

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

“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”.

Autora:

Dra. Silvia Rojas
Médico Residente de III año
Postgrado de Gastroenterología.

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

Cotutor: Prof. Gerardo A. Casanova A. (ULA).

Asesor Metodológico: Msc. Víctor Salazar (IVIC)

Mérida, Octubre de 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”.

Bdigital.ula.ve

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO POR LA MEDICO CIRUJANO SILVIA ROSSANA ROJAS GOMEZ C.I. 17.521.457, ANTE EL CONSEJO DE FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, COMO CREDENCIAL DE MERITO PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN GASTROENTEROLOGÍA.

C.C.Reconocimiento

AUTOR:

SILVIA R. ROJAS G.

MÉDICO CIRUJANO

RESIDENTE DE 3ER AÑO DE POSTGRADO DE GASTROENTEROLOGÍA

TUTOR:

MILAGRO FERNÁNDEZ D., PH.D.

INVESTIGADOR ASOCIADO.

LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA GASTROINTESTINAL (CENTRO DE BIOFÍSICA Y BIOQUÍMICA). DIRECCIÓN ACTUAL: LABORATORIO DE MATERIALES (CENTRO DE INGENIERÍA DE MATERIALES Y NANOTECNOLOGÍA). INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS. MIRANDA - VENEZUELA.

COTUTOR:

GERARDO CASANOVA

MÉDICO ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA Y GASTROENTEROLOGÍA.

PROFESOR TITULAR (JUBILADO ACTIVO) DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES. MERIDA - VENEZUELA

ASESORES:

VICTOR SALAZAR

MSc. LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA GASTROINTESTINAL (CENTRO DE BIOFÍSICA Y BIOQUÍMICA). DIRECCIÓN ACTUAL: LABORATORIO DE MATERIALES (CENTRO DE INGENIERÍA DE MATERIALES Y NANOTECNOLOGÍA). INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS. MIRANDA - VENEZUELA.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios y la Virgen por ser la luz que guía mi vida.
- Al Dr. Gerardo Casanova tutor y fundador del postgrado, GRACIAS por los conocimientos impartidos y permitirnos crecer como profesionales en este gran postgrado.
- A la Dra. Milagro Fernández pilar fundamental en la realización de este TEG, MIL GRACIAS por la paciencia, ayuda y el apoyo recibido.
- Al MSc. Víctor Salazar, por el apoyo incondicional recibido desde el inicio de este TEG.
- Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y su personal, por su cálida receptividad y haberme permitido realizar mi TEG con todo su equipo material y humano profesional.
- A todo el personal que hace vida en el Postgrado de Gastroenterología de la Universidad de los Andes (HULA), por la formación académica y personal, así como el apoyo recibido GRACIAS.
- A mi Madre pilar fundamental de mi vida, GRACIAS por tanto amor y sacrificio
- A Cesar Angulo por estar siempre presente, en los triunfos y las derrotas.
- A mi Familia por siempre creer en mí.
- A los habitantes de la Comunidad Renacer y Santa Eduvigis por la colaboración prestada en este estudio.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Introducción	1
Marco teórico	3
Antecedentes	10
Objetivos	12
Materiales y Métodos	
Área de Estudio	13
Población de Estudio	13
Recolección de datos epidemiológicos	14
Muestreo	15
Procesamiento de muestras de heces y agua para detección de <i>H. pylori</i>	17
Detección cuantitativa de antígenos fecales de <i>H. pylori</i> en voluntarios de Mucuchies	18
Detección cuantitativa de <i>H. pylori</i> por Hibridación fluorescente <i>in situ</i> en filtrado de agua	19
Análisis de agroquímicos en muestras de aguas	22
Análisis estadístico	23
Resultados	24
Discusión	43
Conclusiones	48
Recomendaciones	49
Referencias Bibliográficas	51
Anexos	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo de Mucuchíes	17
Tabla 2. Concentración de antígenos fecales de <i>H. pylori</i> determinada en los individuos de las comunidades de Santa Eduvigis y Renacer	25
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos del agua en los sitios de muestreo	31
Tabla 4. Contaje de células totales y eubacterias	33
Tabla 5. Variables del estudio que presentaron correlación de Pearson	41

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa con sitios de muestreo de aguas. Mucuchies estado Mérida	16
Figura 2. Curva de calibración de antígenos fecales de <i>H. pylori</i>	24
Figura 3. Distribución por género	27
Figura 4. Distribución por edad	27
Figura 5. Individuos sintomáticos con infección por <i>H. pylori</i>	28
Figura 6. Síntomas en pacientes con infección por <i>H. pylori</i>	28
Figura 7. Método de desinfección de agua empleada por habitantes de Santa Eduvigés y Renacer	29
Figura 8. Método de desinfección de vegetales empleada por habitantes de Santa Eduvigés y Renacer	29
Figura 9. Antecedente de cáncer gástrico en familiares de Renacer y Santa Eduvigés	30
Figura 10. Imágenes representativas de microscopia de fluorescencia correspondiente a los filtrados de agua de Mucuchíes	32
Figura 11. Control positivo y negativo	34
Figura 12. Curva de calibración que presenta los niveles de concentración y absorbancia para el pesticida Bifentrina	35
Figura 13. Curva de calibración que presenta los niveles de concentración y absorbancia para el pesticida Clorpirifos	35
Figura 14. Curva de calibración que presenta los niveles de concentración y absorbancia para el pesticida Famoxadone	36
Figura 15. Curva de calibración que presenta los niveles de concentración y absorbancia para el pesticida Cimoxanil	36

Figura 16. Cromatografía del producto Equation Pro	37
Figura 17. Cromatografía del producto Lorsban	37
Figura 18. Cromatografía del producto Brigadier	38
Figura 19. Cromatografía de muestra de agua del Tanque la Hoyada	38
Figura 20. Cromatografía de muestra de agua del Tanque Renacer	39
Figura 21. Cromatografía de muestra de agua del Tanque La Toma	39
Figura 22. Análisis de conglomerados o “Cluster”	42
Anexo 1. Consentimiento informado	60
Anexo 2. Formato de recolección de datos	61
Anexo 3. Concentraciones, longitud de onda y parámetros determinados por HPLC-DAD en patrones de agroquímicos	62
Anexo 4. Concentraciones, longitud de onda y parámetros determinados por HPLC-DAD en muestras de aguas de Mucuchíes.	63

RESUMEN

Introducción: El *Helicobacter pylori* es un microorganismo que infecta el estómago humano y se asocia con patologías gastroduodenales benignas y malignas como linfoma MALT y el ADC gástrico. Estudios han demostrado la importancia del agua como fuente de transmisión principalmente en países subdesarrollados como Venezuela donde se describe una prevalencia del 60%. En nuestra área de estudio fue superior al 75%.

Objetivos: Evaluar la asociación entre la infección por *H. pylori* y síntomas gástricos con la presencia de agroquímicos en fuentes de agua de consumo de la población de Mucuchíes.

Materiales y métodos: Se determinó la presencia de *H. pylori* por el test cuantitativo de antígenos fecales en voluntarios de las comunidades Renacer y Santa Eduvigés. La bacteria y la isla de patogenicidad CagA fueron detectadas y cuantificadas en muestras de aguas de la localidad mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) e Inmunohistoquímica. Por otra parte, la presencia de agroquímicos en estas muestras de agua fue evaluada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Resultados: Se identificó la infección por *H. pylori* en 53 de 71 habitantes con una prevalencia del 74,65%. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la concentración de antígenos fecales de *H. pylori* en voluntarios de Mucuchíes con la determinación de esta bacteria y CagA en fuentes de aguas. No se pudo evaluar su asociación con agroquímicos en vista de la ausencia de los mismos en las muestras de agua evaluadas.

Conclusión: La técnica FISH permitió la detección precisa de *H. pylori* en muestras de aguas de Mucuchíes, así como la Inmunohistoquímica para la isla de patogenicidad CagA. El agua representa una de las principales vías de transmisión de *H. pylori* en la localidad de

Mucuchíes, en base a la correlación positiva encontrada entre la infección y el consumo de agua sin tratamiento. Los síntomas gástricos prevalecieron en los pacientes infectados. No se logró determinar niveles de agroquímicos estudiados en las aguas de esta localidad.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, antígenos fecales, CagA, FISH, Inmunohistoquímica, agroquímicos.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

ABSTRACT

Introduction: *Helicobacter pylori* is a microorganism which infects the human stomach and is associated with benign and malignant gastroduodenal diseases such as gastric MALT lymphoma and ADC. Studies have shown the importance of water as a source of transmission, mainly in developing countries. For instance, in Venezuela is reported a prevalence around 60%. In our study area it was above 75%.

Objectives: To evaluate the association between the infection by *H. pylori* and gastric symptoms with the presence of agrochemicals in water sources of human consumption in Mucuchíes population.

Materials and methods: the presence of *H. pylori* was determined by the quantitative test of fecal antigens in voluntars of Renacer and Santa Eduvigis communities. The bacterium as well as the pathogenic island CagA were detected and quantified in water samples of the locality by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and Immunohistochemistry. By other side, the presence of agrochemicals was analyzed in the water samples by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results: *H. pylori* infection was identified in 53 from 71 habitants of Mucuchíes with a prevalence of 74,65%. A statistically significant association was found between the concentration of *H. pylori* fecal antigens in volunteers from Mucuchíes and *H. pylori* and CagA concentrations in water samples. However, it was not possible to evaluate their association with agrochemicals in view of their absence in the evaluated water samples.

Conclusion: FISH allowed the accurate detection of *H. pylori* in water samples of Mucuchíes, as well as the Immunohistochemistry for the pathogenic island CagA. Water could represent one of the main routes of *H. pylori* transmission in the locality, based on the positive correlation found between the infection and the water consumption without

treatment. Gastric symptoms in infected patients prevailed. It was not possible to determine levels of agrochemicals studied in the waters of this town.

Keywords: *Helicobacter pylori*, fecal antigens, CagA, FISH, Immunohistochemistry, agrochemicals.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

INTRODUCCIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) afecta aproximadamente el 50% de la población mundial y en países latinoamericanos se describe una cifra de infección hasta el 90%.¹ En Venezuela existe una alta prevalencia de infección por *H. pylori*, particularmente en la población de Mucuchíes del Estado Mérida, donde estudios previos han determinado una prevalencia del 75% de infección asociada al consumo de agua potable. Se registra también una alta incidencia de cáncer gástrico.^{1,2,3,4}

Los agroquímicos son sustancias que se producen sintéticamente, encaminadas a disminuir, controlar o erradicar una plaga o cualquier organismo patógeno de una planta o cultivo.⁵ La introducción de agroquímicos en Latinoamérica data desde el año 1945 cuando en México, se implementó un modelo agrícola industrial basado en el uso intensivo y extensivo de productos químicos sintéticos.⁶ El impacto de este modelo sobre la producción mundial de alimentos es innegable, en cuanto a que produjo un gran incremento de los rendimientos agrícolas y como consecuencia una disminución del hambre y la pobreza en el mundo. Sin embargo, los efectos negativos ambientales y en la salud, siempre han estado presentes.⁷

Mérida es uno de los principales estados productores de papa y ajo a nivel nacional. En la zona del Municipio Rangel se ha reportado la infección de estos rubros por la polilla guatemalteca en la papa y el hongo *Sclerotium cepirovum* en el ajo, los cuales representan las plagas de mayor preocupación para campesinos y pequeños productores de la localidad.⁶ La producción de estos rubros es monitorizada constantemente por los organismos gubernamentales con el fin de que los productores cumplan las regulaciones establecidas en la Ley de Salud Agrícola Integral.⁸ Sin embargo, es conocido que no todos cumplen las regulaciones, sobre todo en el tema del uso abusivo de los agroquímicos en la

producción de papa y ajo, lo cual causa preocupación a los pobladores, ya que pueden generar contaminación silente en el agua de consumo.⁷

Siendo un problema de salud pública la elevada incidencia de infección por *H. pylori*, la contaminación bacteriológica de las aguas potables y sistemas de riego, así como la preocupación de la comunidad por la contaminación de las aguas con agroquímicos, se plantea realizar un estudio observacional transversal con el fin de evaluar la infección por *H. pylori* y síntomas gástricos en la población de Mucuchíes y establecer su posible asociación con la presencia de agroquímicos usados para el control de la polilla guatemalteca de la papa y el hongo *S. cepirovum* en el ajo en diferentes cuerpos de agua usados para el consumo humano.

Estos datos servirán de base para identificar los riesgos a la salud que presenta esta población en exposición a contaminación química y bacteriológica del agua potable, así como permitirán optimizar el tratamiento de aguas de consumo humano y la aplicación de las regulaciones establecidas en la Ley de Salud Agrícola Integral para el uso de agroquímicos.

MARCO TEÓRICO

1. Prevalencia de la infección y diagnóstico de *H. pylori*.

El *H. pylori* es una de las infecciones bacterianas más comunes en humanos. Esta bacteria coloniza el epitelio gástrico debido a diversos mecanismos patogénicos. La producción de ureasa es uno de los más importantes y sirve como tampón para neutralizar el medio ácido del estómago, por medio de la producción de amonio que condicionará un daño directo por efecto tóxico sobre el epitelio.⁹ Sin embargo, se ha establecido que la virulencia de *H. pylori* está relacionada principalmente con la presencia del gen *CagA* encontrado en el 60% de las cepas circulantes en los países en desarrollo.^{10,11} En Venezuela, se han reportado cifras elevadas de infección por *H. pylori* que alcanzan 62% en sujetos asintomáticos, 90% en pacientes con gastritis y úlcera duodenal y 20% en pacientes con cáncer gástrico.^{12,13} En Mérida, se señalan cifras de 67% en la población general, que aumentan a 81% en pacientes con patologías gástricas, mientras que en el Municipio Rangel (Mucuchíes) se ha reportado una prevalencia del 75% de infección por *H. pylori* en la población adulta.¹⁴

Dentro de las vías de transmisión de esta infección se describen: fecal-oral, oral-oral, gástrica – oral¹⁵, endoscópica y la transmisión por vía acuática,^{16,17,18} siendo los principales factores de riesgo para su adquisición el hacinamiento y el bajo nivel socioeconómico.^{9,12}

La infección crónica por *H. pylori* se asocia con gastritis, duodenitis, úlceras gástricas, úlceras duodenales, linfoma MALT y ADC gástrico, que pueden manifestarse con dispepsia, náuseas, vómitos, anorexia y hemorragia digestiva superior.^{19,20,21,22} Es necesario utilizar métodos diagnósticos de tipo directos o endoscópicos e indirectos o no endoscópicos para determinar la presencia de la bacteria y las enfermedades.⁹

Entre los métodos diagnósticos directos se describe la toma de biopsia, la cual se realiza a nivel del antro, cuerpo e incisura, sitio de mayor colonización por la bacteria.^{23,24,25} Otro método es el test de la ureasa la cual se realiza colocando el material obtenido por biopsia en una solución de urea, rojo fenol y un agente bacteriostático, virando el color del medio de amarillo a rojo si el *H. pylori* está presente.²⁵

Histológicamente también puede identificarse la bacteria por coloraciones especiales como Giemsa modificada, Hematoxilina Eosina, Warthin-Starry, entre otros.²⁴ Los medios de cultivo deben ser enriquecidos como el agar sangre, agar chocolate y medios especiales como Skirrow's, que cuentan con antibióticos para evitar el crecimiento de otras bacterias, pudiendo evidenciar el crecimiento de colonias translúcidas, de forma convexa y de aproximadamente 1 mm.⁴

