Tomate		
Si	19	63%
No	11	37%
4. Otros vegetales		
Si	13	43 %
No	17	57 %

Fuente: Datos de la encuesta.

www.bdigital.ula.ve

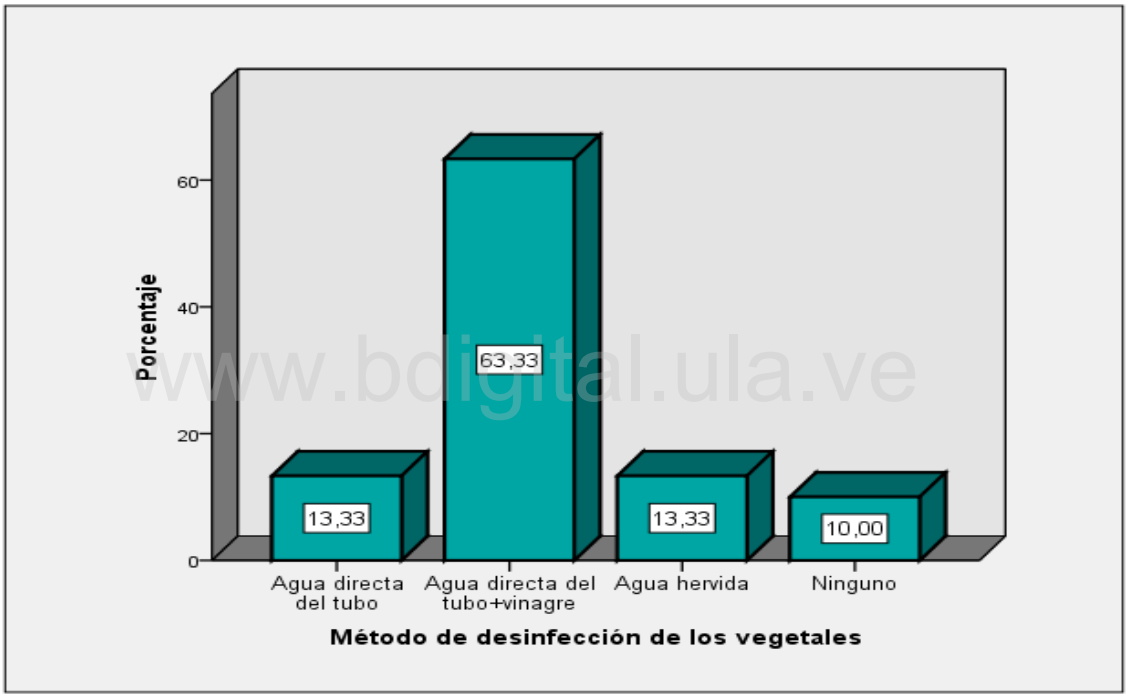
El modo de desinfección de los vegetales crudos utilizado por la mayoría de las familias (63,3 %) fue la combinación de agua directa del tubo con vinagre, siendo sólo un 13,3 %, de las viviendas, donde los vegetales eran desinfectados con agua hervida e igual porcentaje eran lavadas sólo con agua directa del tubo (Fig 2). En el 23,3 % del total, que corresponde

C.C. Reconocimiento

a 7 familias de las encuestadas, se encontró antecedente de infección por *H. pylori* en alguno de sus miembros (Tabla 3).

El 70% de las familias, no presentaba para el momento de la entrevista antecedentes de cáncer gástrico. (Tabla 4).

Figura 2. Distribución de frecuencia del método de desinfección de los vegetales de consumo en las viviendas encuestadas. Cifras porcentuales.



Fuente: Datos de la encuesta.

C.C. Reconocimiento

Tabla 3. Distribución de frecuencia del antecedente de infección por *H. pylori* en algún miembro del grupo familiar. Cifras absolutas y porcentajes.

	Frecuencia	Porcentaje
Si	7	23,3
No	23	76,7
Total	30	100,0

Fuente: Datos de la encuesta.

Tabla 4. Distribución de frecuencia del antecedente de Cáncer Gástrico en algún miembro del grupo familiar. Cifras absolutas y porcentajes.

	Frecuencia	Porcentaje
Si	9	30,0
No	21	70,0
Total	30	100,0

Fuente: Datos de la encuesta.

www.bdigital.ula.ve

El 40 % manifestó que algún miembro de la familia presenta síntomas gastrointestinales (Tabla 5) y los síntomas más comunes son resumidos en la Tabla 6.

Tabla 5. Distribución de frecuencia de la presencia de síntomas gastrointestinales en miembros del grupo familiar. Cifras absolutas y porcentajes.

	Frecuencia	Porcentaje
Si	12	40,0
No	18	60,0
Total	30	100,0

Fuente: Datos de la encuesta.

C.C. Reconocimiento

Tabla 6. Distribución de frecuencia de los síntomas gastrointestinales en miembros del grupo familiar. Cifras absolutas y porcentajes.

Variables	Frecuencia	Porcentaje
1. Regurgitaciones		
Si	7	23,3 %
No	23	76,7%
2. Pirosis		
Si	9	30,0%
No	21	70,0%
3. Meteorismo		
Si	6	20,0 %
No	24	80,0 %
4. Distensión abdominal		
Si	10	33,3 %
No	20	66,7 %

