

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES
UNIDAD DE GASTROENTEROLOGÍA
POSTGRADO DE GASTROENTEROLOGÍA

**“DETECCIÓN DE *Helicobacter pylori* EN AGUAS AMBIENTALES DESTINADAS
AL CONSUMO HUMANO EN MUCUCHÍES, MUNICIPIO RANGEL, ESTADO
MÉRIDA, 2013”.**

www.bdigital.ula.ve

Autora: Nereida Lisbeth Duarte Roperó.

Tutor: Dr. Gerardo Casanova (ULA).

Co-Tutora: Dra. Milagro Fernández D. (IVIC).

Asesor metodológico: T.SU. Francisco Salcedo (HULA).

Mérida, Septiembre de 2014.

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES
UNIDAD DE GASTROENTEROLOGÍA
POSTGRADO DE GASTROENTEROLOGÍA

**“DETECCIÓN DE *Helicobacter pylori* EN AGUAS AMBIENTALES DESTINADAS
AL CONSUMO HUMANO EN MUCUCHÍES, MUNICIPIO RANGEL, ESTADO
MÉRIDA, 2013”.**

www.bdigital.ula.ve
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO POR EL MÉDICO CIRUJANO
NEREIDA LISBETH DUARTE ROPERO, CI: 15.242.796, ANTE EL CONSEJO DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, COMO
CREDENCIAL DE MÉRITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
ESPECIALISTA EN GASTROENTEROLOGÍA.

Autora:

Nereida Lisbeth Duarte Roper.

Médico Cirujano.

Residente de 3^{er} año del Post Grado de Gastroenterología de la Universidad de Los Andes.

Tutor:

Dr. Gerardo Casanova (ULA).

Médico especialista en Medicina Interna y Gastroenterología.

Profesor titular (jubilado activo) de la Universidad de Los Andes.

Fundador del post grado de Gastroenterología U.L.A.-H.U.L.A.

Co-Tutora:

Dra. Milagro Fernández D. (IVIC).

Licenciada en Bioanálisis, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Ph.D. en Ciencias Biológicas.

Investigadora del Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Asesor metodológico:

T.SU. Francisco Salcedo (HULA).

Técnico Superior Universitario en Estadísticas de la Salud. Universidad de Los Andes.

Coordinador (E) del departamento de Registro y Estadística de Salud del I.A.H.U.L.A.

AGRADECIMIENTOS

A papá Dios, por guiar correctamente cada uno de mis pasos y mantenerme en pie.

A mis Padres, por siempre estar a mi lado y ser mi pilar fundamental. Los Amo.

A mis hermanas, ángeles el cielo que Dios me regaló.

Al Dr. Gerardo Casanova, por darme la oportunidad y la experiencia de realizar este Trabajo Especial de Grado.

A la Dra. Milagro Fernández, por su incansable labor y mística de trabajo durante la realización de ésta investigación.

A la Dra. Mónica Contreras y a todo el personal del Laboratorio de Fisiología y Microbiología Gastrointestinal (IVIC) por su gran colaboración en la realización de esta investigación.

Al Lic. Víctor Salazar por el apoyo en el área de microscopia de fluorescencia en los ensayos de FISH.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por el financiamiento para la realización de este proyecto.

Al Profesor Enrique Rivas, por su valiosa colaboración y conocimientos aportados para la realización de la investigación.

A mi futura colega Yohanna Dugarte por el apoyo brindado.

A mis compañeras de post-grado Yenny, Wendy y Johanna por su paciencia y colaboración.

A la población de Mucuchíes, siempre presta a colaborar en pro del bienestar de la comunidad.

¡A todos gracias!

ÍNDICE GENERAL

	pag.
Índice de tablas	Vi
Índice de gráficos	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	1
Antecedentes	6
Planteamiento del problema	10
Justificación	11
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
 Materiales y métodos	 13
Diseño del estudio	13
Área de estudio y de muestreo	13
Recolección de datos epidemiológicos	20
Sistema de variables	21
Análisis estadístico	21
 Análisis de resultados	 22
Discusión	33
Conclusiones	38
Recomendaciones	39
Referencias bibliográficas	40
Anexos	44

ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1	14
Tabla 2	18
Tabla 3	23
Tabla 4	24
Tabla 5	26
Tabla 6	30
Tabla 7	31
Tabla 8	32

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1	25
Figura 2	25
Figura 3	27
Figura 4	28
Figura 5	29
Figura 6	30
Figura 7	32

www.bdigital.ula.ve

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES
UNIDAD DE GASTROENTEROLOGÍA
POSTGRADO DE GASTROENTEROLOGÍA

“DETECCIÓN DE *Helicobacter pylori* EN AGUAS AMBIENTALES DESTINADAS AL CONSUMO HUMANO Y SISTEMAS DE RIEGO EN MUCUCHÍES, MUNICIPIO RANGEL, ESTADO MÉRIDA, 2013”.

Autora: Nereida Lisbeth Duarte Roperó.

Tutor: Dr. Gerardo Casanova.

Co-autora: Dra. Milagro Fernández.

RESUMEN

Desde el descubrimiento del *Helicobacter pylori* y su reconocimiento como carcinógeno tipo I en la génesis de cáncer gástrico el cual es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial y a nivel nacional, han sido múltiples las investigaciones realizadas para determinar la principal fuente de infección y re-infección por ésta bacteria. **Objetivo general:** Determinar la presencia de *H. pylori* en el agua de consumo de la población de Mucuchíes y los posibles factores asociados con la adquisición de la infección en el año 2013. **Materiales y métodos:** Se trata de una investigación observacional descriptiva de corte transversal en la cual se obtuvieron muestras de agua de quebradas, tanques de abastecimiento y aguas de riego, las cuales se procesaron para obtención de cultivos en medio HP, PCR y FISH. **Resultados:** Cinco sitios fueron analizados. No se obtuvieron cultivos positivos para *H. pylori*. A través de PCR sólo se obtuvo geles positivos para familia Helicobacteriaceae, pero negativos para genes específicos de *H. pylori* (*glmM*, *ureA* y *cagA*). Sin embargo los ensayos de FISH confirmaron la presencia de *Helicobacter spp.* en los filtrados de agua de los sitios estudiados en Mucuchíes y mostraron evidencias de *H. pylori* viable en los cultivos de estos mismos sitios principalmente células cocoides. **Conclusiones:** El agua para consumo humano debe recibir mejor tratamiento antes de llegar a los hogares de la población de Mucuchíes para evitar infección y re-infección por *H. pylori*. Igualmente es necesario realizar educación en la población para incentivar el consumo de agua hervida previamente filtrada.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, agua, PCR, FISH.

UNIVERSITY OF THE ANDES
FACULTY OF MEDICINE
INDEPENDENT INSTITUTE UNIVERSITY HOSPITAL OF THE ANDES
UNIT GASTROENTEROLOGY
GRADUATE OF GASTROENTEROLOGY

DETECTION OF *Helicobacter pylori* IN ENVIRONMENTAL WATER INTENDED FOR HUMAN CONSUMPTION IN MUCUCHÍES, RANGEL MUNICIPALITY, MÉRIDA STATE, 2013.

Autor: Nereida Lisbeth Duarte Roperó.

Tutor: Dr. Gerardo Casanova.

Co-autor: Dra. Milagro Fernández.

ABSTRACT

Since the discovery of *Helicobacter pylori* and its recognition as a carcinogen type I in the genesis of gastric cancer, the second leading cause of death from gastric cancer worldwide and national level, have been multiple investigations conducted to determine the main source of infection and reinfection by this bacterium. **Overall objective:** determine the presence of *H. pylori* in water of consumption of the population of Mucuhíes and the possible factors associated with the acquisition of the infection in the year 2013. **Methods and materials:** it is a descriptive observational research of cross-section in which there were obtained samples from ravines, supply tanks and irrigation water, which were processed for cultivation in medium HP, PCR and FISH. **Results:** Five sites were analyzed. There were no positive cultures for *H. pylori*. Through PCR, only positive gels were obtained for family Helicobacteraceae, but negatives for specific genes of *H. pylori* (*glmM*, *urea* and *cagA*). Nevertheless, the tests of FISH confirmed the presence of *Helicobacter* spp. in the filtered water of the studied sites in Mucuchíes and showed evidence of *H. pylori* in the viable crops of these same sites mainly coccoid cells. **Conclusions:** The water for human consumption should receive better treatment before arriving at the homes of the population of Mucuchíes to avoid infection and re-infection with *H. pylori*. The same way it is necessary to carry out education in the population to encourage the water consumption boiled previously leaked.

Keywords: *Helicobacter pylori*, water, PCR, FISH.

INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* fue cultivada con éxito por Warren y Marshall en el año se trata de una bacteria espiral, Gram negativa, microaerofílica (crecimiento óptimo entre 5-15% de oxígeno), flagelada, productora de ureasa y que coloniza la mucosa gástrica del ser humano. Esta bacteria puede transformarse a una forma cocoide en condiciones adversas para su supervivencia en el hospedador humano y el ambiente ^{1,2}. Ha sido considerada el principal agente implicado en la aparición de gastritis crónica, duodenitis, 80% de los casos de úlcera gástrica y 95% de úlcera duodenal, linfoma de MALT y cáncer gástrico tipo intestinal. Es reconocida desde 1994 como carcinógeno tipo I por su papel en el desarrollo del cáncer gástrico ^{3, 4,5}. El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por cáncer y la cuarta causa de muerte a nivel mundial, siendo mayor la incidencia en países como Japón, China, Corea, países del norte de Europa y América Latina, principalmente en los países andinos ^{6,7}.

El *H. pylori* está ampliamente distribuido a nivel mundial. Se calcula que más del 50% de la población mundial presenta esta infección y su prevalencia varía entre los países en vías de desarrollo con un 80% y aquellos desarrollados con sólo 20%, incluso entre las diferentes localidades de un mismo país. Esto se debe a la influencia que ejercen los factores socioeconómicos sobre su prevalencia, principalmente el déficit de adecuada higiene, dietas pobres, hacinamiento, la edad (90% de la población infectada se encuentra entre los 70 y 79 años), el género y la ubicación geográfica (rural vs. urbana), siendo esta infección inversamente proporcional al estándar de vida y a las adecuadas prácticas sanitarias. ^{6,8}

La infección se adquiere en más del 50% de la población durante la infancia y con menos frecuencia en la edad adulta, principalmente en los países en vías de desarrollo. De los individuos infectados, 10-15% desarrollarán úlcera péptica y 1-2% cáncer gástrico. En los últimos años, se ha observado un descenso en la prevalencia de la infección por *H. pylori* sobre todo en los países desarrollados por la mejoría de las medidas higiénicas de la población y el tratamiento de las aguas de consumo humano, así como mayores tasas de tratamiento en personas infectadas.^{9,10}

El modo de transmisión de este patógeno se ha debatido fuertemente y hasta el momento no se ha determinado con exactitud.¹¹ Se han propuesto como modalidades de transmisión las rutas fecal-oral (transmisión mediante fuentes de agua o alimentos contaminados con heces infectadas), oral-oral (transmisión de persona a persona, a través de la saliva), gástrica-oral (modalidad típica de transmisión en la infancia, por vómitos contaminados) y gástrica-gástrica (transmisión por procedimientos endoscópicos)¹²; presentando la que corresponde a la vía fecal-oral y la oral-oral las evidencias más fuertes¹³. Más recientemente se ha sugerido que la bacteria pueda existir de forma natural en el ambiente^{14, 15}. Sin embargo, ninguna ruta *per se* es capaz de explicar exactamente su transmisión. ¿Cómo el microorganismo abandona a su hospedador y entra en el ambiente?, ¿dónde reside en el ambiente? y ¿cuándo las personas adquieren la infección? son preguntas que todavía no se han resuelto del todo¹³.

A pesar que muchas evidencias muestran que el *H. pylori* está bien adaptado para adherirse a la mucosa y al epitelio gástrico, es difícil establecer que éste sea su único nicho ecológico¹². Diversos estudios ambientales y comunitarios son consistentes en plantear que el agua juega un rol importante en la transmisión^{14, 16}. Se ha determinado que el *H. pylori*

está presente en aguas subterráneas y superficiales¹⁷, en lagos y ríos¹⁸, en aguas de consumo humano^{13,16}, en biopelículas formadas en los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable^{19,20}, en aguas municipales y aguas residuales tratadas y no tratadas^{21,22} y en ambientes marinos costeros como microorganismo libre en el agua de mar y también asociado a organismos planctónicos^{2,14,15}, lo que implica la existencia de una ruta acuática de transmisión a los humanos.

Estudios epidemiológicos nacionales e internacionales sobre *H. pylori*.

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, desde 52,7 % a 84,7 %.²³ En este sentido, Gutiérrez *et al.* (2006) estudiaron en Santo Domingo, República Dominicana, 100 pacientes y encontraron una prevalencia de 84%. Se evidenció una asociación del 100% con la úlcera duodenal y del 92,8% con la úlcera gástrica²⁴. Otros estudios realizados en la región han reportado el hallazgo de *H. pylori* en ambientes acuáticos. Por primera vez, Klein *et al.*, (1991) indicaron la posibilidad de transmisión acuática de este patógeno en una comunidad de Lima, Perú, encontrándose una asociación entre la prevalencia de la infección (48%) y las fuentes de agua, debido a que los niños cuyas casas tenían fuentes externas de agua (drenaje comunitario) eran tres veces más propensos a la infección que los niños cuyas casas tenían fuentes internas (tanques domésticos)¹⁶. Posteriormente, Hultén *et al.* (1996) analizaron muestras de agua potable de esta misma comunidad en Lima. Al inicio se realizaron intentos por cultivar este microorganismo directamente de las muestras de agua, pero esto fue infructuoso, por el rápido crecimiento de otros microorganismos interferentes

presentes en el agua que cubrieron las placas del medio agar sangre e imposibilitaron el aislamiento. Finalmente, se confirmó por PCR la presencia del gen 16S del ARNr de *H. pylori* en 11 de las 48 muestras analizadas¹³. Un estudio semejante desarrollado en un área rural de los Andes Colombianos determinó 69% de prevalencia de *H. pylori*, incrementando las tasas de esta infección por el uso de arroyos como fuente de agua para consumo humano y con actividades acuáticas como nadar en ríos, arroyos o piscinas.