Entre las técnicas indirectas se encuentran el test de aire espirado marcado con C¹³ y C¹⁴ con sensibilidad y especificidad del 98%²⁷, el uso de marcadores serológicos que utilizan anticuerpos circulantes en el suero del paciente y pueden ser determinados por reacciones de aglutinación, fijación del complemento y ELISA²⁸, y la determinación de antígenos fecales para *H. pylori*.^{24,25} Esta última técnica es una prueba rápida y de bajo costo, útil en el estudio de grandes poblaciones con prevalencia elevada de la infección y como control de erradicación posterior al tratamiento.²⁶ Se fundamenta en un ensayo inmunocromatográfico que usa anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos fecales de *H. pylori*. Esta prueba mantiene especificidad y sensibilidad promedio de 91 y 93%, indica infección activa y entre sus ventajas, no depende de la respuesta inmune del hospedero.^{29,30}

2. Detección de *H. pylori* en fuentes de aguas.

En relación a la detección de *H. pylori* en fuentes de agua, se han reportado métodos moleculares basados principalmente en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica que emplea cebadores para la amplificación de genes específicos de *H. pylori* detectando así el ADN de la bacteria en concentraciones muy bajas de 5 a 10 células por litro de agua.^{16,31}

Diversos estudios han considerado la separación inmunomagnética como un paso previo a la PCR para mejorar la sensibilidad de este método molecular y obtener una mayor recuperación de ADN. Así mismo, otros autores han propuesto el cultivo, la inmunofluorescencia, la confirmación de la secuencia del gen 16S del ARNr, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o la integración de algunas de estas técnicas con el propósito de mejorar la sensibilidad y especificidad de estos ensayos.³² Sin embargo, se ha observado la importancia del FISH como método de detección de *H. pylori* en aguas^{33,34}, en vista que los métodos tradicionales de identificación microbiana basados en medios de cultivo presentan dificultad para su aislamiento, principalmente debido a la entrada de la bacteria a su forma cocoide, un estado viable no cultivable (VNC) en respuesta a condiciones de estrés ambiental.^{4,35} Además, estos métodos no reflejan la población exacta o la mezcla de las comunidades bacterianas presentes en el microhábitat. Por su parte, la identificación empleando la técnica de FISH combina la precisión de la biología molecular con la información visual de la microscopía, lo cual permite la identificación y visualización de la célula microbiana individual dentro de su microhábitat natural.³⁴

Este método localiza un determinado fragmento de la secuencia de los ácidos nucleicos por medio del marcaje de sondas de ADN o ARN acopladas a un fluoróforo, seguido de su hibridación y finalmente la visualización de las células marcadas usando microscopía de

fluorescencia.³⁶ Esta técnica ha permitido en estudios previos determinar *H. pylori* en muestras de agua, describiendo la efectividad y utilidad en la visualización de ácidos nucleicos de microorganismos morfológicamente intactos en su ambiente.³⁴ Pocos estudios han evaluado la efectividad de FISH para la detección directa de células viables de *H. pylori* en muestras de agua dulce, potable, marina y agua tratada con hipoclorito de sodio. Aunque esta técnica necesita una evaluación más exhaustiva, ha demostrado ser sensible, específica, cuantitativa y rápida para detectar células completas de *H. pylori* en muestras ambientales.^{37,38}

3. Isla de patogenicidad CagA.

Un factor de virulencia importante de *H. pylori* es la isla de patogenicidad CagA, constituida por 31 genes (incluyendo el gen *cagA*) que en conjunto codifican para proteínas de un sistema de secreción tipo IV especializado en translocar la proteína CagA al interior del citoplasma de la célula epitelial³⁹. Una vez en el citoplasma de la célula epitelial, CagA interrumpe vías de señalización dependiente e independiente de fosforilación y conduce a proliferación y motilidad anormal de la célula epitelial gástrica, así como cambios en el citoesqueleto. La interacción entre la proteína CagA y la célula epitelial induce respuesta inmune celular e inflamación asociada con carcinoma gástrico.^{39,40}

Esta proteína Cag A generalmente se ha estudiado en biopsias gástricas mediante técnicas histológicas y moleculares, la inmunohistoquímica es una técnica que permite localizar moléculas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos (proteínas del tipo inmunoglobulina G). La técnica, por la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer moléculas o proteínas y unirse a ellas, permite detectar cantidades ínfimas de proteínas presentes en el tejido.⁴¹

4. Uso de agroquímicos para el control de plagas en cultivos de vegetales.

Los agroquímicos son sustancias químicas o que se producen sintéticamente, encaminadas a disminuir, controlar o erradicar una plaga o cualquier organismo patógeno de una planta o cultivo.⁷ Su historia inicia a principios del siglo XIX, cuando se descubrió accidentalmente la acción plaguicida de algunos elementos naturales como el azufre, cobre, arsénico, piretrinas y fósforo. En 1922, se emplean diferentes aceites insecticidas y poco más tarde los primeros productos sintéticos.⁵ En 1940, el descubrimiento de las propiedades insecticidas del dicloro-difeniltricloroetano (DDT), da origen a la industria de los plaguicidas órgano-sintéticos.⁴²

El empleo intensivo y extensivo de productos agroquímicos produjo un gran incremento de los rendimientos agrícolas y estableció el paradigma de que se constituiría en una herramienta para reducir el hambre y la pobreza en el mundo; sin embargo, también ofreció efectos negativos ambientales y sobre la salud humana que se amplificaron por la utilización inadecuada, que condiciona mayor contacto con los mismos y la contaminación de alimentos y agua de consumo.^{42,43,44}

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la mortalidad en los países en desarrollo atribuible a las condiciones ambientales representa el 25%, y entre éstas el 3,1% de las muertes a nivel mundial son atribuidas a condiciones de saneamiento ambiental, principalmente del agua.⁴⁵ Se estima que la industria, el sector agropecuario y las aguas domésticas generan 9.000 toneladas de materia orgánica contaminante de los acuíferos, siendo baja la calidad del agua para consumo humano, aunado a la gestión inadecuada de sustancias químicas, un problema de salud y de alto costo económico.⁴⁶

En Venezuela, se introduce por primera vez el DDT con el fin de erradicar enfermedades endémicas, lo que permitió disminuir la mortalidad y aumentar la población,

trayendo como consecuencia un incremento de las necesidades básicas como la alimentación y la producción de cultivos para cubrir este fin.⁴⁷

Mérida es uno de los principales productores agrícolas del país. Principalmente, el municipio Rangel se ha destacado en la producción de los rubros como papa y ajo en los sectores de Cacute, Mucurubá, Mucuchíes, La Toma, San Rafael, Mitivivó, Llano del Hato, Gaviria, Apartaderos y Mucubají.^{6,48}

La protección de los cultivos es un proceso complejo que debe ser efectuado por especialistas.³³ La adecuada combinación de métodos tradicionales de control como rotaciones apropiadas, buenas técnicas de preparación de suelos, entre otros, y aplicación de agroquímicos pueden favorecer la protección efectiva de los cultivos.⁴⁹ Sin embargo, es importante saber que el uso de estas sustancias químicas implica un riesgo para la salud de diversos sectores de la población.^{50,51} En primer término, para quienes trabajan en la fabricación, manipulación y aplicación de estos productos, y en segundo término para la comunidad, por el consumo de residuos de plaguicidas en la dieta diaria, por el uso de ellos a nivel del hogar o por la contaminación de las fuentes de agua.⁵¹

La toxicidad crónica hace referencia a aquellos efectos que se producen por la exposición prolongada y acumulación de bajas cantidades o concentraciones de una sustancia química, produciendo enfermedades como las neoplasias (cáncer) que se manifiestan a mediano o largo plazo.⁵² Los agroquímicos están relacionados con daño al ADN, carcinogénesis, funcionamiento inadecuado de los mecanismos de reparación del ADN y otros procesos celulares de protección. Algunos productos químicos no son mutagénicos o genotóxicos a exposiciones bajas, pero pueden activar o desactivar genes específicos que alteran la susceptibilidad de una persona a agentes genotóxicos o

posiblemente afectar la progresión del cáncer.⁵¹ Algunos productos químicos pueden actuar como carcinógenos epigenéticos, es decir, sustancias que no dañan el ADN por sí mismos, pero causan alteraciones que predisponen al cáncer. Los pesticidas pueden aumentar así el riesgo de cáncer a través de una variedad de mecanismos, entre ellos la genotoxicidad, la promoción de tumores, efectos epigenéticos y acción e inmunotoxicidad hormonal.⁵³ El peligro de este tipo de toxicidad es que sus efectos no se observan inmediatamente, lo que contribuye a esa sensación de seguridad que a su vez potencia el uso irresponsable creando un círculo vicioso y silencioso que incrementa paulatinamente el riesgo de exposición humana a través del agua y los alimentos.⁵⁴

Por mucho tiempo la determinación de agroquímicos en aguas se ha abordado empleando la cromatografía de gas acoplada a diferentes detectores de alta sensibilidad y/o especificidad, con el uso de técnicas que ayudan a obtener un alto poder de concertación. Sin embargo, este método no es viable utilizarlo en la determinación de una variedad de pesticidas, debido a la baja volatilidad o inestabilidad térmica que estos presentan. En algunos casos, presentan limitaciones en cuanto a la sensibilidad. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) presenta gran ventaja en comparación a otras técnicas cromatográficas debido a su gran potencial de separación e identificación y su aplicabilidad en una gran variedad de matrices y compuestos (productos volátiles, termolábiles, entre otros). Esta técnica consiste en aumentar la eficacia de la separación y así incrementar la resolución empleando fases estacionarias con tamaño de partícula mucho menor (entre 2 y 5 μm), dado a que la difusión de los solutos entre la fase móvil y estacionaria se hace más rápida. Ello implica la necesidad de impulsar la fase móvil con un sistema de alta presión.⁵⁵

ANTECEDENTES

En estudios en la zona de Mucuchíes del estado Mérida, se ha determinado la presencia de *H. pylori* en las aguas de consumo humano. Duarte en el 2013, determinó al género *Helicobacter* en fuentes de agua potable y de riego en cultivos de esta localidad por medio de la técnica PCR semi-anidada para la amplificación de un fragmento específico en el gen 16S ARNr y por FISH para la confirmación de este gen de la familia Helicobacteriaceae y de *H. pylori*, demostrando la última técnica mayor sensibilidad que la PCR para la detección de esta bacteria en muestras ambientales.⁴

Nieto en el 2014 evaluó y cuantificó por FISH la presencia de *H. pylori* en aguas de tanques y grifos en hogares de las comunidades Renacer y Santa Eduvigis, Mucuchíes. Este estudio identificó al patógeno bajo la forma cocoide o VNC, la cual podría ser responsable de la transmisión de la infección. Igualmente, se determinó la presencia de *H. pylori* en muestras de heces de voluntarios de estas comunidades por medio del test cualitativo de antígenos fecales, demostrando ser un método rápido, sensible, específico y no invasivo para la población estudiada en Mucuchíes.³

Se enfatiza que no se han realizado estudios en la zona de Mucuchíes donde se determinen los niveles de agroquímicos en aguas de consumo humano ni su relación con la infección por *H. pylori* y sintomatologías gástricas asociadas.

Contreras y col, en el 2006 estudiaron las enfermedades que atacan el proceso productivo del rubro papa y las medidas de control ejercidas por los productores del Municipio Rangel, estado Mérida, este estudio reportó la presencia de virus plagas, enfermedades y factores externos que afectan las cosechas, conduciendo a una gran dependencia en el uso de pesticidas, los cuales son adquiridos en condiciones

desfavorables. Esta situación genera un deterioro considerable de la rentabilidad de los pesticidas, aunado a los severos daños que estos ocasionan a la salud y el ambiente.⁶

Flores M. y col en el 2011 analizaron los residuos de plaguicidas en agua potable del Municipio Rivas Dávila, mediante extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (SPE-HPLC-DAD), encontrando que los niveles de plaguicidas no superaron los valores máximos permitidos por la Legislación Venezolana.⁴⁸

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la asociación entre la infección por *H. pylori* y los síntomas gástricos en la población de Mucuchíes, y la presencia de agroquímicos en fuentes de agua de consumo.

ESPECÍFICOS

1. Determinar a través del test de antígenos fecales cuantitativo la prevalencia de infección por *H. pylori* en voluntarios de las comunidades Renacer y Santa Eduvigés.
2. Identificar por FISH la presencia, morfología y número de células de *H. pylori* en muestras de aguas de consumo de estas comunidades.
3. Determinar por Inmunohistoquímica la presencia de la isla de patogenicidad CagA de *H. pylori* en aguas de la localidad.
4. Investigar la presencia de síntomas gastrointestinales en los voluntarios del estudio.
5. Evaluar la correlación entre la infección por *H. pylori* y los síntomas gástricos en los voluntarios de Renacer y Santa Eduvigés con concentraciones del patógeno y agroquímicos detectados en las fuentes de aguas de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área de estudio.

Mucuchíes es una localidad del estado Mérida - Venezuela, ubicada en el municipio Rangel. Está situada a 8°, 45' de latitud Norte y a 70°, 55' de longitud Oeste con una altitud de 2.983 m.s.n.m., encontrándose entre los pueblos de mayor altura de Venezuela. El clima de Mucuchíes es fresco y frío de alta montaña, conservando temperaturas que no suelen variar al transcurrir el año. La temperatura máxima puede ser de 12°C y la mínima de hasta 4°C con 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 Mocao.

De acuerdo al Censo de Población y Vivienda del año 2011 el municipio Rangel posee una población de 19.008 habitantes que representan un 2,29% de la población total del estado Mérida, y de estos sólo 3.400 habitantes en la población de Mucuchíes, siendo dos de sus comunidades del casco central Santa Eduvigis y Renacer. Estas comunidades se escogieron para la realización del presente estudio por solicitud de sus habitantes y considerando sus antecedentes de alta prevalencia de infección por *H. pylori* y de intensa actividad agrícola, principalmente en los rubros papa y ajo.

2. Población de estudio.

Comprende individuos pertenecientes a familias de las comunidades Renacer y Santa Eduvigis que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

2.1. Criterios de inclusión.

Personas de cualquier edad y ambos géneros que accedieron a formar parte del estudio a través de un consentimiento informado (Anexo 1). Estos individuos suministraron información a través de encuestas de datos clínicos y epidemiológicos (Anexo 2) y muestras de heces para el estudio de antígenos fecales de *H. pylori*. Los menores de edad requirieron autorización por sus representantes legales para participar en el estudio.

2.2. Criterios de exclusión.

Individuos que no suministraron la muestra biológica, embarazadas y voluntarios con antecedente de gastrectomía.

3. Recolección de datos epidemiológicos

Estos datos se recolectaron para la fecha del muestreo por medio de una encuesta a las familias voluntarias residentes de los sectores Renacer y Santa Eduvigis, posterior a aceptar participar en el estudio por medio de la firma del consentimiento informado. Se recolectaron los siguientes datos consideradas variables clínicas e higiénico-sanitarias en este estudio:

Datos clínicos:

- Síntomas gastrointestinales.
- Antecedentes de cáncer gástrico familiar de primer grado.
- Infección por *H. pylori* y tratamiento previo en el participante y/o algún miembro del grupo familiar.

Datos higiénico-sanitarios:

- Tratamiento del agua de consumo: filtrada, hervida, directa del grifo, envasada.
- Método de desinfección de los vegetales: lavado con agua del grifo, lavado con agua del grifo y vinagre, lavado con agua hervida o ninguno.