www.bdigital.ula.ve

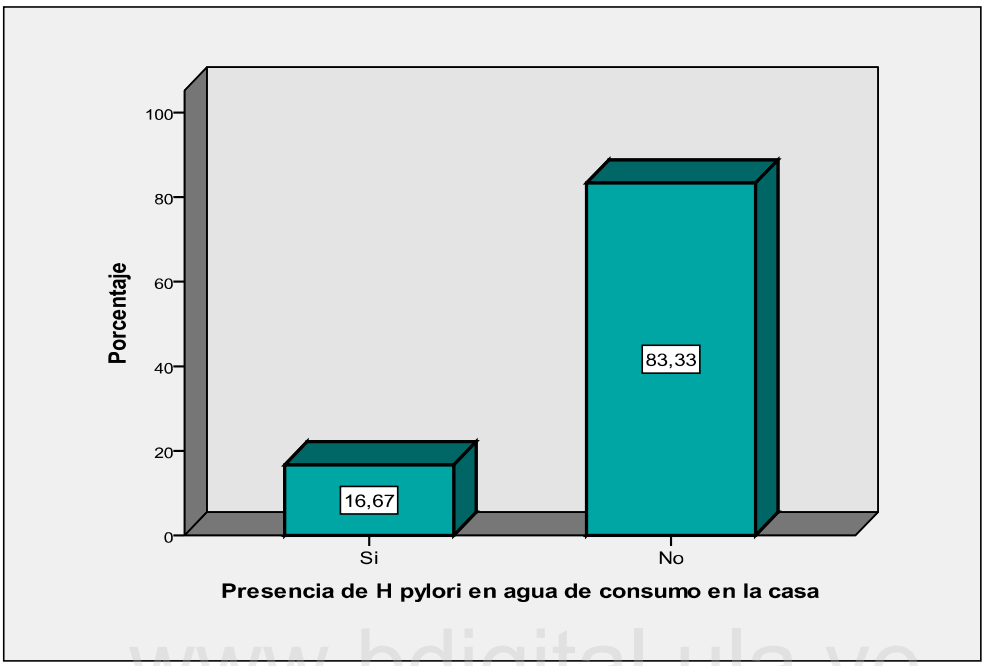
Fuente: Datos de la encuesta.

Detección de *H. pylori:*

Mediante PCR para la amplificación de un segmento del gen que codifica específicamente para la adhesina de *H. pylori* en muestras de agua de consumo y vegetales cultivados en la localidad de Mucuchíes, Municipio Rangel del Estado Mérida, logró detectarse la presencia del microorganismo en 7 muestras de agua de un total de 37 muestras (18,92%): muestra número 2: tanque número 1 que abastece al casco central de Mucuchíes, ubicado en el sector de Misintá; muestra número 7: tanque de riego número 2 de Misintá; muestra de agua de casas N° 9 del sector 1, casas N° 1 y N° 6 del sector 3, casa N° 10 del sector 5 y casa N° 13 del sector 9. (ver Figuras 3 y 4 y anexo 1). En el caso de los vegetales de cultivo y de consumo local, no se obtuvo resultado positivo alguno mediante PCR de las muestras procesadas.

C.C. Reconocimiento

Figura 3. Distribución de frecuencia de la presencia de *H. pylori* en agua de consumo en las casas. Cifras porcentuales.



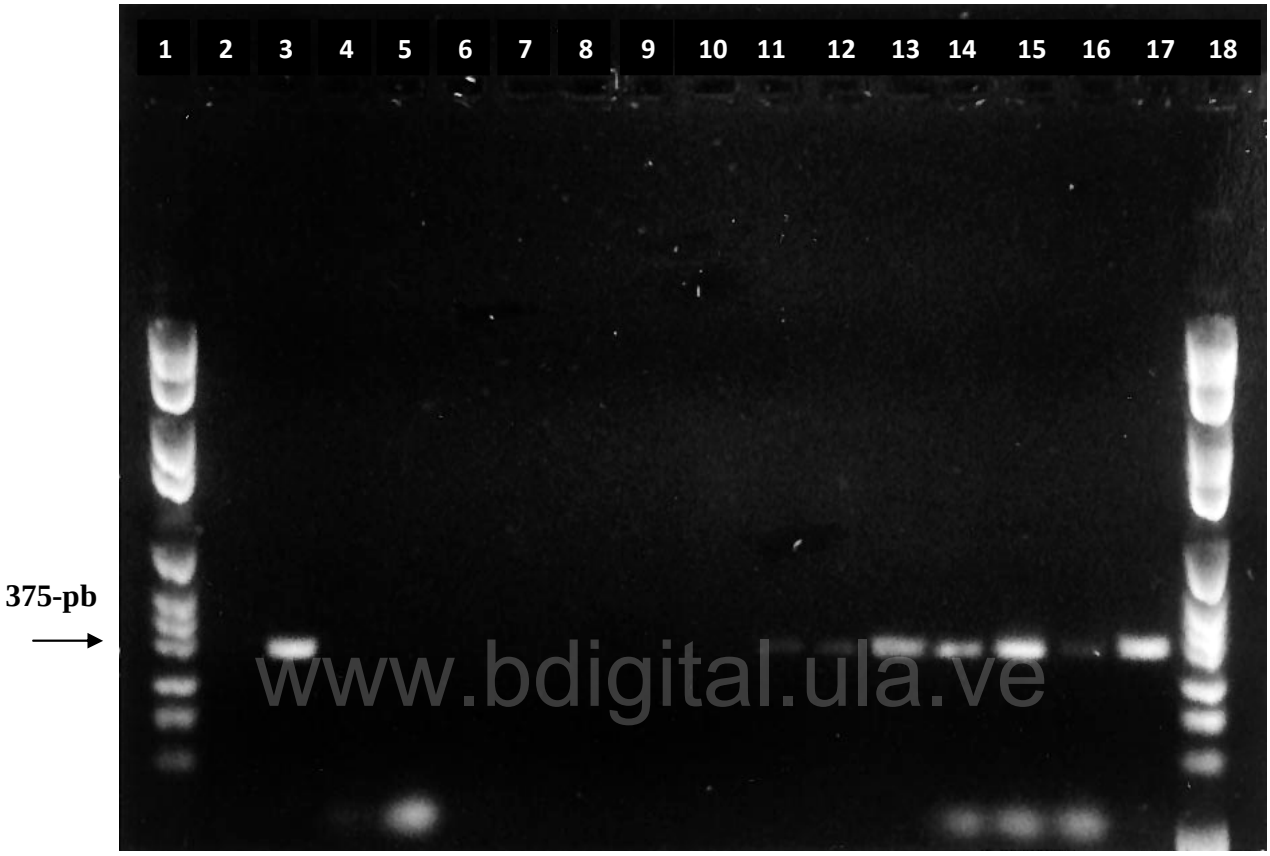
www.bdigital.ula.ve

Tabla 7. Resumen de los resultados del análisis estadístico del cruce de variables con la presencia de *H. pylori* en el agua de consumo en las casas.