En Venezuela, se ha diagnosticado la infección por *H. pylori* en 62% de sujetos asintomáticos, 90% de los pacientes con gastritis y úlcera duodenal, así como 20% de los pacientes con cáncer gástrico. Entre los estados más afectados por cáncer gástrico en nuestro país se encuentran en primer lugar el estado Táchira, con una tasa del 22,47%, seguido del estado Mérida con 22,04%, cuyas áreas de mayor afectación son los municipios Bailadores, Mesa Bolívar, Santa Cruz de Mora y Tovar^{25,26}. De Sousa *et al.* (2004) evaluaron 144 pacientes (97 con síntomas dispépticos y 50 asintomáticos) de una población del estado Mérida, observando una relación estadísticamente significativa entre la infección por *H. pylori* y los síntomas digestivos²⁷.

En el país muy pocos estudios epidemiológicos han evaluado la relación de la infección por *H. pylori* con factores ambientales. Al respecto, Domínguez-Bello *et al.* (2002) reportaron por primera vez evidencias de la influencia de los cambios climáticos en el desarrollo de dispepsia no ulcerosa en sujetos infectados con *H. pylori* que acudían a un hospital público de Caracas. Estos autores determinaron una frecuencia de pacientes infectados significativamente más alta durante los meses de lluvia (96%) que durante la estación de sequía (70%, $p = 0.0001$). Posiblemente, distintos factores asociados a las lluvias podrían conducir a una manifestación sintomática aguda de la infección o exacerbar

los síntomas de gastritis en personas infectadas, debido a un aumento en la densidad bacteriana y/o a cambios de formas cocoides en estado de latencia a formas bacilares en división celular²⁸.

En la población de Mucuchíes, municipio Rangel del estado Mérida, se ha reportado una incidencia de 78,7% para la infección por *H. pylori*²⁹, siendo ésta mayor para el género femenino. En un estudio realizado en la misma comunidad, Flores *et al.* (2009)³⁰, encontraron una asociación positiva entre el consumo de vegetales crudos y agua tomada directamente del grifo o de fuentes ambientales y la infección por *H. pylori* con un valor de Odds Ratio (OR) de 1,47 y 2,29, respectivamente, mientras que no se encontró asociación con el consumo de bebidas alcohólicas o el hábito de fumar. A pesar del tratamiento antibiótico indicado a los pacientes infectados, se han encontrado tasas de reinfección de 76%, como se reporta en el trabajo realizado en esta comunidad por Villarreal *et al.* (2011)³¹.

Antecedentes.

La mayoría de los estudios orientados a la detección de este microorganismo en fuentes de agua se han fundamentado en diferentes métodos de PCR que emplean cebadores para la amplificación de genes específicos de *H. pylori*. Así mismo, otros autores han propuesto el cultivo, separación inmunomagnética, inmunofluorescencia, hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o la integración de algunas de estas técnicas con el propósito de mejorar la sensibilidad y especificidad de estos ensayos¹¹.

Al respecto, Hultén *et al.* (1998), detectaron *Helicobacter spp.* en muestras de agua provenientes de fuentes municipales, aguas residuales tratadas y aguas de tanques

domésticos de 25 condados de Suecia, analizadas por separación inmunomagnética y PCR¹³. Por una metodología similar, Lu *et al.* (2002) determinaron *H. pylori* en muestras de aguas residuales de Ciudad Juárez, en la frontera entre México y Estados Unidos. Este estudio fue el primero en lograr aislar este microorganismo de fuentes de agua, a través de la combinación del cultivo en agar sangre Columbia con la separación inmunomagnética, identificándose por PCR 23 aislados, de los cuales 2 presentaron un alto porcentaje de homología con cepas de referencia²¹.

Algunos estudios han fundamentado la detección de *H. pylori* en los ambientes dulce-acuícolas sólo con variantes del ensayo de PCR, por la utilidad ampliamente demostrada de este método para la detección de un amplio espectro de microorganismos presentes en el agua, incluyendo a *H. pylori*¹¹. Así lo ha reportado Queralt *et al.* (2005) en distintas fuentes acuáticas, relacionando el uso y consumo de aguas contaminadas por este patógeno con su prevalencia en comunidades de Canadá y España²².

Baker *et al.* (2001) estudiaron por PCR y anticuerpos fluorescentes la presencia de *H. pylori* en aguas de grifo provenientes de 22 hogares de 55 pacientes sintomáticos digestivos que asistieron a un centro de salud privado en Pensylvania, EE.UU. Este estudio encontró que 13 de las 22 muestras fueron positivas para *H. pylori* por anticuerpos fluorescentes y 4 de las 5 analizadas por PCR. Al menos un miembro de cada familia cuya fuente de agua analizada fue positiva presentaba infección por *H. pylori*³⁴.

Por otra parte, Moreno *et al.* (2003) detectaron *H. pylori* mediante FISH en muestras de agua de río y aguas residuales de Valencia, España. Estos autores evaluaron la efectividad de esta técnica comparada con otros métodos de detección, el cultivo en agar

sangre Columbia y PCR, encontrando que a partir del cultivo no fue posible en ningún caso el aislamiento de *H. pylori* y que la técnica FISH presenta una mayor sensibilidad que la PCR¹⁸.

En el 2005, Voytek *et al.*, determinaron mediante PCR convencional la presencia del ADN de *H. pylori* en 11 de 33 muestras (33%) tomadas en 5 ríos de Norte América³⁵.

En aguas residuales también se ha estudiado la presencia de *H. pylori*. Un estudio realizado por Nayak y Rose (2007) comparó el uso de PCR en tiempo real con PCR convencional para evaluar muestras de aguas no cloradas, obteniendo con la primera técnica 84% de detección de *H. pylori* en estas muestras de aguas, mientras que con el uso de la segunda se encontró 0%. Se demostró que el PCR en tiempo real es un método específico, sensible y rápido para la detección cuantitativa de *H. pylori* en aguas³⁶.

Los resultados negativos del cultivo de *H. pylori* a partir de ambientes marinos reseñados por Carbone *et al.* (2005), concuerdan con los obtenidos por Moreno *et al.* (2003), cuyo trabajo tuvo intentos infructuosos por cultivar este microorganismo a partir de muestras de aguas residuales y de río, debido a la naturaleza incómoda de la bacteria y a la competencia con otros microorganismos dominantes¹⁸. Estos autores consideran el cultivo un método inapropiado para la detección de *H. pylori* en muestras ambientales. Sin embargo, los medios de cultivo (agar sangre Columbia y agar Pylori) propuestos en estos dos estudios^{15, 18}, no suministran suplementos selectivos y/o factores de crecimiento que pueden ser requeridos para el aislamiento de cepas ambientales de *H. pylori*.

Degnan *et al.* (2003) desarrollaron un medio selectivo para el aislamiento de esta bacteria de muestras de agua potable que contienen poblaciones microbianas mixtas,

formulado para permitir la investigación rutinaria y a gran escala de este patógeno. Inicialmente, probaron 5 medios convencionales, como el agar infusión cerebro corazón suplementado con 7% de suero bovino, agar brucella, agar sangre base Columbia, agar Skirrow *Campylobacter* y el medio HPSPA (Agar *Hp* con peptona especial), complementados con suplementos selectivos para *H. pylori* (*Hp* selective **supplement, Oxoid Limited**) y *Campylobacter* (*Campylobacter* selective supplement S, Becton Dickinson). Utilizaron 8 cepas de microorganismos transmitidos por agua (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*) e incluyeron a *H. pylori*. Se evaluó la recuperación de colonias de *H. pylori* y la inhibición de la microbiota acompañante, determinando que sólo *Acinetobacter*, *E. coli* y *H. pylori* eran capaces de crecer en todos los medios estudiados. En vista del crecimiento muy lento de *H. pylori*, se consideró necesario una mayor inhibición de los organismos competentes, y para ello los investigadores desarrollaron un medio más selectivo que denominaron agar HP, cuya fórmula incluyó una mezcla nueva de suplementos nutricionales, más los antibióticos anfotericina B y polimixina B. Adicionalmente, se incorporó urea, rojo de fenol y ácido clorhídrico 1 N para facilitar la identificación presuntiva de colonias de *H. pylori* por el cambio de color inducido por la actividad ureasa. Para evaluar este novedoso medio de cultivo se utilizó una muestra de agua de tanque adulterada con las 8 cepas empleadas en el ensayo anterior, con una microbiota nativa (*Flavobacterium*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pasteurella*, *Ochrobactrum* y *Rahnella*) fue identificada por el sistema API 20E. Se sembró alícuotas del agua modificada en el agar HP, observándose sólo colonias de *H. pylori* luego de 7 días de incubación a 37 °C en condiciones microaerófilas, a pesar de la contaminación microbiana presente en la muestra. El sistema indicador de color del agar

HP permitió la identificación presuntiva de las colonias de esta bacteria en un tiempo más corto.

Al-Sulami *et al.* (2012) utilizaron cultivo y PCR para la detección de *H. pylori* en agua de consumo de Basrah, Iraq. Analizaron 471 muestras de agua (266 muestras de agua potable y 205 de cisternas) y encontraron que sólo 11/266 muestras de agua potable y 3/205 muestras de agua de cisternas fueron positivas para *H. pylori* mediante el uso de cultivo. Por otra parte, este estudio confirmó por PCR que 6/11 cultivos de agua potable y 1/3 cultivos de agua de cisternas fueron positivos para *H. pylori*, de allí la importancia de realizar ambos métodos para mejorar la detección de *H. pylori* en aguas ambientales³⁸.

En Mucuchíes, Ramírez y Vera (2012) realizaron por PCR convencional el estudio de *H. pylori* en distintas fuentes de agua de consumo de la población y muestras de vegetales como posibles fuentes de infección y re-infección en la población estudiada. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de ADN de *H. pylori* en 16,67% de 30 muestras de agua de grifo de hogares del casco central tomadas al azar y 50% de los tanques que abastecen de agua el casco central, mientras que no se detectó a esta bacteria en los vegetales³⁹.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El municipio Rangel se ubica en la Cordillera de Los Andes, entre la Sierra Nevada y la Sierra Norte de La Culata, al noreste del estado Mérida. Se encuentra limitado por el

norte con los municipios Justo Briceño y Miranda, por el sur con el estado Barinas, por el este con el municipio Cardenal Quintero y por el oeste con el municipio Santos Marquina. Mucuchíes es la capital de la parroquia Capitán Rangel, con una población de aproximadamente 8000 habitantes. Esta parroquia tiene como principal curso de agua el río Chama, al que drenan las quebradas Misintá, La Carbonera, La Musuy, La Toma, El Vergel, El Royal y Mocoa. El agua de consumo de la población es distribuida y almacenada en dos tanques principales (Misintá y La Hoyada) que reciben tratamiento diario o interdiario con cloro. Adicionalmente, Mucuchíes cuenta con dos plantas de tratamiento para aguas negras que incluyen como paso final el proceso de cloración antes de verter estas aguas al río Chama. Las aguas tratadas son utilizadas para los sistemas de riego de los cultivos de la zona⁴⁰.

A pesar de la cloración aplicada a estas fuentes de aguas, existen escasos controles de su calidad microbiológica y la posibilidad de sobrevivir algunos patógenos como *H. pylori* a estas condiciones de tratamiento y ser transmitidos por vía acuática a los humanos (20,23), implicando riesgos para la salud de la población que consume las aguas directamente sin procesos adicionales de tratamiento.

En el estado Mérida, particularmente en la parroquia Capitán Rangel, se ha reportado una prevalencia elevada de infección y re-infección por *H. pylori*^{25,26} y un importante número de pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico²⁹. Ante esta problemática de salud pública, en la actual investigación surgieron las siguientes interrogantes:

1. ¿Es el agua de consumo humano una fuente de infección o re-infección por *H. pylori* en la población de Mucuchíes?
2. ¿Está tratada adecuadamente el agua potable que se distribuye en los tanques principales de la población de Mucuchíes y se emplea en el riego de cultivos?
3. ¿Influyen los hábitos higiénico-sanitarios de esta población, como consumir agua directamente del grifo o de fuentes ambientales y vegetales crudos, en la adquisición de la infección?