4. Muestreo.

4.1. Recolección de muestras de heces de voluntarios.

El estudio se realizó durante el mes de julio del 2015, período en el cual se encuestaron 32 familias para una muestra de 79 individuos. De estas familias se excluyeron dos (2) por no cumplir con los criterios de inclusión, quedando un total de 30 familias: 12 en el sector Renacer (40%) y 18 en el sector Santa Eduvigis (60%), conformadas por 71 miembros con edades comprendidas entre los 2 y 85 años. De los 71 individuos, que cumplieron con los criterios de inclusión se les suministraron recolectores de heces. Las muestras de heces se conservaron a -20°C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal del IVIC para la detección de antígenos fecales de *H. pylori*.

4.2. Recolección de muestras de fuentes de aguas.

En el mes de julio del 2015 se realizó un muestreo de distintas fuentes de aguas de consumo de la población de Mucuchíes, recolectando un volumen de 1 L de muestra por triplicado de los siguientes sitios:

1. Tanque de agua potable del sector Misintá que abastece aproximadamente a la mitad de la población de Mucuchíes.
2. Tanque La Hoyada que abastece de agua potable a la población del casco central de Mucuchíes, incluyendo el sector Santa Eduvigis.
3. Tanque Renacer que abastece de agua potable a este sector.

4. Naciente de Misintá, fuente de agua subterránea que surte al tanque Misintá.
5. 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.
6. Tanque Los Aposentos que almacena aguas de riego para cultivos de este sector.
7. Tanque la Toma que surte de agua potable al sector Los Aposentos (Figura 1).

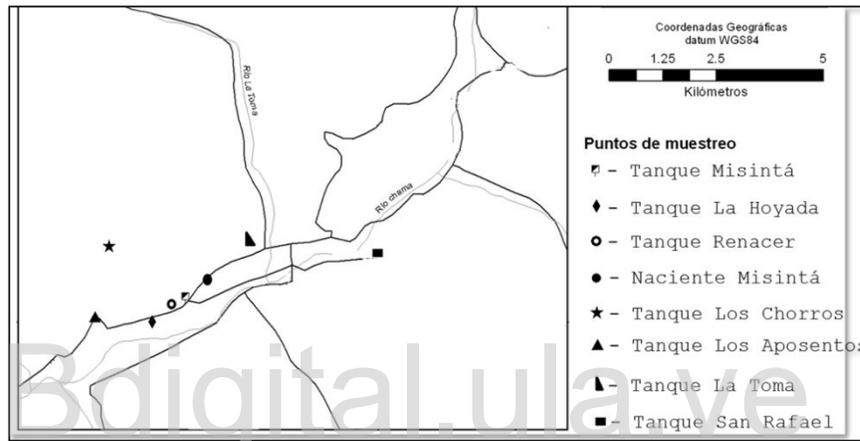


Figura 1. Mapa con sitios de muestreo de aguas evaluados en Mucuchíes, estado Mérida, Julio-2015 (Fuente UNISIG, IVIC).

Al momento de la toma de las muestras de agua se registraron las coordenadas geográficas (Tabla 1) y los parámetros fisicoquímicos: pH (pHep1, Hanna Instruments), temperatura y oxígeno disuelto (oxigenómetro OXDP-02, VWR). (Tabla 3)

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

Sitios	Coordenadas geográficas	Altura (m.s.n.m)
1. Tanque sector Misintá	10°24'06,1''N; 66°52'51,8''O	3303
2. Tanque La Hoyada	08°45'02,7''N; 70°55'28,5''O	3011
3. Tanque Renacer	08°45,187''N; 70°55,080''O	3043
4. Naciente de Misintá	08°46'23,0''N; 70°55'35,9''O	3499
5. Tanque Quebrada Los Chorros	8°46'13,4''N; 70°56'29,7''O	3500
6. Tanque Los Aposentos	08°45'11,9''N; 70°55'52,9''O	3011
7. Tanque la Toma	08°46'17,0''N ; 70°53'59,3''O	3136

5. Procesamiento de las muestras de heces y aguas para la detección de *H. pylori*.

Se prepararon suspensiones de las muestras de heces de los voluntarios de las Comunidades Renacer y Santa Eduvigés, a partir de 80-100 mg de las heces resuspendidas en 1 ml de buffer de tratamiento de muestra del Kit AccuDiag™ *H. pylori* Antigen ELISA Kit (Diagnostic Automation / Cortez Diagnostics, Inc., IMMUNO DIAGNOSTICS). Estas suspensiones fueron amalgamadas por 1 min a 10.000 rpm en un Vortex-Genie 2 (MO BIO Laboratories, Inc.) para favorecer la dispersión de agregados celulares y diluidas 1:100 en tampón salino fosfato (PBS, por sus siglas en inglés).

Por otra parte, se filtraron por triplicado volúmenes de 1 L de las muestras de aguas en membranas de policarbonato (diámetro 47 mm; tamaño de poro 0,22 µm; Durapore, Millipore®) bajo condiciones de esterilidad. Las membranas fueron lavadas con 5 ml de PBS (0.32 M) a pH 7,2 y este volumen se destinó para los siguientes ensayos: (1) una alícuota de 1 ml para FISH e Inmunohistoquímica fijada con paraformaldehído al 4% por 1 hora para su conservación al 1% a 4°C hasta su procesamiento. (2) Otra alícuota de 1 ml

para el conteo total de células conservada a 4°C y (3) el volumen restante fue conservado como respaldo a -20°C.

Las alícuotas de 1 ml de los filtrados de agua de cada sitio de muestreo destinada para los ensayos de FISH e Inmunohistoquímica se centrifugaron a 5.000 rpm por 20 min. Seguidamente, se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado al precipitado con 500 µl de PBS y se centrifugó a 5.000 rpm por 20 min adicionales. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con iguales volúmenes (50 a 500 µl) de PBS y etanol, según la observación preliminar al microscopio óptico para estimar la concentración de las células en cada muestra, siguiendo el protocolo de Samarbaf-Zadeh *et al.* (2006).³³ Estas muestras se amalgamaron en iguales condiciones a las aplicadas a las suspensiones de heces.

6. Detección cuantitativa de antígenos fecales de *H. pylori* en voluntarios de Mucuchíes.

Se determinó cuantitativamente la presencia de infección por *H. pylori* en la población del estudio utilizando el kit AccuDiag™ ELISA para la detección de antígenos fecales de *H. pylori*. Para ello se colocaron 100 µl de los calibradores, controles y suspensiones de las muestras de heces en los pozos de la placa de microtitulación suministrada por el kit, eliminando las burbujas de aire del líquido y dejando incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el líquido de todos los pozos y se realizaron tres lavados con la solución buffer siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Al culminar los lavados se colocaron 100 µl de la enzima conjugada a cada pozo y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se retiró este volumen y se realizaron tres lavados con la solución tampón. Seguidamente, se procedió a colocar 100 µl del sustrato

cromogénico 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) a cada pozo en condiciones de oscuridad e incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 100 µl de solución ácida al 1,25 M para detener la reacción, asegurando que no existieran burbujas de aire en los pozos. Inmediatamente, se registró la densidad óptica a 450 nm de los pozos de la placa en un espectrofotómetro LabSystems Multiskan.

7. Detección cuantitativa de *H. pylori* por Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) en filtrados de aguas.

7.1. Preparación de las láminas.

Preliminarmente, las láminas (cel-line/Thermo Scientific) se lavaron con solución sulfocrómica durante 15 min. Se realizaron tres lavados con agua destilada y se dejaron secar durante 4 h aproximadamente, para luego colocar gelatina de cromo (gelatina 0,5%, alumbre de cromo 0,05%, agua destilada) como pegamento.

Se colocaron 20 µl de las suspensiones de filtrados de aguas en los pozos de las láminas, se dejaron secar a temperatura ambiente y se conservaron a -20°C hasta que se realizó la hibridación.

7.2. Procedimiento:

7.2.1 Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) en filtrados de aguas.

Los análisis de FISH descritos a continuación se realizaron siguiendo los protocolos reportados por Fernández-Delgado y col. (2016)⁵⁶, Contreras y col. (2012)²³ y Trebesius y col. (2000)⁵⁷.

Las suspensiones de filtrados de aguas fijadas en las láminas portaobjetos se deshidrataron con etanol al 50% por 3 min. Posteriormente, se descartó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente.

Se colocó en el primer pozo de las láminas 23 μ l de tampón de hibridación 1 (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 y 5 μ l de la sonda específica de *H. pylori* (Hpy-1) marcada con el fluoróforo Cy3-5' (fluorescencia roja). En el segundo pozo de cada lámina se colocaron 18 μ l de tampón de hibridación 2 (0,9 M NaCl; 0,02 M Tris/HCl, pH 8,0; 0,01% SDS; agua destilada 4,5 ml), 12 μ l de formamida, 5 μ l de la sonda Hpy-1 y 5 μ l de la sonda EUB338 marcada con el fluoróforo Alexa488N-5' (fluorescencia verde) para detectar eubacterias, es decir, todas las bacterias presentes en las muestras. Se consideró un pozo sin la aplicación de sondas para cada muestra como control negativo de autofluorescencia.

Para los ensayos de FISH, se incluyeron láminas preparadas con cultivos de una cepa clínica de *H. pylori* (Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, CBB, IVIC) y una cepa de *Shigella* spp. ATCC 11126 como controles positivo y negativo, respectivamente.

La hibridación se llevó a cabo para todas las láminas con filtrados de aguas en una cámara húmeda a 54°C por 2 h. Luego cada pozo se lavó tres veces con tampón de lavado (112 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 8,0 y 0,01% SDS) y se incubó a 56°C durante 45 min con el último lavado. Posteriormente, las muestras hibridadas se lavaron con PBS y se secaron a temperatura ambiente. Todos los pasos del ensayo de hibridación se realizaron en condiciones de oscuridad. Las láminas se conservaron a -20°C para los ensayos posteriores de Inmunohistoquímica.

7.2.2 Cuantificación de la proteína CagA de la isla de patogenicidad de *H. pylori* en filtrados de aguas por Inmunohistoquímica.

Posterior a la realización del FISH, se procedió a lavar las láminas con PBS durante 3 min. Se retiró el exceso y se colocaron las láminas en cámara húmeda, incubando con solución de bloqueo (PBS-T 0,1% con 3% de albúmina bovina sérica - BSA) durante 15 min a temperatura ambiente, que actuará reduciendo la unión inespecífica de los anticuerpos.

Las láminas se incubaron durante 40 min a temperatura ambiente con el anticuerpo primario IgG anti-CagA de *H. pylori* de ratón (ab7351 Abcam Inc.) diluido 1:1000. Después de esta etapa de incubación, se realizaron tres lavados rápidos con PBS frío y se incubaron las láminas por 40 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo asociado con FITC (ab6717 Abcam Inc.) diluido 1:1000 en PBS con 3% de BSA. Luego de lavar con PBS, se colocó medio de montaje Immunomount (Thermo Inc.) a cada pozo de las láminas. 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.

Adicionalmente, se cuantificó el número de células totales (CT) en las muestras de aguas utilizando una cámara de Neubauer mejorada mediante la tinción fluorescente yoduro de propidio visualizada por microscopia de epifluorescencia a 40 X.

7.2.3. Análisis de agroquímicos en muestras de aguas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD).

Alícuotas de 250 ml de las muestras de aguas recolectadas en Mucuchíes fueron conservadas a -20°C y enviadas al Laboratorio de Química Analítica del IVIC para el análisis de agroquímicos con la colaboración de la Lic. Oriana Barrios y la Dra. Wendy Rondón. Se procedió a filtrar cada muestra con cartuchos de filtración de nylon $0,45\mu\text{m}$ marca Target®, para posteriormente ser analizadas con un cromatógrafo líquido marca Waters serie 600S, acoplado a un inyector automático Waters serie 700 Plus y a un detector Uv-Visible con arreglo de diodo Waters serie 996 y equipado con un computador, software Millennium.

La separación de los analitos se llevó a cabo en una columna C18 Nova-Pak Waters de 150 mm de longitud, 3,9 mm de diámetro interno (di) y $4\mu\text{m}$ de diámetro de partícula (dp). Se utilizaron diferentes solventes orgánicos como el acetonitrilo y metanol en la fase móvil, de manera de optimizar el método de separación.

Se emplearon estándares marca Chem Service de alta pureza para los pesticidas bifentrina (98 %), blorpirifós (99,5%) y en el caso de famoxadona (22,50%) y cimoxanil (30,00%) se utilizó el producto de Equation Pro importado por INICA, los cuales fueron aportados por Agropatria. Se preparó la solución madre (1000 mg/mL) de cada uno de ellos en acetonitrilo (Sigma Aldrich, grado HPLC) correspondiente a la fase móvil del análisis. Posteriormente, se almacenaron en refrigeración a 4°C . Se prepararon soluciones de trabajo entre 10, 20, 50, 100 y $200\ \mu\text{g/L}$ para la obtención de las curvas de calibración de los pesticidas en estudio.

Para el desarrollo del HPLC-DAD, se optimizó la cromatografía estudiando estadísticamente los parámetros analíticos del método a través de la ecuación de regresión lineal del gráfico de calibración para cada analito.

Adicionalmente, se empleó la técnica espectrometría de masas disponible en el Laboratorio de Química Analítica del IVIC para analizar con mayor precisión la composición de algún compuesto presente en las muestras de aguas.

8. Análisis estadístico de los datos experimentales y epidemiológicos.

Se trata de una investigación observacional descriptiva de corte transversal y experimental que evaluó muestras biológicas y de aguas recolectadas en Julio del 2015 en las comunidades Renacer y Santa Eduvigis de Mucuchíes. Se realizaron análisis de varianza por la prueba no paramétrica Mann-Whitney para determinar diferencias en las concentraciones de antígenos fecales de *H. pylori* entre individuos de las dos comunidades en estudio. Adicionalmente, se evaluó la correlación (coeficiente de correlación de Pearson) y similitud por análisis de conglomerados o “cluster” entre la concentración de *H. pylori*, CagA, residuos de agroquímicos y variables clínicas e higiénico-sanitarias de la población a través del programa PAST.

RESULTADOS

1.- Detección de antígenos fecales y análisis epidemiológico en las comunidades Renacer y Santa Eduvigis.

Preliminarmente, se preparó una curva de calibración de antígenos fecales de *H. pylori* con los patrones suministrados por el kit, considerándose un resultado positivo a la infección con concentraciones mayores a 10 ng/mL (Figura 2).

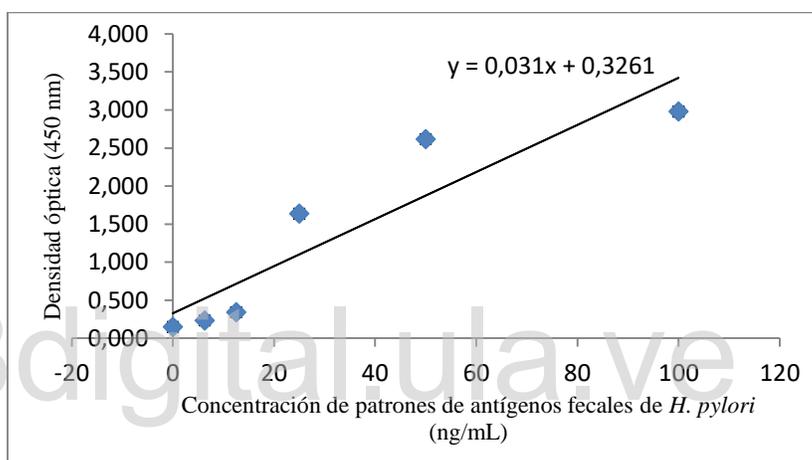


Figura 2. Curva de calibración de antígenos fecales de *H. pylori* que presenta las concentraciones y densidad óptica de los patrones empleados (0, 6,3, 12,5, 25, 50 y 100 ng/mL) para la estandarización del kit.