Variable	χ^2	Gl.	*p*
Modo de uso del agua	5,47	4	0,24
Consumo de vegetales	0,43	1	0,51
Método de desinfección de los vegetales	3,47	3	0,32
Antecedente de H. pylori en algún habitante	0,03	1	0,84
Síntomas Gastrointestinales	1,00	1	0,31
Cáncer Gástrico	2,57	1	0,10

C.C. Reconocimiento

No hubo asociación estadística significativa en el cruce de las variables clínicas e higiénico-sanitarias con la presencia de *H. pylori* en el agua de consumo de las viviendas.



www.bdigital.ula.ve

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% que muestra los amplicones de 375-pb obtenidos por PCR para la detección de parte del gen que codifica para la adhesina de *Helicobacter pylori*. Pozos 1 y 18: marcador de peso molecular de 100-pb; pozo 2: control de reactivos (mezcla de la PCR sin ADN); pozo 3: control positivo (biopsia antral de paciente con gastritis crónica y *H. pylori* +++ por biopsia); pozo 4: control negativo (biopsia antral de paciente con gastritis crónica sin evidencias de infección por *H. pylori*); pozos 5-10: algunas de las muestras negativas seleccionadas para este gel; pozos 11-17: muestras positivas.

C.C. Reconocimiento

DISCUSIÓN

El *H. pylori* es causal de una de las infecciones bacterianas más comunes en todo el mundo. Se asocia con gastritis crónica, úlcera péptica y constituye un importante factor de riesgo para adenocarcinoma gástrico y linfomas asociados a la mucosa gástrica (35).Desde 1994 ha sido catalogado como un carcinógeno tipo I por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (36).

En Venezuela, la región de Los Andes constituye un área endémica de cáncer gástrico, con altas tasas de morbimortalidad y en vista de la asociación de esta patología con la infección previa por *H. pylori*, han surgido numerosos estudios y grupos de investigación. En Mucuchíes, población capital del municipio Rangel en los páramos del estado Mérida, De Sousa y colaboradores (2004) encontraron una prevalencia de la infección de 75,5 % (37), Silva y colaboradores (2008) de 68,7 % (38) y De Faría y colaboradores (2010) de un 76% (39).Posteriormente Villarreal y colaboradores en el 2011, encontraron tasas de reinfección de casi un 80% en la misma población de Mucuchíes posterior a una terapia de erradicación altamente efectiva (17).

www.bdigital.ula.ve

Estas altas tasas de prevalencia y de reinfección representan un importante problema de salud pública local, e impulsa la investigación de la principal fuente de transmisión de la bacteria, que permita tomar medidas de prevención para romper la cadena epidemiológica de la infección y evitar las enfermedades asociadas. Aunque no todaslasvías de transmisión deesta bacteria enlos seres humanos hansidoplenamente identificadas,suficientes datoshan sugerido quelas principales rutas son la oral-oral o fecal-oral (40).El agua como vehículo de transmisión, ha tomado cada vez más importancia en los últimos tiempos, probablemente pudiendo explicar la ruta fecal-oral.

C.C. Reconocimiento

Karita M. y colaboradores (2003), plantearonque la mayortransmisión de*H. pylori*en Japóndepende deagua contaminaday la infección se asocia fuertemente conla historia de beberagua de pozo (41).En la populosa ciudad de Karachi, Pakistán, Khan A. y colaboradores (2012), encontraron suficientes evidencias para señalar al agua de consumo humano, como fuente importante de contaminación por *H. pylori*, detectado por PCR cualitativa (33).

En el presente estudio se encontró ADN de *H. pylori* mediante la técnica de PCR cualitativa, utilizando cebadores ("primers") específicos para la adhesina de la bacteria; en el 16,67% de las viviendas donde se examinó el agua de los grifos en el casco central de Mucuchíes. En contraste con los resultados obtenidos en esta investigación, Horiuchi T. y colaboradores (2001) en Japón, examinaron por PCR el agua de grifos, ríos, pozos y mar para la detección del ADN de *H. pylori* utilizando 3 secuencias (Adhesina, UreA y rRNA 16S), no encontrando en ninguna de las 10 muestras de agua de chorro analizadas el ADN de la bacteria, no obstante si se identificó el ADN de *H. pylori* en 2 de las 6 muestras de agua de pozo, específicamente con la secuencia rRNA y 16S (42). Hultén K. y colaboradores (1996), evidenciaron la presencia de *H. pylori* en el agua potable de Lima, Perú, al examinar 48 muestras de agua, de las cuales 24 fueron positivas para el gen de adhesina de la bacteria y 11 tanto para el gen de adhesina como para el ARN ribosomal 16S (43). El mismo autor en Suecia (1998), detectó el material genético de *Helicobacter spp.* en 3 de 25 muestras de agua de chorro municipales utilizando las mismas secuencias (44).

Cabe destacar que en las 5 casas que resultaron positivas para *H. pylori*, la totalidad de estas utilizan para el consumo, agua hervida o filtrada, 2 y 3 casas, respectivamente. Esto podría sugerir que en estas familias el agua pudiese no ser un vehículo para la transmisión

www.bdigital.ula.ve
C.C. Reconocimiento

dela bacteria de manera directa; sin embargo, es de destacar que el agua utilizada para el lavado de alimentos, utensilios e incluso en la higiene bucal, pudiese estar asociado a la transmisión de la infección.

Hay 02 (dos) tanques de agua de consumo que surten a la población del casco central de Mucuchíes, ambos fueron examinados en la presente investigación, determinándose la presencia del ADN bacteriano del *H. pylori* en uno de ellos. Llama la atención que el tanque ubicado en la parte más alta en la zona de Misintá, resultó positivo para ADN bacteriano, mientras que el tanque ubicado en una zona más baja, a pesar de recibir agua del 1er tanque, en el mismo no se encontró material genético de la bacteria. En relación con esto, es importante destacar que la PCR no es infalible, y pueden presentarse resultados falsos negativos, bien sea inherentes a la toma de la muestra o al ensayo propiamente dicho. Este tipo de inconvenientes pueden solventarse cuando se recurren a otros métodos adicionales de muestreo seriado y de eliminación de inhibidores de la polimerasa empleada en la PCR (45).

www.bdigital.ula.ve

El ADN de *H. pylori* detectado en recipientes de agua y en tuberías de hierro, sugiere que las biopelículas (“biofilms”) pudieran jugar un papel importante en la presencia bacteriana y por ende, en la transmisión, ya que la bacteria a pesar de no encontrarse en la fuente de agua original pudiese permanecer formando biopelículas (27).A su vez, existen reportes en donde se ha demostrado que el *H. pylori* subsiste en la capa basal de estos biofilms, posiblemente beneficiándose de zonas de bajo potencial redox para aumentar de esta manera su supervivencia (46), por este motivo muy probablemente la densidad bacteriana sea menor en las aguas más superficiales o mientras más se aleje de estas comunidades complejas de microorganismos asociados a interfase.

