



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN



**Detección de *Helicobacter pylori* y la Proteína CagA en Biopelículas Presentes en
Sistemas de Agua de Mucuchíes, Estado Mérida.**

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Br. German Andrés González Antequera

Tutora:

Dra. Milagro Fernández

Co-tutor:

MSc. Víctor Salazar

Mérida, Junio de 2019



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN



**Detección de *Helicobacter pylori* y la Proteína CagA en Biopelículas Presentes en
Sistemas de Agua de Mucuchíes, Estado Mérida.**

(Trabajo de Grado para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis)

Autor:

Br. German Andrés González Antequera

Tutora:

Dra. Milagro Fernández

Co-tutor:

M.Sc. Víctor Salazar

Mérida, Junio de 2019



FARMACIA Y BIOANÁLISIS
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
MÉRIDA VENEZUELA

VEREDICTO

Los suscritos miembros del jurado, Dra. Milagro Fernández, Dr. Gerardo Casanova y Prof. Judith Velasco, miembros designados por el Consejo de Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, para conocer el trabajo titulado "Detección de *Helicobacter pylori* y la Proteína CagA en biopelículas presentes en sistemas de agua de Mucuchíes, estado Mérida", presentado por el Bachiller Germán González, C.I. 21.447.783, como requisito parcial para optar al grado de Licenciado en Bioanálisis, reunidos el día Jueves 27 de Junio de dos mil diecinueve a las 11:00 am, en el aula virtual del edificio Administrativo de la Universidad de los Andes, previo estudio y análisis del Trabajo de Grado de la Escuela de Bioanálisis, nos permitimos **APROBAR** el trabajo, para los efectos que ha sido presentado e igualmente **RECOMENDAMOS SU PUBLICACIÓN**.

En Mérida, a los 27 días del mes de junio de dos mil diecinueve

Milagro Fernández

Dr. Milagro Fernández (tutor)

Judith I. Velasco C.

Prof. Judith Velasco (jurado)

Gerardo Casanova

Dr. Gerardo Casanova (jurado)

CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN DR. JOSÉ RAFAEL LUNA ESCUELA DE BIOANÁLISIS Sector Campo de Oro, detrás del Hospital Universitario de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Edificio Lic. Gonzalo González. 3er piso. Teléfono: (58-274)2403291. Correo: ciffbula@gmail.com

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por todas las oportunidades brindadas, por estar presente siendo una fuerza positiva en mi vida.

A mi familia por su apoyo incondicional en mi formación académica, por su sacrificio y constancia sin la cual no sería posible encontrarme hoy aquí.

A mi tutora y co-tutor por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, por ser parte de mi formación académica y compartir sus conocimientos y experiencias.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por abrirme las puertas y haberme brindado todos los recursos sin los cuales no sería posible esta investigación.

A la Universidad de Los Andes por haber sido un segundo hogar, a la gran dedicación y entrega de sus profesores que me brindaron conocimientos y herramientas para formarme como un profesional competente en el bioanálisis permitiéndome alcanzar mis metas y sueños.

DEDICATORIA

A Dios por estar presente todos los días, por acompañarme y guiarme durante toda la carrera llenando mi vida de bendiciones y alegría.

A mis padres por estar presentes siempre siendo una fuerza positiva en mi vida, por brindarme la oportunidad de estudiar y apoyarme de forma incondicional en todo momento.

A mi tutora y co-tutor por su esfuerzo y dedicación, por compartir sus conocimientos y experiencias, motivándome a terminar mis estudios con éxito. De igual manera a cada uno de los profesores y maestros que fueron partícipes en mi formación académica que con su esfuerzo y dedicación me permitieron llegar hoy aquí.

A la Universidad de Los Andes por haberme aceptado y permitirme ser parte de toda esta comunidad académica.

INDICE DE CONTENIDO

VEREDICTO	i
AGRADECIMIENTO	ii
DEDICATORIA	iii
INDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación	7
Objetivos de la Investigación	8
Objetivo General	8
Objetivos Específicos	8
Alcances y Limitaciones de la Investigación	9
Alcances de la Investigación	9
Limitaciones de la Investigación	10
CAPÍTULO II	12
MARCO TEÓRICO	12
Trabajos previos	12
Bases Teóricas	13
<i>H. pylori</i>	13
Características morfológicas	14
Principales Factores de Virulencia de <i>H. pylori</i>	15
Biopelículas	18
Tapetes microbianos	22
Operacionalización de las variables	23
Hipótesis	25
CAPÍTULO III	26
MARCO METODOLÓGICO	26
Tipo de investigación	26
Diseño de la investigación	26
Población y Muestra	27
Área de Estudio	27
Unidad de Investigación	27

Selección del tamaño de la muestra	28
Sistema de Variables	28
Procedimientos de la Investigación	29
Recolección y Transporte de la Muestra	29
Procesamiento de la Muestra	31
Diseño de Análisis	36
CAPITULO IV	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Resultados	37
Detección de <i>H. pylori</i> por Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	37
Detección por Inmunohistoquímica de la proteína CagA de <i>H. pylori</i>	42
Detección de <i>H. pylori</i> por Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH) en tapetes microbianos.	42
DISCUSIÓN	46
CAPITULO V	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
Conclusiones	50
Recomendaciones	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables.	24
Tabla 2. Sitios y tipos de muestras de biopelículas recolectadas en Mucuchíes	28
Tabla 3. Sitios de recolección de muestras de biopelículas y tapetes microbianos estudiados en Mucuchíes en Julio del 2015.	30
Tabla 4. Cantidad de reactivos requeridos en los ensayos de FISH y agregados a cada pozo de las láminas para la detección de <i>H. pylori</i> .	34
Tabla 5. Cantidad de reactivos agregados a cada fila de las láminas para la cuantificación de la proteína CagA de la isla de patogenicidad de <i>H. pylori</i> .	35
Tabla 6. Promedio de células positivas a <i>H. pylori</i> estimado por duplicado en muestras de biopelículas y en cinco campos evaluados al microscopio de fluorescencia.	39
Tabla 7. Porcentaje de área de <i>H. pylori</i> en biopelículas de los tanques de Mucuchíes.	40
Tabla 8. Porcentaje de área de bacterias totales en biopelículas de los tanques de Mucuchíes.	41
Tabla 9. Valores de <i>p</i> obtenidos con la Prueba de Bonferroni en el análisis de prevalencia de <i>H. pylori</i> entre las diferentes muestras de biopelículas de los tanques de agua de Mucuchíes.	44

Tabla 10. Valores de p obtenidos con la prueba de Bonferroni en el análisis del área de *H. pylori* por campo entre las diferentes muestras de biopelículas de los tanques de agua de Mucuchíes. 44

Tabla 11. Valores de p obtenidos con la prueba de Bonferroni en el análisis del número de bacterias totales por campo entre las diferentes muestras de biopelículas de los tanques de agua de Mucuchíes. 45

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales factores de virulencia de <i>H. pylori</i> (Merrell et al., 2004).	17
Figura 2. Etapas de formación de biopelículas en bacterias Gram negativas: (1) planctónica, (2) adhesión, (3) formación de microcolonias, (4) macrocolonias y maduración, y (5) desprendimiento (Modificado de Monds & O'Toole, 2009).	21
Figura 4. Promedio células positivas a <i>H. pylori</i> en los sitios de muestreo en los tanques de Mucuchíes.	40
Figura 5. Porcentaje promedio de área de <i>H. pylori</i> en los sitios de muestreo en los tanques de Mucuchíes	41
Figura 6. Porcentaje promedio de área de células totales en los sitios de muestreos de los tanques de Mucuchíes.	42
Figura 7. Imágenes de FISH para la detección de <i>H. pylori</i> en tapetes microbianos. En las imágenes a y b no se observan bacterias, pero si una autofluorescencia de la muestra. En la imagen c se puede observar fluorescencia positiva a una célula de <i>H. pylori</i> .	43

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
Detección de *Helicobacter pylori* y la Proteína CagA en Biopelículas Presentes
en Sistemas de Agua de Mucuchíes, Estado Mérida

Autor: Germán González

Tutor: Dra. Milagro Fernández

Co-Tutor: M.Sc. Víctor Salazar

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria que coloniza la mucosa gástrica en los seres humanos causando enfermedades como gastritis, ulceraciones e incluso cáncer. Esta bacteria se puede encontrar en el agua o adherida a las superficies formando biopelículas. Estudios anteriores han aislado la bacteria en muestras de agua en la población de Mucuchíes. El objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de *H. pylori* y la proteína CagA de la isla de patogenicidad PAI-*cag* asociada con riesgo de cáncer gástrico en biopelículas y/o tapetes microbianos recolectados en sistemas de almacenamiento y distribución de agua de consumo de la población de Mucuchíes, empleado técnicas de Hibridación fluorescente *in situ* (FISH) e Inmunohistoquímica. Se eligieron cuatro sitios de muestreo, con un total de 10 muestras, en los que identificó a la bacteria en tres muestras, las cuales resultaron estadísticamente diferentes entre sí ($p \leq 0.05$). Sin embargo, no se encontró a la proteína CagA en ningún caso. Estos resultados indican que las biopelículas y/o tapetes microbianos formados en los tanques de agua que abastecen a la población de Mucuchíes actúan como reservorios ambientales de la bacteria, existiendo el riesgo de contraer una infección o reinfección por transmisión acuática con implicaciones para la salud pública.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, Hibridación fluorescente *in situ* (FISH), Inmunohistoquímica, CagA, biopelículas, tanques de agua.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria que se encuentra en la mucosa gástrica de los seres humanos. En la mayoría de los casos es asintomática; sin embargo, se ha asociado a diversas patologías gástricas como la gastritis, úlceras y el cáncer gástrico debido a que posee factores de virulencia como la ureasa que le permite adaptarse al pH ácido estomacal (Montero *et al.*, 2011). Además, mediante los factores de virulencia presentes en la Isla de Patogenicidad (PAI-*cag*), *H. pylori* es capaz de desencadenar una acción patógena en el hospedador gracias a la principal proteína de virulencia CagA (Hatakeyama, 2009).

La proteína de virulencia CagA se ha asociado al cáncer gástrico; ésta es capaz de introducirse en el citoplasma de las células del epitelio gástrico interrumpiendo las vías de señalización dependiente e independiente de fosforilación que conducen a una proliferación y motilidad anormal en la célula, así como cambios en el citoesqueleto, lo que provoca una reacción inmunológica celular e inflamación asociada a carcinoma gástrico (Cervantes, 2016).

H. pylori es capaz de sobrevivir fuera de la mucosa gástrica. La bacteria se ha encontrado en el agua y biopelículas formadas en superficies presentes en ambientes acuáticos, donde permanece principalmente en un estado de latencia denominado viable no cultivable (VNC). En este estado fisiológico la bacteria modifica su morfología de bacilos a cocos, reduce el volumen celular y disminuye el metabolismo, entre otros factores celulares, para sobrevivir a las condiciones ambientales adversas del medio acuático; sin embargo, mantiene todo el potencial de

síntesis de factores de virulencia y resistencia a antibióticos con importantes implicaciones a la salud pública (Azevedo *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007; Fernández-Delgado *et al.*, 2008).

Las biopelículas bacterianas son microambientes donde existe asociación entre una o varias especies de bacterias que forman conexiones unidas a un polisacárido. Este polisacárido le facilita a las bacterias protección y adherencia a la superficie, así como les confiere resistencia a desinfectantes y antimicrobianos debido a que restringe su acceso a las células bacterianas dentro de la biopelículas, dificultando su eliminación (Yang *et al.*, 2011; Schoenen, 2002). Por otra parte, los tapetes microbianos se definen como biopelículas de mayor complejidad conformadas por comunidades funcionales de organismos estratificados e integrados en una matriz orgánica que puede contener una gran cantidad de minerales como carbonatos o silicatos. Estos tapetes se desarrollan en sustratos sólidos como arena, rocas y otros sedimentos. Se consideran autotróficos en su mayoría ya que son capaces de utilizar el carbón inorgánico como fuente de carbono. Su estudio se ha enfocado recientemente en identificar la biodiversidad microbiana o los miembros de la comunidad microbiana que forman parte de estos ecosistemas con el fin de tener una aproximación de sus mecanismos de adaptación y en algunos casos de su potencial biotecnológico (Bolhuis *et al.*, 2014).