A través del test cuantitativo de antígenos fecales de *H. pylori* se encontró que la prevalencia de infección por *H. pylori* en la población estudiada fue de 74,65% (53 individuos positivos) (Tabla 2), siendo del 75,51% (37) en mayores de 15 y 72,72% (16) en menores de 15 años.

Tabla 2. Concentración de antígenos fecales de *H. pylori* determinada en individuos de las comunidades Santa Eduvigis y Renacer, Mucuchíes (estado Mérida).

ID individuo	Localidad	Nombre	DO 1 (450 nm)	DO 2 (450 nm)	Promedio	Desviación estándar	Concentración antígenos fecales Hp (ng/mL)
1	RE	LP	0.870	0.860	0.865	0.007	17.384
2	RE	GB	1.304	1.287	1.296	0.012	31.271
3	RE	MFA	1.405	0.763	1.084	0.454	24.448
4	RE	SB	0.793	0.789	0.791	0.003	14.997
5	RE	JE	0.750	0.743	0.747	0.005	13.561
6	RE	DJ	0.087	0.083	0.085	0.003	0
7	RE	MJ	0.320	0.321	0.321	0.001	0
8	RE	JA	0.998	0.999	0.999	0.001	21.690
9	RE	YA	0.198	0.209	0.204	0.008	0
10	RE	RR	0.568	0.570	0.569	0.001	7.835
11	RE	YA	0.391	1.426	0.909	0.732	18.787
12	RE	LAE	2.925	2.952	2.939	0.019	84.271
13	RE	LE	1.050	1.065	1.058	0.011	23.594
14	RE	OE	3.028	2.950	2.989	0.055	85.900
15	RE	EB	2.458	2.446	2.452	0.008	68.577
16	RE	GA	1.992	1.995	1.994	0.002	53.787
17	RE	GT	1.720	2.362	2.041	0.454	55.319
18	RE	CA	1.438	1.433	1.436	0.004	35.787
19	RE	DA	2.216	2.206	2.211	0.007	60.803
20	RE	RA	2.910	3.003	2.957	0.066	84.852
21	RE	YV	0.857	0.849	0.853	0.006	16.997
22	RE	JM	1.916	1.935	1.926	0.013	51.594
23	RE	YB	0.115	0.115	0.115	0.000	0
24	RE	IB	0.551	0.548	0.550	0.002	7.206
25	RE	BR	0.882	0.898	0.890	0.011	18.190
26	RE	LS	1.562	1.568	1.565	0.004	39.965
27	RE	JR	1.075	1.088	1.082	0.009	24.368
28	RE	LR	0.906	0.909	0.908	0.002	18.755
29	SE	YR	1.863	1.860	1.862	0.002	49.529
30	SE	YC	0.945	0.950	0.948	0.004	20.045
31	SE	ER	0.915	0.920	0.918	0.004	19.077
32	SE	RR	1.488	1.490	1.489	0.001	37.513
33	SE	YR	0.279	0.285	0.282	0.004	0
34	SE	YSR	0.880	0.887	0.884	0.005	17.981
35	SE	RL	0.347	0.358	0.353	0.008	0.852
36	SE	AL	0.273	0.273	0.273	0.000	0

37	SE	CL	0.779	0.784	0.782	0.004	14.690
38	SE	ML	1.761	1.787	1.774	0.018	46.706
39	SE	MV	0.535	0.543	0.539	0.006	6.868
40	SE	SV	1.335	1.327	1.331	0.006	32.416
41	SE	GRV	1.265	1.278	1.272	0.009	30.497
42	SE	NQ	0.865	0.866	0.866	0.001	17.400
43	SE	AS	0.836	0.840	0.838	0.003	16.513
45	SE	HS	2.989	2.952	2.971	0.026	85.303
46	SE	BP	2.655	2.730	2.693	0.053	76.335
47	SE	ER	0.587	0.593	0.590	0.004	8.513
48	SE	YV	1.051	1.050	1.051	0.001	23.368
49	SE	AA	3.081	3.109	3.095	0.020	89.319
50	SE	RE	1.429	1.435	1.432	0.004	35.674
51	SE	AE	2.887	2.813	2.850	0.052	81.416
52	SE	LE	2.885	2.851	2.868	0.024	81.997
53	SE	JE	2.157	2.174	2.166	0.012	59.335
54	SE	ME	1.493	1.503	1.498	0.007	37.803
55	SE	NA	0.233	0.232	0.233	0.001	0
56	SE	FR	2.650	2.632	2.641	0.013	74.674
57	SE	DP	3.088	3.042	3.065	0.033	88.352
58	SE	ZP	0.650	0.651	0.651	0.001	10.465
59	SE	MR	0.909	0.908	0.909	0.001	18.787
60	SE	LE	1.351	1.359	1.355	0.006	33.190
61	SE	AP	2.229	2.244	2.237	0.011	61.626
62	SE	MH	1.832	1.845	1.839	0.009	48.787
63	SE	ER	1.500	1.508	1.504	0.006	37.997
64	SE	HM	1.271	1.284	1.278	0.009	30.690
65	SE	ER	1.845	1.831	1.838	0.010	48.771
66	SE	JR	0.124	0.124	0.124	0.000	0
67	SE	AS	0.585	0.582	0.584	0.002	8.303
68	SE	GG	0.046	0.047	0.047	0.001	0
69	SE	MM	0.049	0.050	0.050	0.001	0
70	SE	FM	0.066	0.069	0.068	0.002	0
73	RE	RP	2.903	2.968	2.936	0.046	84.174
77	RE	YR	0.126	0.127	0.127	0.001	0

SE: Santa Eduvigis; RE: Renacer; DO: densidad óptica; Hp: *H. pylori*. Resultado en rojo positivo a la infección (concentración mayor a 10 ng/mL)

En relación al sexo de los individuos estudiados: El sexo femenino 42 (59,1%) y el masculino 29 (40,84%) (Figura 3). Mientras que la distribución por edad para ambos géneros fue mayor en el grupo etario ≥ 16 años 70,42% y para los ≤ 15 años 29,57% (Figura 4).

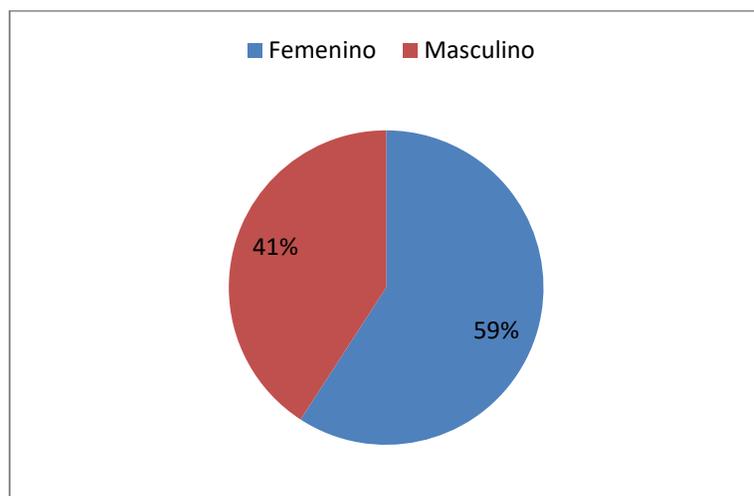


Figura 3. Distribución por género de voluntarios de Mucuchíes que participaron en el estudio.

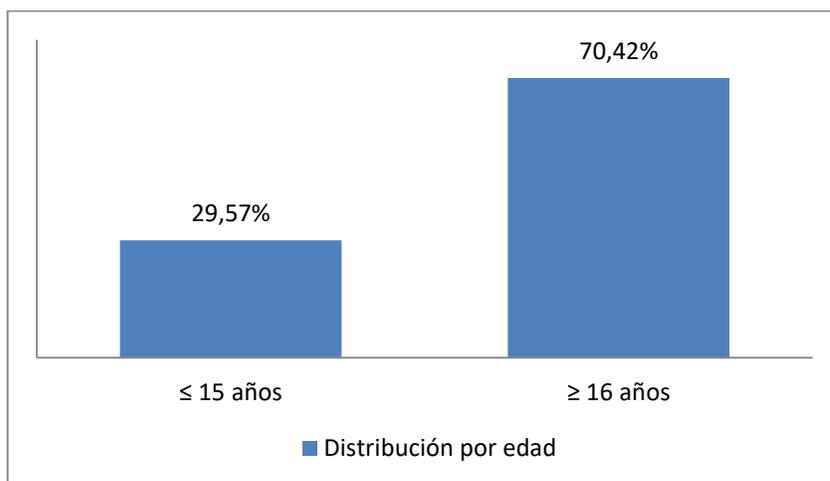


Figura 4. Distribución por edad de voluntarios de Mucuchíes que participaron en el estudio.

En relación a la presencia de síntomas en los individuos con infección por *H. pylori*, 43 resultaron sintomáticos (81,13%) y 10 asintomáticos (18,86%) (Figura 5).

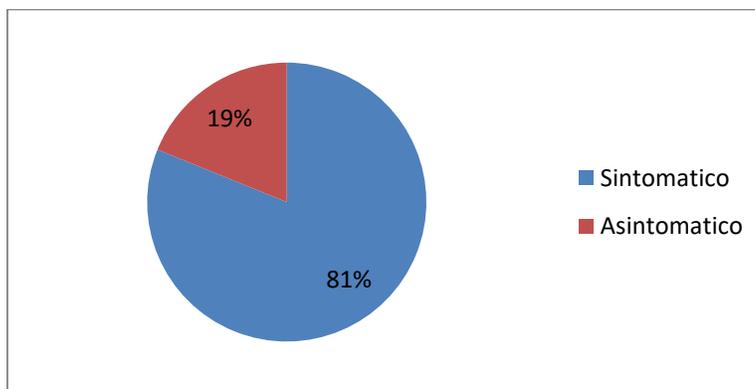


Figura 5. Individuos sintomáticos con infección por *H. pylori*.

De los individuos positivos a infección por *H. pylori*, los síntomas fueron: epigastralgia 32 casos (60,37%), distensión abdominal 22 casos (41,50%), regurgitación 12 casos (22,64%), meteorismo 6 casos (11,32%), pirosis y náuseas 3 casos (5,66%), pérdida de peso 2 casos (3,77%) y eructos y anorexia 1 caso (1,88%) (Figura 6).

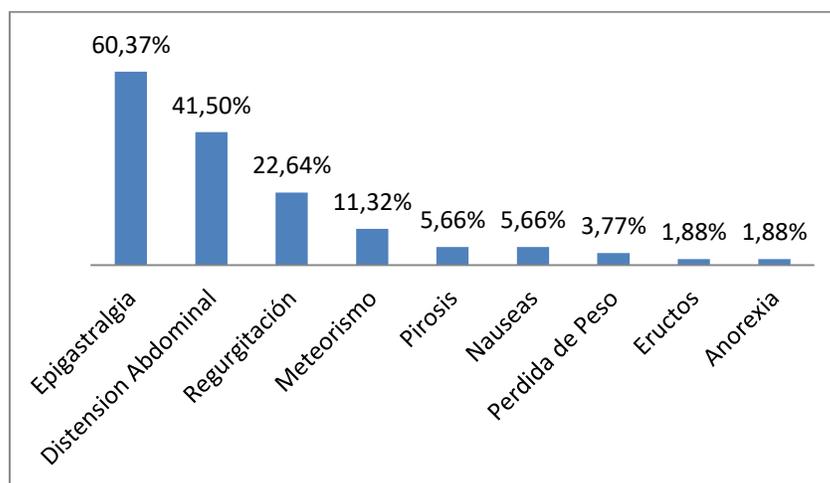


Figura 6. Síntomas en pacientes con infección por *H. pylori*.

En relación al uso rutinario de métodos de desinfección adicional del agua potable, se encontró que 22 familias (73,33%) aplicaron: filtración (16,66%), agua hervida (53,33%) y ozono (6,66%), mientras que el 33,33% reportó consumir agua del grifo (Figura 7).

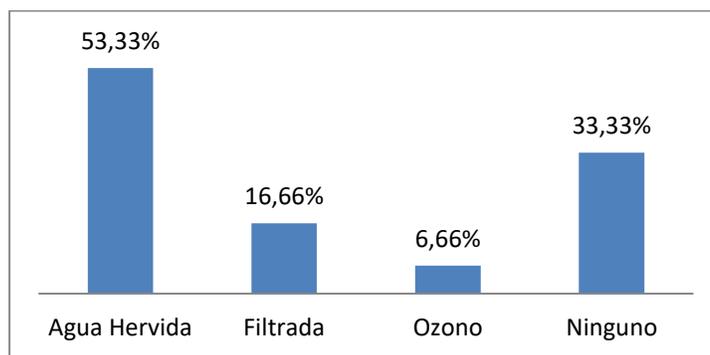


Figura 7. Métodos de desinfección del agua potable empleados por habitantes de Renacer y Santa Eduvigis.

En cuanto a los hábitos dietéticos, el 93,33% de las familias estudiadas refiere ingerir vegetales crudos, de los cuales el 66,66% de las familias usa como método de desinfección agua de grifo y vinagre (Figura 8), representando un 75% de los casos positivos para *H. pylori*.

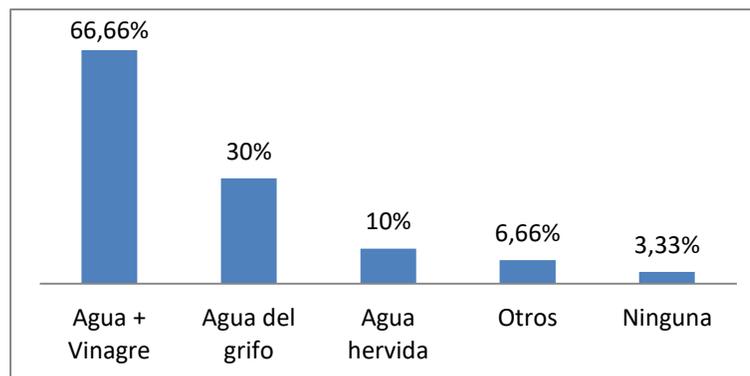


Figura 8. Métodos de desinfección de vegetales empleados por habitantes de Renacer y Santa Eduvigis.

Al evaluar la infección previa con *H. pylori*, se determinó que ésta estuvo presente en 12 familias (40%), de las cuales 8 (66,66%) recibieron tratamiento, mientras que 4 no recibieron tratamiento (33,33%).

Respecto al antecedente familiar de cáncer gástrico, este antecedente estuvo presente en 8 familias, representando el 26,66% (Figura 9).

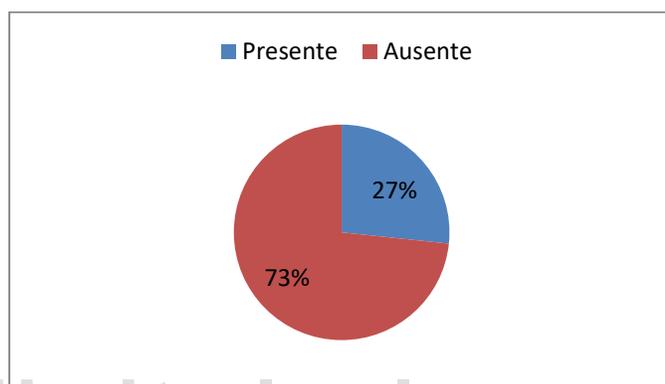


Figura 9. Antecedente de cáncer gástrico en familias de Renacer y Santa Eduvigés.