C.C. Reconocimiento

En esta investigación se examinó el agua de 2 riachuelos, en los cuales no hubo evidencia del material genético del *H. pylori*. Es importante mencionar que la toma de muestra se realizó en un período no lluvioso y estudios han revelado que eventos de fuertes lluvias, pueden facilitar la diseminación de materia fecal que contiene la bacteria (27).

A pesar de que en trabajos previos se ha mencionado como factor de riesgo el consumo de vegetales crudos (27), en el presente estudio no se encontró material genético del *H. pylori* en los vegetales examinados, sin embargo el número de muestras tomadas fue pequeño (6 muestras), lo cual pudo haber influído en dicho resultado. No obstante hay muchas causas de falsos negativos en PCR, entre ellas: el método de la toma de muestras, la sensibilidad y especificidad del ensayo, la inhibición de la reacción de PCR, y la degradación de los moldes de ADN (47).La detección por PCR de *H. pylori* en muestras clínicas y ambientales requiere a veces de la remoción de inhibidores de la polimerasa que pudiesen influir en la obtención de falsos negativos (48,49). Goodman K. y colaboradores (1996) en un estudio realizado en Colombia, establecieron que el consumo frecuente de lechuga incrementó la prevalencia del *H. pylori* (23), es de acotar que en este estudio el 96,66 % de las familias afirmó consumir este vegetal.

El 100 % de las familias con PCR positiva para *H. pylori* en el agua, afirmaron que consumían vegetales crudos y que el método de desinfección utilizado era el uso de agua corriente directa del grifo, más la adición de ácido acético en cantidades o concentraciones no precisadas; sin embargo, a pesar de que es conocido que el ácido acético tiene una fuerte actividad bacteriostática (50), no hay trabajos publicados sobre el efecto en la inhibición del crecimiento, ni la actividad bactericida específicamente en *H. pylori*; por lo que no

www.bdigital.ula.ve
C.C. Reconocimiento

puede descartarse a los vegetales crudos como vehículos de transmisión de la bacteria a través del agua utilizada para el lavado.

Además, se encontró en este estudio la presencia de la bacteria en el agua de 1 de los 2 tanques de riego examinados; por lo que pudiese inferirse la posibilidad de transmisión de la infección al ingerir vegetales crudos regados previamente con estas aguas probablemente contaminadas con materia fecal.

En la presente investigación no hubo asociación estadística significativa desde el punto de vista estadístico respecto a la presencia de síntomas gastrointestinales, antecedentes de haber presentado infección por la bacteria, ni antecedentes de cáncer gástrico en el grupo familiar con la identificación de la bacteria en el agua de consumo del hogar; pero es lógico pensar que el análisis de este hallazgo en particular, pudiera deberse a que el número de casas positivas fue pequeño, sin descartar la presencia de falsos negativos en el resto de las viviendas evaluadas.

www.bdigital.ula.ve

Es de considerar que en Venezuela, se han empleado diferentes formatos de PCR para la detección de *H. pylori* procedente de diversas fuentes, generalmente clínicas, pero existe poca o casi nula experiencia en la detección de esta bacteria en aguas o alimentos como posible fuente de infección o contaminación (51, 52).

C.C. Reconocimiento

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La presente investigación es la primera que se realiza en Venezuela, con la finalidad de detectar la presencia de *H. pylori* en el agua y en vegetales de consumo humano, utilizando PCR cualitativa en una localidad ya definida por trabajos previos con alta prevalencia de infección, como lo es la población del casco central de Mucuchíes del municipio Rangel del estado Mérida.

La población de Mucuchíes se encuentra en una zona de alta prevalencia de infección por *H. pylori*, la identificación del ADN de la bacteria tanto en el agua de riego como de consumo, permite plantear y apoyar la evidencia de trabajos previos, donde el *H. pylori* puede ser transmitido a través del agua de consumo humano y representa probablemente por ende un vehículo para la ruta fecal-oral.

www.bdigital.ula.ve

En el presente estudio no es posible descartar el consumo de vegetales crudos como intermediario en la transmisión de la infección por la ruta fecal-oral, tomando en cuenta que a pesar de que no hubo evidencia de material genético de la bacteria en ninguna de las muestras de vegetales, el agua empleada para riego de los mismos resultó ser positiva y además de que existe posibilidad de obtener falsos negativos principalmente por la posible presencia de inhibidores de la polimerasa en los vegetales.

En vista de que la experiencia en la detección por PCR de *H. pylori* en los alimentos y en el ambiente es limitada, es necesario realizar más investigaciones que permitan mejorar la toma de muestra y extracción de ADN para evitar falsos negativos de la prueba y a su vez comparar entre las diferentes secuencias cebadoras (“primers”) existentes para evaluar mejor la sensibilidad y especificidad de las mismas.

C.C. Reconocimiento

Se sugiere el muestreo seriado del tanque principal de abastecimiento del casco central de Mucuchíes, así como también tomar en cuenta en la toma de las muestras, el agua más cercana al fondo de los tanques, que pudiese estar más en contacto con los biofilms y en consecuencia, poseer mayor densidad bacteriana.

Se recomienda realizar trabajos con un número mayor de muestras de vegetales, así como también llevar a cabo protocolos de extracción del ADN que permitan disminuir los inhibidores de la polimerasa, por ejemplo con el uso de nanopartículas paramagnéticas de óxido de hierro (48, 53).