JUSTIFICACIÓN

En vista del carácter emergente que ha adquirido la infección por el *H. pylori* a nivel mundial y nacional y a la alta prevalencia de este patógeno en el estado Mérida y específicamente en Mucuchíes, este trabajo especial de grado consideró importante confirmar las posibles fuentes de infección por *H. pylori* en esta población, mediante el estudio de sistemas naturales de aguas, tanques de almacenamiento y distribución de agua potable y aguas de riego de vegetales. Así mismo determinar el método más fidedigno para la detección de *H. pylori* en aguas de consumo, como una forma de contribuir a lograr el mejor tratamiento de las aguas y reducir la prevalencia de infección por *H. pylori* en esta población.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *H. pylori* en el agua de consumo y sistemas de riego de la población de Mucuchíes y los posibles factores asociados con la adquisición de la infección en el año 2013.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la calidad bacteriológica de las aguas de consumo de la población de Mucuchíes, a través de la estimación del número de coliformes totales y fecales y del registro de sus parámetros físico-químicos.
2. Cultivar *H. pylori* a partir de muestras de aguas de riachuelos, tanques de abastecimiento y riego de vegetales de Mucuchíes y Misintá.
3. Detectar por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de una región específica del gen ARNr 16S del género *Helicobacter*, los genes *glmM* y *ureA* específicos de *H. pylori* y el gen *cagA* de patogenicidad en estas fuentes de aguas y/o cultivos bacterianos.
4. Determinar por Hibridización Fluorescente *in situ* (FISH) la presencia de regiones específicas de la familia *Helicobacteriaceae* y *H. pylori* y morfologías microscópicas asociadas a esta bacteria en cultivos y filtrados de las muestras de aguas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se trata de una investigación observacional descriptiva de corte transversal para determinar la presencia de *H. pylori* en muestras de agua de consumo en Mucuchíes durante el mes de Agosto 2013 y los posibles factores asociados con la adquisición de la infección.

Área de estudio y muestreo

Mucuchíes se encuentra ubicada a 48 km de la ciudad de Mérida (coordenadas 8°45' N y 70°55' O), a una altitud de 2.983 m.s.n.m., con temperaturas que varían de los 4 a 12°C y una precipitación promedio de 600 mm. Su paisaje varía entre estrechos valles longitudinales y transversales con fuertes pendientes. Tiene como principal curso de agua el río Chama, al que drenan las quebradas Misintá, La Carbonera, La Musuy, La Toma, El Vergel, El Royal y Mocaó⁴⁰.

En Agosto de 2013, se realizó un muestreo de diferentes fuentes de aguas de consumo en la población que coincidió con el período de lluvias reportado para el lugar. Un volumen de aproximadamente 1 L de agua se recolectó de las siguientes localidades:

1. Tanque principal de agua potable ubicado en el sector Misintá que abastece a la mitad de la población de Mucuchíes (capacidad 200.000 L).
2. Quebrada Los Chorros, proveniente de la Laguna del Humo. Esta quebrada llega a un tanque principal donde se origina la tubería de agua para consumo de la población de Mucuchíes.

3. Tanque de riego de cultivos en el sector Los Aposentos.
4. Tanque La Hoyada en el sector Los Aposentos que abastece de agua potable a la población del casco central de Mucuchíes (capacidad 200.000 L).
5. Quebrada Mifafí. Forma parte de la microcuenca que desemboca en el río Chama y abastece de agua a los sectores Mitivivó y Llano del Hato pertenecientes a Mucuchíes.

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo en Mucuchíes.

Sitios	Coordenadas geográficas	Altura (m.s.n.m)
1. Tanque de abastecimiento, sector Misintá	10°24'06,1''N; 66°52'51,8''O	3303
2. Quebrada Los Chorros	8°46'N; 70°56'O	3500
3. Aguas de riego, sector Los Aposentos	08°45'06,8''N; 70°56'10,5''O	2985
4. Tanque La Hoyada, sector Los Aposentos	08°45'02,7''N; 70°55'28,5''O	3011
5. Quebrada Mifafí, P.N. Sierra de La Culata	08°50'43,8''N; 70°51'43,2''O	3779

Al momento de la toma de las muestras se registraron los parámetros fisicoquímicos pH (pHep1, Hanna Instruments), temperatura y oxígeno disuelto (oxigenómetro OXDP-02, VWR) de las fuentes de aguas en estudio. Las muestras se transportaron refrigeradas en cavas con hielo hasta ser procesadas en el laboratorio.

Evaluación bacteriológica de las fuentes de aguas.

Se determinó la calidad bacteriológica de las aguas de consumo en todas las localidades estudiadas por la Técnica de Fermentación en Tubos Múltiples (TFTM), estimándose el

Número más Probable (NMP) de los indicadores coliformes totales y fecales (6). Se realizaron cinco réplicas de cuatro diluciones seriadas (100, 10, 1 y 0,1 ml) de las muestras de agua, inoculándose cada una en tubos con caldo Lauryl Sulfato (Merck) y tubos durham invertidos en su interior. Estos tubos inoculados se cultivaron a 35°C por 24-48 h. En esta fase presuntiva se registró una reacción positiva para los coliformes al observar turbidez en el medio y producción de gas. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de los tubos positivos y se inocularon en los medios confirmativos para coliformes totales (bilis verde brillante, BRILA, Merck) a 35°C por 24-48 h y después a coliformes fecales (*Escherichia coli*, EC, Merck) a 44,5°C por 24-48 h. La formación de gas en los tubos durham se consideró una respuesta positiva y confirmativa de coliformes totales y fecales. El valor del NMP se calculó con el número de tubos positivos de los caldos BRILA y EC utilizando la tabla del NMP⁵⁶.

Procesamiento de las muestras de agua para el cultivo y detección de *H. pylori*.

Se filtraron volúmenes de 250 ml de las muestras de agua de cada localidad en membranas hidrofílicas Durapore (diámetro 47 mm; tamaño de poro 0,22 µm; Millipore®) bajo condiciones de esterilidad. Las membranas fueron lavadas con 5 ml de tampón salino fosfato (PBS, por sus siglas en inglés; 0.32 M) a pH 7,2 y este volumen fue destinado para la extracción de ADN y conservado como respaldo a -80°C. Por otra parte, se filtraron por duplicado 250 ml de todas las muestras de agua en membranas de éster de celulosa (diámetro 47 mm; tamaño de poro 0,2 µm; Advantec®): una membrana fue lavada con 5 ml de PBS para el cultivo en medio HP y la otra fue fijada con paraformaldehído al 4% para FISH.

Cultivo de *H. pylori*.

Se realizó el cultivo de esta bacteria a través de un novedoso medio denominado HP que incluye factores selectivos y de enriquecimiento para su aislamiento de fuentes de aguas contaminadas³⁷. Para ello, una alícuota de 1 ml de las muestras de aguas filtradas se inoculó en 9 ml de caldo HP en atmósfera microaerofílica con la mezcla de gases 85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂, siguiendo las recomendaciones de Degnan *et al.* (2003). Adicionalmente, 100 µl se cultivaron directamente en agar HP bajo las condiciones ya descritas. Estos cultivos se incubaron por 3 a 5 días a 37°C. Preliminarmente, se observaron estos cultivos mediante tinción Gram y Microscopía óptica.

Análisis moleculares de las muestras de aguas y los cultivos bacterianos.

Extracción de ADN.

A un volumen de 1 ml de las suspensiones en PBS de los filtrados de agua (incluyendo la mitad de la membrana de filtración) se les extrajo el ADN utilizando el kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Por otra parte, un volumen de 1 ml de los cultivos bacterianos en caldo HP de 5 días de incubación fue utilizado para la extracción del ADN de acuerdo con las instrucciones del kit UltraCleanTM Microbial DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc.). Se depositaron 5 µl de ADN en un gel de agarosa-tampón tris-borato (TBE) al 2% p/v teñido con bromuro de etidio. Se realizó electroforesis a 150 V por 70 min y el rendimiento de ADN se observó por transiluminación a través de una lámpara de UV. El ADN se conservó a -20°C.

Detección por PCR de *Helicobacter* spp. y genes específicos de *H. pylori*.

Para comprobar la presencia de ADN bacteriano se realizó una PCR utilizando los cebadores 8F y 1525R que amplifican el gen 16S ARNr de eubacterias⁴¹. Para la detección del género *Helicobacter* se realizó una PCR semi-anidada que utilizó dos grupos de cebadores. En la primera reacción de PCR se utilizaron los cebadores HeliF y EpsR para amplificar un fragmento específico del orden de las Epsilonbacterias. En la segunda reacción se utilizó 2 µl del producto final de PCR de la primera reacción y los cebadores HeliF y HeliR específicos del género *Helicobacter*⁴². Posteriormente, para detectar la especie *H. pylori* se emplearon cebadores específicos que amplifican fragmentos de los genes *glmM*, *ureA* y *cagA* (Tabla 2). El gen *glmM* codifica para la enzima fosfoglucoamina mutasa que cataliza la conversión de glucosamina-6-fosfato a glucosamina-1-fosfato y es de gran especificidad como un gen único y esencial para el crecimiento de esta especie⁴³. El gen *ureA* es importante en la producción y ensamblaje de la enzima ureasa, central para el metabolismo y virulencia de *H. pylori* en la colonización de la mucosa gástrica, además de producir una fuerte respuesta inmune. El gen *cagA* se ha reportado en la detección de cepas patogénicas que presentan el antígeno asociado a citotoxina (Cytotoxin associated antigen, CagA) implicado en el riesgo de adquirir lesiones precancerosas y cáncer⁴⁴.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la detección de *Helicobacter* spp. y *H. pylori*.

Gen	Secuencia de los cebadores	Amplicón (pb)	Condiciones PCR	Referencia
ARNr 16S de eubacterias.	8Flp: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' 1525R: 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'	1517	94°C por 6 min; 30 ciclos de 94°C por 45 s, 55°C por 45 s y 72°C por 1 min; 72°C por 10 min.	Contreras <i>et al.</i> , 2007(41).
ARNr 16S de <i>Helicobacter</i>	1era PCR (Orden Epsilon bacteria) HeliF: 5'-AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA G-3' EpsilonR: 5'-TAT TCA CCG YRR CAT GGC TGA TYY R-3'	1279	94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min; 72°C por 10 min.	Germani <i>et al.</i> , 1997(42).
	2da PCR (16S <i>Helicobacter</i> spp.) HeliF: 5'-AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA G-3' HeliR: 5'-GTG CTT ATT CST NAG ATA CCG TCA T-3'	399	94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min; 72°C por 10 min.	
<i>glmM</i>	GlmMF: 5'-GGA TAA GCT TTT AGG GGT GTT AGG GG-3' GlmMR: 5'-GCT TAC TTT CTA ACA CTA ACG CGC-3'	294	94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 1 min; 72°C por 7 min.	Kansau <i>et al.</i> , 1996(43).
<i>ureA</i>	F: 5'-GCC AAT GGT AAA TTA GTT-3' R: 5'-CTC CTT AAT TGT TTT TAC-3'	411	94°C por 5 min; 32 ciclos de 94°C por 1 min; 45°C por 1 min y 72 °C por 1 min; 72°C por 1 min	Clayton <i>et al.</i> , 1992
<i>cagA</i>	F: 5'-ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA G-CGA-3' R: 5'-AGA AAC AAA AGC AAT ACG ATC ATT C-3'	128	94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 30 s; 72°C por 7 min.	Rugge <i>et al.</i> , 1999 (44).

Se incluyó como control positivo de estas reacciones ADN de una cepa clínica de *H. pylori* (facilitada por la Dra. Mónica Contreras del Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, CBB, IVIC) y como control negativo agua estéril. En el caso de la PCR

anidada se empleó en la segunda reacción agua destilada estéril como control negativo y 2 µl de los productos de PCR de los controles positivos y negativos de la primera reacción. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador modelo Gen AMP 9700 utilizando el kit Ready-To-Go PureTaq PCR (Amersham Biosciences). Los amplicones se visualizaron mediante corrida en gel de agarosa-TBE al 2,0% y tinción con bromuro de etidio, observándose por transiluminación a través de radiación UV.

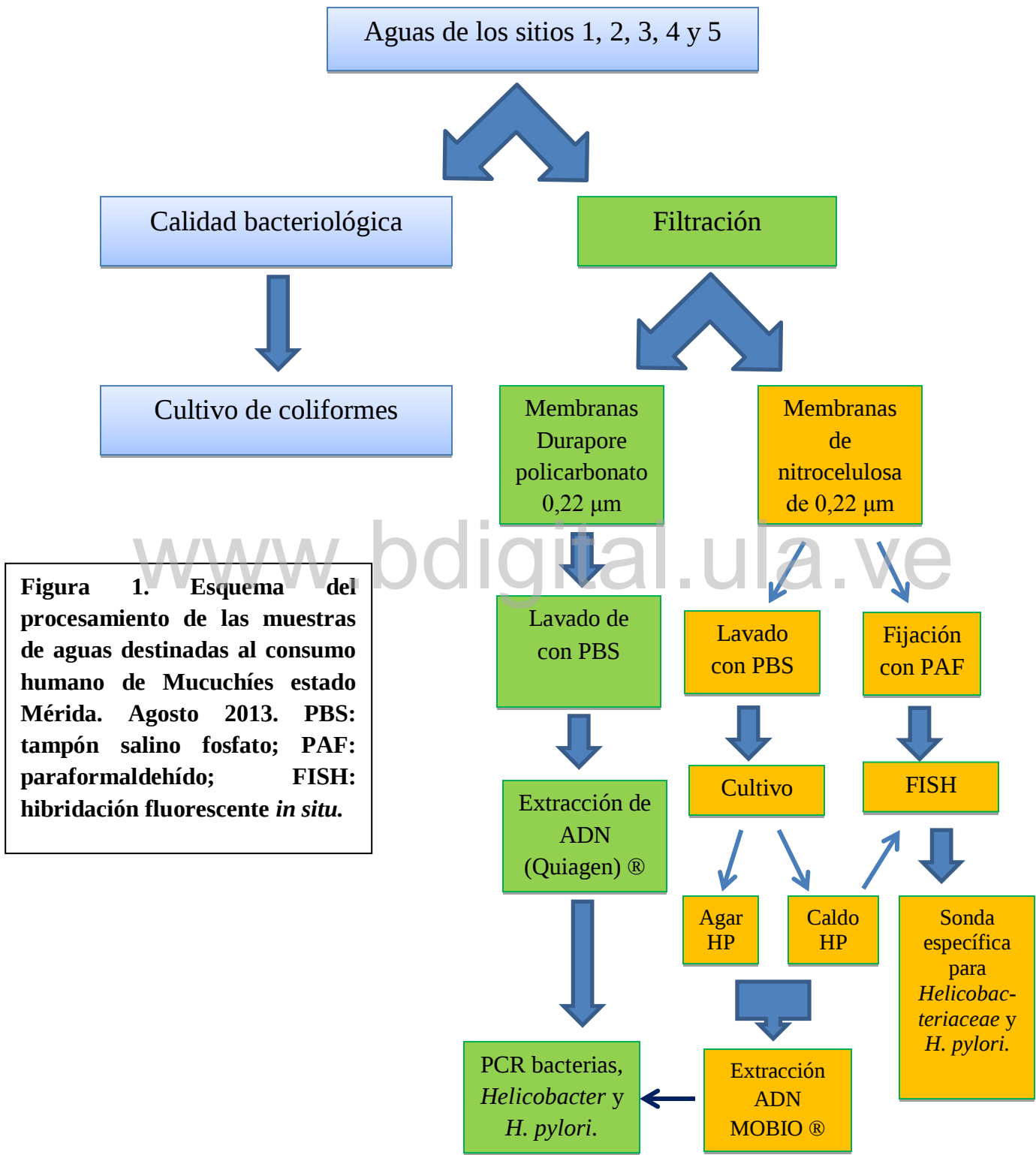
Detección de *Helicobacter* y *H. pylori* por Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).