2.- Evaluación bacteriológica de *H. pylori* y CagA en las muestras de aguas.

2.1. Parámetros físico-químicos.

Durante el muestreo de los tanques y nacientes de aguas, se registraron los siguientes parámetros fisicoquímicos del agua: oxígeno disuelto con valores comprendidos entre 6,9 y 9 mg/L, temperatura entre 10,1 y 22°C y pH entre 5,1 y 6. 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 tanques de Mucuchíes corresponden a aguas del sub-tipo 1A, cuyos valores de oxígeno disuelto deben ser mayores a 4,0 mg/l y pH entre 6,0 a 8,5⁵⁸. Los resultados de pH se encontraron por debajo de lo estipulado por esta normativa, mientras que los de oxígeno disuelto estuvieron dentro de los límites establecidos. Las temperaturas

determinadas se corresponden con las temperaturas locales durante el muestreo y similares a las reportadas para el área de estudio^{3,4} (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos del agua en los sitios de muestreo en Mucuchíes.

Sitio de muestreo de agua	pH	Oxígeno disuelto (mg/L)	Temperatura (°C)
1. Tanque Misintá	5,1	7,6	18.7
2. Tanque la Hoyada	5,5	8,4	16.5
3. Tanque Renacer	5,5	6,9	22
4. Naciente de Misintá	5,5	7,9	14.5
5. Quebrada los Chorros	5,3	9	10.1
6. Tanque los Aposentos	6	8,7	13
7. Tanque la Toma	5,3	-	10 – 12

2.2. Detección de *H. pylori* por FISH y la isla de patogenicidad CagA por Inmunohistoquímica.

En todos los filtrados de aguas de Mucuchíes, se evidenció por FISH la presencia de células predominantemente cocoides o coco-bacilares positivas a la sonda específica de *H. pylori* (Hpy-1, fluorescencia roja). De igual forma se identificaron por Inmunohistoquímica células de esta bacteria que resultaron positivas a los anticuerpos primario (IgG anti-CagA de *H. pylori*) y secundario (IgG anti-conejo asociado con FITC, fluorescencia amarillo-verdoso) indicativas de la proteína o isla de patogenicidad CagA (Figura 10).

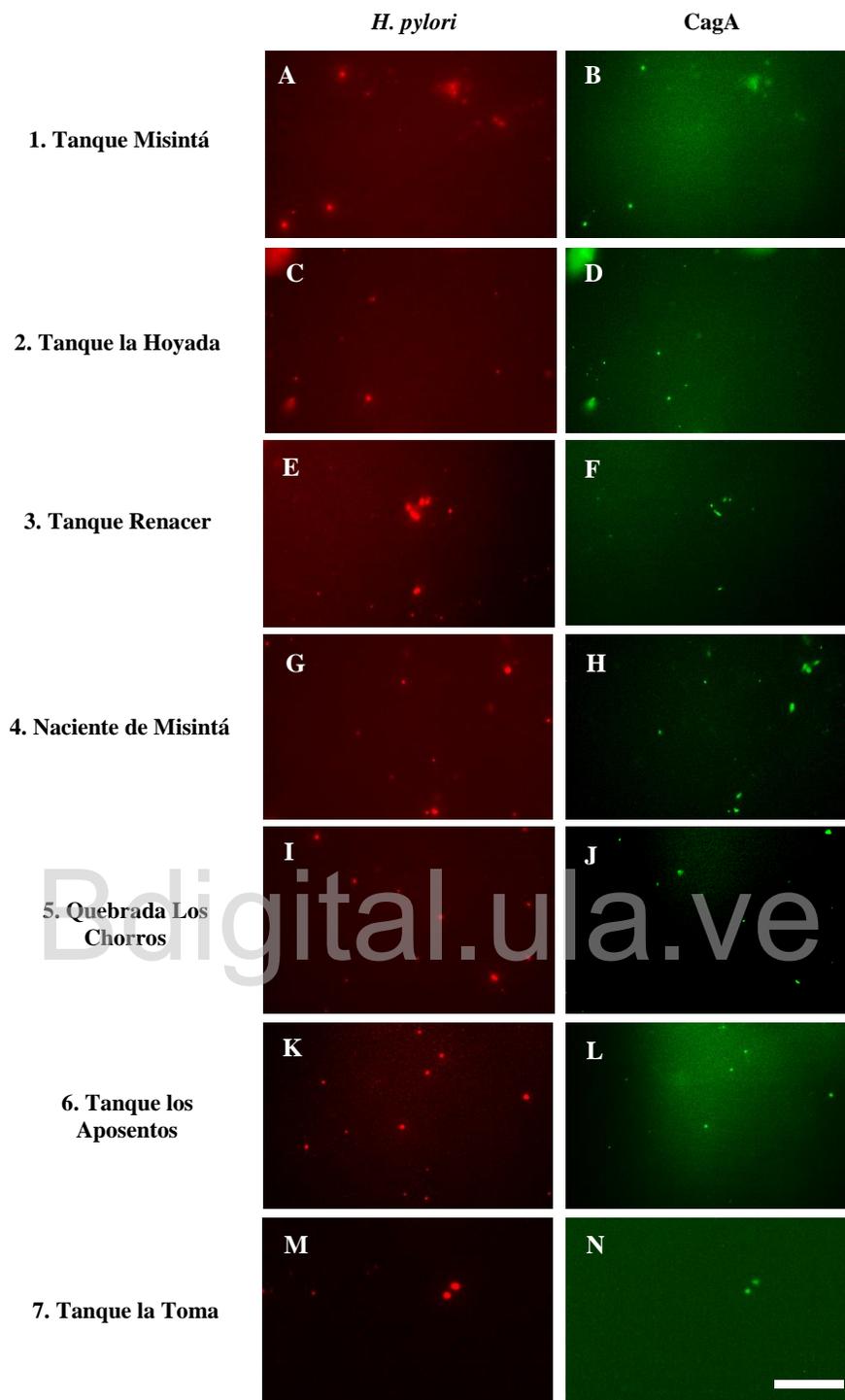


Figura 10. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia correspondientes a filtrados de agua de Mucuchíes. Se observan células positivas a *H. pylori* (rojas) por FISH y CagA (verdes) por Inmunohistoquímica en aguas del tanque Misintá (A –B), Tanque la Hoyada (C-D), Tanque Renacer (E-F), Naciente de Misintá (G-H), Quebrada Los Chorros (I-J), Tanque los Aposentos (K-L) y Tanque la Toma (M-N). Barra A–N: 10 μ m.

Se determinó en las muestras de aguas un rango de concentración de *H. pylori* de $9,97 \times 10^6$ a $4,73 \times 10^7$ cel/mL y CagA de $5,33 \times 10^6$ a $3,03 \times 10^7$ cel/mL, con una mayor concentración en la Quebrada Los Chorros (sitio 5). Adicionalmente, se identificó y cuantificó con la sonda EUB-338 488 N-5' el número de eubacterias en cada muestra de agua como control de la presencia de bacterias generales y el conteo de células totales (CT) mediante tinción de Ioduro de propidio para la estimación del porcentaje y concentración de *H. pylori* y CagA (Tabla 4). Para este fin se emplearon las siguientes ecuaciones:

CT

$$= \sum \text{cél 5 cuadrantes} \times 50 \text{ (factor cámara)} \times 0,8 \text{ (dilución ioduro)} \times 20 \times 200 \text{ (diluciones muestras)}$$

$$\% \text{ células Hp o CagA} = (\sum \text{Hp o CagA}) / (\sum \text{Hp o CagA} + \sum \text{Eub}) \times 100$$

$$[\text{Hp o CagA}] = (\% \text{ Hp o CagA}) \times \text{CT}$$

Tabla 4. Contaje de células totales y eubacterias, porcentaje y concentración de *H. pylori* y CagA (CT) en filtrados de aguas de Mucuchíes.

FA	Contaje de <i>H. pylori</i> (cel/campo)	Contaje de Eu (cel/campo)	Contaje de CagA (cel/campo)	porcentaje Hp (%)	a (nro total de cel en cámara neubauer mejorada)	Contaje total de células (cel/ml)	Concentración de <i>H. pylori</i> (cel/ml)	porcentaje de CagA (%)	CagA/ml
1.1	41	32	30	56,16	2,00	3,20E+05	1,80E+07	29,13	9,32E+06
2.1	62	26	44	70,45	1,00	1,60E+05	1,13E+07	33,33	5,33E+06
3.1	48	29	45	62,34	1,00	1,60E+05	9,97E+06	39,34	6,30E+06
4.1	20	17	16	54,05	5,00	8,00E+05	4,32E+07	37,74	3,02E+07
5.1	39	27	37	59,09	5,00	8,00E+05	4,73E+07	37,86	3,03E+07
6.1	26	123	21	17,45	4,00	6,40E+05	1,12E+07	15,29	9,79E+06
7.1	11	15	10	42,31	3,00	4,80E+05	2,03E+07	30,56	1,47E+07

Por otra parte, el control positivo del ensayo de FISH mostró morfologías características de *H. pylori* y la ausencia de células en el control negativo (*Shigella* spp.) (Figura 11), indicando la especificidad de la sonda Hpy-1.

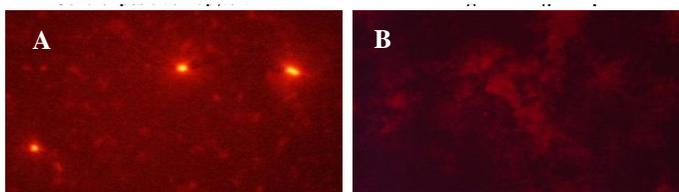


Figura 11. Controles positivo (A, cepa clínica de *H. pylori*) y negativo (B, *Shigella* spp. ATCC11126) empleados para evaluar la sensibilidad y especificidad de los ensayos de FISH en la detección de *H. pylori* en filtrados de aguas. Barra A–B: 10 μ m.

3. Evaluación de agroquímicos por HPLC-DC en muestras de aguas.

Previamente a la evaluación de agroquímicos por HPLC-DC, se prepararon curvas de calibración con absorbancias y concentraciones de los patrones bifentrina, clorpirifós, famoxadona y cimoxanil (Figuras 12, 13, 14 y 15 respectivamente), estudiando estadísticamente los parámetros analíticos a través de la ecuación de regresión lineal del gráfico de calibración en cada analito. Estas curvas se utilizaron como referencia para la detección de agroquímicos en las muestras de aguas de Mucuchíes.

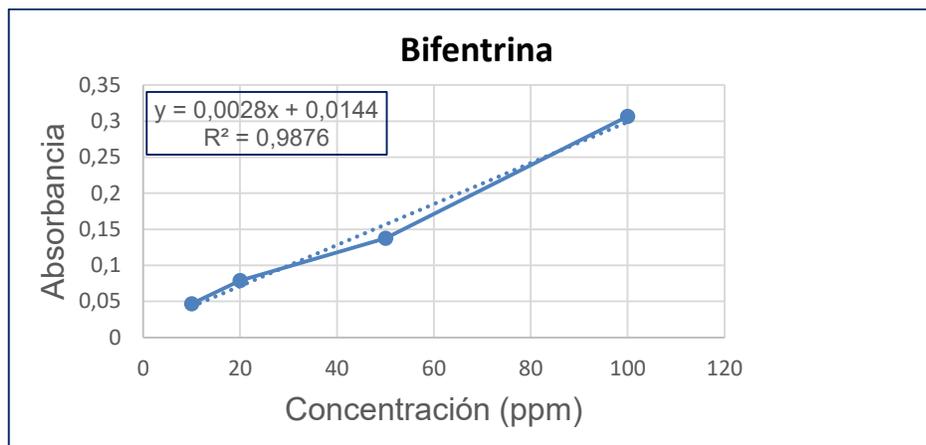


Figura 12. Curva de calibración que presenta los niveles de concentración y absorbancia para el pesticida Bifentrina.

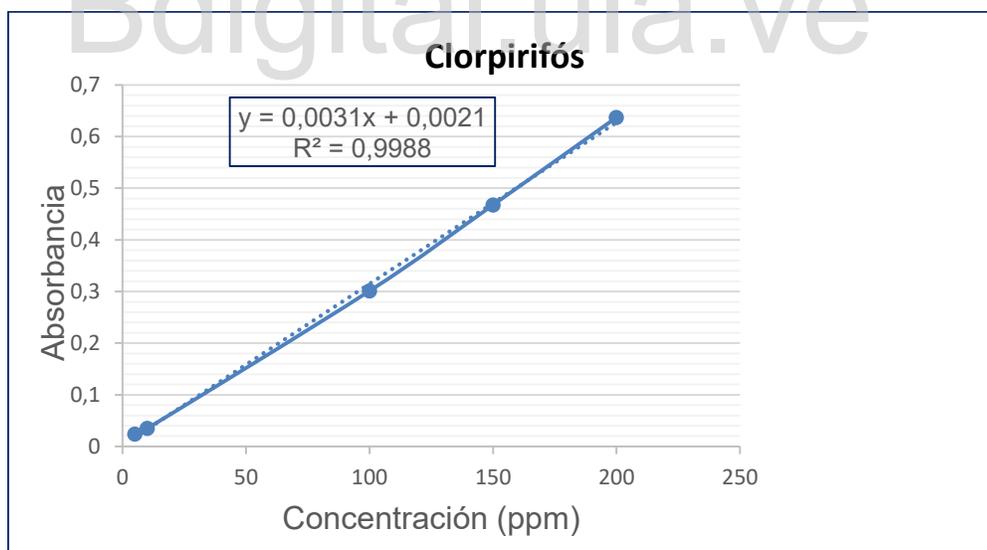


Figura 13. Curva de calibración que presenta los niveles de concentración y absorbancia para el pesticida Clorpirifós.

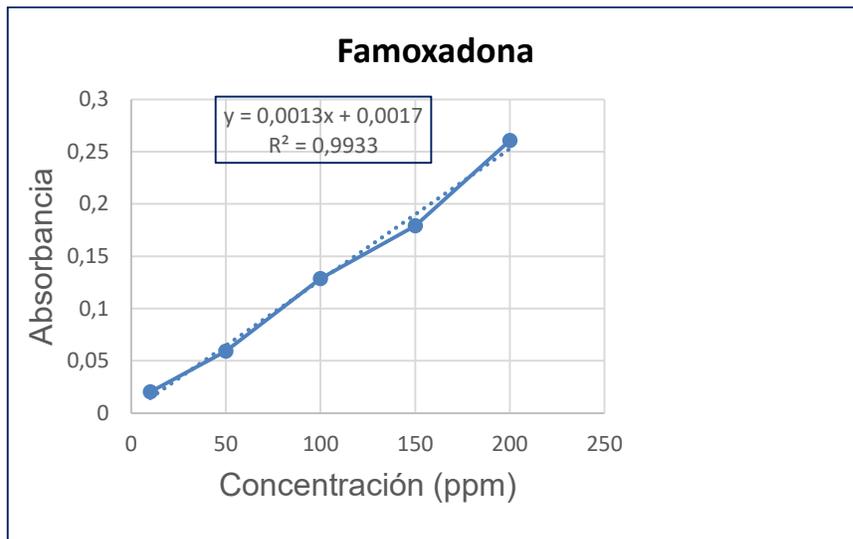


Figura 14. Curva de calibración que presenta los niveles de concentración y absorbancia para el pesticida Famoxadona.