Se recomienda el estudio de los niveles de cloro en la población de Mucuchíes a fin de utilizar las concentraciones necesarias para la desinfección adecuada del agua, que corresponden a 1,1 mg/l (54), tomando en cuenta que con la concentración que se utiliza actualmente no fue suficiente para lograr la eliminación del microorganismo.

www.bdigital.ula.ve

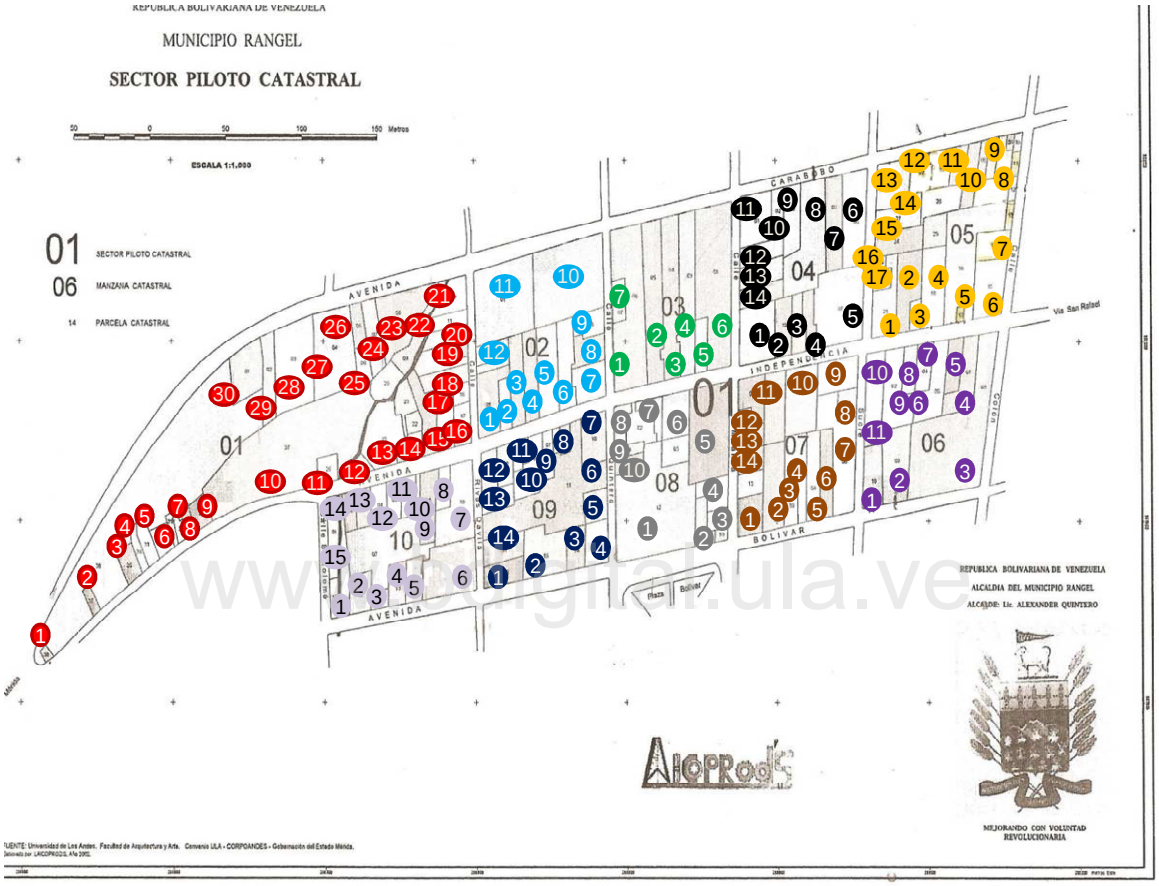
Se plantea igualmente realizar estudios diagnósticos para *H. pylori* a los habitantes de las viviendas donde se obtuvo positividad para el ADN bacteriano, que permita inferir una asociación más clara del agua como fuente de transmisión.

También es importante realizar programas de educación para la salud en la población de Mucuchíes, con respecto a la manipulación de los alimentos y el manejo del agua para el consumo y para los sistemas de riego.

Se considera necesario continuar investigaciones que evalúen las condiciones ambientales, higiénicas y alimentarias de los habitantes de Mucuchíes, para precisar la fuente principal de la infección por *H. pylori* y así establecer estrategias que interrumpan el ciclo biológico de la bacteria y por lo tanto la transmisión de la infección y sus terribles consecuencias.

C.C. Reconocimiento

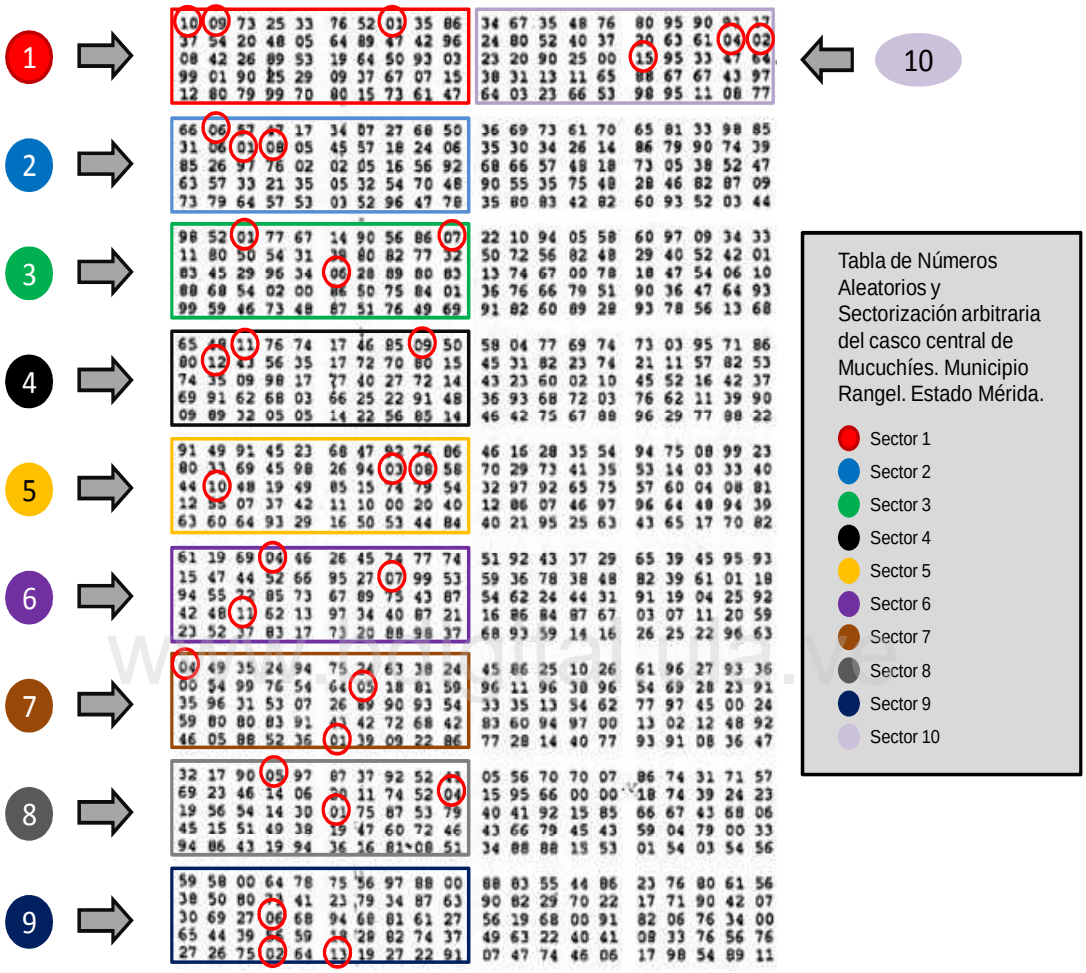
Anexo 1: Mapa del casco central de Mucuchíes dividido en 10 sectores.



www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

Anexo 2: Tabla de números aleatorios y selección aleatoria estratificada de las viviendas del casco central de Mucuchíes.