Mucuchíes es capital del municipio Rangel en el estado Mérida en la cual se presentan cifras de infección por *H. pylori* de un 75% (De Farías *et al.*, 2012) Estudios realizados en la zona demostraron que en las redes de tratamiento de agua potable se encuentra la bacteria, indicando que los métodos de desinfección utilizados no son

suficientes para erradicarla; sin embargo, esta bacteria puede encontrarse adherida a la superficie de los tanques uniéndose a las biopelículas que allí se forman (Villarreal, 2011; Fernández *et al.*, 2014).

Se ha comprobado que la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) es un método altamente sensible, específico y eficiente para la detección de *H. pylori* en el ambiente. Esta técnica se fundamenta en el uso de sondas de ADN dirigidas a regiones específicas del gen *16S ARNr* bacteriano unidas a fluoróforos que permiten visualizar las células blanco empleando microscopía de fluorescencia (Azevedo *et al.*, 2003; Fernández-Delgado *et al.*, 2008). De igual forma, por fluorescencia e Inmunohistoquímica es posible detectar la proteína como la CagA de *H. pylori*, utilizando anticuerpos específicos acoplados a fluoróforos que se unen a esta proteína y emiten fluorescencia en rangos específicos de emisión (Soler & Acosta, 2010; Martínez, 2011).

En esta investigación se determinó si *H. pylori* se encuentra en biopelículas formadas en redes de distribución de agua potable y si expresa la proteína CagA asociada al riesgo de cáncer gástrico.

CAPÍTULO I

Planteamiento del Problema

El cáncer representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en el año 2012 un millón de casos de cáncer gástrico a nivel global, estableciéndose a esta enfermedad como el cuarto cáncer más común. Anualmente al menos unas 750.000 personas sucumben al carcinoma (OMS, 2018). En Venezuela el cáncer constituye la segunda causa de muerte según el Anuario de Mortalidad publicado en 2013 por el Ministerio de Poder Popular Para la Salud (MPPP la Salud, 2013). Los estados andinos, principalmente Táchira y Mérida, presentan tasas muy altas de cáncer gástrico e infección por *H. pylori* (De Faría *et al.*, 2012).

La OMS y la Sociedad Americana de Cáncer consideran a *H. pylori* como el principal causante de la úlcera péptica y lo definen como un cancerígeno definitivo clase 1. Esta bacteria es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedador y permanecer en el cuerpo humano durante toda su vida, provocando diferentes patologías como úlceras, gastritis, linfoma de MALT de células B y cáncer gástrico (Montero *et al.*, 2010). La infección representa un problema de salud a nivel mundial debido a su elevada prevalencia, con cifras superiores al 70% en los países en vías de desarrollo, donde es adquirida principalmente en edades tempranas por individuos con deficientes condiciones económicas y socioculturales (Ramos *et al.*, 2003).

El principal factor de virulencia de esta bacteria es un gen denominado gen A asociado a la citotoxina que codifica junto a otros genes la proteína CagA y la PAI-*cag* de *H. pylori* asociada con el carcinoma gástrico (Cervantes, 2016). Las cepas de *H. pylori* pueden dividirse en positivas o negativas para el gen *cagA*. Se estima que entre el 60 al 70% de las cepas aisladas en los países occidentales son *cagA* positivas (Hatakeyama, 2009). Hasta la fecha no existen reportes de prevalencia de *cagA* en Mérida o la localidad de Mucuchíes, a pesar de las altas cifras de cáncer gástrico en la localidad (Ramírez & Vera, 2012; Duarte, 2013; Nieto, 2014).

El único reservorio conocido de *H. pylori* es el hombre; sin embargo, sus vías de transmisión no han sido completamente definidas hasta el presente. Se han propuesto dos principales vías de transmisión: i) fecal-oral, a través de aguas o alimentos contaminados con heces de personas infectadas, y ii) oral-oral, mediante el contacto de saliva entre familiares de pacientes infectados. Adicionalmente, se han planteado otras vías de transmisión como la gastro-oral a través del vómito y la iatrogénica por equipos endoscópicos (Macenlle, 2007). Las infecciones por *H. pylori* pueden presentarse además como epidemias, sugiriendo el rol del agua y los alimentos como rutas más frecuentes de transmisión (Camargo & Boschian, 2012).

Las biopelículas encontradas en los ambientes acuáticos representan un mecanismo de supervivencia de las bacterias que favorecen su colonización a las superficies y adaptación a las condiciones de estrés ambiental (Yang *et al.*, 2011).

El cloro es un método de desinfección comúnmente utilizado al nivel mundial para la potabilización del agua (Schoenen, 2002). Estudios realizados por Johnson *et al.* (1997) demostraron que *H. pylori* es inactivado por la aplicación del cloro; sin

embargo, la técnica utilizada fue mediante la recuperación de cultivos y no consideraron el estado VNC de la bacteria. Más recientemente mediante técnicas de biología molecular se demostró que la bacteria puede sobrevivir a bajas concentraciones de cloro en un estado VNC (Moreno *et al.*, 2007). Ambos estudios se realizaron usando cultivos puros para suspender células en el agua; sin embargo, se ha reportado que en el ambiente *H. pylori* coloniza las superficies de tuberías y tanques de distribución de agua potable a través de la formación de biopelículas que les permite resistir a los tratamientos convencionales de potabilización manteniéndose en un estado VNC (Bunn *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2004; Giao *et al.*, 2010).

Mucuchíes se encuentra ubicada en el municipio Rangel del estado Mérida y es una región endémica de *H. pylori*, donde se reporta una prevalencia del 75% (De Faría *et al.*, 2012; Rojas, 2016) y una reinfección del 76% en pacientes tratados (Villarreal, 2011). En vista de la alta prevalencia de *H. pylori* en esta localidad de los Andes venezolanos y la alta resistencia de esta bacteria a la desinfección por la formación de biopelículas, en este trabajo se planteó la siguiente pregunta: ¿Las biopelículas presentes en redes de distribución de agua potable y sistemas de riego de hortalizas en la población de Mucuchíes pueden ser colonizadas por *H. pylori* y por cepas positivas al factor de virulencia CagA?.

Justificación

En Venezuela se estima que el 70% de la población está infectada por *H. pylori*, este elevado número de personas se infectan en las primeras dos décadas de su vida debido a bajas condiciones de saneamiento público. La infección al principio es asintomática y es a través del tiempo van apareciendo síntomas cada vez más severos. *H. pylori* está asociada a enfermedades severas como linfoma de MALT e incluso enfermedades fuera del tubo digestivo como la anemia (Gutiérrez, 2008). A pesar de aplicar un tratamiento adecuado, aún existe la posibilidad de reinfección y altas tasas de resistencia a antibióticos como nitroimidazoles, macrólidos, quinolonas y rifamicinas. Se han detectado variedad de cepas, unas son más virulentas que otras y son portadoras de la PAI-*cag* asociada al riesgo de cáncer gástrico (Pajares *et al.*, 2007; Trespalacios *et al.*, 2010).

Diversos estudios han demostrado que la bacteria puede encontrarse en redes de distribución de agua potable de forma libre, contaminando no sólo el agua para el consumo de los habitantes sino también los sistemas de distribución de las aguas de riego de cultivos de hortalizas como otras fuentes de infección a los humanos (Nieto, 2014; Rojas, 2016). Así mismo, se ha reportado que este patógeno puede colonizar biopelículas formadas en las superficies de las tuberías y tanques de agua potable como mecanismo de supervivencia ambiental y transmisión a los humanos (Azevedo *et al.*, 2006; Fernández-Delgado *et al.*, 2008).

Debido a los elevados índices de infección por *H. pylori* en localidades de los Andes venezolanos como Mucuchíes, donde se reporta una prevalencia del 75% y

reinfección del 76% (De Faría *et al.*, 2012), y a la alta concentración de la bacteria en las redes de distribución de agua potable de esta población (Nieto, 2014; Rojas, 2016), se motiva este estudio que persiguió comprobar si la bacteria está presente en las biopelículas y/o tapetes microbianos que se encuentran en las redes de distribución de agua de potable y riego de hortalizas en Mucuchíes y si las mismas podrían ser portadoras de la proteína antigénica CagA.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar la presencia de *H. pylori* y la proteína CagA de la PAI-*cag*- en biopelículas y/o tapetes microbianos recolectados de sistemas de almacenamiento y distribución de agua de consumo de la población de Mucuchíes.

Objetivos Específicos

- Detectar la presencia de regiones específicas del gen *16S ARNr* de *H. pylori* en las muestras de biopelículas y/o tapetes microbianos formados en tanques y tuberías principales de abastecimiento de agua potable y aguas de riego de hortalizas de Mucuchíes, empleando el método de FISH
- Evaluar por Inmunohistoquímica la presencia de la proteína CagA de *H. pylori* en las muestras de estudio.
- Estimar la concentración de *H. pylori* y células positivas a CagA en las biopelículas a través del análisis de imágenes con el programa ImageJ.

- Estimar el porcentaje de área de las biopelículas colonizadas por *H. pylori* y células positivas a CagA a través del análisis de imágenes con el programa ImageJ.
- Evaluar estadísticamente diferencias en la prevalencia de *H. pylori* o CagA en relación al origen de las muestras de biopelículas y los sitios de muestreo.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

Entre los alcances de esta investigación se encuentran la aplicación de las técnicas FISH e Inmunohistoquímica para evaluar la presencia y cuantificación de *H. pylori* y la proteína CagA en muestras de biopelículas y/o tapetes microbianos. Para ello, se emplearon sondas y anticuerpos marcados con fluoróforos de elevada sensibilidad y especificidad que permiten la visualización de las células blanco, a través de un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros en rangos de excitación de 320 a 580 nm y disponible en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Adicionalmente, se considera como otro alcance del estudio determinar mediante pruebas estadísticas si existen diferencias en las estimaciones de *H. pylori* y/o su factor de virulencia CagA en relación al origen de las biopelículas o los sitios de muestreo. Este análisis permitió evaluar si la presencia de la bacteria en biopelículas

encontradas en las redes de distribución de agua de consumo de Mucuchíes representa un riesgo para la salud de esta población.

Limitaciones de la Investigación

Entre las limitaciones relacionadas al muestreo se encuentran el tamaño de la muestra o número de muestras de biopelículas y/o tapetes microbianos recolectados en las áreas más externas o superficiales de las tuberías y tanques de aguas de los sitios disponibles para el muestreo. Por ello se considera que estas muestras no representan toda la biopelícula acumulada en las redes de distribución de agua de consumo de la población de Mucuchíes. Otra limitación del estudio es el posible desprendimiento de la biopelícula bacteriana antes de su recolección por procedimientos de lavado o desinfección de los tanques realizados por personal de los organismos competentes.

En relación a la parte experimental, en el laboratorio no se disponía de suficiente cantidad de sonda para la detección de Eubacterias en los ensayos de FISH, utilizada como control del conteo de bacterias generales encontradas en las biopelículas. Para estos fines se empleó la tinción 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, se encontró como limitación en los ensayos de FISH e Inmunohistoquímica la autofluorescencia emitida por cianobacterias a la misma longitud de onda empleada para la sonda de *H. pylori* (510-560 nm) y el anticuerpo secundario unido al fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC; longitud de emisión 450-490 nm) en los ensayos de Inmunohistoquímica.

En relación al análisis estadístico, no se encontró uniformidad en los tipos de biopelículas recolectadas en los distintos sitios de muestreo, es decir, no fue posible comparar estadísticamente biopelículas procedentes de tanques de aguas, tuberías y tapetes microbianos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Estudios anteriores en la población de Mucuchíes del estado Mérida, determinaron en su población elevadas tasas de infección por *H. pylori*. En Mérida, Bracho *et al.*, (1995) y De Sousa *et al.*, (2004) describen para Mucuchíes una prevalencia de 77% y 73,5%, respectivamente, mientras que Rojas *et al.* (2008) y De Faría *et al.* (2012) describen una prevalencia de 68 a 75%, con una tasa más alta en los pacientes jóvenes quienes adquieren la infección antes de los 10 años.

Nieto (2014) determinó la presencia de *H. pylori* en muestras de agua de los tanques y grifos de la comunidad, así como también en muestras de heces de los voluntarios de las comunidades de Renacer y Santa Eduvigis en la población de Mucuchíes mediante el test de antígenos fecales para *H. pylori*, demostrando una asociación entre la elevada prevalencia de *H. pylori* en esta población y las fuentes de agua potable.

Un estudio posterior determinó una prevalencia de infección del 74,65% en individuos de la comunidad de Santa Eduvigis y Renacer en Mucuchíes mediante la detección cuantitativa de antígenos fecales de *H. pylori*. Además, mediante técnicas de FISH e Inmunohistoquímica se detectaron elevadas concentraciones de

H. pylori ($9,97 \times 10^6$ - $4,73 \times 10^7$ cel/mL) y su factor de virulencia CagA ($5,33 \times 10^6$ - $3,03 \times 10^7$ cel/mL) en la mayoría de las muestras de agua potable y riego de Mucuchíes. Se concluyó que estas fuentes de agua eran inadecuadas para su consumo como agua potable o uso en riego de hortalizas (Rojas, 2016).

Cuervo *et al.* (2017) realizaron un estudio que se basó en la detección de *H. pylori* en muestras de aguas y biopelículas de los grifos de instituciones oficiales en la ciudad de Medellín, Colombia, a través del cultivo en agar HPSP y la reacción de la cadena polimerasa (PCR). Sus resultados evidenciaron la presencia de la bacteria en el acueducto y en las biopelículas de los grifos, demostrando el riesgo de adquirir la infección que presenta esta población y cómo esta bacteria puede sobrevivir a los métodos de desinfección.

www.bdigital.ula.ve

Bases Teóricas

H. pylori

H. pylori es una bacteria descubierta por Marshall y Warren en 1983. Inicialmente se nombró como *Campylobacter* like organism (Organismo parecido a *Campylobacter*) y posteriormente renombrado *H. pylori* (Warren & Marshall 1983). Es capaz de colonizar el epitelio gástrico humano donde se estima que ha infectado al 60% de la población mundial, principalmente África (79,1%), América Latina (63,4%) y Asia (54,7%), mientras que los menos afectados son Norte América (37,1%) y Oceanía (24,1%) (Hooi *et al.*, 2017). Esta bacteria al colonizar la mucosa gastrointestinal produce una gastritis crónica, donde el 20% de los infectados

presentarán úlceras péptidas (15-17%), linfoma de MALT gástrico (1/100.000) y cáncer gástrico (CG) (1-3%), siendo responsable del 90% de los casos reportados de cáncer gástrico (Otero, 2017).

La infección por *H. pylori* se adquiere generalmente durante la infancia en niños menores de 10 años, aumentado su prevalencia en grupos familiares grandes con alto hacinamiento y bajos niveles socioeconómicos y educacionales (Parsonnet, 1995; Malaty *et al.*, 2002; De Faria *et al.*, 2010).

Características morfológicas

Es una bacteria Gram negativa, de morfología helicoidal, con cuatro a seis flagelos que la dotan de movilidad, microaerofílica, con un crecimiento óptimo de 2-5% de oxígeno, productora de catalasa, ureasa y oxidasa (Cuervo & Gaviria 2017). El bacilo es de crecimiento lento, muy móvil, midiendo de 2,5 a 4 µm de largo y 0,5 a 1,0 µm de diámetro. Sin embargo, al estar expuesto a un estrés ambiental la bacteria adopta una forma cocoide pasando a un estado VNC. Sobrevive brevemente a pH menores de 4, con un rango de crecimiento de pH de 5,5 a 8 y óptimo crecimiento a pH neutro. En cuanto al rango de temperatura de crecimiento es de 34-40 °C, con un óptimo crecimiento a 37 °C. A temperaturas inferiores de 30 °C se ha encontrado que la bacteria puede sobrevivir en alimentos como hortalizas frescas, carnes y algunos productos lácteos, así como también en agua y leche (Camargo & Boschian, 2012).

Principales Factores de Virulencia de *H. pylori*

Isla de Patogenicidad PAI-*cag*

Es un segmento de 40 kb con un contenido de G+C del 35%. La isla tiene 27 marcos de lecturas abiertos, entre los cuales se encuentra el gen *cagA*. Estos genes no se expresan constitutivamente. Su expresión dependerá de las condiciones ambientales a las que se exponga la bacteria. La PAI-*cag* codifica la secreción de proteínas tipo IV que inyectan la proteína CagA y peptidoglicanos a las células epiteliales del hospedador. La traslocación de esta proteína dependerá de la presencia de un canal de urea protón dependiente (Urel). Ante un descenso del pH, CagA se mueve del centro a la porción periférica del citoplasma para ser inyectada, donde interactuará con las moléculas de la célula hospedadora (Cervantes, 2016).

Proteína Antigénica CagA

Es una proteína de 120 a 140 kD codificada en la PAI-*cag*, constituida por 31 genes que incluyen el *cagA*. Este gen puede estar o no presente en las células de *H. pylori*. El sistema de secreción tipo IV transloca la proteína CagA al interior de la célula epitelial, donde una vez dentro del citoplasma interrumpe las vías de señalización dependiente e independiente de fosforilación y conducen a una proliferación y motilidad anormal en la célula, así como cambios en el citoesqueleto, lo que provoca una reacción inmunológica celular e inflamación asociada a carcinoma gástrico (Hatakeyama, 2005; Arevalo, 2009; Cervantes, 2016). Las células CagA positivas al ser más virulentas se encuentran asociadas a casos de ulceración duodenal, gastritis atrófica y carcinoma (Traverso & Hernández, 2000). CagA

fosforilada también interacciona e inhibe el complejo de serina/treonina quinasas PAR1/MARK (*partitioning-defective/microtubule affinity-regulating kinase*). El papel de estas proteínas es esencial en el ciclo celular, encargándose de la dinámica del citoesqueleto, concretamente de la estabilidad de los microtúbulos; esta interacción produce cambios en el reordenamiento y origina el peculiar “fenotipo colibrí” (Palframan *et al.*, 2012).

Ureasa

La ureasa es la enzima más abundante producida por *H. pylori* tiene un peso de 480 kDa y se compone de dos subunidades, UreA y UreB; su actividad depende del pH circundante de la bacteria. El hábitat de *H. pylori* se encuentra por debajo de la mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad (Cervantes, 2016). La ureasa se activa durante la colonización para protegerse del pH ácido del estómago (pH<4). Este último es considerado una “barrera ácida” y un ambiente bactericida capaz de eliminar gran cantidad de bacterias provenientes de la ingesta de agua y alimentos. Gracias a la ureasa la bacteria es capaz de hidrolizar la urea para producir amonio y carbamato que se transformará en otra molécula de amonio y ácido carbónico (Traverso & Hernández, 2000).

Citotoxina Vacuolizante VacA

El gen que codifica para esta citotoxina se encuentra presente en todas las células de *H. pylori*; sin embargo, sólo del 50 al 60% de las bacterias expresan el gen para la síntesis de la proteína VacA. Esta toxina tiene un peso molecular de 87 kDa, induce la vacuolización, así como múltiples actividades celulares, donde destacan la formación

de canales en la membrana, liberación del citocromo C de la mitocondria, el cual produce apoptosis, además se une a los receptores en la membrana de las células del hospedador iniciando una respuesta proinflamatoria (Cervantes, 2016). VacA se considera una toxina multifuncional, debido a la variedad de efectos que provoca en la célula hospedadora: se internaliza en la célula y forma vacuolas con características de endosomas y lisosomas; puede unirse a mitocondrias, translocarse a través de la membrana externa y formar un canal que la atraviesa dando lugar a una cascada de señales que finalizará con la apoptosis de la célula. También es capaz de inducir señales proinflamatorias a nivel nuclear y activar la proliferación de células T (Palframan *et al.*, 2012). En la Figura 1 se presenta una imagen que ilustra los principales factores de virulencia de *H. pylori*.

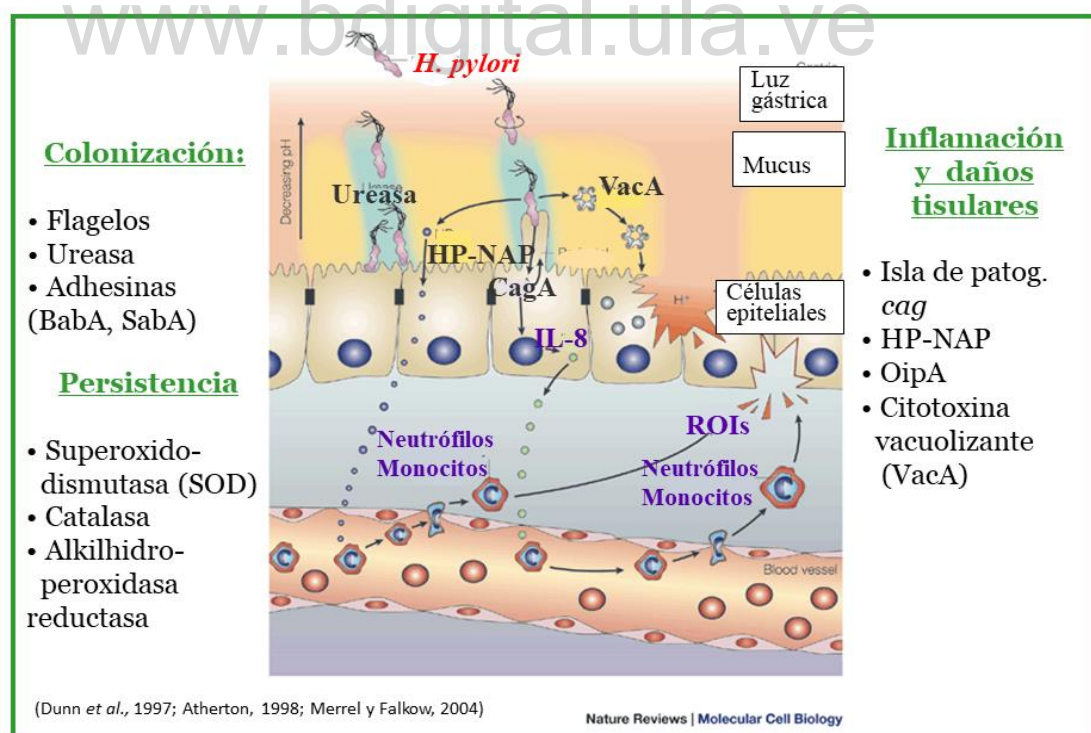


Figura 1. Principales factores de virulencia de *H. pylori* (Merrell *et al.*, 2004).

Biopelículas

Las biopelículas están compuestas principalmente de células microbianas y un polímero de sustancia extracelular. Esta sustancia puede representar desde el 50% al 90% del carbono total en la biopelícula (Flemming *et al.*, 2000) y es el componente principal en la matriz de la biopelícula. Puede variar su composición, pero se compone principalmente de polisacáridos. Algunos de estos polisacáridos son neutros o polianiónicos, como es el caso del EPS de bacterias Gram negativas. La presencia de ácidos urónicos (como D-glucurónico, D-galacturónico y manurónico) o piruvatos le confieren la propiedad aniónica. Esta propiedad es importante porque permite la asociación de cationes de divalente, como el calcio y el magnesio que se entrecruzan con las cadenas de polímeros y proporcionan una mayor fuerza de unión a la biopelícula desarrollada. El EPS se encuentra también muy hidratado porque puede incorporar grandes cantidades de agua en su estructura por los enlaces de hidrógeno (Sutherland, 2001). El EPS puede asociarse con iones metálicos, cationes divalentes y otras macromoléculas (como proteínas, ADN, lípidos e incluso sustancias húmicas) (Flemming *et al.*, 2000).

Se sabe que la producción de EPS se ve afectada por el estado de los nutrientes del medio de crecimiento; el exceso de carbono disponible y la limitación de nitrógeno, potasio o fosfato promueven la síntesis de EPS. El crecimiento bacteriano lento también mejorará la producción de EPS (Sutherland, 2001). Como el EPS está altamente hidratado, evita la desecación en algunas biopelículas naturales. El EPS también puede contribuir a las propiedades de resistencia a los antimicrobianos

impidiendo el transporte masivo de antibióticos a través de la biopelícula, probablemente uniéndose directamente a estos agentes (Donlan, 2000).

La formación de biopelículas bacterianas puede producirse por al menos tres mecanismos. Uno de ellos es la redistribución de celular, la cual ocurre por la motilidad de las células sobre la superficie a la que se encuentran adheridas. Un segundo mecanismo es la división binaria de células unidas a la superficie. Las células hijas se extienden hacia fuera y hacia arriba desde la superficie de unión para formar grupos de células. Un tercer mecanismo de formación es el reclutamiento de células planctónicas para la biopelícula en desarrollo. La contribución relativa de cada uno de estos mecanismos dependerá de la especie bacteriana, la naturaleza de la superficie que se está colonizando y las condiciones fisicoquímicas del medio ambiente (Stoodley *et al.*, 2002). La formación de biopelículas en bacterias Gram negativas tal como *H. pylori* procede a través de distintas etapas de desarrollo:

Etapas 1: Planctónica. Un número de células planctónicas (de libre flotación) involucradas en el inicio de la formación de biopelículas están rodeadas por pequeñas cantidades de EPS. Otras células son capaces de moverse independientemente a través de pili y movimientos tipo *twitching* o deslizamiento desde el medio líquido hacia la superficie (Stoodley *et al.*, 2002).

Etapas 2: Adhesión. La adhesión celular inicialmente puede ocurrir de forma reversible. Estas células adherentes todavía no están "comprometidas" con el proceso de diferenciación que conduce a la formación de biopelículas y muchas pueden dejar la superficie para reanudar el estilo de vida planctónico. Durante esta etapa, las

bacterias exhiben varios comportamientos específicos que incluyen la formación de láminas, hileras y agregados por empaquetamiento (Stoodley *et al.*, 2002).

Etapas 3: Formación de microcolonias. La formación de agregados celulares se conoce como la formación de microcolonias embebidas en EPS y puede ocurrir por translocación de células activas de la superficie o por división binaria de células adheridas. En esta etapa muchas células alteran sus procesos fisiológicos (por ejemplo, modificación del metabolismo aeróbico a anaeróbico) en respuesta a las condiciones de sus nichos específicos (Stoodley *et al.*, 2002).

Etapas 4 y 5: Macrocolonias, maduración y desprendimiento. La siguiente fase de desarrollo de la biopelícula consiste en el aumento de tamaño de las microcolonias a macrocolonias producto de la división binaria y su posterior maduración que resulta en la generación de arquitectura compleja, canales para el paso de agua y nutrientes, poros y una redistribución de las bacterias fuera del sustrato. Se ha postulado que el agotamiento de nutrientes puede conducir al desprendimiento celular de la biopelícula que permite a las bacterias buscar hábitats más ricos en nutrientes. Las microcolonias individuales pueden desprenderse de la superficie o dar lugar a revertientes planctónicos que nadan o flotan lejos de estas estructuras, dejando espacios vacíos en la superficie que pasan a formar parte de los canales. Además, microcolonias y macrocolonias enteras pueden naturalmente desprenderse de la biopelícula sin ninguna perturbación evidente para el sistema (Stoodley *et al.*, 2002; Figura 2).

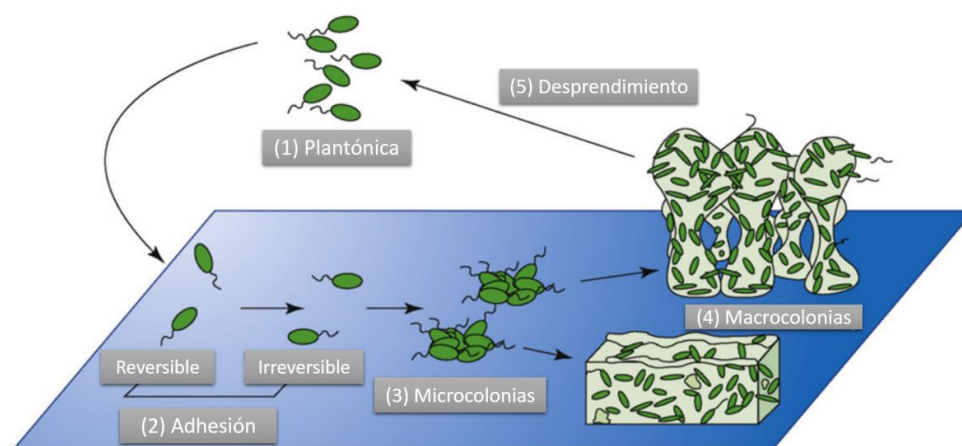


Figura 2. Etapas de formación de biopelículas en bacterias Gram negativas: (1) planctónica, (2) adhesión, (3) formación de microcolonias, (4) macrocolonias y maduración, y (5) desprendimiento (Modificado de Monds & O'Toole, 2009).

Se ha demostrado que varios patógenos bacterianos pueden asociarse a superficies y crecer en biopelículas. Estos incluyen: *Legionella pneumophila* (Murga *et al.*, 2001), *Staphylococcus aureus* (Raad *et al.*, 1992), *Listeria monocytogenes* (Wirtanen *et al.*, 1996), *Campylobacter* spp. (Buswell *et al.*, 1998), *Escherichia coli* O157:H7 (Camper *et al.*, 1998), *Salmonella* Typhimurium (Hood *et al.*, 1997), *Vibrio cholerae* (Watnick *et al.*, 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Lebeaux *et al.*, 2013), *Proteus mirabilis* (Fernández-Delgado *et al.*, 2014), *H. pylori* (Stark *et al.*, 1999), entre otros.

Aunque todos estos microorganismos tienen la capacidad de adherirse a superficies y biopelículas, la mayoría, si no todos, parecen incapaces de un crecimiento extenso en la biopelícula. Esto puede ser debido a sus elevados requerimientos de crecimiento o debido a su incapacidad para competir con organismos autóctonos de las biopelículas (Murga *et al.*, 2001). La supervivencia y el crecimiento de microorganismos patógenos dentro de las biopelículas también puede

favorecerse mediante la asociación o interacción con estos organismos autóctonos y el aprovechamiento de su metabolismo (Camper *et al.*, 1998).

Aun en ausencia de cloro, el crecimiento bacteriano es despreciable en el agua de los sistemas de distribución, y sólo las bacterias presentes en las biopelículas adheridas a las paredes de las tuberías crecen y se reproducen, por lo que el agua no es un reservorio como tal, sino las biopelículas que pueden crecer en los sistemas por donde fluye el agua (Mackay *et al.*, 1999).

En el caso de *H. pylori* se ha demostrado que no hay diferencias estadísticamente significativas en el número total de células adheridas a diferentes sustratos de tuberías usados para determinar el crecimiento *in vitro* de este patógeno; sin embargo, se ha demostrado que la naturaleza del material afecta la morfología bacteriana; el cobre particularmente permite que la bacteria mantenga su morfología en espiral, asociada a una forma más activa e infecciosa de la bacteria; mientras que con otros sustratos, como el acero inoxidable, PVC, polipropileno y vidrio, las bacterias adquieren una forma cocoide, asociada a un estado de latencia para la supervivencia a condiciones ambientales adversas (Azevedo *et al.*, 2006). Otro estudio evidenció un mejor crecimiento en las tuberías de cobre que en el resto de los materiales debido a que *H. pylori* posee un sistema de transporte de cobre, haciendo que la bacteria tenga una mayor tolerancia a este metal (Ge *et al.*, 1995).

Tapetes microbianos

Los tapetes microbianos han sido descritos como comunidades bentónicas estratificadas que se desarrollan en la interfase entre el agua y sustratos sólidos. Estos

tapetes dependen de una superficie en la cual establecerse, ya que se constituyen de múltiples microorganismos mediante uniones complejas entre sí. Además, a estas uniones se incorporan partículas salinas y sedimentos clásticos. La granulometría de los sedimentos es importante, dado que de ésta depende el drenaje, incluyendo la capacidad de retención de agua y la aireación (Demergasso *et al.*, 2003). Se caracterizan por tener diferentes tamaños, estar compuestos por varios sustratos y presentan variabilidad en el pH, temperatura y/o salinidad (Chacon-Baca *et al.*, 2015)

Operacionalización de las variables

La presente investigación tiene como propósito la detección de *H. pylori* y su proteína antigénica CagA en biopelículas y/o tapetes microbianos presentes en redes de distribución de agua de consumo de la población de Mucuchíes. Por ello se consideraron dos variables, detalladas a continuación en la Tabla 1

Tabla 1. Operacionalización de variables.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión	Indicador
<i>H. pylori</i>	Es una bacteria Gram negativa que se puede encontrar en biopelículas	Identificación de la bacteria <i>H. pylori</i> a través de una sonda fluorescente	Presencia de la bacteria	Células con fluorescencia roja
	formadas en ambientes acuáticos y es capaz de colonizar el epitelio gástrico		Ausencia de la bacteria	No se observan células con fluorescencia roja
Factor de virulencia CagA	Es una proteína producida por la PAI- <i>cag</i> de <i>H. pylori</i> . Es un factor asociado con el riesgo de cáncer gástrico en el hospedador	Identificación de la proteína CagA mediante un anticuerpo fluorescente	Presencia de la proteína CagA	Células con fluorescencia verde
			Ausencia de CagA	No se observan células con fluorescencia verde

Hipótesis

“Es posible que la bacteria *H. pylori* junto con su factor de virulencia CagA esté presente en biopelículas formadas en las redes de distribución de agua de Mucuchíes y estas células bacterianas se liberen periódicamente en el agua de la tubería aumentando el riesgo de infección a través del consumo de agua potable y hortalizas contaminadas con agua de riego”.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

Este trabajo corresponde a una investigación analítica, que consta en descomponer una totalidad en sus partes y cuyo fin es comprender la naturaleza del evento estudiando sus elementos y las relaciones de estos. En esta investigación se analizaron muestras de biopelículas y tapetes microbianos recolectados en redes de distribución de agua de Mucuchíes, inicialmente preservadas con paraformaldehído y posteriormente sometidas a procesos de deshidratación, incubación a diferentes temperaturas con tampones de hibridación preparados con distintas concentraciones de sales y formamida para la permeabilización de las membranas celulares, penetración y unión de la sonda específica al ADN bacteriano o unión a la proteína CagA mediante anticuerpos específicos. Todo esto con la finalidad de evaluar la presencia de *H. pylori* y su factor de virulencia CagA.

Diseño de la investigación

Este fue un trabajo que tuvo un diseño experimental para la detección de *H. pylori* por FISH y la proteína CagA mediante Inmunohistoquímica en muestras de biopelículas y tapetes microbianos recolectados previamente en el año 2015 en las

redes de distribución de agua de Mucuchíes. Este estudio fue transeccional y transversal ya que se analizaron muestras recolectadas una sola vez y en un determinado momento (Julio 2015). Además, multivariable ya que se analizaron dos variables.

Población y Muestra

Área de Estudio

Mucuchíes es la capital del municipio Rangel; está ubicada a 48 Km de la ciudad de Mérida, a una altura de 2.983 m.s.n.m. Se ubica entre las coordenadas 8° 51' y 8° 48' de latitud Norte y 70° 54' y 70° 58' de longitud Oeste. Su temperatura varía de 3 a 11°C y su precipitación promedio es de 600 mm. Los recursos hídricos tienen como principal curso el agua del río Chama, al que drenan las quebradas Misintá, La Carbonera, La Musuy, La Toma, El Vergel, El Royal y Mocado (Infantes, 2008).

Unidad de Investigación

La unidad de investigación estuvo representada por las muestras de biopelículas y tapetes bacterianos tomados de las redes de distribución de agua potable de la población de Mucuchíes, estado Mérida. Se seleccionaron un total de cuatro sitios: tanques la Hoyada, Renacer, los Chorros y los Aposentos, donde se recolectaron por duplicado cada muestra de hisopado y adicionalmente se tomaron 2 muestras de tapetes microbianos, para un total de 10 muestras. (Tabla 2).

Tabla 2. Sitios y tipos de muestras de biopelículas recolectadas en Mucuchíes

Sitios	Tipo de muestra
La Hoyada	Hisopados de biopelículas
Renacer	Hisopados de biopelículas y tapete microbiano
Los Chorros	Hisopados de biopelículas y tapete microbiano
Los Aposentos	Hisopados de biopelículas

Selección del tamaño de la muestra

Debido a la disponibilidad de los recursos y tiempo se consideraron solo cuatro sitios diferentes de muestreo, en los cuales se tomaron ocho muestras de hisopado a las biopelículas en las paredes de los tanques y dos muestras de tapetes microbianos. Estas muestras fueron procesadas y analizadas en un periodo de cuatro meses.