Bdigital.ula.ve

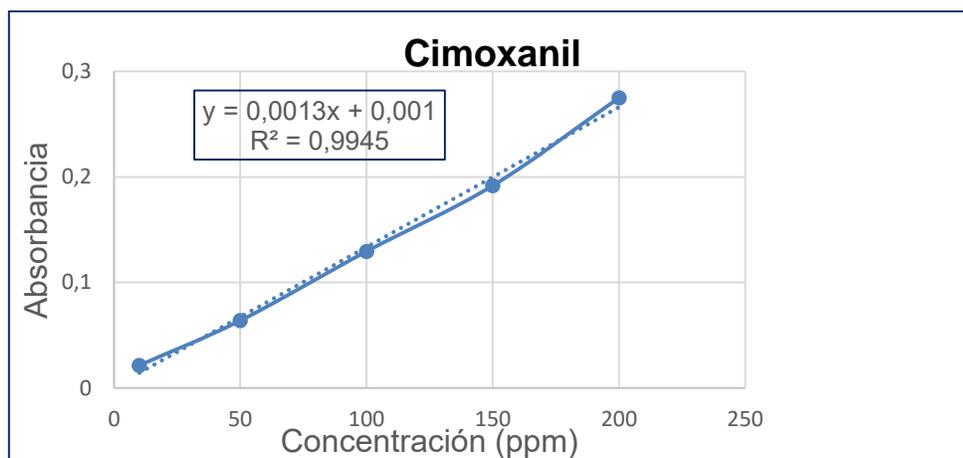


Figura 15. Curva de calibración que presenta los niveles de concentración y absorbancia para el pesticida Cimoxanil.

C.C.Reconocimiento

En el desarrollo del método, se establecieron los cromatogramas de los patrones (Figuras 16, 17 y 18 respectivamente), que fueron comparados con cromatogramas de las muestras de aguas de Mucuchíes.

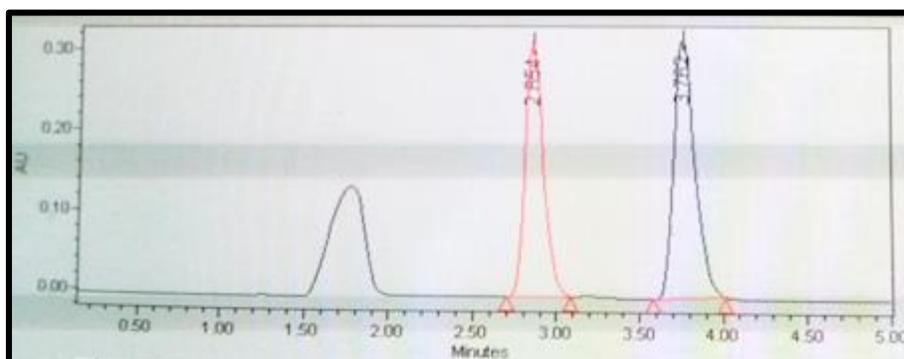


Figura 16. Cromatograma del producto Equation Pro, componentes activos cimoxanil (pico ubicado en tiempo de retención 2-3 min, color rojo) y famoxadona (pico ubicado en tiempo de retención 3,5-4 min, color azul). Pico ubicado entre 1,5-2,00 min corresponde a algún otro ingrediente activo del producto.

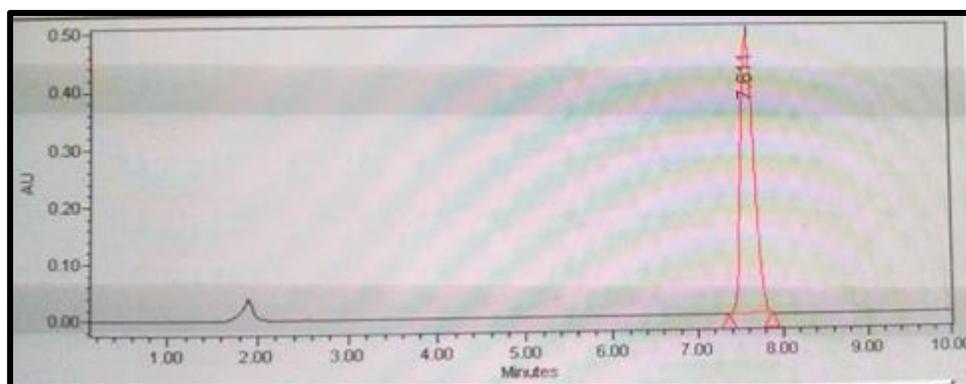


Figura 17. Cromatograma del producto Lorsban (componente activo: Clorpirifós).

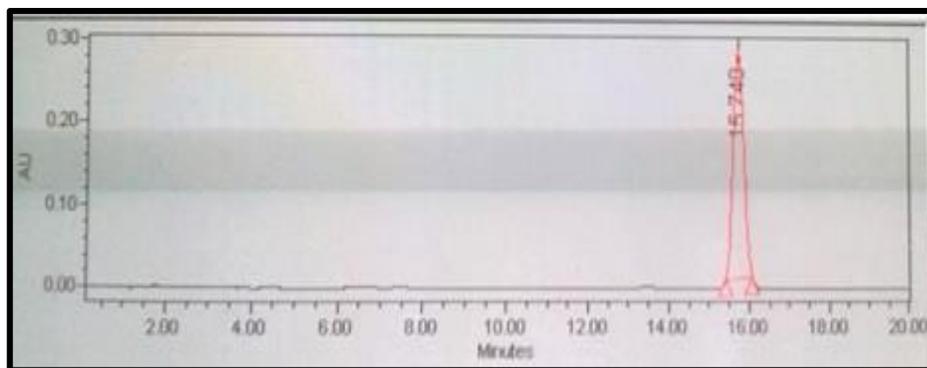


Figura 18. Cromatograma del producto Brigadier (componente activo: Bifentrina).

Preliminarmente, en las muestras de aguas de Mucuchíes se encontraron picos indicativos de posibles compuestos con tiempos de retención entre los minutos 2 y 3 (Figuras 19, 20 y 21 representativas de todos los sitios de muestreo), lo cual sugiere que este pesticida podría estar presente en las muestras de aguas. Sin embargo, la confirmación de este resultado por el detector de arreglos de diodos UV, herramienta acoplada al HPLC que permite identificar la longitud UV de los compuestos, indicó diferentes longitudes de onda entre el cimoxanil (240,3 nm) y las muestras de aguas (221,5 nm) (Anexos 2 y 3), descartando la presencia de este pesticida en las aguas de Mucuchíes.

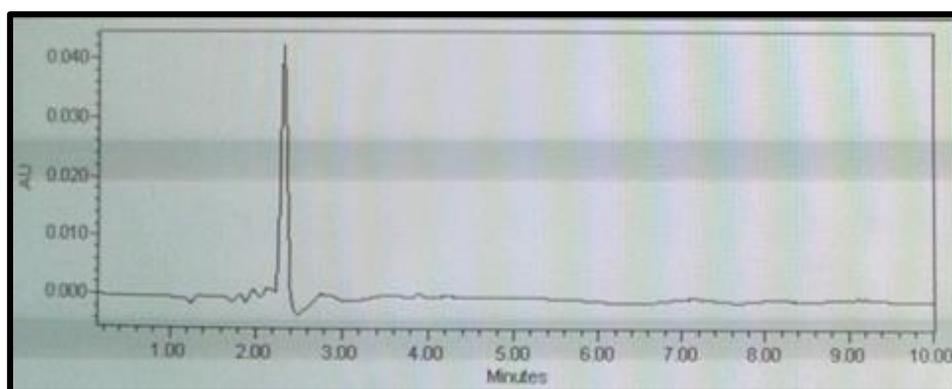


Figura 19. Cromatograma de muestra de agua del Tanque la Hoyada (sitio 2).

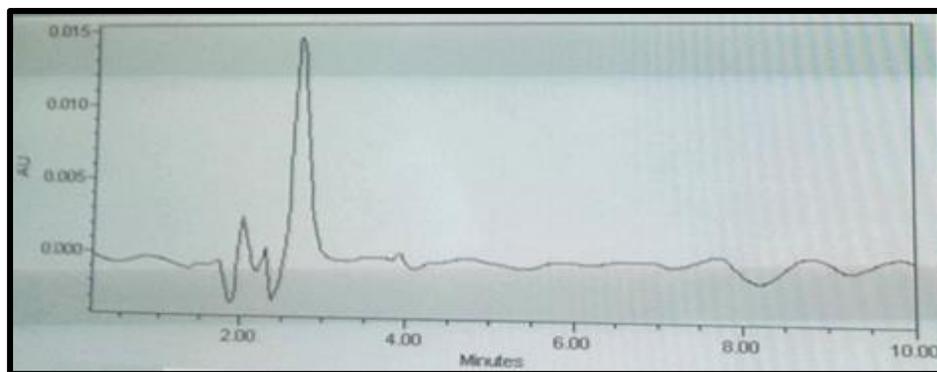


Figura 20. Cromatograma de muestra de agua del Tanque Renacer (sitio 3).

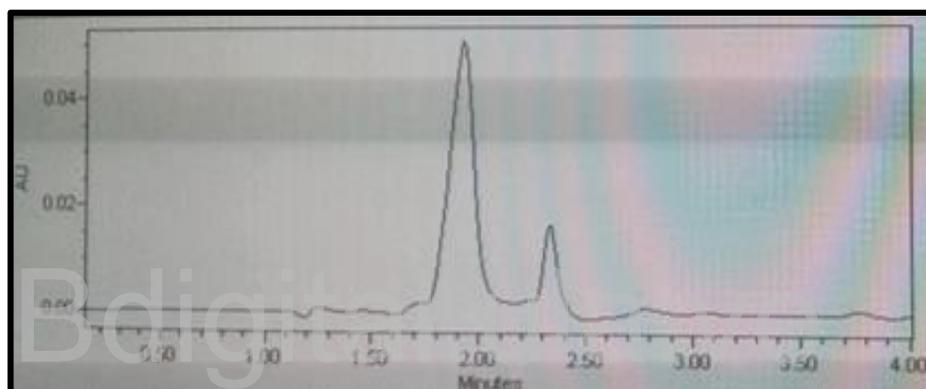


Figura 21. Cromatograma de muestra de agua del Tanque la Toma (sitio 7).

Adicionalmente, se realizó un análisis de las muestras de aguas por espectrometría de masas. Esta técnica arrojó resultados de algún compuesto químico presente en estas aguas de Mucuchíes distinto a los pesticidas convencionales y a los reportados por los agricultores de la localidad (Bifentrina, Clorpirifós, Famoxadona y Cimoxanil).

4. Análisis estadístico.

En vista de la ausencia de los principales agroquímicos usados por agricultores de Mucuchíes en las muestras de aguas de estudio, no fue posible realizar análisis de correlación entre ésta y las otras variables del estudio.

A pesar de ello, se realizó un análisis de varianza por la prueba no paramétrica Mann-Whitney entre las concentraciones de antígenos fecales de *H. pylori* de las comunidades Renacer y Santa Eduvigis, encontrándose que no hay diferencia significativa ($p>0,05$) en la prevalencia de infección de *H. pylori* presentada por los voluntarios habitantes de estas dos comunidades.

Así mismo, se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre antígenos fecales de *H. pylori*, concentración de esta bacteria y CagA en muestras de aguas y variables clínicas e higiénico-sanitarias de los individuos evaluados en la población de Mucuchíes, considerándose una correlación positiva en aquellas variables que presenten un valor de r cercano a 1 y una correlación negativa en variables con valores negativos cercanos a -1.

Entre todas las variables evaluadas, se encontró una correlación significativa entre la concentración de *H. pylori* en aguas con la concentración de CagA en aguas ($r=1$) y una correlación con la concentración de Antígenos fecales de $r=0,9$. Mientras que la concentración de antígenos fecales de *H. pylori* y la presencia de epigastralgia ($r=0,3$; $p=0,01$) y a su vez una correlación negativa entre la concentración de antígenos fecales y los individuos asintomáticos ($r=-0,33$; $p=0,004$). Otras variables que presentaron correlación se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Variables del estudio que presentaron correlación de Pearson.

Prueba de correlación de Pearson			
Variable	Variable	<i>p</i>	<i>r</i>
Concentración de <i>H. pylori</i> en aguas (cel/L)	Comunidad	0	1
Concentración de CagA en aguas (cel/L)	Comunidad	0	1
Antecedente familiar de cáncer gástrico	Concentración de <i>H. pylori</i> en aguas (cel/L)	0	1
Individuo nunca infectado	Antecedente familiar de cáncer gástrico	3,83E-11	-0,686632
Epigastralgia	Antígenos fecales <i>H. pylori</i> (ng/ml)	0,0104585	0,302078
Asintomático	Antígenos fecales <i>H. pylori</i> (ng/ml)	0,00479633	-0,3311
Asintomático	Individuo nunca infectado previamente	0,0379045	0,246916
Desinfección de Agua por medio de Filtrado	Individuo nunca infectado previamente	0,0120025	-0,29665
Desinfección de Agua por medio de Filtrado	Individuo con infección previa de <i>H. pylori</i>	0,0105765	0,301639
Ninguno método de desinfección de Vegetales	Antecedente familiar de cáncer gástrico	0,00947367	0,305917
Epigastralgia	Antígenos fecales <i>H. pylori</i> (ng/ml)	0,0104585	0,302078
Asintomático	Antígenos fecales <i>H. pylori</i> (ng/ml)	0,00479633	-0,3311
Asintomático	Individuo nunca infectado	0,0379045	0,246916
Desinfección del Agua por filtrado	Individuo nunca infectado	0,0120025	-0,29665
Desinfección del Agua por filtrado	Individuo con infección previa de <i>H. pylori</i>	0,0105765	0,301639
Ninguno método de desinfección de Vegetales	Antecedente familiar de cáncer gástrico	0,00947367	0,305917

Por otra parte, por medio del análisis de conglomerados o “cluster” se determinó la similitud entre las variables a través del programa PAST, evidenciándose que existen individuos como el N° 36 (Figura 22) que no presentan un comportamiento similar en las variables evaluadas en relación a los demás individuos, por lo que es preciso determinar en estudios posteriores los factores que favorecen esta conducta.