C.C. Reconocimiento

Anexo 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,_____, CI:_____ Jefe de mi grupo familiar, por medio de la presente confirmo que se me ha informado acerca de mi participación en el proyecto de investigación "**Presencia del *Helicobacter pylori* en el agua de consumo humano y en vegetales de la población del Casco Central de Mucuchíes – Estado Mérida"**

Se me ha explicado que se me realizara un cuestionario y posteriormente se tomarán muestras de agua de los grifos de mi vivienda y algún alimento vegetal.

Así mismo doy fé que se me ha informado acerca de los beneficios de ser partícipe en este proyecto de investigación, haciendo de mi conocimiento que se buscará identificar la presencia o no de *Helicobacter pylori* en el agua de consumo humano. Así mismo soy consciente de que contribuiré con el conocimiento científico para el estudio de la fuente de *H. pylori* y los otros conocimientos que de este proyecto puedan derivarse.

Igualmente se me ha explicado que estoy en libertad de abandonar el estudio cuando así lo considere sin dar ninguna razón, sin que se afecte mi cuidado médico o mis derechos legales.

Todas mis preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. Doy féde que mi participación es voluntaria. Así mismo entiendo que recibiré una copia de este formato de consentimiento informado por escrito.

www.bdigital.ula.ve

NOMBRES Y APELLIDOS DEL PACIENTE FECHA

FIRMA

NOMBRES Y APELLIDOS DE TESTIGO FECHA

FIRMA

NOMBRES Y APELLIDOS DEL INVESTIGADOR FECHA

FIRMA

C.C. Reconocimiento

Anexo 4: FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES – UNIDAD DE GASTROENTEROLOGÍA.

FECHA: _____

Casa Nro:

Dirección_____

Número de Teléfono_____

I. Datos del Jefe del Grupo Familiar

Nombres y apellidos_____

www.bdigital.ula.ve

II. Medidas Higiénico-sanitarias:

Métodos de desinfección del agua:

Filtro_____

Hierven el agua ____

Directo del tubo ____

Compran aguas envasadas _____

Ingiere vegetales el grupo familiar: Si_____ No_____

Vegetales Crudos: Si_____ No_____ Cuáles?_____

Método de desinfección de vegetales crudos:

Ninguno_____

Agua Corriente directa del tubo_____

Agua Corriente directa del tubo + Otro agente (Cloro-Vinagre)_____

Agua Hervida_____

C.C. Reconocimiento

¿Algún miembro de la familia tiene historia clínica en la Unidad de Gastroenterología del I.A.H.U.L.A ?

Sí_____ Nro: _____ No_____

¿Por qué?

_____
_____
_____
_____

_____

¿A algún miembro de la familia le ha sido diagnosticada infección por *Helicobacter pylori*?

Sí____ No_____

¿Recibió tratamiento?: Sí_____ No_____

www.bdigital.ula.ve

¿Hay antecedentes de Cáncer Gástrico en la familia?

Si____ No____

Parentesco_____

¿Alguien del grupo familiar presenta alguno de los siguientes síntomas?

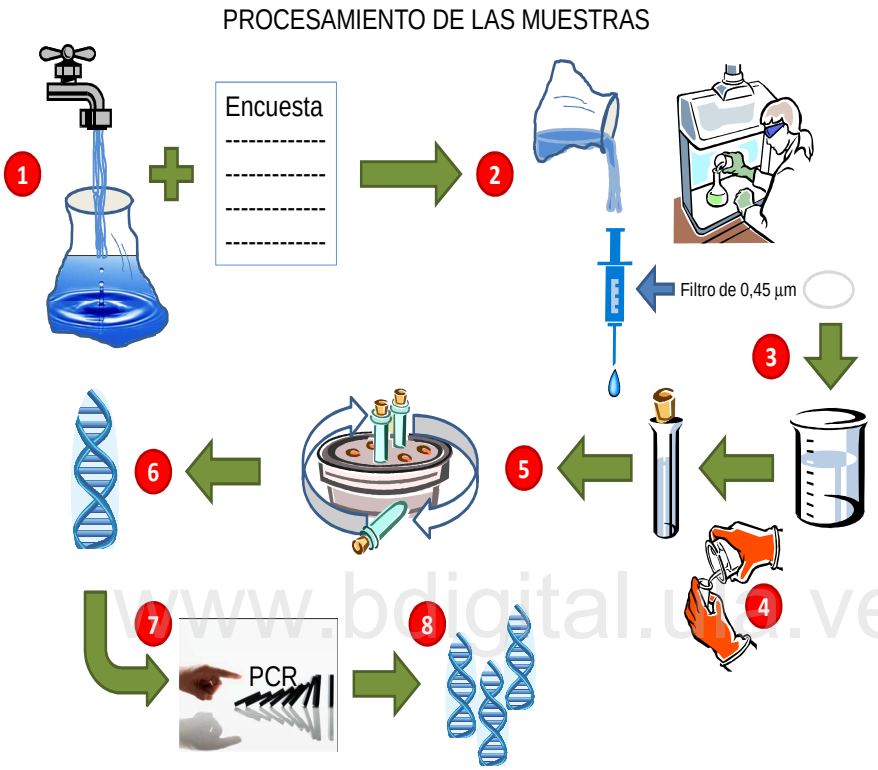
Náuseas_____ Regurgitaciones_____Odinofagia_____ Pirosis_____

Vómitos_____ Disfagia: _____ Meteorismo_____ Distensión abdominal_____
Eructos_____Anorexia: _____Pérdida de peso_____

Nombre y apellidos de pacientes sintomáticos:

C.C. Reconocimiento

Anexo 5: Esquema del Procesamiento de las Muestras



www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tamariz Ortiz J H, Capcha Mendoza R, Palomino Cadenas E J, Aguilar Olano J, Actividad Antibacteriana de la Sangre de Grado (Croton lechleri) frente al *Helicobacter pylori*. Rev Med Hered 2003; 14 (2): 81 – 88.

2. Jian-Ping Yuan, Tao Li, Hua-Biao Chen, Zhen-Hong Li, Gui-Zhen Yang, Bao-Yu Hu et al. Analysis of gene expression profile in gastric cancer cells stimulated with *Helicobacter pylori* isogenic strains. J Med Microbiol 2004; (53): 965 – 974.

3. Berroterán A, Perrone M, Correnti M, Cavazzi M E, Tombazzi C, Lecuna V. et al. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en el estómago y placa dental de una muestra de población en Venezuela. Acta Odontol. Venez 2001; 39 (2).

4. Pueyo A M, Huarte M P, Jiménez C, Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. Anales del Sistema Sanitario de Navarra 1998; 21 Supl 2.: 9 – 17.

5. Ramírez Ramos A., Sánchez Sánchez R.Contribución de Latinoamérica al estudio del *Helicobacter pylori*. Acta Gastroenterol Latinoam 2009; 39 (3): 197 – 218.

6. Ghose C, Pérez Pérez G I, Van Doorn L J, Domínguez Bello M G, Blaser M J, High Frequency of Gastric Colonization with Multiple *Helicobacter pylori* Strains in Venezuelan Subjects. J. Clin. Microbiol 2005; 43 (6): 2635 – 2641.

7. González, G. Patologías gastroduodenales asociadas a la infección por *Helicobacter pylori*. IX Congreso Venezolano de Bioanálisis. XI Jornadas Científicas de la Sociedad de Bioanalistas Especialistas 1999. Pág 20.

8. Páez Valery M C, Barón M A, Solano L, Nadaff G, Infección por *Helicobacter pylori* (13C – UBT) y factores nutricionales y socioeconómicos asociados en escolares de estratos bajos de la ciudad de Valencia. Venezuela. ALAN 2006; 56 (4): 342 – 349.

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

9. Rodríguez S, Prevalencia de Infección por *Helicobacter pylori* en una población del estado Nueva Esparta. Correlación clínica, endoscópica y anatomopatológica. Rev GEN 2008; 62 (4): 290 – 293.

10. Marcano Lozada M J, Urrestarazu M I, Serrano N M, Erradicación de Infección por *Helicobacter pylori* asociada a mejoría clínica de urticaria crónica idiopática. Resultados preliminares. Rev Panam Infectol 2010; 12 (3): 22 – 27.

11. Stone A M, Current Concepts in Medicine. Transmission of *Helicobacter pylori*. Postgrad Med J 1999; 75: 198 – 200.

12. Azevedo N F, Almeida C, Fernandes I, Cerqueira L, Dias S, Keevil C W et al, Survival of Gastric and Enterohepatic *Helicobacter* spp. in Water: Implications for Transmission. Appl Environ Microbiol 2008; 74 (6): 1805 – 1811.

13. Janzon A, Sjoling A, Lothigius A, Ahmed D, Qadri F, Svennerholm A M, Failure to detect *Helicobacterpylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive Real Time PCR Assays, Appl Environ Microbiol 2009; 75 (10): 3039 – 3044.

14. Sen K, Schable N A, Lye D J, Development of an internal control for Evaluation and Standardization of a Quantitative PCR Assay for detection of *Helicobacter pylori* in drinking water, Appl Environ Microbiol 2007; 73 (22): 7380 – 7387.

15. Adams B L, Bates T C, Oliver J D, Survival of *Helicobacterpylori* in a natural freshwater environment, Appl Environ Microbiol 2003; 69 (12): 7462 – 7466.

16. Gemmato AM, Casanova GA, García M, Novoa D, Parlapiano D, Martínez D. Relación entre infección por *Helicobacter pylori* y lesiones preneoplásicas gástricas. Rev GEN 2005. (59) 2: 93-98.

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

17. Villarreal Sánchez L. Tasas de reinfección de *Helicobacter pylori*, hallazgos endoscópicos e histopatológicos posterior a una terapia de erradicación efectiva. Mucuchíes-Estad Mérida (Tesis doctoral) Mérida. Universidad de Los Andes; 2011.

18. Marshal B J, Warren J R, Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1984; 1: 1311 – 1315.

19. Sánchez N, Giono S, Maldonado C, Receptores Tipo Toll Patogénesis y Respuesta Inmune a *Helicobacter pylori*. Salud Pública Mexicana 2010; 52 (5): 447-54.

20. Fernández–Delgado M, Contreras M, García-Amado M, Michelangeli F, Suárez P, Evidencias de la Transmisión Acuática de *Helicobacter pylori*, Interciencia 2008; 33 (6): 412–417.

21. Dawn I, Peek R, The Role of Persistence in *Helicobacterpylori* Pathogenesis: Helicobacter *pylori* and the host immune response, Curr Opin Gastroenterol 2006, 22 (1): 3-7.

22. Fernández M, Contreras M, Suárez P, Gueneau P, García M, Use of HP selective medium to detect *Helicobacter pylori* associated with other enteric bacteria in seawater and marine mollusks.Appl Microbiol 2007; 45: 213–218.

23. Goodman K J, Correa P, Tengana H, Ramírez H, Delany J, Guerrero O et al, *Helicobacterpylori* Infection in the Colombian Andes: a population – based Study of Transmission Pathways, Am J Epidemiol 1996; 144 (3): 290 – 299.

24. Domínguez M, Beker B, Guelrud M et al. Short report: socioeconomic andseasonal variations of *Helicobacter pylori* infection in patients in Venezuela. Am J Trop Med Hyg 2002; (66) 1: 49-51.

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

25. Azevedo N F, Pacheco A P, Keevil C W, Vieira M J, Nutrient Shock and Incubation Atmosphere Influence Recovery of Culturable *Helicobacter pylori* from Water, Appl Environ Microbiol 2004; 70 (1): 490 – 493.

26. Braganc S M, Azevedo N F, Simo L C, Keevil C W, Vieira M J, Use of fluorescent in situ hybridization for the visualization of *Helicobacterpylori* in real drinking water biofilms, Water Science and Technology 2007; 55 (8 – 9): 387 – 393.

27. Bellack N R, Koehoorn M W, MacNab Y C, Morshed M G, A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission : a review of the evidence, Epidemiol Infect 2006; 134: 439 – 449.

28. Azevedo N , Pinto A , Reis N , Vieira M J, Shear stress, temperature and inoculation concentration influence the adhesion of water – stressed *Helicobacter pylori* to stainless steel 304 and polypropylene, Appl Environ Microbiol 2006; 72 (4): 2936 – 2941.

29. Montero V, Masís F, López G, Hernández A, Barboza K, Orozco J et al, Hallazgo de la bacteria *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y su relación con la incidencia de Cáncer Gástrico en Costa Rica, Tecnología en Marcha 2011; 24 (3): 3 – 14.

30. Giao M S, Azevedo N F, Wilks S A, Vieira M J, Keevil C W, Effect of Chlorine on Incorporation of *Helicobacter pylori* into Drinking Water Biofilms, Appl Environ Microbiol 2010; 76: 1669 – 1673.

31. Hopkins R J, Vial P A, Ferreccio C, Ovalle J, Prado P, Rusell R G et al, Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission, J Infect Dis 1993; 168 (1): 222 – 226.

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

32. Shahamat M, Alavi M, Watts J E M, González J M, Sowers K R, Maeder D W et al, Development of two PCR-based Techniques for detecting Helical and Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*, J Clin Microbiol 2004; 42 (8): 3613-3619.

33. Khan A, Farooqui A, Urooj Kazmi S, Presence of *Helicobacterpylori* in drinking water of Karachi, Pakistan, J Infect Dev Ctries 2012; 6: 251-255.

34. Evans D G, Karjalainen T, Evans D J, Graham D Y, Lee C H, Cloning, nucleotide sequence and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*, J Bacteriol 1993; 175: 674 – 683.

35. Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, Sibley RK, Prittkin J, Chang Y, *Helicobacter pylori* infection in intestinal and diffuse-type gastric adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst 1991; 83: 640–643.

www.bdigital.ula.ve

36. Kuipers E, Helicobacter pylori erradication for the prevention of gastric cancer. Helicobacter 2006; 11 Supl 1: 52-57.

37. De Sousa L, Vásquez L, Velazco J, Parlapiano D. Características clínicas y epidemiológicas de la infección por *Helicobacter pylori* en una población de Los Andes Venezolanos. Invest Clin 2006 ; 47 (2): 109-16.

38. Silva R, Casanova G, Albarracín Z, García M, Torres R, Prueba del Aliento y Hallazgos Histopatológicos asociados a la infección por *Helicobacter pylori*. Rev Gen 2012; 66 (2): 93-99.

39. De Faría A, Casanova G, Milano M, Torres A. Relación entre histología y prueba de aliento cuantitativa en Gastritis Folicular (*Helicobacter pylori*, Mucuchíes – Mérida). Rev Gen 2012; 66 (3): 166-170.

C.C. Reconocimiento

40. Pérez L, Codony F, López D, Fittipaldi M, Adrados B, Morato J et al, Quantification of Helicobacter pylori levels in soil samples from public playgrounds in Spain. Biomed and Biotechnol 2010; 11 (1): 27-29.

41. Karita M, Teramukai S, Matsumoto S, Risk of Helicobacter pylori transmission from drinking well water is higher than that from infected intrafamiliar members in Japan. Dig Dis Sci 2003; 48 (6): 1062-7.

42. Horiuchi T, Ohkusa T, Watanabe M, Kobayashi D, Miwa H, Eishi Y.*Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan.Microbiol Immunol 2001; 45 (7): 515-9.

43. Hulten K, Enroth H, Nystrom T, Engstrand L, Presence of Helicobacter species DNA in Swedish water. J Appl Microbiol 1998; 85 (2): 282-6.

44. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein P D, Opekun A R, Gilman R H el al, *Helicobacter pylori* in the drinking wáter in Peru, Gastroenterol 1996; 110 (4): 1031 -5.

45. Clayton C, Kleanthous H, Coates P, Morgan D, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30(1):192-200.

46. Azevedo N, Vieira M, Keevil C. Development of peptide nucleic acid probes to detect *Helicobacter pylori* in diverse species potable water biofilms Water Sci Technol 2003; 47 (5): 155-60.

47. Mazari M, López Y, Ponce S, Calva J, Rojo F, Castillo G. Longitudinal Study of Microbial Diversity and Seasonality in the Mexico City Metropolitan Area Water Supply System. Appl Environ Microbiol 2005; 71 (9): 5129 – 37.

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento

48. Van Zwet A, Thijs J, Kooistra A, Schirm J, Snijder J, Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients. J Clin Microbiol 1994; 32: 1346 - 1348.

49.Yakoob J, Jafri W, Abbas Z, Abid S, Islam M, Ahmed Z. The diagnostic yield of various tests for *Helicobacter pylori* infection in patients on acid-reducing drugs. Dig Dis Sci 2008; 53(1): 95-100.

50. Entani E, Asai M, Tsujihata S, Tsukamoto Y, Ohta M, Antibacterial Actin of vinegar against food – borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7 (Part 1). Examination of bacteriostatic and bactericidal activities, Kansenshogaku Zasshi 1997, 71 (5): 443-50.

51. Berroterán A, Perrone M, Correnti M, Cavazza M E, Tombazzi C, Goncalvez R et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. J Med Microbiol 2002; 51: 764 – 770.

52. Ortiz D, Guariglia V, Avila M, Correnti M, Perrone M, Gutierrez B et al. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes in Cuban and Venezuelan populations. Mem Inst Osvaldo Cruz 2010; 105 (3): 331 – 335.

53. Basu S, Chatterjee S, Bandyopadhyay A, Sarkar K. Potential application of superparamagnetic nanoparticles for extraction of bacterial genomic DNA from contaminated food and environmental samples. J Sci Food Agric 2012.

54. Johnson C H, Rice E W, Reasoner D J, Inactivation of *Helicobacter pylori* by Chlorination. Appl Environ Microbiol 1997; 63 (12): 4969-4970.

www.bdigital.ula.ve

C.C. Reconocimiento