Los análisis de FISH se realizaron siguiendo los protocolos reportados por Trebesius *et al.* (2000) y Contreras *et al.* (2012). Alícuotas de 250 µl a 1 ml de los filtrados de agua de los sitios 1.1, 2.1, 3.1, 4.1 y 5.1, así como 500 µl a 1 ml de los cultivos de agua de los sitios 1.2, 2.2, 3.2, 4.2 y 5.2 (previamente fijados en paraformaldehído al 4%) fueron utilizados como muestras para este ensayo. Adicionalmente, una cepa clínica de *H. pylori* (facilitada por la Dra. Mónica Contreras del Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, CBB, IVIC) y una cepa de *Shigella* sp. (ATCC11126) fueron usadas como controles positivo y negativo, respectivamente. Estas muestras fueron centrifugadas a 8.000 rpm por 8 min. Posteriormente, se realizó un lavado al precipitado con 500 µl de PBS y se centrifugó a 8.000 rpm por 8 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió con 50-1000 µl de PBS y 50-1000 µl de etanol absoluto según el protocolo de Samarbaf-Zadeh *et al.* (2006). Se colocó 20 µl por muestra en los 3 pozos de cada fila de la lámina y se dejó secar al aire por toda la noche. Las láminas secas se conservaron a – 20°C hasta que se realizó la hibridación.

Hibridación.

Las células fijadas en láminas portaobjeto se deshidrataron con etanol al 50%, 80% y 98% por 3 minutos cada uno. Se añadió en cada pozo 40 µl de tampón de hibridación (0,9 M NaCl; 0,02 M Tris/HCl, pH 8,0; 0,01% SDS) conteniendo 30% formamida y 5 ng/µl de las sondas en estudio (51). Se utilizaron cuatro sondas fluorescentes dirigidas al gen 16S ARNr bacteriano: la sonda EUB338 marcada con el fluoróforo Alex488N-5' para detectar todas las bacterias (fluorescencia verde), dos sondas específicas de *Helicobacter* HEL274 y HEL717 ambas marcadas con el fluoróforo Cy3-5' (fluorescencia roja) y una sonda específica de *H. pylori* Hpy-1 (fluoróforo Cy3-5') (fluorescencia roja). La hibridización se llevó a cabo en una cámara húmeda a 54°C por 2 h y luego cada pozo se lavó con tampón de lavado (112 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 8,0 y 0,01% SDS) a 56°C durante 30 min. Posteriormente, las muestras hibridadas se lavaron rápidamente con PBS, fueron secadas al aire y finalmente examinadas 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) y B2A para Alexa Fluor 488 N (filtro de excitación: 450-490 nm). Las imágenes fueron digitalizadas con una cámara Nikon Coolpix 8700. Hibridaciones positivas fueron visibles como células naranjas o rojas para *Helicobacter* o *H. pylori*.

ANEXOS



RECOLECCIÓN DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.

Se realizó la recolección de datos clínicos e higiénico-sanitarios para el estudio aportados por el jefe familiar de las viviendas seleccionadas al azar del casco central de Mucuchíes. Los resultados obtenidos se registraron en un formato Ad-Hoc y se analizaron estadísticamente.

Sistema de variables.

1. Variable principal: presencia o ausencia de *H. pylori* en aguas de consumo y riego de cultivos de la población de Mucuchíes.

2. Variables clínicas en la población encuestada:

- Síntomas gastrointestinales: presentes-ausentes.
- Antecedentes de cáncer gástrico familiar de 1er grado: presente-ausente.
- Antecedentes 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 grifo, envasada, filtrada y/o hervida.
- Ingestión de vegetales crudos: Sí-No.
- Método de desinfección de los vegetales: lavado con agua directa del grifo, lavado con agua directa del grifo y vinagre, lavado con agua hervida, ninguno.

Análisis de datos.

Se realizó un análisis univariable de los datos y los resultados de las variables cualitativas se presentaron en tablas de frecuencias absolutas y relativas o gráficos.

RESULTADOS.

Parámetros ambientales y calidad bacteriológica de las fuentes de agua de Mucuchíes.

Para la fecha del muestreo los parámetros fisicoquímicos del agua de los sitios 1, 2, 3, 4 y 5 comprendieron valores de oxígeno disuelto de 7 a 10,1mg/l, temperatura de 8 a 14,2°C y pH de 4,5 a 5,5. De acuerdo con la Normativa Venezolana para el control de la calidad de los cuerpos de agua publicada en el Decreto 883, las aguas de los sitios 1, 2, 4 y 5 corresponden a aguas del sub-tipo 1A (aguas que desde el punto de vista sanitario pueden ser acondicionadas con la sola adición de desinfectantes), cuyos valores de oxígeno disuelto deben ser mayores a 4,0 mg/l y pH en el rango de 6,0 a 8,5 ⁴⁸. Los resultados del pH evaluado en las aguas del sub-tipo 1A de este estudio se encontraron por debajo del rango permitido, mientras que los de oxígeno disuelto estuvieron dentro de los límites establecidos. Las aguas del sitio 3 corresponden a aguas para riego de vegetales destinadas al consumo humano y son clasificadas como aguas del sub-tipo 2A (aguas para riego de vegetales destinados al consumo humano). La normativa no contempla parámetros físico-químicos para este tipo de aguas³⁹; sin embargo, estos parámetros fueron evaluados en el agua del sitio 3, resultando el oxígeno disuelto inferior y el pH similar a los valores registrados en las aguas del sub-tipo 1A. Las temperaturas determinadas en todas las muestras de agua se corresponden con la altura de los sitios y las horas de muestreo para el período de lluvias.

Tabla 3. Parámetros físico-químicos del agua de los sitios evaluados en Mucuchíes.

Sitios	Oxígeno disuelto (mg/L)	pH	Temperatura (°C)
1. Tanque de abastecimiento, sector Misintá	9,5	4,5	11,8
2. Quebrada Los Chorros	9,6	5,5	8,0
3. Aguas de riego, sector Los Aposentos	7,0	5,5	14,2
4. Tanque La Hoyada, sector Los Aposentos	10,1	5,5	11,5
5. Quebrada Mifafí, P.N. Sierra de La Culata	7,2	5,0	11,0

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la calidad bacteriológica de las fuentes de aguas de Mucuchíes. Se detectó la presencia de coliformes totales y fecales en las aguas destinadas para el consumo humano (sitios 1, 2, 4 y 5) y riego de cultivos (sitio 3). Los valores de coliformes totales estimados en las muestras de agua de los sitios 1, 2, 4 y 5 y muestra de agua del sitio 3 son inferiores a los límites establecidos por el Decreto 883 para aguas del subtipo 1A (promedio mensual menor a 2000 NMP por cada 100 ml) y subtipo 2A (promedio mensual menor a 1000 NMP por cada 100 ml), respectivamente⁴⁸. Sin embargo, el NMP de coliformes fecales determinado en todas las muestras de aguas indica su contaminación con materia fecal, considerando que estos patógenos deben estar ausentes en aguas de consumo humano o de riego de vegetales.

Tabla 4. NMP de coliformes totales y fecales en fuentes de aguas de Mucuchíes.

Sitio	Coliformes totales (NMP/100 mL de muestra)	Límites de confianza (56)	Coliformes Fecales (NMP/100 ml de muestra)	Límites de confianza (56)
1. Tanque de abastecimiento, sector Misintá	11	4 – 30	8	3 – 25
2. Quebrada Los Chorros	30	10 – 120	11	4 – 30
3. Aguas de riego, sector Los Aposentos	240	100 – 940	160	60 – 530
4. Tanque La Hoyada, sector Los Aposentos	11	4 – 30	2	1 – 9
5. Quebrada Mifafí, P.N. Sierra de La Culata	9	4 – 25	5	2 – 17

Cultivo de *H. pylori* en aguas de Mucuchíes.

Se obtuvieron 10 cultivos en caldo HP de todas las muestras de agua luego de 5 días de incubación en condiciones microaerofílicas. Adicionalmente, en este período se seleccionaron 3 colonias de apariencia similar a *Helicobacter* (sitio 3.2) a partir del agar HP. La observación microscópica preliminar indicó la presencia de cultivos mixtos con morfologías de cocos y bacilos Gram positivos y Gram negativos. Estos cultivos se destinaron para la extracción de ADN y/o ensayos de PCR y FISH. En otros cultivos no se obtuvo continuidad en el crecimiento luego de repiques sucesivos.

Detección por PCR de *Helicobacter* y *H. pylori*.

La presencia de bacterias fue inicialmente detectada por PCR en todas las muestras de filtrados de agua y cultivos en caldo y agar HP seleccionados del estudio, en las cuales se encontró una banda de 1517 pb (Figura 2).

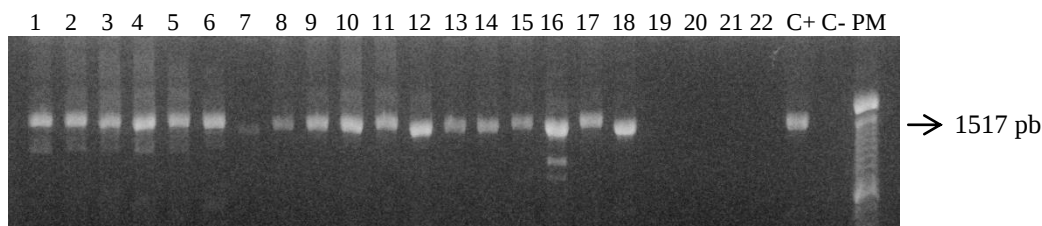


Figura 2. Amplificación del gen 16S ARNr de eubacterias en muestras de agua de Mucuchíes. Líneas 1-5: filtrados de agua de los sitios 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5. Líneas 6-15: cultivos en caldo HP de las muestras de agua con sus respectivas réplicas. Líneas 16-18: colonias A, B y C del sitio 3.2. Líneas 19-22: controles negativos kits de extracción de ADN. Línea 23: control positivo *H. pylori*. Línea 24: control negativo PCR (agua estéril). Línea 25: marcador de peso molecular de ADN.

Sin embargo, el género *Helicobacter* sólo fue amplificado por PCR semianidada en los filtrados de agua de todos los sitios y en el cultivo en caldo HP de la muestra de agua del sitio 4.2 (Figura 3)

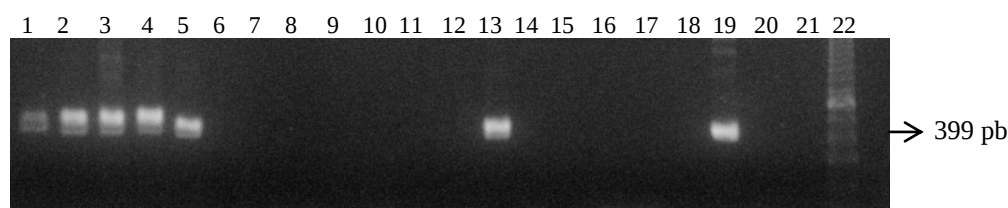


Figura 3. Amplificación de un fragmento específico del gen 16S ARNr del género *Helicobacter* en muestras de agua de Mucuchíes. Líneas 1-5: filtrados de agua de los sitios 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5. Líneas 6-15: cultivos en caldo HP de las muestras de agua con sus respectivas réplicas. Líneas 16-18: colonias A, B y C del sitio 3.2. Línea 19: control positivo *H. pylori*. Línea 20: control negativo 1era. PCR (agua estéril). Línea 21: control negativo 2da. PCR (agua estéril). Línea 22: marcador de peso molecular de ADN.

Posteriormente, se realizaron ensayos de PCR específicos para *H. pylori* sin lograr amplificar los genes *glmM*, *ureA* y *cagA* (anexos 3, 4 y 5).

Tabla 5. Detección por PCR de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* en filtrados y cultivos de aguas de Mucuchíes.

Muestras	Sitios	PCR				
		16S ARNr eubacterias	Semianidada <i>Helicobacter</i> spp.	<i>glmM</i>	<i>ureA</i>	<i>cagA</i>
Filtrados de agua	1.1 Tanque Misintá	+	+	-	-	-
	2.1 Quebrada Los Chorros	+	+	-	-	-
	3.1 Agua de riego	+	+	-	-	-
	4.1 Tanque La Hoyada	+	+	-	-	-
	5.1 Quebrada Mifafí	+	+	-	-	-
Cultivos en caldo HP	1.1 Tanque Misintá	+	-	ND	ND	ND
	1.2 Tanque Misintá	+	-	ND	ND	ND
	2.1 Quebrada Los Chorros	+	-	ND	ND	ND
	2.2 Quebrada Los Chorros	+	-	ND	ND	ND
	3.1 Agua de riego	+	-	ND	ND	ND
	3.2 Agua de riego	+	-	ND	ND	ND
	4.1 Tanque La Hoyada	+	-	ND	ND	ND
	4.2 Tanque La Hoyada	+	+	-	-	-
	5.1 Quebrada Mifafí	+	-	ND	ND	ND
Cultivos en agar HP (colonias aisladas)	5.2 Quebrada Mifafí	+	-	ND	ND	ND
	Colonia A, sitio 3.2	+	-	ND	ND	ND
	Colonia B, sitio 3.2	+	-	ND	ND	ND
	Colonia C, sitio 3.2	+	-	ND	ND	ND

ND: No determinado por resultado negativo previo de *Helicobacter* spp.

Detección por FISH de *Helicobacter* spp. y *H. pylori*.

Los ensayos de FISH confirmaron *Helicobacter* spp. en las aguas de Mucuchíes y mostraron evidencias de *H. pylori* en filtrados y cultivos de estas muestras de aguas. En la Figura 6 se presentan microfotografías de células rojas cocoides (forma más frecuentemente observada), coco-bacilares y bacilares positivas a la sonda fluorescente específica de *H. pylori*, observadas para los sitios 1 y 2 a través de microscopio confocal (A) y para los sitios 3, 4 y 5 por microscopio convencional fluorescente (B), en función de

la disponibilidad de estos equipos para la fecha del ensayo. El control positivo del ensayo mostró morfologías características de *H. pylori* y la ausencia de células en el control negativo (*Shigella* sp.) indicó la especificidad de la sonda empleada (C).

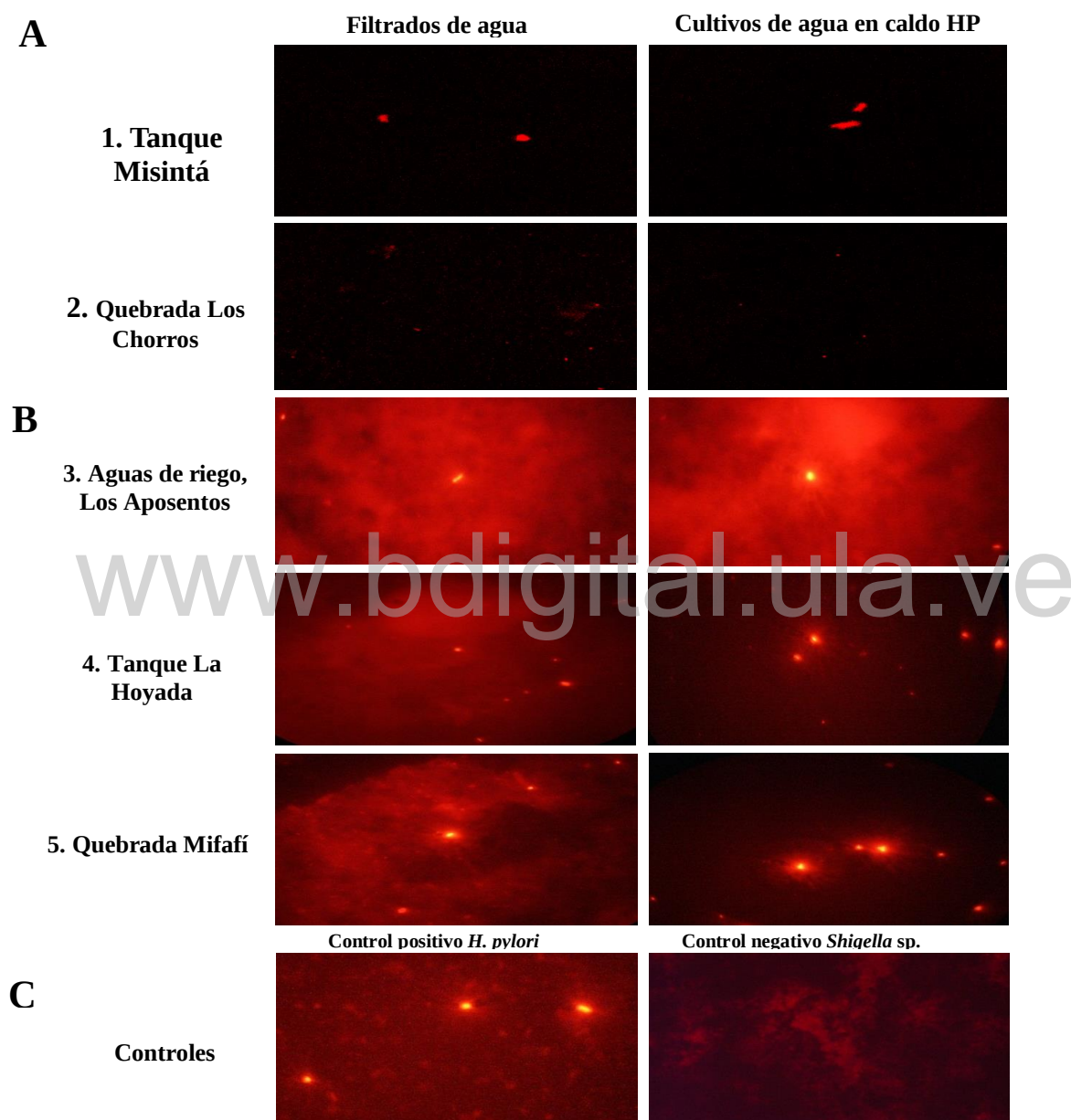


Figura 4. Detección por FISH de *H. pylori* en filtrados (imágenes de la izquierda) y cultivos (imágenes de la derecha) de aguas de Mucuchíes. Fotomicrografías tomadas con microscopio confocal en muestras de los sitios 1 y 2 (A) y con microscopio convencional de fluorescencia en los sitios 3, 4 y 5 (B). Controles positivo (cepa clínica de *H. pylori*) y negativo (*Shigella* spp. ATCC11126) (C).

Análisis de datos epidemiológicos.

Número de familias por unidad de vivienda.

El 58,5% de los hogares encuestados (41) se encuentra habitado por una sola familia, el 17,1% por dos familias y un 24,4% por más de 2 familias.

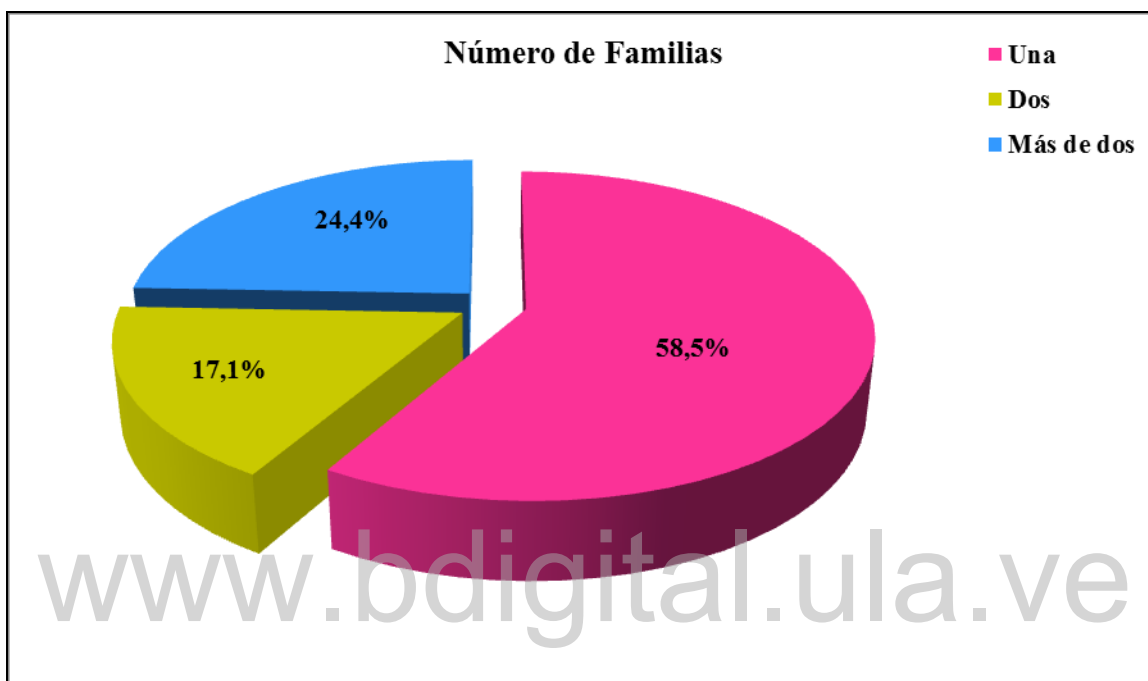
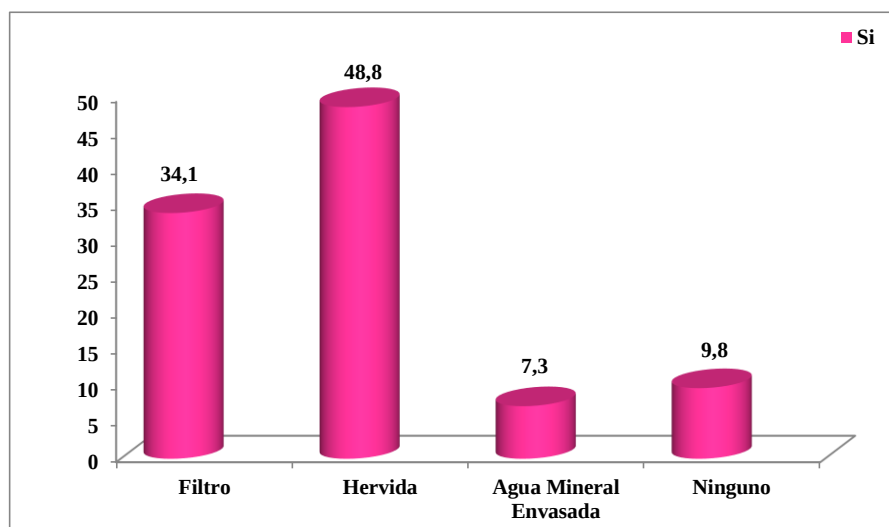


Figura 5. Número de Familias por unidad de vivienda en porcentaje de la población del casco central de Mucuchíes estado Mérida. Julio 2013.

Método de desinfección del agua.

Un 48,8% manifestó consumir agua previamente hervida, 34,1% agua sólo filtrada, 9,8% no realiza ningún método de desinfección previo al consumo y 7,3% consume agua mineral envasada.

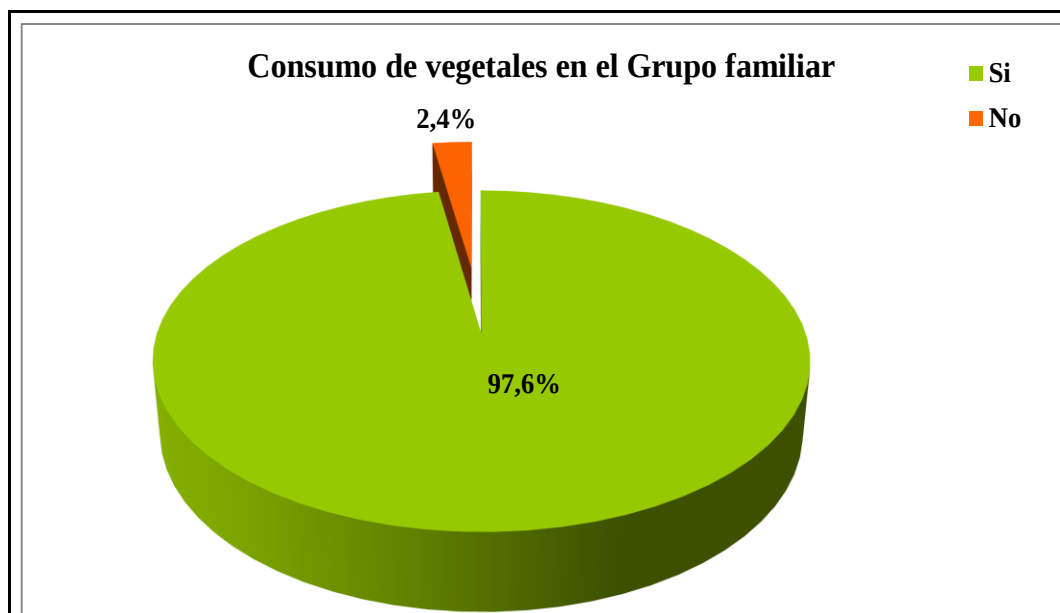


Fuente: Ficha de Recolección de Datos

Figura 6. Métodos de Desinfección del agua en porcentaje de la población del casco central de Mucuchíes estado Mérida. Julio 2013.

Consumo de vegetales en el grupo familiar.

El 97,4% respondió afirmativo al consumo de vegetales en el grupo familiar, mientras que el 2,6% respondió que no.



Fuente: Ficha de Recolección de Datos.

Figura 7. Consumo de vegetales por grupo familiar en porcentaje de la población del casco central de Mucuchíes estado Mérida. Julio 2013.

Tipo de vegetales consumidos.