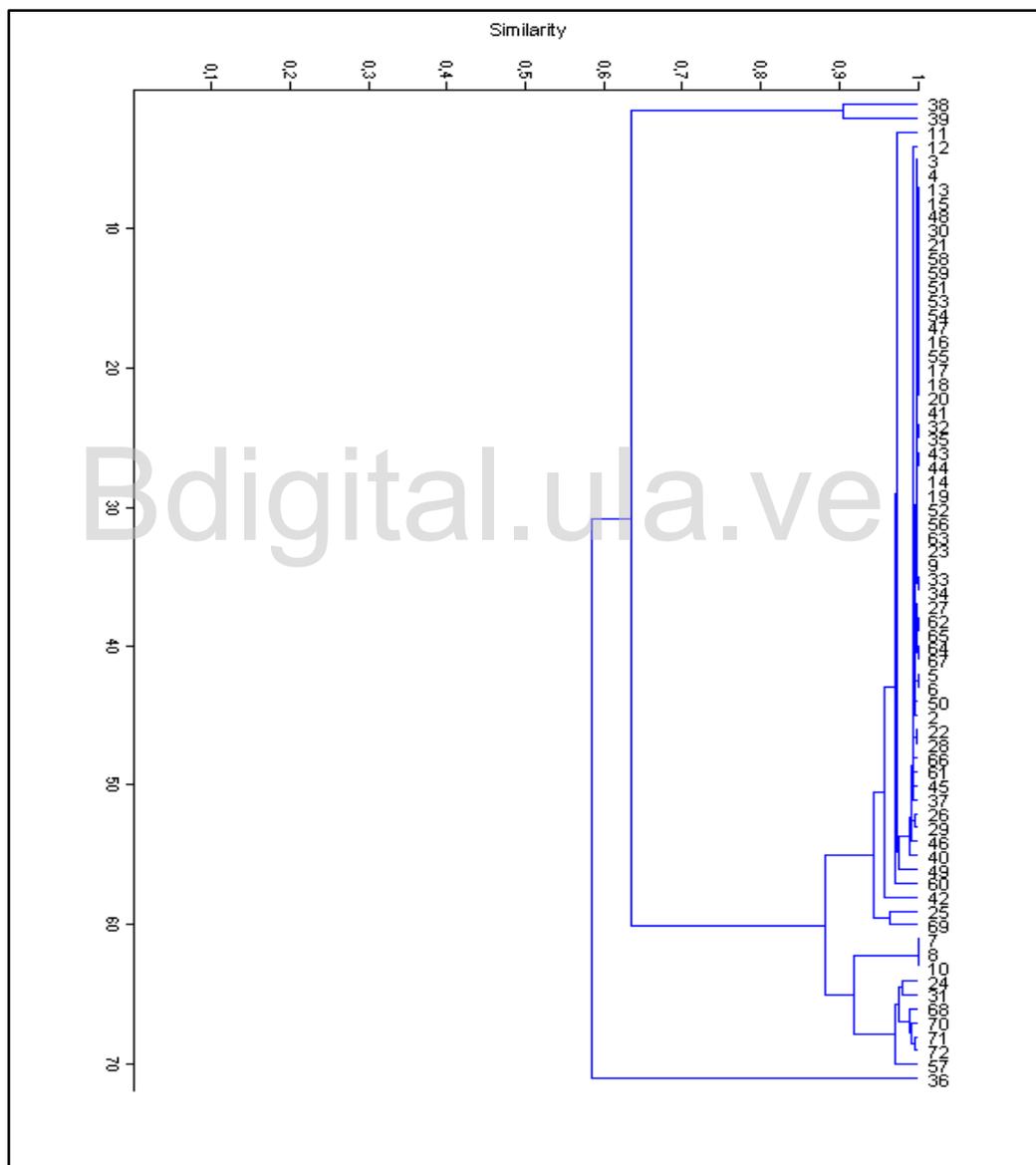


Figura 22. Análisis de conglomerados o “cluster” que muestra la similitud entre los individuos del estudio en relación a las variables evaluadas.

DISCUSIÓN

En la población de Mucuchíes se encontró en nuestro estudio una prevalencia de infección por *H. pylori* de 74,65% determinada por medio del test cuantitativo de antígenos fecales, cifra que coincide con lo descrito en la literatura para Venezuela⁵⁹, siendo factores que influyen la edad, género, ubicación geográfica y condición socioeconómica de los individuos, que permiten mantener variaciones en las poblaciones de un mismo país, como fue descrito en una comunidad pemón del estado Bolívar, Venezuela, con una prevalencia baja de infección por *H. pylori* del 11%.⁵⁶

En Mérida, se describen para Mucuchíes una prevalencia entre el 68% y 77%,^{24,60,61,62} similar a la encontrado en nuestro estudio, con una tasa alta en los jóvenes quienes adquieren la infección antes de los 10 años.⁵⁹ Por el contrario nuestra prevalencia difiere de las cifras registradas en países desarrollados donde no supera el 40%.^{63,64}

Los métodos cualitativos y cuantitativos permiten determinar la presencia del *H. pylori*. Estos últimos con mayor valor, principalmente el test cuantitativo de antígenos fecales, por permitir evaluar la densidad bacteriológica, además de demostrar ser un método fácil, rápido, económico e indirectos. Este test se puede realizar en cualquier edad con una sensibilidad y especificidad del 96,1% y 90,6%, respectivamente, lo cual permite determinar la infección en grandes poblaciones como método de despistaje.⁶⁵ Mientras que otros métodos como el test de la ureasa, cultivo y la histología por ser métodos invasivos o directos representan mayor riesgo, molestias para el paciente y requieren sedación.²⁷

Estudios han demostrado 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.^{3,4,18} En nuestro estudio se logró determinar y cuantificar por medio de FISH la presencia de este patógeno predominantemente en forma cocoide o VNC en todas las fuentes de agua potable y aguas de riego estudiadas en Mucuchíes, similar a lo encontrado en estudios previos, resultados que sugieren la influencia del agua como fuente de infección y reinfección.^{3,4}

El *H. pylori* es una bacteria con múltiples factores de patogenicidad y virulencia, entre los que se describe la isla de patogenicidad CagA como factor asociado a patologías benignas y malignas⁶⁶. En nuestro estudio se determinó y cuantificó la presencia de esta proteína en fuentes de agua potable a través de la estandarización de ensayos de Inmunohistoquímica acoplados a FISH para la detección simultánea de la bacteria y este factor de virulencia, resultando positiva y en números similares al conteo de células de *H. pylori* en todos los sitios de muestreo. Estos resultados indican la presencia de la bacteria en las fuentes de agua potable y de riego de vegetales de Mucuchíes con potencial de causar patologías importantes en esta población, como el cáncer gástrico. Otros estudios han reportado ninguna o baja identificación del gen *cagA* en fuentes de aguas por medio de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).^{4,67} Fernández-Delgado et al. (2016) realizó un estudio en ambientes acuáticos del Tepuy Roraima (Estado Bolívar) sin lograr detectar el gen *cagA* por PCR, posiblemente debido a la baja concentración o fragmentación del ADN en las muestras evaluadas y al diseño clínico de los cebadores, los cuales podrían no ser suficientemente robustos para permitir la detección precisa de genes de *H. pylori* en fuentes de aguas.⁵⁶ Por ello, se propone la Inmunohistoquímica para la detección de la proteína CagA en fuentes de aguas, así como distintos trabajos han propuesto al FISH como una técnica de mayor sensibilidad que la PCR para la detección de

genes específicos de *H. pylori* en muestras ambientales.^{4,34,56} Los resultados del FISH acoplado a la Inmunohistoquímica indican la prevalencia de células de *H. pylori* portadoras de CagA en fuentes de aguas de los tanques de agua potable, quebradas que surten a estos tanques y aguas de riego de Mucuchíes, con el potencial de transmisión por la vía acuática de la infección y del principal factor de virulencia asociado a cáncer gástrico a las personas de la localidad que consumen estas fuentes de aguas.

El 63,6% de los individuos con infección por *H. pylori* fueron sintomáticos, lo cual se corresponde con estudios previos realizados en la zona^{3,4} cuyos resultados reafirman que la presencia del patógeno en el tracto digestivo superior está estrechamente relacionada con diversas patologías⁶⁸, aun cuando no sea específico ni sensible para la sospecha diagnóstica y un buen porcentaje de infección se presenta en forma asintomática.²⁵ Este comportamiento coincide con la evolución natural de la infección comprobada por estudios realizados en Estados Unidos y en Europa que demuestran 37% y 34,9% respectivamente de pacientes infectados, son asintomáticos, resultados más altos a los encontrados en nuestro estudio (18,86%).⁶⁹

El análisis estadístico demostró correlaciones positivas entre las concentraciones de *H. pylori* y la isla de patogenicidad CagA en las muestras de aguas con las concentraciones de antígenos fecales presentes en individuos de las comunidades estudiadas. Así mismo, la concentración de *H. pylori* en aguas se correlacionó con la presencia de infecciones previas, sugiriendo que las concentraciones de antígenos fecales encontradas en los voluntarios están relacionadas con las concentraciones de *H. pylori* en aguas de los tanques que surten a cada comunidad. Por ello, se plantea la transmisión acuática como método de infección de los individuos, como en otro estudio.⁷⁰

Adicionalmente, el análisis estadístico indicó que los individuos nunca infectados por *H. pylori* consumían y utilizaban el agua hervida como método de desinfección de vegetales ($r=0,86$), lo que señala que el agua hervida puede ser un método de desinfección adecuado de los vegetales para erradicar el *H. pylori*.³

Los individuos no infectados por *H. pylori* no presentaban antecedentes de cáncer gástrico con una correlación de $-0,68$, mientras que la variable concentración de *H. pylori* en aguas presentó correlación positiva con los antecedentes familiares de cáncer gástrico y la concentración de antígenos fecales, pudiendo sugerir la transmisión acuática de la bacteria en los habitantes de Mucuchíes y estos a su vez condicionar un factor importante en el desarrollo de cáncer gástrico, como ha sido descrito en la literatura donde se describe a el *H. pylori* como un carcinógeno de tipo 1.⁷¹

A pesar de que los habitantes que consumían agua y vegetales sin ningún método de desinfección no reportaron resultados estadísticamente significativos, con relación a la infección, los habitantes que tenían consumo de agua sin ningún método de desinfección presentaron con mayor frecuencia epigastralgia, siendo éste el síntoma que prevaleció en los voluntarios infectados con mayores concentraciones de antígenos fecales ($r=0,3$ y $p=0,01$). Por el contrario, la población asintomática presentaron correlación negativa de $-0,33$ ($p=0,004$) con respecto a la concentración de antígenos fecales, sugiriendo este resultado que la epigastralgia es un síntoma importante en los individuos con infección por *H. pylori*, similar a lo reportado por Fernández y col en el 2014, quienes observaron que la epigastralgia era el síntoma más frecuentemente asociado a la infección por *H. pylori* (409 afectados, 20%); sin embargo, estos autores reportan que a pesar que puede existir

infección en pacientes asintomáticos, la epigastralgia prevalece en los pacientes con infección ($r=0,24$).⁷²

Se encontró correlación positiva entre las concentraciones de antígenos fecales y la familia evaluada ($r=0,90$), posiblemente debido a la transmisión interpersonal de *H. pylori*, similar a lo encontrado en estudios realizados en Austria y Canadá^{73,74} donde observaron un aumento de la prevalencia de la infección en miembros de la misma familia.

En relación al estudio de agroquímicos en las fuentes de aguas de Mucuchíes, la técnica utilizada para este análisis (HPLC) no evidenció los pesticidas, Equation Pro[®] (componentes activos cimoxanil y famoxadona), Lorsban[®] (componente activo clorpirifós) y Brigadier[®] (bifentrina), mayormente usados por agricultores de la localidad, los cuales fueron reportados en encuestas realizadas en el 2015 previo al muestreo de Julio de ese mismo año. Esta técnica presenta gran ventaja para la determinación de multiresiduos de pesticidas, debido a su gran potencial de separación e identificación y su aplicabilidad en una gran variedad de matrices y compuestos (productos volátiles, termolábiles). A pesar de no detectarse estos pesticidas convencionales en las aguas de Mucuchíes, estas muestras presentaron con el detector de arreglos de diodos UV picos con tiempos de retención entre los minutos 2 y 3 que no corresponden a los patrones de pesticidas estudiados. Estos picos pueden pertenecer a otros tipos de pesticidas no reportados por los agricultores de la localidad o derivados de los compuestos analizados que requieren mayores estudios químicos para su identificación. En contraposición a nuestros hallazgos, Flores y col. en el 2008⁴⁸ encontraron niveles elevados de pesticidas en aguas del municipio Rivas Dávila, Edo. Mérida, principalmente diazinon (26,31 $\mu\text{g/L}$), metamidofos (10,99 $\mu\text{g/L}$), malation (2,03 $\mu\text{g/L}$) y mancozeb (1,27 $\mu\text{g/L}$). Sin embargo, estos niveles de plaguicidas no superaron los valores máximos permitidos por la Legislación Venezolana.⁵⁸

CONCLUSIONES

- El test cuantitativo de antígenos fecales es un método no invasivo para la detección rápida de *H. pylori* que permite el diagnóstico inicial y comprobar su eliminación posterior al tratamiento erradicador.
- Por primera vez en Venezuela, se evaluó por medio de las técnicas de FISH e Inmunohistoquímica la presencia de *H. pylori* y su principal factor de virulencia (Cag A) asociado con el cáncer gástrico, encontrándose en concentraciones elevadas en la mayoría de las muestras de aguas potables y de riego de Mucuchíes. Por lo cual se comprueba que el agua actúa como fuente de infección.
- El consumo de agua sin método de desinfección representa una de las principales vías de transmisión de *H. pylori* en las comunidades estudiadas de Mucuchíes.
- Se confirmó que las fuentes de aguas estudiadas son inadecuadas para su consumo como agua potable y uso en riego de vegetales, requiriendo métodos de tratamiento efectivos para su desinfección.
- Los principales agroquímicos empleados en Mucuchíes (cimoxanil, famoxadona, clorpirifós y bifentrina) no fueron identificados en las muestras de aguas evaluadas en Mucuchíes; sin embargo, se reportan picos de posibles compuestos agroquímicos o sus derivados que requieren posteriores análisis para su identificación y estimación de riesgos a la salud pública.

RECOMENDACIONES

1. Promover ante los organismos correspondientes la conservación del medio ambiente del páramo merideño (Municipio Rangel).
2. Mantener vigilancia a través de los programas de pesquisa y el seguimiento de los casos diagnosticados y tratados, así como aquellos pacientes con concentraciones de antígenos fecales cercanas a 10 ng/ml.
3. Evaluar con las autoridades correspondientes, las medidas implementadas a partir de septiembre del 2013 (en los tanques de consumo de agua potable y sistemas de riego en la población de Mucuchíes).
4. Evaluar la campaña de educación continua emprendida en Mucuchíes por la representante del IVIC en Mérida.
5. Realizar una campaña de concientización en la población de Mucuchíes, para evitar el consumo de zanahorias crudas, sin realizar las medidas de desinfección adecuadas.
6. Estudiar la presencia de otros tipos de agroquímicos en aguas y determinar la presencia de los mismos en la población de Mucuchíes, a fin de establecer si existe o no intoxicación crónica en sus habitantes.
7. En los estados andinos con alta prevalencia de infección por *H. pylori* e incidencia de carcinoma gástrico, se recomienda: hervir el agua de consumo, lavarse las manos con agua y jabón después de realizar sus necesidades fisiológicas, no consumir lechugas y los vegetales y legumbres deben ser cocinados. Promover el consumo de alimentos ricos en antioxidantes como carotenos (vitamina A) vitamina C y Vitamina E.

8. Presentar estos resultados ante las autoridades del ministerio del poder popular para la salud, ambiente, educación, alcaldías, representantes de las comunidades y otras organizaciones interesadas.
9. Insistir ante las autoridades correspondientes para establecer un programa de pesquisa de cáncer del aparato digestivo con sede en el Hospital de Mucuchíes, con apoyo de la unidad y del posgrado gastroenterología del IA. HULA, de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología, Sociedad Venezolana de Endoscopia Digestiva y Organización Panamericana de la Salud.
10. La Metodología aplicada en este TEG, puede ser aplicada en Bailadores donde existe condiciones similares al municipio Rangel.