Sistema de Variables

Las variables que guardan relación con el propósito de esta investigación fueron:

Variable Dependiente (VD): Factor de virulencia CagA.

Variable Independiente (VI): Presencia de *H. pylori*.

Procedimientos de la Investigación

Recolección y Transporte de la Muestra

En julio del 2015, personal de investigación del IVIC y la Universidad Simón Bolívar recolectaron con hisopos estériles muestras de biopelículas formadas en las paredes de los tanques de aguas de consumo de la población de Mucuchíes. Así mismo, se recolectaron muestras de tapetes microbianos encontrados en quebradas y estos sistemas de distribución de aguas de la localidad (Tabla 3). Los hisopados y muestras de tapetes microbianos fueron colocados en tubos cónicos estériles y transportados en cava refrigerada en un período menor a 4 h hasta el lugar de procesamiento de muestras en la Casa de Oficios de Mucuchíes. Allí en condiciones de esterilidad, se fijaron las muestras por un período menor a 4 h con paraformaldehído al 4% en tampón salino fosfato (PBS, por sus siglas en inglés; 0.32 M, pH 7,2) y posterior dilución al 1% para su conservación a 4°C hasta su procesamiento para los ensayos de FISH e Inmunohistoquímica.

Tabla 3. Sitios de recolección de muestras de biopelículas y tapetes microbianos estudiados en Mucuchíes en Julio del 2015.

Sitios		Coordenadas geográficas	Altura (m.s.n.m)	Descripción	Tipo de muestra
Tanque La Hoyada		08°45'02,7''N ; 70°55'28,5''O	3011	Abastece de agua potable al casco central de Mucuchíes	Hisopado de biopelículas
Tanque Renacer		08°45,187'N; 70°55,080'O	3043	Abastece de agua potable al sector Renacer	Hisopado de biopelículas y tapetes microbianos
Tanque Los Chorros		8°46'13,4''N; 70°56'29,7''O	3500	Esta quebrada llega a un tanque principal donde se origina la tubería de agua para consumo de la población de Mucuchíes	Hisopado de biopelículas y tapetes microbianos
Tanque Los Aposentos		08°45'11,9''N ; 70°55'52,9''O	3011	Almacena aguas de riego para cultivos de este sector	Hisopado de biopelículas

Procesamiento de la Muestra

Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH)

Los análisis de FISH descritos a continuación se realizaron siguiendo los protocolos reportados por Trebesius *et al.* (2000), Contreras *et al.* (2012), Fernández-Delgado *et al.* (2016) y Rojas (2016).

Clasificación de las muestras

Las muestras conservadas en los tubos cónicos con paraformaldehído al 1% presentaban una diferencia considerable en la concentración de la biopelícula, por lo que se necesitó tratarlas de forma diferente de acuerdo a su naturaleza como hisopados de biopelículas o tapetes microbianos.

Concentración de las muestras

Las muestras de hisopados de biopelículas fueron separadas en dos tubos cónicos. Los hisopos fueron retirados a otros tubos cónicos con PBS y el resto permaneció en el tubo original, esto con la finalidad de obtener un mayor número de células en las suspensiones. Los tapetes microbianos no requirieron procedimientos para incrementar la concentración.

Preparación de las muestras de biopelículas y tapetes microbianos

Las muestras de biopelículas y tapetes microbianos conservadas en paraformaldehído al 1% fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min para posteriormente, descartar el sobrenadante de las muestras; el sedimento se resuspendió en PBS y se sonicó a 50 Hz por 5 min con la finalidad de desprender las

células adheridas a los hisopos. Se tomaron alícuotas de las muestras y se centrifugaron a 14.000 rpm por 15 min. Seguidamente se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado al sedimento con 500 µL de PBS, llevándose de nuevo a centrifugar a 14.000 rpm por 15 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió y diluyó convenientemente en PBS y etanol absoluto según el protocolo Samarbaf-Zadeh *et al.* (2006).

Fijación de las muestras

Se colocaron 20 µL de las muestras en los tres pozos de cada fila de las láminas, usando una fila por muestra. Las láminas se dejaron secar tapadas a temperatura ambiente. Una vez secas, bajo una campana de extracción se le aplicó a cada pozo 40 µL de borohidruro de sodio al 0,1% en PBS filtrado por membranas de 0,22 µm de tamaño de poro, incubándose por 20 min a temperatura ambiente. Este paso se realizó con el fin de eliminar el fondo amarillo al momento de observar las muestras en el microscopio de fluorescencia, producto del tiempo prolongado de conservación en paraformaldehído. Se retiró el sobrante, se realizó un lavado rápido con PBS y se dejaron secar las láminas tapadas a temperatura ambiente. Una vez secas se llevaron a congelar hasta el ensayo de hibridación.

Hibridación de las muestras

Las suspensiones de biopelículas fijadas en las láminas se deshidrataron con etanol al 50% por 3 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se dejaron secar tapadas a temperatura ambiente.

Una vez secas las láminas bajo campana de extracción y en oscuridad se agregó en el primer pozo de cada fila 23 μ L del tampón de hibridación (0,9 M NaCl; 0,02 M Tris/HCl, pH 8,0; 0,01% SDS; agua destilada 5,75 mL), 12 μ l de formamida al 30% y 5 μ L de la sonda específica de *H. pylori* (Hpy-1) con una concentración de 5 ng/ μ L (conservada en hielo durante el ensayo), marcada con el fluoróforo Cy3-5' (fluorescencia roja).

El tercer pozo de cada fila de las láminas se utilizó para el control negativo. Se agregó 23 μ L de tampón de hibridación y 12 μ L de formamida (pozo control de la autofluorescencia que contiene todas las soluciones del ensayo de FISH a excepción de la sonda).

Las láminas se colocaron en cámara húmeda en una estufa a 54 °C durante 2 h y 20 min. Posteriormente cada pozo se lavó dos veces con el tampón de lavado (112 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 8.0 y 0.01 SDS) y se dejó incubando con 40 μ L en cada pozo del tercer lavado a 56 °C durante 45 min en cámara húmeda. Finalmente, las muestras hibridadas se lavaron con PBS y se secaron a temperatura ambiente para luego conservarlas en oscuridad a -20°C hasta los ensayos posteriores de Inmunohistoquímica.

Tabla 4. Cantidad de reactivos requeridos en los ensayos de FISH y agregados a cada pozo de las láminas para la detección de *H. pylori*.

Reactivo	Primer Pozo	Segundo Pozo	Tercer Pozo
Tampón de hibridación	23 µL	-	23 µL
Formamida al 30%	12 µL	-	12 µL
Sonda <i>H. pylori</i> (Hpy-1) Cy3-5'	5 µL	-	-

Cuantificación de la proteína CagA de *H. pylori* por Inmunohistoquímica.

Posterior a la realización del FISH, en condiciones de oscuridad se procedió a lavar las láminas con PBS durante 3 min. Se retiró el exceso y las láminas se colocaron en cámara húmeda incubando con 40 µL de la solución de bloqueo (PBS-T 0,1% con 3% de albúmina bovina sérica - BSA) en cada pozo durante 15 min a temperatura ambiente. Esto permite que se reduzcan las uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Una vez finalizada la incubación, se agregó en el primer pozo de cada fila 10 µL del anticuerpo primario IgG anti-CagA de *H. pylori* de ratón (ab7351 Abcam Inc) diluido 1:1000, incubándose las láminas en cámara húmeda durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados rápidos a las láminas con PBS frío. Finalmente, en el primero y último pozo de cada fila de las láminas se agregaron 10 µL del anticuerpo secundario IgG anti-conejo asociado con FITC (ab6717 Abcam Inc.) diluido 1:1000 en PBS, incubándose durante 45 min en cámara

húmeda y a temperatura ambiente. Las láminas fueron lavadas tres veces con PBS. Se colocaron 10 µL del medio de montaje Immunomount (Thermo Inc.) previamente preparado con la tinción DAPI a 0,5 µg/mL para la estimación del total de células presentes en las muestras. El DAPI se une a regiones enriquecidas en adenina y timina de las secuencias de ADN (Porter & Feig, 1980).

El último pozo de cada fila de las láminas se usó como control negativo. Este pozo contuvo todos los reactivos del ensayo menos el anticuerpo primario.

Tabla 5. Cantidad de reactivos agregados a cada fila de las láminas para la cuantificación de la proteína CagA de la isla de patogenicidad de *H. pylori*.

Reactivo	Primer Pozo	Segundo Pozo	Tercer Pozo
Solución de bloqueo	40 µL	-	40 µL
Anticuerpo primario IgG anti-CagA de ratón	10 µL	-	-
Anticuerpo secundario IgG anti-conejo	10 µL	-	10 µL
Immunomount (Thermo Inc.) – DAPI	10 µL	10 µL	10 µL

Finalmente, las láminas se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon, modelo eclipse E 600 TE2000-U, equipado con los siguientes filtros: G2A para Cy3 (filtro de excitación: 510-560 nm), B2A para Alexa Fluor 488 N o FITC (filtro de excitación: 450-490 nm) y filtro triple (filtro de excitación: 320- 580). Las

imágenes fueron fotografiadas con una cámara digital Canon Rebel 3Ti y analizadas utilizando el software ImageJ (versión 1.48v).

Diseño de Análisis

Esta investigación tuvo un enfoque cuantitativo y cualitativo ya que se recolectaron datos para evaluar la relación de *H. pylori* con la presencia o no de su proteína antigénica CagA en biopelículas presentes en redes de distribución de agua potable de la población de Mucuchíes. Estos datos se cuantificaron mediante la medición del número de células positivas a *H. pylori* o CagA por campos observados en el microscopio de fluorescencia y mediante el porcentaje de área de *H. pylori* ocupada por campo utilizando el software ImageJ. Los resultados fueron evaluados estadísticamente por las pruebas Kruskal Wallis y Bonferroni para determinar posibles diferencias en la prevalencia de *H. pylori* y su proteína CagA entre los sitios de muestreo, considerando valores de $p < 0,05$. Todo el análisis estadístico se realizó con el software PAST (v. 2.17c).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

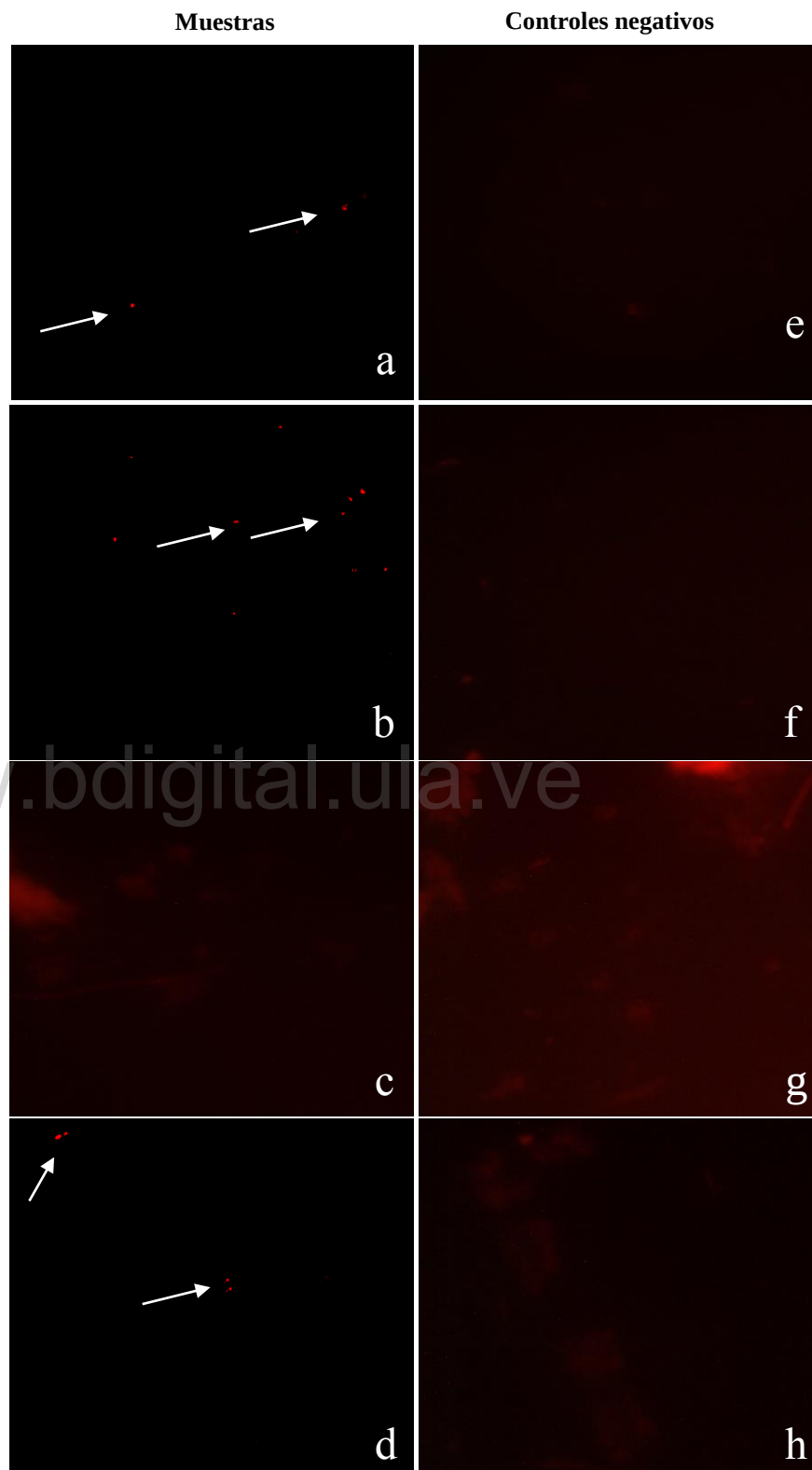
Resultados

Detección de *H. pylori* por Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH)

En la Figura 3 se presentan microfotografías de muestras de biopelículas analizadas por FISH como se detalla a continuación: en la columna izquierda se muestran imágenes de biopelículas tratadas con la sonda Hpy-1 específica para *H. pylori* que demuestran la presencia de células cocoides con fluorescencia roja positiva a la bacteria en los tanques de la Hoyada (A), Renacer (B) y Los Aposentos (D); en el tanque los Chorros (C) no se observaron células indicativas de *H. pylori*. En la columna derecha de esta misma figura, se presentan imágenes de estas muestras tratadas con todos los reactivos del FISH sin la adición de la sonda Hpy-1 como control negativo. No se observaron células fluorescentes a *H. pylori*, descartando falsos positivos en el ensayo.

Figura 3. Detección de *H. pylori* por FISH en biopelículas presentes en tanques de distribución de aguas de Mucuchíes.

Se observan células con fluorescencia positiva a la sonda Hpy-1 (roja) de *H. pylori* en las muestras de los tanques de La Hoyada (a), Renacer (b) y Los Aposentos (d). En Los Chorros (c) no se observaron células indicativas de la bacteria. Las imágenes e, f, g y h son representativas para los controles negativos para la sonda Hpy-1 en los Tanques de la Hoyada, Renacer, Los Chorros y Los Aposentos respectivamente.



Para cada una de las réplicas de muestras de biopelículas se calculó un promedio por campo observado al microscopio de células positivas a *H. pylori*, presentado en la Tabla 6 y un promedio total de células positivas de *H. pylori* en los diferentes sitios de muestreo en la Figura 4.

Tabla 6. Promedio de células positivas a *H. pylori* estimado por duplicado en muestras de biopelículas y en cinco campos evaluados al microscopio de fluorescencia.

	Tanque	Tanque	Tanque	Tanque
Campo	La Hoyada	Renacer	Los Chorros	Los Aposentos
	(cel/campo)	(cel/campo)	(cel/campo)	(cel/campo)
1	1,0	3,5	0,0	2,0
2	3,0	3,0	0,0	2,0
3	3,5	4,0	0,0	0,0
4	1,5	3,0	0,0	0,0
5	1,0	3,0	0,0	0,0

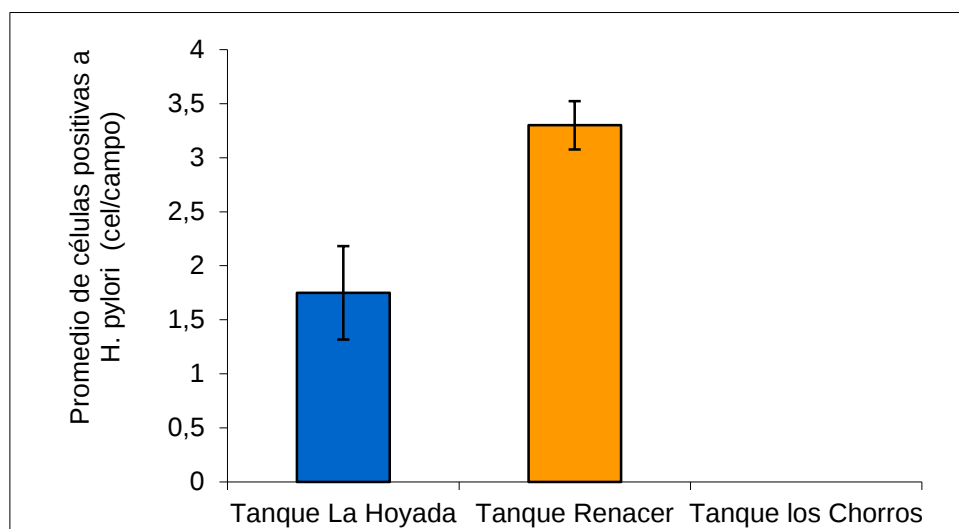


Figura 3. Promedio células positivas a *H. pylori* en los sitios de muestreo en los tanques de Mucuchíes.

De cada uno de los sitios de muestreo se realizó un promedio del área ocupada por biopelículas de *H. pylori* en los campos observados al microscopio de fluorescencia a través del programa ImageJ, cuyos resultados se muestran en la Tabla 7 y un promedio de *H. pylori* en la Figura 5.

Tabla 7. Porcentaje de área de *H. pylori* en biopelículas de los tanques de Mucuchíes.

Campo	Tanque	Tanque	Tanque
	La Hoyada (%)	Renacer (%)	Los Chorros (%)
1	0,0060	0,0235	0,0000
2	0,0110	0,0175	0,0000
3	0,0110	0,0235	0,0000
4	0,0090	0,0415	0,0000
5	0,0000	0,0140	0,0000

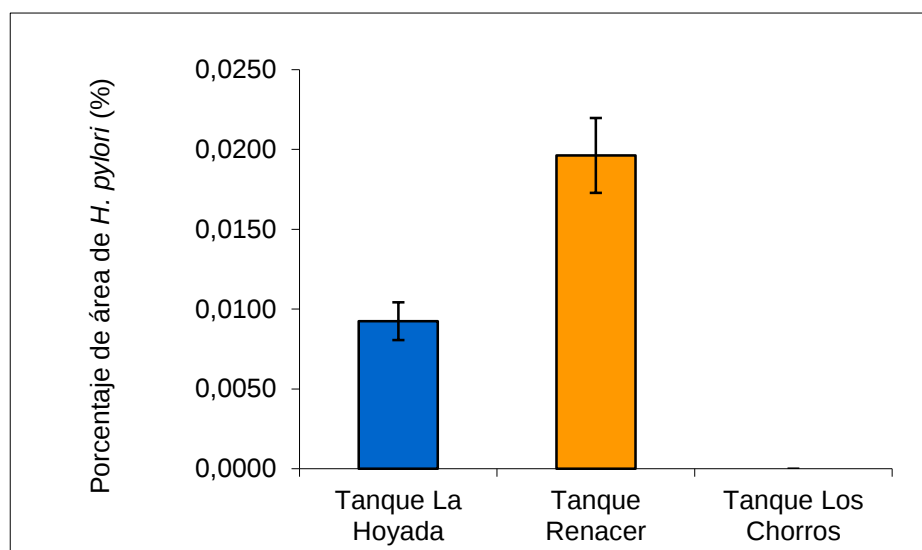


Figura 4. Porcentaje promedio de área de *H. pylori* en los sitios de muestreo en los tanques de Mucuchíes

Se realizó además para cada sitio de muestreo un promedio de área de las bacterias totales encontradas en las biopelículas por medio de la tinción DAPI, presentado en la Tabla 8 un promedio de área de bacterias en las muestras analizadas y en la Figura 6 un promedio de bacterias en los diferentes sitios de muestreo.

Tabla 8. Porcentaje de área de bacterias totales en biopelículas de los tanques de Mucuchíes.

Campo	Tanque	Tanque	Tanque
	La Hoyada (%)	Renacer (%)	Los Chorros (%)
1	2,85	1,15	0,00
2	1,40	0,25	0,00
3	4,80	1,35	0,00
4	3,50	0,21	0,00
5	1,55	0,01	0,00

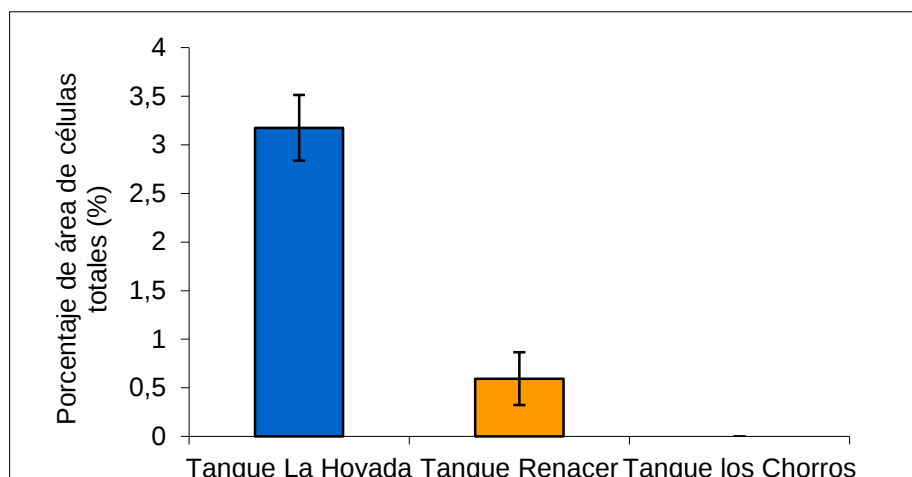


Figura 5. Porcentaje promedio de área de células totales en los sitios de muestreos de los tanques de Mucuchíes.

Detección por Inmunohistoquímica de la proteína CagA de *H. pylori*

Los ensayos de Inmunohistoquímica para la detección de la proteína CagA de *H. pylori* resultaron negativos para todas las muestras de biopelículas de los distintos sitios de muestreo.

Detección de *H. pylori* por Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) en tapetes microbianos.

En el análisis de los tapetes microbianos no se apreció la fluorescencia roja indicativa de la presencia de la bacteria en la mayoría de los campos enfocados. Esto podría ser debido a que los tapetes microbianos están constituidos de una gran cantidad de restos vegetales (clorofila) los cuales tienen fluorescencia propia al ser iluminados por la luz de estos microscopios, impidiendo apreciar o analizar la imagen adecuadamente. Sin embargo, en ciertos campos fue posible apreciar bacterias

positivas a la sonda específica de *H. pylori*. En la Figura 7 se muestran estas imágenes.

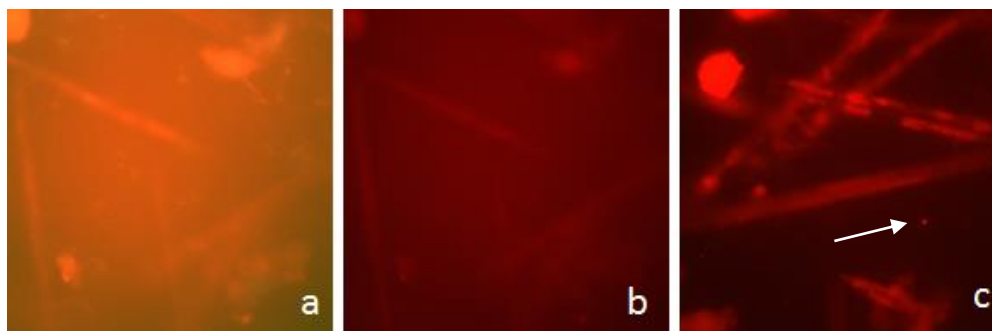


Figura 6. Imágenes de FISH para la detección de *H. pylori* en tapetes microbianos. En las imágenes a y b no se observan bacterias, pero sí una autofluorescencia de la muestra. En la imagen c se puede observar fluorescencia positiva a una célula de *H. pylori*.

Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico realizado a través de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis nos indicó que existen diferencias significativas en el número de células positivas a *H. pylori* entre los sitios de muestreo (tanques La Hoyada, Renacer y Los Chorros) donde se recolectaron las muestras de biopelículas ($p=0,004388$). Los resultados de la prueba de Bonferroni (Tabla 9) indicó que entre los tanques La Hoyada y Renacer no existen diferencias significativas ($p=0,05004$), mientras que entre los otros sitios de muestreo estos resultados son estadísticamente diferentes entre sí.

Tabla 9. Valores de p obtenidos con la Prueba de Bonferroni en el análisis de prevalencia de *H. pylori* entre las diferentes muestras de biopelículas de los tanques de agua de Mucuchíes.

Tanques		p
La Hoyada	Renacer	0,05004
Los Chorros	La Hoyada	0,01996
Renacer	Los Chorros	0,01219

Se analizaron los datos del área de *H. pylori* ocupada por campo del microscopio en las distintas muestras de biopelículas mediante la prueba de Kruskal Wallis, comprobando que existen diferencias significativas entre los sitios de muestreo ($p=0,004793$). La prueba de Bonferroni nos indicó que cada sitio es diferente respecto al otro ($p<0,005$), obteniéndose los valores de p presentados en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de p obtenidos con la prueba de Bonferroni en el análisis del área de *H. pylori* por campo entre las diferentes muestras de biopelículas de los tanques de agua de Mucuchíes.

Tanques		p
La Hoyada	Renacer	0,01219
Los Chorros	La Hoyada	0,01219
Renacer	Los Chorros	0,04720

Se realizaron las mismas pruebas para determinar si existían diferencias significativas en el número de bacterias totales en las biopelículas de los diferentes sitios de muestreo. La prueba de Kruskal Wallis indicó que ninguna de estas muestras

es igual ($p=0,003071$). Adicionalmente, la prueba de Bonferroni indicó que cada sitio es diferente respecto al otro ($p<0,005$, Tabla 11).

Los resultados obtenidos en el hisopado del tanque los Aposentos no fueron comparables estadísticamente con las muestras de los tanques Chorros, La Hoyada y Renacer, debido a diferencias en sitio de toma de muestra, siendo la muestra de los Aposentos un hisopado de la pared de la tubería mientras que los tanques de los Chorros, la Hoyada y Renacer fueron tomados de la pared de los tanques.

Tabla 11. Valores de p obtenidos con la prueba de Bonferroni en el análisis del número de bacterias totales por campo entre las diferentes muestras de biopelículas de los tanques de agua de Mucuchíes.

Tanques		p
La Hoyada	Renacer	0,01996
Los Chorros	La Hoyada	0,01996
Renacer	Los Chorros	0,01219

DISCUSIÓN

La infección por *H. pylori* constituye un problema de salud pública a nivel mundial (OMS, 2018). Varios estudios han mostrado una asociación entre la infección por *H. pylori* y la fuente de agua potable, actuando ésta como un reservorio en el cual la bacteria puede permanecer por periodos prolongados en su forma VNC con potencial infeccioso antes de ser ingerida (Fernández-Delgado *et al.*, 2008). Las células bacterianas presentes en las biopelículas adheridas a las paredes de las tuberías (en fase sésil) tienen una tasa de crecimiento y reproducción mayor que las células bacterianas en fase planctónica (forma libre). Por ello, se consideran que las biopelículas formadas en los sistemas por donde fluye el agua son reservorios que le permiten a los microorganismos patógenos períodos más prolongados de supervivencia ambiental (Mackay *et al.*, 1999; Fernández-Delgado *et al.*, 2008).

Se estima a nivel mundial una infección por *H. pylori* del 50-60% de la población (Ortiz *et al.*, 2003); sin embargo, en Venezuela se ha determinado una infección del 95% en su población (Kato *et al.*, 2004). El estado más afectado es Táchira con cifras de un 90 a 96%, mientras que la población de Mucuchíes en el estado Mérida se ubica con cifras desde 68 hasta 77% de individuos infectados (Rojas *et al.*, 2008; De Farías *et al.*, 2012; Camargo & Boschian, 2012). A pesar que se han sugerido medidas para la adecuada esterilización de las aguas (Nieto, 2014; Rojas, 2016), el método más común de desinfección sigue siendo la cloración, que permite eliminar la mayoría de las bacterias suspendidas en el agua, pero no tiene la misma efectividad cuando éstas se encuentran adheridas en las biopelículas, donde son hasta 150 veces más

resistentes al cloro (Yu & McFeters, 1994; LeChevallier *et al.*, 1998; Watson *et al.*, 2004). Por ello se considera que los organismos que se encuentren adheridos a una biopelícula en los sistemas de distribución de agua pueden sobrevivir a este método de desinfección (Moreno *et al.*, 2007).

Los resultados de este trabajo demostraron que *H. pylori* está presente en las biopelículas adheridas a las paredes y tuberías de los tanques de aguas Renacer, La Hoyada y Aposentos de Mucuchíes, representado un riesgo constante en esta población. Esta bacteria va colonizando la superficie de los tanques y tuberías de aguas a través de un ciclo de adhesión, crecimiento y desprendimiento de la biopelícula, expandiendo e intercambiando material genético donde se incluyen los genes de virulencia (Muro *et al.*, 2012).

En este trabajo a través de la Inmunohistoquímica se intentó evidenciar si estas células de *H. pylori* presentes en las biopelículas contenían la proteína CagA; sin embargo, los resultados fueron negativos. No se encontró esta proteína en las biopelículas formadas en las superficies de los tanques y tuberías, a diferencia de un estudio anterior realizado con filtrados de agua de los tanques de Mucuchíes donde se lograron evidenciar células de *H. pylori* positivas a CagA suspendidas en el agua (Rojas, 2016). Al entrar en contacto con el agua estas células suspendidas fluyen hasta formar o adherirse a una biopelícula (Mackay, *et al.*, 1999). Por ello, la presencia de la proteína Cag A en células de *H. pylori* detectadas por Rojas (2016) en muestras de aguas de los mismos tanques de Mucuchíes para el mismo período de muestreo (Julio del 2015), sugiere una contaminación reciente debido a que estas células no se han adherido todavía a ninguna superficie.

H. pylori al encontrarse en un ambiente hostil cambia su morfología para adaptarse y sobrevivir entrando en un estado VNC (Camargo & Boschian, 2012). Las bacterias en este estado no solo cambian morfológicamente sino también su metabolismo, modificando la expresión de sus genes y su potencial de virulencia (Tamagnini & Paraje, 2015). Las células de *H. pylori* detectadas en las biopelículas presentaron en las imágenes del FISH una morfología predominantemente cocoide indicativa del estado VNC (Figura 3).

La expresión de la proteína CagA requiere de factores de patogenicidad como el sistema de secreción tipo IV y la proteína VacA que sólo pueden ser expresados en la mucosa gástrica (Atherton, 2006). Estudios han demostrado que la actividad metabólica y la expresión de genes asociados a estas funciones disminuyen en una fase planctónica; sin embargo, los genes que regulan la codificación de proteínas ante el estrés (*hrcA*, *hspR*, *crdR*, *recR* y *pgdA*) se incrementan, por lo que los genes que expresan la virulencia, colonización o genes inmunogénicos disminuyen en las biopelículas (Hathroubi *et al.*, 2018).

Por esta razón, a pesar que las células de *H. pylori* detectadas en las biopelículas no son portadoras de esta proteína asociada con cáncer gástrico, la transmisión acuática de esta bacteria sigue representando un riesgo para la salud de la población de Mucuchíes, debido a que *H. pylori* puede expresar otros factores de virulencia como la ureasa, hemaglutininas, factores de colonización y la citotoxina vacuolizante (VacA que favorecen la colonización y permanencia en la mucosa gástrica (Torres y Rodríguez, 2007). Por ello, las biopelículas presentes en estos sistemas de distribución de agua de Mucuchíes podrían actuar como reservorios del patógeno por

períodos prolongados y mediante ciclos de formación y desprendimiento, las cuales continúan extendiéndose por la superficie de todos los sistemas de distribución de agua potable y riego de hortalizas de Mucuchíes en el estado Mérida.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Mediante la técnica de FISH se pudo detectar la presencia de células cocoides de *H. pylori* en las biopelículas de las redes de distribución de agua potable y riego de Mucuchíes.
- Por primera vez se intentó detectar la presencia del factor de virulencia CagA de *H. pylori* en muestras de biopelículas mediante Inmunohistoquímica.
- La presencia de *H. pylori* en biopelículas formadas en las superficies de los tanques y tuberías de aguas de Mucuchíes indica que estos sistemas acuáticos no tienen tratamientos efectivos para la potabilización del agua de consumo de la población ni son adecuados para su distribución, así como representan un riesgo de contaminación para el riego de cultivos de hortalizas producidas en esta localidad.
- Los tapetes microbianos podrían representar hábitats donde esté presente *H. pylori* en asociación a otros microorganismos autóctonos de estos ecosistemas acuáticos. Sin embargo, se requieren mayores estudios para identificar a esta bacteria dentro de estas comunidades complejas de organismos como otro posible reservorio ambiental.

Recomendaciones

- Debido a los resultados reportados en este estudio se recomienda mejorar los tratamientos aplicados para la potabilización del agua de consumo de la población de Mucuchíes y cercar o restringir el acceso a las nacientes de las quebradas y alrededores de estos cuerpos de aguas, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación.
- Realizar vigilancia epidemiológica y seguimiento en las distintas fases del proceso de potabilización del agua y siembra de cultivos de hortalizas hasta su consumo humano, con la finalidad de detectar las posibles rutas de contaminación de *H. pylori* en la población.
- Realizar estudios posteriores que contemplen un mayor número y tipos de muestras de biopelículas donde se evalúen otras posibles fuentes de contaminación de *H. pylori* como grifos, bebederos, duchas, recipientes para almacenar agua y tanques caseros.
- Informar a las comunidades y autoridades competentes mediante reuniones, talleres, medios de difusión, divulgación y/o comunicación, sobre el riesgo de infección de *H. pylori* en la población de Mucuchíes a través de las fuentes de aguas y las biopelículas formadas en sus redes de distribución.
- Aclarar a la población y autoridades de la localidad que la cloración no es un proceso que garantice la eliminación de la bacteria en los cuerpos de aguas y biopelículas, así como la existencia de tratamientos alternativos para la potabilización del agua como las cloramidas.

- Fomentar el hábito de consumo de agua hervida previamente filtrada u ozonizada, así como evitar el consumo de hortalizas crudas.
- Debido a que la población ha estado expuesta a esta bacteria por largo tiempo, incentivar la realización de controles de salud periódicos para descartar la infección por *H. pylori* en las personas y evitar el riesgo de padecer una enfermedad crónica que posteriormente pueda convertirse en cáncer gástrico, recalcando que la mayoría de estas infecciones ocurren en edades tempranas de la población.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arévalo A, Trespalacios AA, Otero W. (2009) Importancia de la proteína CagA en la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 24, 388-395
- Atherton, J. C. 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology*, 1, 63–96.
- Azevedo NF., Vieira MJ., Keevil CW. (2003) Establishment of a continuous model system to study *Helicobacter pylori* survival in potable water biofilms. *Water Science & Technology*, 47, 155-160.
- Azevedo N.F. Pacheco A.P. Keevil C.W. Vieira M.J. (2006) Adhesion of water stressed *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 718–724.
- Bolhuis, H., Cretoiu, M. S., Stal, L. J. (2014). Molecular ecology of microbial mats. *FEMS Microbiology. Ecology*, 90, 335-350.
- Bracho S, Vizcaya L, Velasquez A, Casanova G. (1995) Valoración de la prueba de ureasa, cultivo y coloración de Gram en la investigación de *Helicobacter pylori* de biopsias gástricas. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 33, 10-14.
- Bermúdez DL., Torres DL, & Rodríguez GB. (2009). Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Medicina*, 48, 1-12
- Bunn, J. E. G., W. G. MacKay, J. E. Thomas, D. C. Reid, and L. T. Weaver. (2002). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms:

implications for transmission in early life. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 450-454.

Buswell CM, Herlihy YM, Lawrence LM, McGuiggan JTM, Marsh PD, Keevil CW.

(1998) Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 733–741.

Camargo C, Boschian E. (2012). *Helicobacter pylori*: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 25, 85–93.

Camper AK., Varnecke, Jones M. and McFeters G.A., (1998) Pathogens in Model Distribution System Biofilms. Denver: American Water Works. Association Research Foundation.

Cervante-García E. (2016). *Helicobacter pylori*: mecanismo de patogenicidad. *Revista latinoamericana de Patología Clínica y medicina de laboratorio*, 63, 100-109.

Contreras, M., Salazar, V., & Garcia , M. (2012). High frequency of *Helicobacter pylori* in the esophageal mucosa of dyspeptic patients and its possible association with histopathological alterations. *International Journal Infect Diseases*, 16, 364–370.

Cuervo, C., & Gaviria, A. (2017). Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua y biopelícula de los grifos de las instituciones educativas oficiales en la ciudad de Medellín. *Acta Médica Colombiana*, 42, 121-128.

- De Faría, Alejandro & Casanova, Gerardo & Milano, Melise & Torres, Ramon. (2012). Relación entre Histología y Prueba de Aliento Cuantitativa en Gastritis Folicular (*Helicobacter pylori*), Mucuchíes - Mérida. *Gen*, 66, 166-170.
- De Sousa L, Vásquez I, Velasco J, Parlapiano D. (2004) Características clínicas y epidemiológicas de la infección por *Helicobacter pylori* en una población de los Andes Venezolanos. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 46, 2-7.
- Donlan RM. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 8, 881-890.
- Duarte N. (2013) Detección de *Helicobacter pylori* en aguas de consumo humano de Mucuchíes, Municipio Rangel, estado Mérida. (Trabajo Especial de Grado). Mérida, Universidad de los Andes.
- Flemming, HC., Wingender, J., Mayer, C., Körstgens, V. and Borchard, W. (2000). Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: *Community Structure and Cooperation in Biofilms*. H.M. Lappin-Scott, P. Gilbert, M. Wilson and D. Allison (eds.), SGM symposium 59. Cambridge University Press, pp 87–105.
- Fernández Duharte, Jesús, Tacher Romano, Víctor, García Céspedes, María Eugenia, Caro Fernández, Miriam Teresa, & Álvarez Guerra, Odalis María. (2014). Caracterización de los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* durante un trienio, *MEDISAN*, 18, 928-933.
- Fernández-Delgado M., Contreras M., García-Amado MA., Michelangeli FY., Suárez P. (2008). Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*. *Interciencia*, 33, 412-417.

- Fernandez-Delgado, M., Duque, Z., Rojas, H., Suarez, P., Contreras, M., Garcia-Amado, M.A. and Alciaturi, C. (2015) Environmental scanning electron microscopy analysis of *Proteus mirabilis* biofilms grown on chitin and stainless steel. *Annals of Microbiology*, 65, 1401-1409.
- Fernández-Delgado, M., Giarrizzo, J., García, M., & Contreras, M. (2016). Evidence of *Helicobacter* spp. in freshwaters from Roraima Tepui, Guayana Shield, South America. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109, 529-542
- Giao, M. S., Azevedo, N. F., Wilks, S. A., Vieira, M. J., & Keevil, C. W. (2010). Effect of chlorine on incorporation of *H. pylori* into drinking water biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 1669–1673.
- Ge Z., Hiratsuka K., Taylor DE. (1995) Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport. *Molecular Microbiology*, 15, 97-106
- Gutiérrez, Beatriz, Cavazza, María Eugenia, Ortiz, Diana, Correnti, María, Vidal, Teresita, Mégraud, Francis, Guerram, Manuel, & Álvarez, Patricia. (2008). Seroprevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con Gastritis Crónica, Úlcera Duodenal y Gástrica: Primer estudio de corte retrospectivo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 27, 2.
- Hatakeyama, M., and Higashi, H. (2005). *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Science*, 96, 835– 843
- Hatakeyama, M. (2009). *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol*, 44, 239-248.

- Hathroubi S., Zerebinski J., Ottemanna MK. (2018). *Helicobacter pylori* Biofilm Involves a Multigene Stress-Biased Response, Including a Structural Role for Flagella. *mBio*, 9, 1-19.
- Hood, SK., and Zottola EA. (1997). Adherence of stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 145–153.
- Hooi JK, Lai WY, Ng WK, Suen MM, *et al.* (2017). Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 153, 420-429.
- Infantes M. (2008). Lugar del frío: propuesta para un turismo ecológico en la comunidad de Mucuchíes del Estado Mérida. (Trabajo Especial de Grado). Mérida, Colegio Universitario Hotel Escuela los Andes.
- Johnson CH, Rice EW, Reasoner DJ. (1997) Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4969-4970.
- Kato I., Vivas J., Plummer M., (2004) Environmental factors in *Helicobacter pylori* related gastric precancerous lesions in Venezuela. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 13, 468–476
- Knobeslsdorf, M., & Mujeriego, S. (1997). Crecimiento bacteriano en las redes de distribución de agua potable: una revisión bibliográfica. *Ingeniería del agua*, 4, 17-28.
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., & Beloin, C. (2013). From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*, 2, 288-356.

- Macenlle R. (2007). Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en la población general adulta de la provincia de Ourense y estudio de factores de riesgo asociados. (Trabajo especial de grado), Universidad de Santiago de Compostela. Disponible en: https://dspace.usc.es/bitstream/10347/2375/1/9788497509657_content.pdf
- Mackay W. G., Gribbon L. T., Barer M. R. and Reid D. C. (1999) Biofilms in drinking water systems: a possible reservoir for *Helicobacter pylori*. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 85, 52–59.
- Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, (2002). Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet*, 359, 931–935.
- Martínez RR., (2011). Empleo de la técnica hibridación in situ fluorescente para visualizar microorganismos. *Revista Salud UIS*, 43, 307-316.
- Merrell DS., Mueller SH., Tompkins A., Falkow LS., El-Etr., (2004) Phosphorylation-independent effects of CagA during interaction between *Helicobacter pylori* and T84 polarized monolayers. *Journal of Infection Diseases*, 190, 1516–1523.
- Ministerio del Poder Popular Para la Salud. (2015). *Anuario de Mortalidad 2013*. Caracas: Ministerio de Poder Popular Para la Salud. Recuperado de <https://www.ovsalud.org/descargas/publicaciones/documentos-oficiales/Anuario-Mortalidad-2013.pdf>

- Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17, 73–87
- Montero C., V., Hernández S., A., Masís M., F., Camacho S., J., Santamaría, F., Barboza R., K., Orozco G., J. (2011). 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*, 24, 3-14.
- Moreno, Y., Piqueres, J., Alonso, A., Jiménez, A., González, & Ferrús. (2007). Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res*, 41, 3490–3496.
- Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. (2001) The role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable water system. *Microbiology*. 147, 3121–6.
- Muro LA., Ramírez-Castillo F., Avelar F., Guerrero A. (2012). Biopelículas Multi-especie: asociarse para sobrevivir. *Investigación y Ciencia*, 54, 49-56
- Nieto Y. (2014) Asociación entre infección por *Helicobacter pylori* y el consumo de agua potable en la población de Mucuchíes, estado Mérida. (Trabajo Especial de Grado). Mérida, Universidad de los Andes.
- LeChevallier M. W., Cawthon C. D. and Lee R. G. (1988). Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 649-654.

- Leid, J.G., Shirtliff, M.E., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2002) Human leukocytes adhere, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infection and Immunity*, 70, 6339–6345
- Pajares G., J. M., Pajares-Villarroya, R., & Gisbert, J. P. (2007). *Helicobacter pylori*: resistencia a los antibióticos. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99, 63-70.
- Palframan, S., Kwok, S., & K, G. (2012). Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 92.
- Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA A Cancer Journal of Clinicians*, 55, 74–108.
- Parsonnet, J. (1995) The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 9, 45-51.
- Porter KG. and Feig YS. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25, 943-948.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), (2018) *Datos y Cifras sobre la incidencia del cáncer a nivel mundial*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Ortiz D., Cavazza ME., Rodríguez O., Hagel I., Correnti M., Convit J. (2003) Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Warao lineage communities of Delta Amacuro State, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 721-725

- Otero R, W. (2017). *Helicobacter pylori* en agua potable ¿Es la ruta de la infección? *Acta Medica Colombiana*, 42, 87-89.
- Ramírez Ramos, Alberto, Chinga Alayo, Erick, Mendoza Requena, Daniel, Leey Casella, Julio, Segovia Castro, María Cristina, & Otoyá, César. (2003). Variación de la prevalencia del *H. pylori* en el Perú período (1985-2002), en una población de nivel socioeconómico medio y alto. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 23, 92-98.
- Rojas S. (2008). Comparación entre el test de aliento y la densidad histológica en el antro gástrico, en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. (Trabajo Especial de Grado). Mérida, Universidad de los Andes.
- Rojas S. (2016) Evaluación de la infección por *Helicobacter pylori* y síntomas gástricos en la población de Mucuchíes y su asociación con la presencia de agroquímicos en aguas de consumo humano. (Trabajo Especial de Grado). Mérida, Universidad de los Andes.
- Samarbaf-Zadeh, A., Tajbakhsh, S., Moosavian, S., Sadeghi-Zadeh, M., Azmi, M., Hashemi, J., & Masjedi-Zadeh, A. (2006). Application of fluorescent in situ hybridization (FISH) for the detection of *Helicobacter pylori*. *Medical Science Monitor*, 12, 426-430.
- Schoenen, D. (2002). Role of disinfection in suppressing the spread of pathogens with drinking water: possibilities and limitations. *Water Research*, 36, 3874–3888.
- Soler, M. & Acosta G. Guía de inmunohistoquímica para técnicos Ciudad Autónoma de Buenos Aires: *Instituto Nacional del Cáncer*, 2018. Libro digital, PDF/A.

- Stark RM., Gerwig GJ., Pitman RS., Potts LF., Williams NA., Greenman J., (1999).
Biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Letter in Applied Microbiology*,
28,121–126
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as
complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56,
187–209.
- Tamagnini LM. & Paraje MG. (2015). ¿Qué son las bacterias viables no cultivables?
(revisión bibliográfica). *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y
Naturales*, 2, 99-102.
- Traverso, F., & Hernández, F. (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia,
patología y diagnóstico. *Revista Biomédica*, 11, 187-205.
- Trebesius, K., Leitritz, L., Adler, K., Schubert, S., Autenrieth, I., & Heesemann, J.
(2000). Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in
necrotising fasciitis and streptococcal. *Medical Microbiology and
Immunology*, 188, 169–175.
- Trebesius K, Panthel K, Strobel S. (2000) Rapid and specific detection of
Helicobacter pylori macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ
hybridisation. *Gut*, 46, 608–614
- Trespalcios A, Otero W, Mercado M. (2010). Resistencia de *Helicobacter pylori* a
metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Revista
Colombiana de Gastroenterología*, 25, 388-395.
- Raad I, Davis S, Khan A, Tarrand J, Elting L, Bodey GP. (1992) Impact of central
venous catheter removal on the recurrence of catheter-related coagulase-

- negative staphylococcal bacteremia, *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 13, 215-221
- Ramírez P., Vera G. (2012) Presencia de *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y vegetales de cultivo. Mucuchíes, Municipio Rangel estado Mérida. Venezuela. (Trabajo Especial de Grado). Postgrado de Gastroenterología. Universidad de Los Andes.
- Sutherland, I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 4–9
- Villarreal L. (2011). Tasas de reinfección de *Helicobacter pylori*, hallazgos endoscópicos e histopatológicos posterior a una terapia de erradicación efectiva. Mucuchíes-Estado Mérida. Postgrado de Gastroenterología Universidad de Los Andes.
- Watnick PI., Kolter R. (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology*, 34, 586–595
- Watson CL, Owen RJ, Said B, Lai S, Lee JV, Surman-Lee S, (2004) Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 690–698.
- Warren JR, Marshall BJ. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 2, 1273-1275.
- Miettinen, H., & Wirtanen, G. (2006). Ecology of *Listeria* spp. in a fish farm and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from fish farming and processing companies. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 138–146.

- Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 713–739.
- Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Hóiby, N., Molin, S., & Song, Z. J. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3, 74–81.
- Yu, F. P., & G. A. McFeters. (1994). Physiological responses of bacteria in biofilms to disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2462–2466.

www.bdigital.ula.ve