Los vegetales más frecuentemente consumidos son la lechuga en un 58,5%, el tomate 39%, la zanahoria 26,8% y el repollo con 14,6% del total.

Tabla 6. Tipo de Vegetales Crudos consumidos por la población del casco central de Mucuchíes estado Mérida en frecuencia y porcentaje. Julio 2013

Tipo de Vegetales Crudos que Consumen	Si		No		Total	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Lechuga	24	58,5	17	41,5	41	100,0
Tomate	16	39,0	25	61,0	41	100,0
Zanahoria	11	26,8	30	73,2	41	100,0
Repollo	6	14,6	35	85,4	41	100,0

Fuente: Ficha de Recolección de Datos.

Método de desinfección de vegetales.

El 53% de las familias encuestadas refiere usar agua del grifo más cloro o vinagre para desinfectar los vegetales antes de consumirlos, 22% sólo agua del grifo y 19,5% agua hervida.

Tabla 7. Métodos de Desinfección de los Vegetales en frecuencia y porcentaje de la población del casco central de Mucuchíes estado Mérida. Julio 2013.

Métodos de Desinfección de los Vegetales	Si		No		Total	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Agua Directa Del Grifo	9	22,0	32	78,0	41	100,0
Agua Directa del Grifo+ Otro Agente (Cloro o Vinagre)	22	53,7	19	46,3	41	100,0
Agua Hervida	8	19,5	33	80,5	41	100,0

Fuente: Ficha de Recolección de Datos.

Presencia de síntomas digestivos en el grupo familiar.

Los síntomas más frecuentemente encontrados fueron la distensión abdominal en 29,3% de la población, pirosis en 26,8% y regurgitaciones en 2,4%.

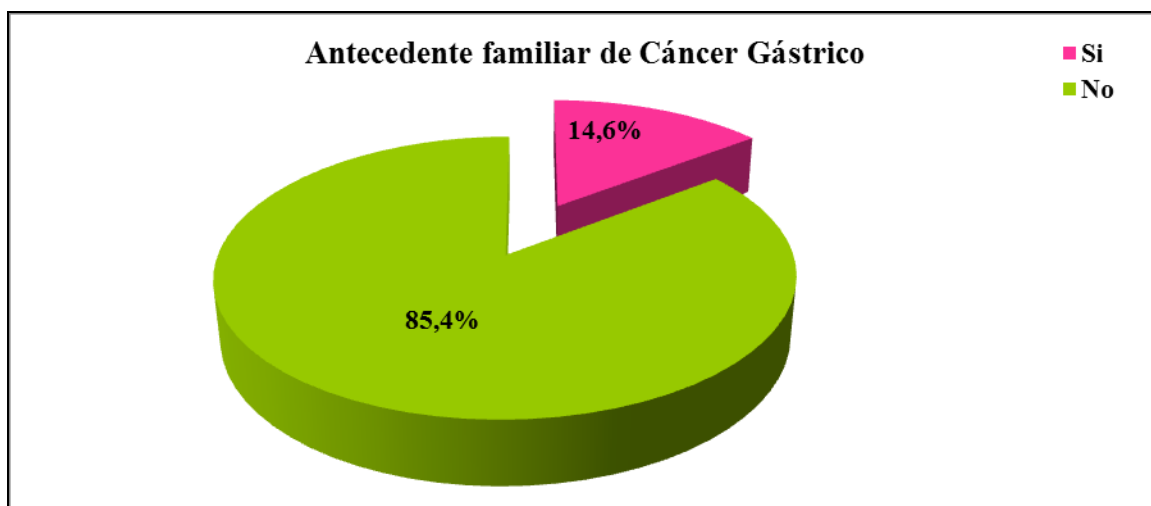
Tabla 8. Síntomas gastrointestinales presentados por el Grupo Familiar en frecuencia y porcentaje de la población del casco central de Mucuchíes estado Mérida. Julio 2013

Síntomas presentados por el Grupo Familiar	Si		No		Total	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Distensión Abdominal	13	29,3	29	70,7	41	100,0
Pirosis	11	26,8	30	73,2	41	100,0
Regurgitaciones	1	2,4	40	97,6	41	100,0

Fuente: Ficha de Recolección de Datos.

Antecedentes de cáncer gástrico.

Sólo el 14,6% de la población presentó antecedentes familiares de cáncer gástrico, mientras que 85,4% negó dicho antecedente.



Fuente: Ficha de Recolección de Datos.

Figura 8. Antecedente de Cáncer en porcentaje de la población del casco central de Mucuchíes estado Mérida. Julio 2013.

DISCUSIÓN.

Más del 50% de la población mundial se encuentra infectada por *H. pylori*. En los países en vías de desarrollo la prevalencia de esta infección puede alcanzar el 90%, convirtiéndose en un problema de salud pública^{18,41} por los altos costos que significa el tratamiento de las patologías asociadas a dicha infección: gastritis, úlcera gástrica y duodenal, linfoma MALT gástrico y su ya reconocido papel en la patogénesis del cáncer gástrico (reconocido por la OMS desde 1994 como carcinógeno tipo I)⁵.

La población de Mucuchíes no escapa a esta realidad. En estudios previos realizados por Silva *et al.* (2008) y De Faría *et al.* (2010) se encontró una incidencia de la infección por *H. pylori* de 68-75%^{33,57}. Igualmente, Villarreal (2011) encontró una tasa de re-infección del 76% en pacientes previamente tratados³¹. Por esta razón, en el presente trabajo se investigó la presencia de *H. pylori* en diferentes sistemas de agua de consumo de la población de Mucuchíes como posibles fuentes de esta infección, a través de técnicas de cultivo y moleculares descritas para la detección de este patógeno en ambientes acuáticos².

Inicialmente, no fue posible el aislamiento de *Helicobacter* de las aguas evaluadas en Mucuchíes con el uso del medio HP, a pesar de haberse obtenido en la primera evaluación colonias pequeñas sugestivas de esta bacteria que no se mantuvieron en cultivo luego de repiques sucesivos. Otras colonias presentaron morfologías microscópicas distintas a la descrita para *Helicobacter* o resultaron negativas por PCR a este género. La dificultad encontrada en este estudio para su aislamiento puede ser debido a la naturaleza incómoda de esta bacteria, la entrada a un estado viable no cultivable (VNC) como mecanismo de adaptación a las condiciones de estrés ambiental², la influencia de factores ambientales

como la temperatura del agua, la desinfección con cloro en las aguas tratadas o por la posible competencia de otros microorganismos presentes en el agua⁴⁹.

La PCR es otra de las técnicas ampliamente utilizadas para determinar la presencia de *H. pylori* en muestras de aguas^{49, 50}. En nuestra investigación se realizó PCR semi-anidada para la amplificación del gen 16S ARNr del género *Helicobacter* en los filtrados y cultivos de agua de los 5 sitios evaluados en Mucuchíes, obteniéndose resultados positivos en los filtrados de todas las muestras de aguas y sólo en un cultivo en caldo HP de agua del sitio 4 (Tanque La Hoyada). Adicionalmente, los resultados de las PCR para genes específicos de *H. pylori* fueron negativos en aquellas muestras que amplificaron para el género *Helicobacter*. Estos resultados pueden ser explicados por las siguientes razones: la baja concentración y distribución heterogénea del ADN de *H. pylori* en las muestras de aguas³⁴; los cebadores específicos de *H. pylori* han sido diseñados para muestras clínicas y en muchos casos se han reportado como incapaces para amplificar el ADN de esta bacteria a partir de muestras de aguas¹⁸. Actualmente, la PCR cuantitativa a tiempo real (Real-Time PCR) se está implementando con el uso de sondas fluorescentes como una técnica de mayor sensibilidad que la PCR convencional para la detección molecular de células no cultivables y cuantificación del patógeno en muestras ambientales¹⁰.

La técnica de FISH ha demostrado ser de mayor sensibilidad que la PCR para detectar *H. pylori* en muestras ambientales^{18, 50, 53}. En esta investigación fue posible observar por FISH distintas morfologías celulares (principalmente formas cocoides) positivas a la sonda específica de *H. pylori* en filtrados y cultivos en caldo HP de las aguas evaluadas en Mucuchíes que resultaron inicialmente negativas a esta especie por PCR, confirmando así la mayor sensibilidad del FISH para la detección de formas viables y no cultivables del

patógeno en fuentes acuáticas¹⁸. La técnica de FISH detecta ARNr y provee información sobre la viabilidad de la bacteria al mantener alto contenido de ARNr⁴⁹. Igualmente, tiene ventajas sobre la PCR como no ser inactivada por inhibidores enzimáticos, no requiere de un protocolo previo para obtener ADN bacteriano y los resultados positivos son directamente observados en la muestra, incluso la forma cocoide que no puede ser detectada a través de cultivo o de PCR. Por ello, también se considera una técnica más costo-efectiva para detectar *H. pylori* en aguas¹⁸.

La forma cocoide es la manifestación de un tipo ambiental de células robustas que puede adoptar *H. pylori* en condiciones adversas para su supervivencia, también considerada como estado VNC^{18, 53}. Se ha determinado que en este estado de latencia la bacteria mantiene activo su metabolismo y potencial infeccioso y puede retornar a su forma habitual (espiralada) al entrar en contacto con un ambiente óptimo como la mucosa gástrica^{52,53}. Esta forma celular ha sido propuesta como responsable de la transmisión ambiental del patógeno a través de las aguas^{11,18}. En todas las fuentes de agua evaluadas en Mucuchíes se encontraron predominantemente formas cocoides de *H. pylori* que pudiesen tener potencial infeccioso y ser transmitidas a la población por vía acuática.

Adicionalmente al estado VNC, es importante mencionar que para sobrevivir en los ambientes acuáticos *H. pylori* se vale de otros mecanismos como la formación de biopelículas. Éstas son comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidas en matriz de polisacáridos y se encuentran adheridas a superficies de organismos vivos o inertes. Las biopelículas aumentan la supervivencia de las bacterias haciéndolas más resistentes a las condiciones ambientales adversas, desinfectantes, antibióticos e incluso otras bacterias.^{2,54}. Distintos estudios han determinado a través de sondas fluorescentes la

presencia de *H. pylori* en sistemas de distribución de agua potable y las conclusiones de sus trabajos indican que estos sistemas le permiten a la bacteria permanecer viable y adherida a las superficies por períodos prolongados de tiempo, además de proveerle de un ambiente microaerófilico adecuado para su supervivencia y protección contra la cloración^{49, 50, 53,54}

En el presente estudio no fue posible analizar muestras de biopelículas en los dos tanques de almacenamiento de agua de consumo de la población de Mucuchíes: Tanque La Hoyada en el sector Los Aposentos y Tanque del sector de Misintá. Estos tanques almacenan 200.000 L de agua y reciben tratamiento inter-diario con cloración en una proporción de 500 g/200.000 L. A pesar de este tratamiento, es posible que *H. pylori* forme biopelículas como mecanismo de supervivencia para resistir la desinfección aplicada a estos sistemas de agua y pueda transmitirse con potencial infeccioso a la población. Se ha reportado que las técnicas habituales de optimización de la calidad del agua como la cloración, pueden ser inefectivas contra *H. pylori*. Baker *et al.* (2002) demostraron que esta bacteria es más resistente que *E. coli* a la cloración⁵⁵. Así mismo, se ha encontrado que *H. pylori* puede sobrevivir en estado VNC con dosis bajas de cloro y asociado a biopelículas⁵³. Por ello, es necesario realizar estudios posteriores que investiguen por métodos moleculares la presencia de este patógeno en biopelículas desarrolladas sobre superficies de los sistemas de distribución de agua potable en la localidad.

Finalmente, la presencia de coliformes fecales en las quebradas, aguas de riego y tanques que abastecen de agua potable a Mucuchíes indica riesgos para la población que consume estas fuentes de agua de adquirir infecciones gastrointestinales por microorganismos patógenos como *H. pylori*. Así mismo, sugiere que el tratamiento con cloro aplicado a estos tanques por la Alcaldía del Municipio Rangel no es suficiente para garantizar la salud de la población, por lo cual se recomienda limitar su uso en estas

condiciones actuales y aplicar procesos adicionales de desinfección como filtración o esterilización antes de su consumo directo.

De acuerdo a los datos epidemiológicos obtenidos en la población del casco central de Mucuchíes el 63% refiere el consumo de agua hervida lo que puede mejorar la calidad del agua antes de ser consumida. Llama la atención que el 97,6% de la población refiere ingerir vegetales crudos y más del 70% los lava con agua directa del chorro y sólo un 53,7% le aplica otro ingrediente como cloro, el cual, como se mencionó antes, no es totalmente efectivo contra el *H. pylori* y esto representa una posible fuente de infección.

Gomes y De Martini, inocularon 25 g (10^6 - 10^7 UFC/g) de una cepa de *H. pylori* a muestras de zanahorias y lechugas lavadas y previamente estériles, en condiciones especiales de temperatura e inhibición de bacterias competitivas, logrando recuperar colonias de bacterias viables a las 72 y 120 horas según el medio de cultivo utilizado, concluyendo que el consumo de vegetales crudos no se puede descartar del todo como fuente de transmisión de *H. pylori* dada la supervivencia de la bacteria así sea por tiempo limitado en los mismos⁵⁸.

En cuanto a la presencia o ausencia de síntomas digestivos, la infección por *H. pylori* se puede presentar de forma asintomática al inicio de la colonización^{32,34}, pero con igual afectación histológica y cambios que van desde la gastritis aguda hasta el cáncer gástrico el cual se diagnostica en fases avanzadas siendo los pacientes sólo susceptibles de tratamiento paliativo. En nuestra investigación los síntomas más frecuentes fueron la distensión abdominal que se puede presentar en la infección por *H. pylori* y la pirosis que se relaciona más con enfermedad por reflujo gastroesofágico.

Por otra parte sólo el 14,6% de las familias entrevistadas presentó antecedentes familiares de cáncer gástrico. Es importante tener en cuenta que en la aparición de esta patología influyen otros factores como la alimentación con alto contenido de sal, alimentos ahumados y poca ingesta de frutas asociado a la edad de adquisición de la infección por *H. pylori* ³⁰.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

1. El agua destinada para consumo humano y aguas de riego del casco central de Mucuchíes resultó positiva mediante ensayos de FISH para la infección por *H. pylori*, lo que puede convertir a la transmisión fecal-oral como la principal fuente de infección y re-infección en esta Comunidad.
2. La calidad bacteriológica de las aguas evaluadas es inadecuada no sólo para el consumo humano sino para ser utilizadas como aguas de riego, ya que exceden el número de coliformes fecales permitido por la norma venezolana para estos tipos de agua, lo que representa un factor de riesgo para la población al adquirir infecciones por el consumo del agua.
3. El cultivo de *H. pylori* a partir de muestras ambientales no fue posible a pesar de utilizar el novedoso medio HP dada la naturaleza incómoda de la bacteria que la mantiene en un estado viable o con potencial infeccioso en condiciones adecuadas pero no cultivable.
4. La Hibridización Fluorescente In Situ (FISH) presenta mayor sensibilidad y especificidad para la detección de *H. pylori* en aguas ambientales comparado con la PCR, ya que permite observar la presencia de la bacteria aún en baja densidad como suele encontrarse en el ambiente incluso en forma cocoide o estado viable no cultivable.
5. El hábito de ingerir vegetales crudos lavados con agua del grifo sola o adicionando cloro, es el hábito sanitario que más puede influir en la adquisición de la infección por *H. pylori* incluso desde edades tempranas en la población del casco central de Mucuchíes.

RECOMENDACIONES

1. Mejorar el sistema de adecuación de las aguas destinadas al consumo humano en los tanques de almacenamiento antes de su llegada a los hogares de la población de Mucuchíes, con la instalación de sistemas de filtrado en las tuberías de salida.
2. Realizar controles periódicos de calidad bacteriológica del agua para detectar fallas en los sistemas de adecuación de las aguas así como contaminación fecal y de esta forma eliminar las fuentes de dicha contaminación.
3. Estimular hábitos de higiene en la población de Mucuchíes como el consumo de agua hervida y/o previamente filtrada, así como el lavado exhaustivo de vegetales con agua hervida antes de su ingesta y explicar la importancia de realizar estas medidas para evitar la infección por *H. pylori* y otros patógenos desde edades tempranas, lo que contribuye a preservar la salud y prevenir el cáncer gástrico en la población de riesgo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Montero, V. (2009). **Enfoques ambientales en la epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori***. Revista Costarricense de Salud Pública, 18 (4): 84-93. Consultado el 11 de julio de 2013
2. Fernández M, Contreras M, García M, Michelangeli F, Suárez P. (2009). **Evidencias de la transmisión acuática de *H. pylori***. Interciencia, 33, (6): 412-17. Consultado el 13 de abril de 2013.
3. Mendall, M. y Northfield, T. (1995). **Transmission of *Helicobacter pylori* infection**. Gut 37, S1A1.
4. Farthing, M.J. (1998). ***Helicobacter pylori* infection: an overview**. British Medical Bulletin 54, 1-6.
5. Uemura N, Okamoto Sh, Yamamoto S, Matsumura N, Yamagushi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper R. (2001). ***Helicobacter pylori* infection and the development of cancer gastric**. New England Journal of Medicine. 345(11): 784-89.
6. Hunt R, Xiao S, Megraud F, Leon-Barúa R, Bazzoli F, Vaz Coelho L, Fock M, Fedail S. (2010). ***Helicobacter pylori* in developing countries**. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines.
7. Riva S de la, Muñoz-Nava S M., Sola J. (2004) **Gastric Carcinogénesis**. Revista Española de Enfermedades Digestivas. 96(4): 265-276.
8. Ahmed K S, Khan A A, Ahmed I, Tiwari S K, Habeeb A, Ahi J D, Abid Z, Ahmed N, Habibullah C. (2007). **Impact of household hygiene and water source on the prevalence and transmission of *Helicobacter pylori*: a South Indian perspective**. Singapore Medical Journal. 48 (6): 543-49.
9. Buitrago F, Rodríguez E, Carmona J. (2010). **Criterios actuales para la erradicación de *Helicobacter pylori***. FMC. 17(3):158-66.
10. Janzon A, Sjoling A, Lothigius A, Ahmed D, Qadri F, Svennerholm A.M. (2009) **Failure to detect *Helicobacter pylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive Real Time PCR Assays**. Applied Environmental Microbiology. 75(10): 3039-44.
11. Engstrand, L. (2001). ***Helicobacter* in water and waterborne routes of transmission**. Journal of Applied Microbiology. 90: 80-84.
12. Leclerc H, Schwartzbrod L. (2002). **Microbial agents associated with waterborne diseases**. Crit. Rev. Microbiol. 28: 371-409.
13. Hultén, K., Enroth, H., Nyström, T. y Engstrand, L. (1998) **Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water**. Journal in Applied Microbiology 85, 282-286.
14. Cellini, L., Del Vecchio, A., Di Candia, M., Di Campi, E., Favaro, M. y Donelli G. (2004). **Detection of free and plankton-associated *Helicobacter pylori* in seawater**. Journal of Applied Microbiology 97: 285-292.
15. Carbone, M., Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., La Camera, E., Biondo, C. y Fera, M.T. (2005). **Occurrence of *Helicobacter pylori* DNA in the coastal environment of southern Italy (Straits of Messina)**. Journal of Applied Microbiology 98: 768-774.

16. Klein, P.D., Graham, D.Y., Gaillour, A., Opekun, A.R. y O'Brian, E. (1991). **Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children.** The Lancet. 337: 1503-1506.
17. Hegarty, J.P., Dowd, M.T. y Baker, K.H. (1999). **Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States.** Journal of Applied Microbiology. 87: 697-701.
18. Moreno Y., Ferrus M.A., Alonso J., Jimenez A., Hernández J. (2003). **Use of fluorescent *in situ* hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water.** Water Research. 37: 2251-2256.
19. Park, S.R., Mackay, W.G. y Reid, D.C. (2001) ***Helicobacter* sp. recovered from drinking water biopelícula sampled from a water distribution system.** Water Research. 35: 1624-1626.
20. Bunn, J., MacKay, W., Thomas, J., Reid, D. y Weaver, L. (2002) **Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biopelículas: implications for transmission in early life.** Letters in Applied Microbiology. 34: 450-454.
21. Lu, Y., Redlinger, T.E., Avitia, R., Galindo, A. y Goodman, K. **Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater.** (2002) Applied and Environmental Microbiology. 68: 1436-1439.
22. Queralt, N., Barratolomé, R. y Araujo, R. (2005) **Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain.** Journal of Applied Microbiology. 98: 889-895.
23. Ramírez A., Sánchez R. **Contribución de Latinoamérica al estudio del *Helicobacter pylori*.** (2009) Acta Gastroenterol Latinoam. 39(3): 197- 218.
24. Gutiérrez B, Vidal T, Valmaña C, Camou C. (2006). **Infección por *Helicobacter pylori* en Santo Domingo, República Dominicana.** Rev Cubana Invest Biomed. 25(4).
25. Gemmato A.M., Casanova G, García M, Noboa D, Parlapiano D, Martínez D. (2005). **Relación entre infección por *Helicobacter pylori* y lesiones preneoplásicas gástricas.** Revista GEN. 59 (2): 93-98.
26. Alonso A., Avendaño M. **Conglomerados de cáncer gástrico en el estado Mérida. Venezuela.** Interciencia sep 2009; 34(9): 617-622.
27. De Sousa L., Vásquez L., Velazco J., Parlapiano D. (2004). **Características clínicas de la infección por *H. pylori* en una población de los Andes venezolanos.** Revista de la facultad de farmacia, Universidad de Los Andes. 46 (2).
28. Domínguez-Bello, M.G., Beker, B., Guelrud, M., Vivas, J., Peraza, S., Perez, M.E. y Pericchi, L.R. (2002) **Short report: Socioeconomic and Seasonal variations of *Helicobacter pylori* infection in patients in Venezuela.** American Journal of Tropical and Medical Hygiene 66, 49-51.
29. Albarracín Z., Casanova G., García M. (2009). **Comparación de la eficacia de dos terapias para la erradicación del *Helicobacter pylori* en Mucuchíes, estado Mérida.** Post grado de Gastroenterología-Universidad de los Andes.
30. Flores Y., Casanova G. (2009). **Características clínico-epidemiológicas de la infección por *Helicobacter pylori* en la población de Mucuchíes estado Mérida.** Post grado de Gastroenterología-Universidad de los Andes.

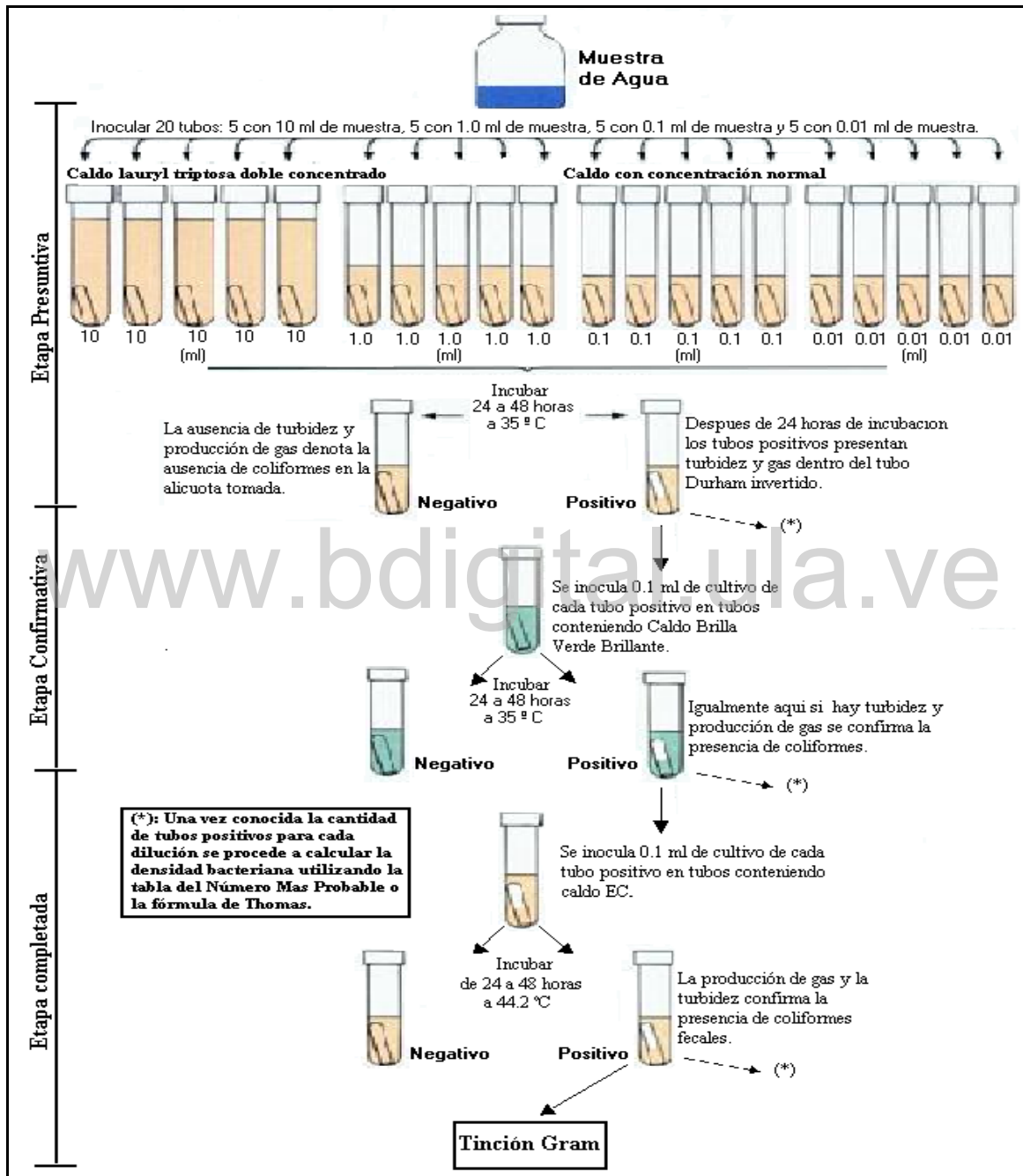
31. Villarreal L. (2011). **Tasas de reinfección de *Helicobacter pylori*, hallazgos endoscópicos e histopatológicos posterior a una terapia de erradicación efectiva. Mucuchíes-Estado Mérida.** Post grado de Gastroenterología Universidad de Los Andes.
32. Puigdengolas A, Cuberas M., Mascort R. (2011) ***Helicobacter pylori*: detección, tratamiento y valoración de la erradicación.** FMC. 18(3):142-145.
33. Silva R., Casanova G., Albarracín Z., García M., Torres R. (2012) **Prueba del aliento y hallazgos histopatológicos asociados a la infección por *Helicobacter pylori*.** Revista Gen 66(2): 93-99.
34. Baker Katherine, Hegarty Jhon. (2001). **Presence of *Helicobacter pylori* in Drinking Water is Associated with Clinical Infection.** Scand J Infect Dis; 33: 744–746.
35. Voytek M., Ashen J., Fogarty L., Kirshtein J., Landa E. (2005) **Detection of *Helicobacter pylori* and fecal indicator bacteria in five North American rivers.** Journal of Water and Health. 3, 405-422.
36. Nayak A.K., Rose J.B. (2007) **Detection of *Helicobacter pylori* in sewage and water using a new quantitative PCR method with SYBR® green.** Journal of Applied Microbiology. 103, 1931-1941.
37. Degan, A., Sonzogni, W., Standridge, J. (2003) **Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples.** Applied and Environmental Microbiology. 69, 2914-2918.
38. Al-Sulami A., Al-Edani T., Al-Abdula A. (2012). **Culture method and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in drinking water in Basrah Governorate Iraq.** Gastroenterology research and practice. 2012
39. Ramírez P., Vera G. (2012). **Presencia de *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y vegetales de cultivo. Mucuchíes, municipio Rangel estado Mérida. Venezuela 2012.** Post grado de Gastroenterología. Universidad de Los Andes.
40. Infante Angelxa. (2008) **Lugar del frio: propuesta para un turismo ecológico en la comunidad de Mucuchíes estado Mérida.** Trabajo especial de grado. Colegio Universitario Hotel Escuela. Mérida.
41. Contreras, M., Morales A, Garcia Amado M.A., De Vera M, Bermudez V, Gueneau P. (2007). **Detection of *Helicobacter*-like DNA in the gastric mucosa of Thoroughbred horses.** Letters in Applied Microbiology. 45, 553–557.
42. Germani, Y., Dauga, C., Duval, P., Huerre, M., Levy, M., Pialoux, G., Sansonetti, P., Grimont, P.A. (1997) **Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy.** Research in Microbiology 148, 315-326.
43. Kansau, I., Raymond, J., Bingen, E., Courcoux, P., Kalach, N., Bergeret, M., Braimi, N., Dupont, C., Labigne, A. (1996). **Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique.** Research in Microbiology. 147, 661-669.
44. Rugge, M., Bussato, G., Cassaro, M., Shiao, Y., Russo, V., Leandro, G., Avellini, C., Fabiano, A., Sidoni, A., Covacci, A. (1999) **Patients younger than 40 years with gastric carcinoma.** Cancer. 85, 2506-2511.

45. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, Kist M.(2000) **Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation.** Gut; 608-614.
46. Contreras M, Salazar V, García-Amado MA, Reyes N, Aparcero M, Silva O, Castro D, Romero R. **High frequency of *Helicobacter pylori* in the esophageal mucosa of dyspeptic patients and its possible association with histopathological alterations.** International journal of infectious diseases. (2012); 16 (5): 364-370.
47. 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*.** Med. Sci.Monit. 12, 426-430.
48. Decreto 883. **Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos.** Gaceta Oficial 5021. Caracas 1995.
49. Giao M, Azevedo N, Wilks S, Vieira M, Keevil C. (2008) **Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking-water biofilms.** Applied Environmental Microbiology. 74 (19): 5898–5904.
50. Braganca S, Azevedo N, Simoes L.C., Keevil C, Vieira M. (2007) **Use of fluorescent in situ hibridisation for the visualization of *Helicobacter pylori* in real drinking water biofilms.** Water Science and Technology. 55(8): 387-393.
51. Hegarty, J.P., Dowd, M.T. y Baker, K.H. (1999) **Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States.** Journal of Applied Microbiology 87, 697-701.
52. Adams B.L., Bates T.C, Oliver J.D. (2003). **Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment.** Applied Environmental Microbiology. 69(12): 7462-7466.
53. Giao M, Azevedo N, Wilks S, Vieira M, Keevil C. (2010) **Effect of chlorine on incorporation of *Helicobacter pylori* into drinking water biofilms.** Appl. Environ. Microbiol. 76(5): 1669-1673.
54. Simoes M, Simoes L, Vieira M. (2010) **A review of current and emergent biofilm control strategies.** Food Science and Technology. 43, 573–583.
55. Baker K.H., Hegarty J.P., Redmond B., Reed N.A., Herson D.S. (2002) **Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*.** Applied Environmental Microbiology. 68(2):981-984.
56. American Public Health Association (APHA) (1995). **Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. 19^a edición.** Washington DC, Secciones 9221 y 9230:44-51, 70-72.
57. Faría A De, Casanova G, Milano M, Torres A. (2012). **Relación entre Histología y Prueba de Aliento Cuantitativa en Gastritis Folicular (*Helicobacter pylori*), Mucuchíes-Mérida.** Revista GEN; 66(3): 166-170.
58. Gomes B, De Martinis E. (2004). **Fate of *Helicobacter pylori* artificially inoculated in lettuce and carrot samples.** Brazilian Journal of Microbiology; 35: 145-150.

ANEXOS

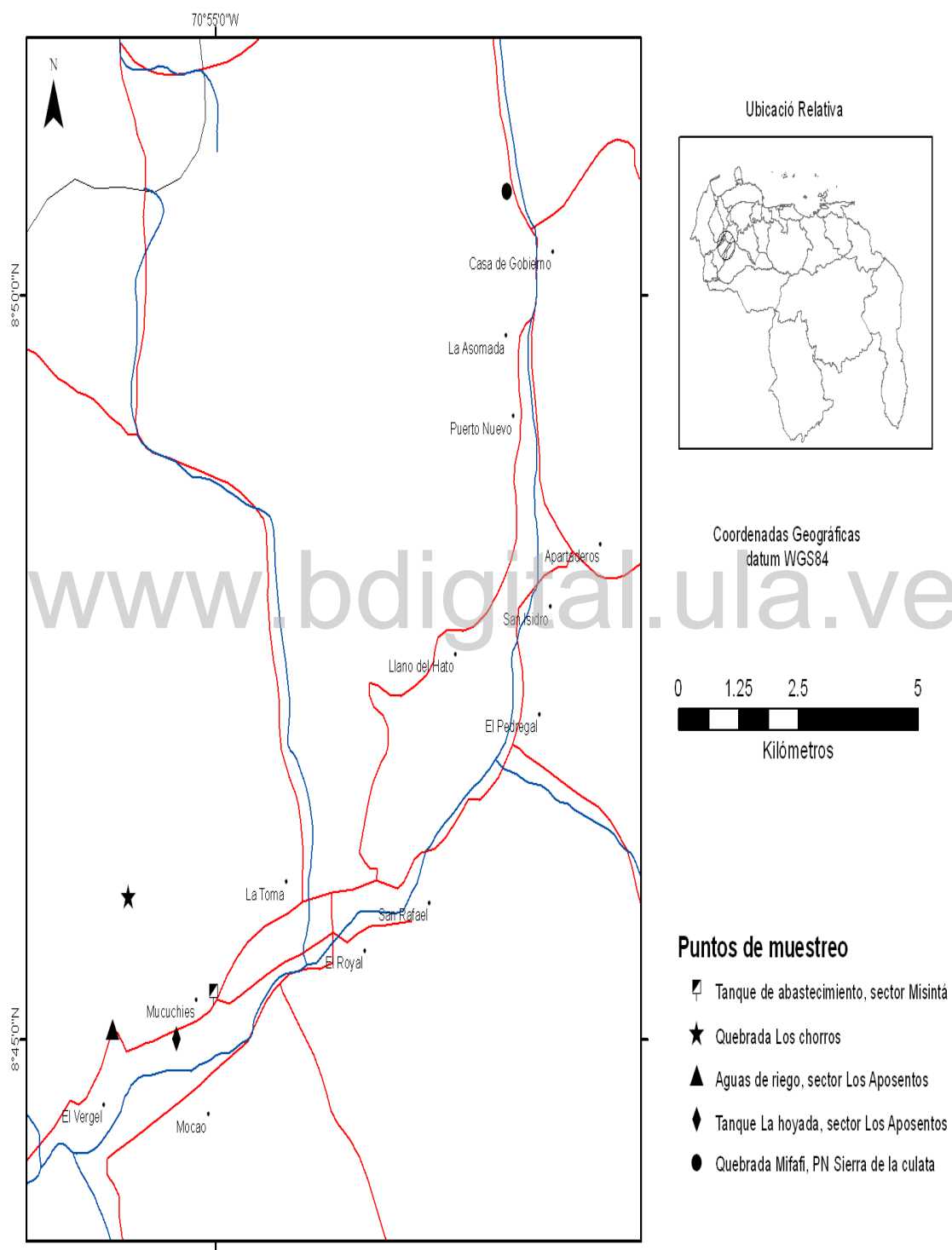
Anexo 1. Técnica de Fermentación en Tubos Múltiples (TFTM).

TFTM para coliformes totales y fecales.

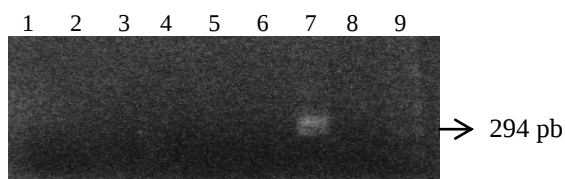


Fuente: Paolucci, 2004

Anexo 2. Mapa de la población de Mucuchíes estado Mérida especificando los sitios de toma de muestras de agua.



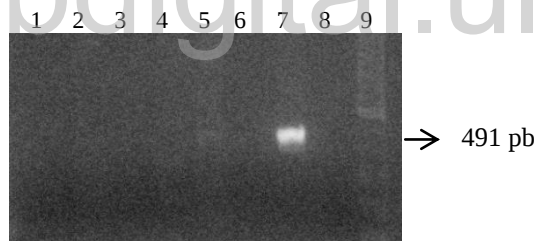
Anexo 3. Amplificación del gen *glmM* específico de *H. pylori* en muestras de agua de Mucuchíes estado Mérida. Agosto 2013.



Líneas 1-5: filtrados de agua de los sitios 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5. Línea 6: cultivo de agua réplica 4.2. Línea 7: control positivo *H. pylori*. Línea 8: control negativo PCR (agua estéril). Línea 9: marcador de peso molecular de ADN.

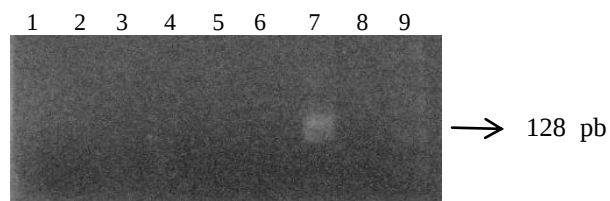
Anexo 4. Amplificación del gen *ureA* específico de *H. pylori* en muestras de agua de Mucuchíes estado Mérida. Agosto 2013.

www.bdigital.ula.ve



Líneas 1-5: filtrados de agua de los sitios 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5. Línea 6: cultivo de agua réplica 4.2. Línea 7: control positivo *H. pylori*. Línea 8: control negativo PCR (agua estéril). Línea 9: marcador de peso molecular de ADN.

Anexo 5. Amplificación del gen *cagA* específico de *H. pylori* en muestras de agua de Mucuchíes estado Mérida. Agosto 2013.



Líneas 1-5: filtrados de agua de los sitios 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5. Línea 6: cultivo de agua réplica 4.2. Línea 7: control positivo *H. pylori*. Línea 8: control negativo PCR (agua estéril). Línea 9: marcador de peso molecular de ADN.

www.bdigital.ula.ve

Anexo 6. 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 **“DETECCIÓN DE *Helicobacter pylori* EN AGUAS DE CONSUMO HUMANO DE MUCUCHÍES, MUNICIPIO RANGEL, ESTADO MÉRIDA”**.

Se me ha explicado que se me realizara un cuestionario sobre las condiciones de la vivienda, así como de los servicios presentes en la misma.

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 fe que mi participación es voluntaria. Así mismo entiendo que recibiré una copia de este formato de consentimiento informado por escrito.

NOMBRES Y APELLIDOS DEL PACIENTE

FECHA

FIRMA

NOMBRES Y APELLIDOS DE TESTIGO

FECHA

FIRMA

NOMBRES Y APELLIDOS DEL INVESTIGADOR

FECHA

FIRMA

Anexo 7. Formato de Recolección de Datos.

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES – UNIDAD DE GASTROENTEROLOGÍA.

FECHA: _____

Casa #:

Dirección _____

Número de Teléfono _____

I. Datos del Jefe del Grupo Familiar

Nombres y apellidos _____

II. Tipo de vivienda

Quinta

--

Casa o apartamento

--

Anexo de casa

--

Casa de barrio

--

Rancho

--

III. Número de familias en la vivienda

Una

--

Dos

--

Más de dos

--

IV. Servicios presentes en el hogar

Nevera

--

Cocina

--

Baño

--

V. El agua es suministrada a través de

Acueducto

--

Chorro común

--

Cisterna

--

Otro

--

VI. Medidas Higiénico-sanitarias:

Métodos de desinfección del agua:

Filtro _____

Agua hervida _____

Directo del tubo _____

Agua mineral envasada _____

Ingiera vegetales el grupo familiar: Si _____ No _____

Vegetales Crudos: Si _____ No _____ Cuáles? _____

Método de desinfección de vegetales crudos:

Ninguno _____

Agua directa del tubo _____

Agua directa del tubo + Otro agente (Cloro o vinagre) _____

Agua Hervida _____

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

Sí _____ Cuántos: _____ No _____

¿Por qué?

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

Sí _____ No _____

¿Recibió tratamiento?: Sí _____ No _____

¿Hay antecedentes de Cáncer Gástrico en la familia?

Sí _____ No _____

Parentesco _____

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

Náuseas _____ Regurgitación _____ Pirosis _____

Vómitos _____ Dolor _____ Distensión abdominal _____

Eructos _____ Anorexia: _____ Pérdida de peso _____