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Casanova G. Temas de Gastroenterología. Vol. I, Publicaciones Facultad de Medicina. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. 2002; 98-116.
2. Ramírez P., Vera G., Casanova G. Presencia de *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y vegetales de cultivo. Mucuchíes, Municipio Rangel estado Mérida. Venezuela. (TEG). Mérida, Universidad de Los Andes. 2012.
3. Nieto Y., Fernández M., Casanova G. Asociación entre infección por *Helicobacter pylori* y el consumo de agua potable en la población de Mucuchíes, estado Mérida. (TEG). Mérida, Universidad de los Andes. 2014.
4. Duarte N., Fernández M., Casanova G. Detección de *Helicobacter pylori* en aguas de consumo humano de Mucuchíes, Municipio Rangel, estado Mérida. (TEG). Mérida, Universidad de los Andes. 2013.
5. Martínez V. González A. Belmonte V. y col. Estudio de la contaminación por pesticidas en aguas ambientales de la provincia de Almería. Ecosistemas 2004; 13 (3): 30-38.
6. Contreras I, Molina O, González B. Negociación de los Pesticidas utilizados para el control de plagas y enfermedades-Rubro Papa. Municipio Rangel-Estado Mérida. Visión gerencial 2005; (4):2.
7. Mendoza J. Botsford J. Hernandez J. et al. Microbial contamination and chemical toxicity of the Rio Grande. BMC Microbiology 2004; (4): 1-6.
8. Ley de Salud Agrícola Integral. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 5890 Extraordinario de fecha 31 de julio de 2008.

9. Feldman M, Friedman L, Sleissenger M. Sleissenger and Fordtran. Enfermedades Gastrointestinales y Hepáticas. Capítulo 48 *Helicobacter pylori*. 8ª edición. (2008); 1049-1066.
10. Kimura, N, Ariaga M Icatlo F, et al. A euthymic hairless mouse model of *Helicobacter pylori* colonization and adherence to gastric epithelial cells in vivo. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5 (4): 578–582.
11. Atherton J. *H. pylori* virulence factors. British medical bulletin 1998; 54 (1): 105-120.
12. Perez G, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter 2004; 9 (1):1-6.
13. Domínguez M. Socioeconomic and seasonal variations of *Helicobacter pylori* infection in patients in Venezuela. Am. J. Trop Med. Hyg 2002; 66 (1):49-51.
14. Flores Y, Casanova G. Características clínico-epidemiológicas de la infección por *Helicobacter pylori* en la población de Mucuchíes estado Mérida. (TEG). Mérida. Universidad de los Andes. 2009.
15. Berroteran A, Perrone N, Correnti M, et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. Journal of Medical Microbiology 2002; 51: 764-770.
16. Bellack N, Koehoorn M, MacNab Y, et al. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. Epidemiol. Infect 2006; 1-11.
17. Azevedo N, Almeida C, Fernandez I, et al. Survival of Gastric and Enterohepatic *Helicobacter* spp. in Water: Implications for Transmission. Appl Environ Microbiol 2008; 74 (6): 1805-1811.

18. Fernández M, Contreras M, García M, y col. Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*. Interciencia 2008; 33 (6): 412 – 416.
19. Bujanover Y, Reif S, Yahav J. *Helicobacter pylori* y enfermedad péptica en el paciente pediátrico. Clin Ped of North. Gastroenterology 1996; 23 (1): 35-42.
20. Acosta C, Benavides J, Sierra C. Análisis cualitativo del deterioro de la calidad del agua y la infección por *Helicobacter pylori* en una comunidad de alto riesgo de cáncer de estómago (Cauca, Colombia). Salud colectiva 2015; 11 (4): 575-590.
21. Montero V, Masís F, López G, y col. Hallazgo de la bacteria *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y su relación con la incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica. Tecnología en Marcha 2011; 24(3): 3-14.
22. Amelot M, Avendaño M. Conglomerados de cáncer gástrico en el estado Mérida, Venezuela. Interciencia 2009; 34 (9): 617-622.
23. Contreras M, Salazar V, García M, et al. High frequency of *Helicobacter pylori* in the esophageal mucosa of dyspeptic patients and its possible association with histopathological alterations. Int J Infect Dis 2012; 16: 364–370.
24. Silva R, Casanova G. Comparación entre el test de aliento y la densidad histológica en el antro gástrico, en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. (TEG). Mérida, Universidad de los Andes. 2008.
25. Dooley C, Cohen H, Fitzgibbons P, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. N Engl J Med 1989; 32 (1):1562-1566.
26. Montes H. Evaluación de un test de ureasa líquido en la detección de *H. pylori*. Acta Gastroenterol Latinoam 2003; 33: 73-78.

27. Carrero Y, Mercado M, Trespalacios A, y col. Comparación de la prueba de antígenos fecales (Elisa) y test de aliento de la urea frente a histología para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*: Revisión sistemática de la literatura. Rev Col Gastroenterol 2009; 24 (4): 373-381.
28. Velasco E, Fernandez M, Rodriguez N. Serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* in endoscopy personnel. Rev Esp Enferm Dig 2007; 99 (2): 88-93.
29. Dore MP, Negrini R, Tadeu V, Marras L, Emanouel L. Novel Monoclonal Antibody-Based *Helicobacter pylori* Stool Antigen. Test *Helicobacter* 2004; 9: 228-232
30. Asfeldt AM, Lochen ML, Straume B, et al. Accuracy of a Monoclonal Antibody-based Stool Antigen Test in the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. J Gastroenterol 2004; 39: 1073-7
31. Watson CL, Owen RJ, Said B, Lai S, Lee JV, Surman-Lee S, et al. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. J Appl Microbiol 2004; 97: 690-698.
32. Flanigan, D, Rodgers, M. A method to detect viable *Helicobacter pylori* bacteria in groundwater. Acta Hydroch. 2003; 31: 45 –48.
33. Samarbaf A, Tajbakhsh S, Mojtaba S, et al. Application of fluorescent in situ hybridization (FISH) for the detection of *Helicobacter pylori*. Med. Sci. Monit 2006; 12: 426-430.
34. Moreno Y. Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. Water research 2003; 37: 2251-2256.

35. Rüssmann H, Kempf V, Koletzko S, et al. Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol* 2001; 39 (1): 304-308.
36. Tajbakhsh S, Samarbaf A, Mojtaba S, et al. Comparison of fluorescent in situ hybridization and histological method for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples. *Med Sci Monit* 2008; 14 (9): 183-187.
37. Braganca S, Azevedo N, Simoes L. Use of fluorescent in situ hybridisation for the visualisation of *Helicobacter pylori* in real drinking water biofilms. *Water Science & Technology* 2007; 55 (8-9): 387-393.
38. Barros D. Técnicas de Detección y Aislamiento para la identificación De *Helicobacter Pylori* en Aguas. (TEG). Bogota. Pontificia Universidad Javeriana. 2012.
39. Covacci A, Telford J, Gludice G, et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284:1328-33
40. Breurec S, Michel R, Seck A, et al. Clinical relevance of 54 *cagA* and *vacA* gene polymorphisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:153-9.
41. Fochesatto N, Guayán V, Moran E. *Helicobacter pylori* y enfermedad gastroduodenal. Bases para el Diagnóstico y Tratamiento. Argentina. Rev de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina 2004;138:11-17.
42. Maldonado H. El uso de plaguicidas, la salud y la Educación Agrícola. Táchira (Venezuela). *Geoenseñanza* 1997; 2: 62 – 75.
43. Benítez R. Plaguicidas y efectos sobre la salud humana: un estado del arte. Artículo de revisión. *Geoenseñanza* 2012; 1-98.

44. Ramos O. Determinación de plaguicidas organoclorados en el agua potable de CD. Victoria, TAMPS. Y su potencial riesgo a la salud. (TEG). Mexico. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2004.
45. Organización Mundial de la Salud. Agua para la salud: un derecho humano [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. 2002. Disponible en: <http://goo.gl/9MjeNx>.
46. Torres D. Capote T. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Ecosistemas Rev Científica y Técnica* 2004; 13 (3): 2-6.
47. Benítez P. Miranda, L. Contaminación de aguas superficiales por residuos de plaguicidas en Venezuela y otros países de Latinoamérica. *Rev Int Contam Amb* 2013; 1 (29):7-23.
48. Flores M. Molina Y. Balzay A. y col. Residuos de plaguicidas en aguas para consumo humano en una comunidad agrícola del estado Mérida, Venezuela. *Invest Clin* 2011; 52(4): 295–311.
49. Parraga C, Espinel R. Análisis de la actividad agrícola como contaminante del agua, alternativas tecnológicas para la desinfección del agua para consumo humano en comunidades rurales y recursos legislativos para la prevención y su conservación. Facultad de Ingeniería mecánica. Escuela superior politécnica. Ecuador. 2010;1-6.
50. Mohammad B. Landeros J. Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCyT Toxicología de Plaguicidas* 2007; 4 (19).
51. How V, Hashim Z, Ismail P, et al. Exploring cancer development in adulthood: cholinesterase depression and genotoxic effect from chronic exposure to

- organophosphate pesticides among rural farm children. *J Agromedicine* 2014; 19(1):35-43.
52. De Silva H, Samarawickrema N, Wickremasinghe A. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100 (9): 803-6.
53. Dich J, Zahm S, Hanberg A, et al. Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;8:420-443.
54. Birnbaum L. Environmental chemicals: evaluating low-dose effects. *Environ Health Perspect* 2012 120(4):143-4.
55. Baez, M. Zincker, J. Parametros de Calidad Analítica de un Método de Determinación Multiresiduos de Plaguicidas por HPLC-DAD. *Bol Soc Chil Quím* 1999;(1)44-357.
56. Fernández M, Giarrizzo J, García M, Contreras M, et al. Evidence of *Helicobacter* spp. in freshwaters from Roraima Tepuy, Guayana Shield, South America. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2016; 109(4):529-42.
57. Trebesius K, Leitritz L, Adler K, et al. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. *Med Microbiol Immunol* 2000; 188: 169-175.
58. Decreto 883: Decreto 883: Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o afluentes líquidos. *Gaceta Oficial* 5.021 Extraordinario 18/12/1995.

59. Lozano J, Lucena M, Pereira K y col. Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis. Correlación anatomopatológica. GEN. 2006; 60(3):193-195.
60. Bracho S, Vizcaya L, Velasquez A, Casanova G. Valoración de la prueba de ureasa, cultivo y coloración de Gram en la investigación de *Helicobacter pylori* de biopsias gástricas. Rev Fac Farm 1995,33:10-14.
61. De Sousa L, Vásquez I, Velasco J, Parlapiano D. Características clínicas y epidemiológicas de la infección por *Helicobacter pylori* en una población de los Andes Venezolanos. Rev Fac Farm 2004;46(2):2-7.
62. De Faria A, Casanova G, Milano M y col. Relación entre Histología y Prueba de Aliento Cuantitativa en Gastritis Folicular (*Helicobacter pylori*), Mucuchíes – Mérida. Gen 2012; 66(3):166-170.
63. Ortega J, Espino A, Calvo A, et al. Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes sintomáticos con patología gastroduodenal benigna. Análisis de 5.664 pacientes. Rev Med Chile 2010; 138: 529-535.
64. Sánchez F, Taxonera C, Garcia M y col. Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en población sana en la comunidad de Madrid. Rev Esp Enf Dig. (2007); 99 (9).
65. Carreño Y. Características operativas de las pruebas de antígenos fecales (Elisa) y test de aliento de la urea frente a la tinción de hematoxilina y Giemsa en histología para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*. Revisión sistemática de la literatura. Pontifica Universidad Javeriana. (TEG). 2009. 1- 134.
66. Covacci A, Censini S, Bugnoli M. Molecular characterization of the cag A gene of *Helicobacter pylori*. Acta gastroenterology 1995;5:51.

67. Alvarado L, Bustos S. Identificación de *Helicobacter pylori* en aguas residuales del Río Arzobispo. (TEG). Bogotá-Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 2013.
68. Molina A, Jaramillo C, Delgado M y col. Detección y genotipificación de *Helicobacter pylori* sobre la base de los genes ADNr 16S y el gen asociado a citotoxicidad (CagA) y posible asociación con enfermedades gastrointestinales. Rev Cub Med Trop 2008. 60(2):105-110.
69. EUROGAST Study Group. Epidemiology, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. Gut 1993;34:1672-1676
70. Camargo C, Tome E. *Helicobacter pylori*: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. An Venez Nutr. 2012; 25(2):85-93.
71. Acosta C, Benavides J, Sierra C. Análisis cualitativo del deterioro de la calidad del agua y la infección por *Helicobacter pylori* en una comunidad de alto riesgo de cáncer de estómago (Cauca, Colombia). SALUD COLECTIVA 2015;11(4):575-590.
72. Fernández J, Tacher V, García M y col. Caracterización de los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* durante un trienio. MEDISAN 2014; 18(7):951
73. Mitchell HM, Bohane T, Hawkes RA, et al. *Helicobacter pylori* infection within families. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1993;280:128-36. 119.
74. Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, et al. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 1990;322:359-63.

ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento Informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO (Anexo 1)

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 **“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”**.

Se me ha explicado que se me realizará un cuestionario y posteriormente se tomarán muestras de orinas y heces de mi grupo familiar y muestras de aguas de los tanques de la comunidad. Doy fe que se me ha informado acerca de los beneficios de ser partícipe en este proyecto de investigación, haciendo de mi conocimiento que contribuiré con el estudio de contaminación bacteriológica y agroquímica de las aguas de consumo humano de Mucuchíes, la prevalencia de infección por *H. pylori*, posibles factores de riesgo asociados con patologías gástricas en esta población y otros conocimientos que puedan derivarse de este proyecto.

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 2. FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FECHA: _____ **Casa #:** _____ **Número de Teléfono:**

Dirección _____

I. Datos del Jefe del Grupo Familiar:

II. Medidas Higiénico-sanitarias:

Métodos de desinfección del agua:

Filtro _____ Hierven el agua _____ Directo del tubo _____ Compran aguas envasadas _____

Vegetales Crudos: Sí _____ No _____ Cuáles? _____

Método de desinfección de vegetales crudos:

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

III. ¿A algún miembro de la familia le ha sido diagnosticada infección por H. pylori?

Sí _____ No _____

IV. ¿Recibió tratamiento?: Sí _____ No _____

V. ¿Hay antecedentes de Cáncer Gástrico en la familia? Sí _____ No _____

Parentesco _____

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

Náuseas		Meteorismo		Disfagia		Regurgitación		Anorexia		Pérdida de peso	
Vómitos		Distensión abdominal		Odinofagia		Pirosis		Eructos			

ANEXO 3. Concentraciones, longitud de onda y parámetros determinados por HPLC-DAD en patrones de agroquímicos.

Producto Equation Pro (componente activo: cimoxanil y famoxadona)

Pesticida	cimoxanil
Concentración	200 ppm
Tiempo de retención	Aprox. 3min
Absorbancia	0,0248
Longitud de onda	240,3 nm

Pesticida	famoxadona
Concentración	200 ppm
Tiempo de retención	Aprox. 4 min
Absorbancia	0,0243
Longitud de onda	229,7 nm

Producto Lorsban (componente activo: clorpirifós)

Pesticida	clorpirifós
Concentración	100 ppm
Tiempo de retención	Aprox. 8 min
Absorbancia	0,3002 nm
Longitud de onda	228,5

Producto Brigadier (componente activo: bifentrina)

Pesticida	bifentrina
Concentración	100 ppm
Tiempo de retención	Aprox. 16 min
Absorbancia	0,3065
Longitud de onda	210,45 nm

ANEXO 4. Concentraciones, longitud de onda y parámetros determinados por HPLC-DAD en muestras de aguas de Mucuchíes.

Muestras	Tanques la Hoyada, Renacer y la Toma
Concentración	desconocida
Tiempo de retención	Aprox. 2 y 3min
Absorbancia	0,040-0,015
Longitud de onda	221,5 nm

Bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento