

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO AUTÓNOMO HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES

UNIDAD DE GASTROENTEROLOGÍA

POSTGRADO DE GASTROENTEROLOGÍA

“ASOCIACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori* Y EL CONSUMO DE AGUA POTABLE EN LA POBLACIÓN DE MUCUCHÍES, ESTADO MÉRIDA”

Autora: Yenny A. Nieto A.

Médico Residente de III año.

Postgrado de Gastroenterología.

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

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

Asesor metodológico: MSc. Galo Buitrón (IVIC)
Lic. Adrián Torres (ULA).

Mérida, Septiembre de 2014.

AUTORA:

YENNY ANDREINA NIETO ALBARRACIN
MÉDICO CIRUJANO
RESIDENTE DE III AÑO DE POSTGRADO DE GASTROENTEROLOGÍA

TUTOR:

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

CO-TUTORA:

MILAGRO FERNÁNDEZ D.
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR
INVESTIGADOR ASOCIADO, INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (IVIC)

ASESOR METODOLÓGICO:

MSc. GALO BUITRÓN -JURADO
BIÓLOGO DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR.
CANDIDATO A DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MENCIÓN ECOLOGÍA.
CENTRO DE ECOLOGÍA. IVIC

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

AGRADECIMIENTOS

- A Dios y la Virgen por ser mi luz mi guía espiritual.
- Al Dr. Gerardo Casanova tutor y fundador del postgrado GRACIAS por ser maestro, guía por sus consejos y conocimientos impartidos.
- A la Dra. Milagros Fernández GRACIAS por toda su ayuda y apoyo en la realización de este Trabajo especial de Grado, por ser excelente profesional y ser humano siempre agradecida.
- Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) GRACIAS por haberme recibido en tal prestigiosa institución por permitirme realizar mi tesis de grado con todo su equipo material, humano profesional, Víctor Salazar microscopista, Lic. María José, Lic Ana Victoria.
- A mis madrinas de promoción Dra. Mareddy Contreras y Dra. Yaneth Flores GRACIAS por todo su apoyo, comprensión, formación, cariño y amistad.
- Al Postgrado de Gastroenterología de la Universidad de los Andes (HULA) especialistas y personal de enfermería, GRACIAS por todos los conocimientos impartidos, formación profesional y académica, por el apoyo recibido gracias! Los dejare en alto.
- A mis Padres Patricia y José mi fuerza mi mayor estímulo mi todo GRACIAS esto es por ustedes.
- A mis hermanas Erika, Jessica y sobrinos Sebas y Diego por ser mi alegría, mi estímulo GRACIAS por todo su apoyo.
- A mis amigas Angie y Fer GRACIAS por todo su apoyo a pesar de la distancia, por brindarme su apoyo y amistad sincera e incondicional.
- A mis compañeros de postgrado y amigos Pablo, Nere, Gaby, Yohana y Wendy GRACIAS por todo su apoyo, cariño por hacer más fácil el camino. Paola y María Isabel por todo su cariño, comprensión y apoyo GRACIAS.
- A la familia Bayona Segura GRACIAS por toda su ayuda, apoyo, cariño, en estos años de carrera.
- A las familias Ramírez y Torres Espindola por haberme recibido en sus hogares cuando lo necesite por todo su apoyo sincero y su cariño.
- Al personal de CAMIULA por toda la colaboración prestada y enseñanzas recibidas.
- A los habitantes de la Comunidad Renacer y Santa Eduvigis por su receptividad y colaboración prestada en nuestro estudio.
- Al departamento de microbiología de la Facultad de Farmacia por permitirnos sus instalaciones.
- Al laboratorio clínico de la Clínica Sanatrix por permitirnos la realización del test de antígenos fecales en sus instalaciones.

ÍNDICE

Introducción	7-8
Planteamiento del problema	9
Marco teórico	10-16
Antecedentes	17-18
Objetivos generales y específicos	19
Materiales y métodos	20-25
Resultados	26-37
Discusión	38-40
Conclusiones	41
Recomendaciones	42
Referencias Bibliográficas	43-50
Anexo 1	51
Anexo 2	52-53
Anexo 3- 4	54

RESUMEN

Introducción: *Helicobacter pylori* es agente causal de gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico. Estudios epidemiológicos han demostrado que el agua contaminada con heces es la principal fuente de infección en países en vías de desarrollo incluyendo Venezuela. Particularmente, una prevalencia de infección superior al 75% ha sido reportada en Mucuchíes (estado Mérida). **Objetivos:** este estudio propuso determinar la asociación entre la infección por *H. pylori* y el consumo de agua potable en Mucuchíes. **Materiales y métodos:** Muestras de aguas de tanques de distribución y grifos de viviendas de Renacer y Santa Eduvigis fueron analizadas por cultivo e hibridación fluorescente *in situ* (FISH) cuantitativa. **Resultados:** El aislamiento de *H. pylori* no fue exitoso; sin embargo, usando FISH fue detectado principalmente como células cocoides (viables no cultivables) y cuantificado en números elevados. Se identificó infección activa por la prueba de antígenos fecales en 17/39 habitantes y se evaluó estadísticamente su asociación con la concentración de la bacteria en aguas de grifo y variables higiénicas y clínicas de estos voluntarios. El análisis de modelo lineal generalizado indicó que el tratamiento del agua es el modelo que mejor explica la incidencia de infección. La prueba de Mann-Whitney mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la concentración bacteriana de las aguas entre las dos localidades. Concentraciones más altas se encontraron en Renacer posiblemente debido a un menor tratamiento del agua. **Conclusiones:** Esta investigación representa una contribución al conocimiento de la transmisión acuática de *H. pylori* y por primera vez muestra análisis cuantitativos de FISH para su estudio en aguas.

Palabras claves: *Helicobacter pylori*, transmisión acuática, técnicas de detección, biopelículas, estado VNC.

SUMMARY

Introduction: *Helicobacter pylori* is causing agent of gastritis, duodenal ulcer and gastric cancer. Epidemiological studies have established that water contaminated with feces is the main source of infection in developing countries including Venezuela. Particularly, a high prevalence over 75% has been reported in Mucuchíes (Mérida state). **Objetives:** Therefore, this study aimed to determine the association between *H. pylori* infection in Mucuchíes and drinking water consumption. **Materials and methods:** Water samples of distribution tanks and house taps from Renacer and Santa Eduvigis localities were analyzed by culture and quantitative Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). **Outcomes:** *H. pylori* isolation was unsuccessful; however, using FISH it was detected mainly as coccoid (viable non cultivable) cells and quantified in high numbers. Active infection was identified by the stool antigen test in 17/39 habitants, and its association with bacterial concentration in tap waters and hygienic and clinical variables of volunteers was statistically evaluated. Generalized linear model analysis indicated that water treatment is the best model explaining the incidence of infection. The Mann-Whitney test showed significant differences ($p \leq 0.05$) in bacterial concentration of tap waters between the two localities. Higher concentrations were found in Renacer possibly due to a less treatment of water.

Conclusions: This study represents a contribution to the knowledge of *H. pylori* waterborne transmission and for first time shows quantitative FISH analysis for its study in waters.

Keywords: *Helicobacter pylori*, water transmission, screening techniques, biofilms, VNC state.

Bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria espiral, Gram negativa, microaerófila, flagelada, productora de ureasa y que coloniza la mucosa gástrica del ser humano. Las complejas variaciones en las relaciones entre la bacteria y el huésped, que en ocasiones acaban en enfermedad, son el resultado de la diversidad de ambos y de las interacciones con otros factores ambientales. La infección por esta bacteria en la actualidad es una de las causas más frecuentes de enfermedades infecciosas crónicas. *H. pylori* origina gastritis crónica en la mucosa gástrica de los infectados, y en algunos sujetos puede causar úlcera péptica, adenocarcinoma o linfoma gástrico^{1,2}.

Desde su descubrimiento en 1982 por Warren y Marshall la infección por *Helicobacter pylori* constituye uno de los fenómenos científicos de mayor relevancia en la literatura biomédica mundial³. Se estima que esta infección afecta a más de la mitad de la población mundial, con mayor prevalencia (80- 90%) en los países en vías de desarrollo y menor prevalencia en los más desarrollados (30-50%)^{4,5}. Estas notables diferencias posiblemente puedan explicarse por una mayor facilidad para el contagio de la infección en poblaciones que reúnen ciertas características como higiene y salubridad deficientes, tratamiento inadecuado de las aguas, hacinamiento y mayor incidencia de la infección durante la infancia (Fernández-Delgado y col. 2008)⁶.

En países latinos como México, Colombia y Perú la cifra de infección alcanza el 90% de los sujetos evaluados. Así mismo, en Venezuela existe una alta prevalencia de infección. Se ha detectado la presencia del patógeno en 62% de sujetos sanos asintomáticos, 90% de pacientes con gastritis y úlcera duodenal y 20% con cáncer gástrico.^{7,8} Estudios realizados en las ciudades de Mérida y Mucuchíes del Estado Mérida, muestran una prevalencia de 75% de infección⁹⁻¹¹.

El mecanismo exacto de transmisión de esta infección se desconoce. Actualmente se acepta, aún sin poder descartar otras rutas, que el contagio se realiza principalmente a través de las vías fecal-oral y oral-oral. La primera vía mediada por alimentos o aguas contaminadas y la segunda por fómites, saliva y el contacto de persona a persona. Ambas

vías están sustentadas por múltiples investigaciones donde la bacteria ha sido cultivada o detectada por técnicas moleculares en aguas o alimentos contaminados con heces (fecal-oral) y en placa dental y saliva de humanos (oral-oral)^{6,12-20}.

Diversos estudios ambientales y comunitarios son consistentes en plantear que el agua juega un rol importante en la transmisión. Se ha determinado que *H. pylori* está presente en aguas subterráneas y superficiales, lagos, ríos, aguas de consumo humano, biopelículas formadas en sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable, acueductos municipales, aguas residuales no tratadas y ambientes marinos costeros como microorganismo libre en el agua de mar y asociado a organismos planctónicos, lo que implica la existencia de una ruta acuática de transmisión a los humanos⁶.

En este Trabajo Especial de Grado se propuso determinar la asociación entre la infección por *H. pylori* y el consumo de agua potable en la población de Mucuchíes, como un aporte al entendimiento de los factores involucrados en la transmisión de este patógeno que representa un problema actual de salud pública para la localidad.

Bdigital.ula.ve

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

En Venezuela existe una alta prevalencia de infección por *H pylori* que alcanza 62% en sujetos asintomáticos, 90% en pacientes con gastritis y úlcera duodenal y 20% en pacientes con cáncer gástrico. Entre los estados más afectados por cáncer gástrico en nuestro país se encuentran en primer lugar el estado Táchira, con una tasa de mortalidad del 22,47%, seguido del estado Mérida con 22,04% con mayor afectación en los municipios Bailadores, Mesa Bolívar, Santa Cruz de Mora y Tovar que limitan con el estado Táchira por el valle del río Mocotíes^{21,22}. Así mismo, la población de Mucuchíes en el Estado Mérida es una zona de alta incidencia de cáncer gástrico, así como de infección por *H. pylori*, y ello constituye un problema importante de salud pública.

Existe gran incertidumbre sobre su transmisión ambiental debido a la dificultad para cultivar y detectar a la bacteria en fuentes acuáticas y a la presencia de mecanismos de supervivencia que le permiten persistir por períodos prolongados en el ambiente en un estado latente o Viable no Cultivable (VNC) o a través de biopelículas formadas en los sistemas de distribución del agua de consumo humano. Estas estrategias de supervivencia y resistencia a las condiciones de estrés ambiental favorecen la transmisión acuática de la bacteria y las altas tasas de infección en poblaciones de países en vías de desarrollo, como el área de estudio, donde son deficientes los sistemas de tratamiento del agua potable⁶.

Ante esta problemática de salud pública, en la actual investigación se evaluó estadísticamente la asociación que existe entre la presencia de infección por *H. pylori* en la población de Mucuchíes y el consumo de agua como fuente de infección. La realización de este estudio constituye una contribución significativa al conocimiento de la principal ruta de transmisión de *H. pylori* en la localidad y la adopción de medidas higiénico-sanitarias que permitan disminuir el riesgo de infección y las enfermedades digestivas causadas por este patógeno, principalmente el cáncer gástrico.

MARCO TEÓRICO

Estudios epidemiológicos y ambientales sobre la transmisión acuática de *H. pylori*.

El *H. pylori* es una bacteria Gram negativa que coloniza el estómago de aproximadamente las dos terceras partes de la población humana mundial y está involucrada en la patogénesis de enfermedades gastroduodenales²³. Su importancia real empieza a tenerse en cuenta cuando Warren y Marshall en 1982 notaron su presencia en la mucosa gástrica y cultivaron por primera vez al microorganismo²⁴. La infección por *H. pylori* actúa en la etapa inicial en la cadena de eventos para el desarrollo del cáncer gástrico, desde la gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia hasta carcinoma. Asimismo, se relaciona con el linfoma gástrico asociado a la mucosa (MALT)²⁵. Puede adquirirse durante la infancia, siendo mayor su prevalencia en grupos familiares numerosos, con hacinamiento y bajos niveles socioeconómicos y educacionales⁶.

La bacteria coloniza la mucosa gástrica, se adhiere y penetra la capa de moco que recubre el epitelio gástrico. La adherencia de la bacteria a la mucosa gástrica es uno de los pasos iniciales de la infección por *H. pylori* y es un factor importante de virulencia²⁶. Además, la bacteria tiene diversos mecanismos para eludir las defensas del hospedero primario y así establecer una infección persistente²⁷.

Las vías de transmisión de la bacteria aún no están plenamente identificadas. Las vías fecal-oral y oral-oral han sido las rutas principalmente descritas. Algunos autores han sugerido que la transmisión fecal-oral podría ocurrir a través de aguas contaminadas²⁸. También la transmisión por el agua potable se ha propuesto como explicación de la vía fecal-oral ya que se ha detectado la presencia de ADN de *H. pylori* en sistemas de agua potable de los Estados Unidos, Inglaterra, Alemania, Japón, Suecia, México, Gambia, y Perú²⁶.

Las primeras evidencias sobre la transmisión acuática fueron aportadas por estudios epidemiológicos realizados en algunos países en vías de desarrollo (Perú, Colombia, Chile, y Venezuela). En Lima, Perú, Klein y cols. (1991)²⁹ demostraron la asociación entre la prevalencia de *H. pylori* en niños (48%) y el consumo de fuentes externas de agua (drenaje comunitario)²⁹. En Colombia, Goodman et al. (1996)³⁰ evidenciaron que nadar en ríos,

arroyos y piscinas se asociaba con mayores probabilidades de infección, así como el uso de agua corriente para consumo³⁰. Un estudio de prevalencia de *H. pylori* en una cohorte de niños de Gambia encontró que el consumo de agua potable estuvo asociado con un aumento en la proporción de niños jóvenes colonizados con *H. pylori*. Además, la colonización fue mayor en niños nacidos durante el período de recolección del agua de la superficie de pozos que en niños nacidos en períodos de consumo de agua del grifo. Los datos anteriores demuestran que el consumo del agua a principios de la infancia, sobre todo en un momento de deficiente potabilización, está asociado con un aumento en la tasa de colonización por *H. pylori*. La presencia de ADN amplificable de *H. pylori* en ollas de agua sustenta las evidencias reportadas sobre la transmisión de esta bacteria a través del agua potable contaminada. Estos hallazgos aportan pruebas sobre *H. pylori* en la cadena del agua, posiblemente presente en biopelículas de sistemas de almacenamiento del agua³¹.

Un estudio epidemiológico sobre infección por *H. pylori* y el uso de agua realizado en Kazajstán indicó una prevalencia elevada de infección entre los individuos que utilizaron agua de río o pozo para beber en comparación a los que utilizaron el agua de grifo³².

Giaoet al.en Portugal (2009)³³, apoyan la idea que el cloro en el agua puede inhibir la actividad de *H.pylori*, pero no lo elimina de las biopelículas en los sistemas de distribución de agua donde puede sobrevivir en el estado VNC.

En Venezuela, Domínguez–Bello y cols. (2002)³⁴, encontraron que la frecuencia de infección por *H.pylori* es significativamente más alta (96%) durante los meses de lluvia, sugiriendo que esto podría deberse a un aumento en la densidad bacteriana y/o cambios de formas cocoides en estado de latencia a formas bacilares en división celular.

Estrategias de supervivencia de *H. pylori* en ambientes acuáticos.

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar las estrategias de supervivencia de *H. pylori* en ambientes acuáticos. La formación de biopelículas, la asociación al plancton y el estado (VNC) han sido las estrategias más importantes reportadas para este microorganismo. *H. pylori* se somete a un cambio morfológico de bacilo a cocoide y en forma de U en el agua. Se ha sugerido que dicha transformación es una forma de resistencia a los efectos potencialmente adversos de entrar en los ambientes acuáticos⁶.

Trabajos realizados en laboratorios han puesto de manifiesto alguna información sobre el comportamiento de *H. pylori* en el medio acuoso. Se ha reportado que el tiempo de supervivencia de la bacteria en agua destilada es de 20 días. Un aumento de la supervivencia está asociado con temperaturas más bajas y niveles de pH entre 5.8 y 7.0. La supervivencia puede ser dependiente de las condiciones específicas del entorno acuático, incluyendo la presencia de otros microorganismos como el zooplancton y las amebas de vida libre³⁵.

La capacidad de supervivencia de *H. pylori* en sistemas de aguas tratadas ha sido cuestionada, con la sugerencia de que este microorganismo es muy sensible al cloro utilizado en las plantas de tratamiento. Sin embargo, Baker et al. sostuvieron que *H. pylori* podía tolerar mejor los desinfectantes que la *Escherichia coli*³⁶.

Adams et al. (2003)³⁷ publicaron los resultados de su investigación sobre la supervivencia de *H. pylori* en un ambiente natural de agua dulce, encontrando que la exposición al ambiente puede inducir a que la bacteria ingrese al estado VNC y que permanezca así hasta que acceda a un huésped susceptible, representando estas formas cocoides de la bacteria una amenaza para la salud pública.

Azevedo y cols. (2008)³⁸, desarrollaron una investigación sobre la supervivencia de las formas gástrica y enterohepática de *Helicobacter* en el agua y sus implicaciones para la transmisión, en donde se evaluó la influencia de diferentes temperaturas y la presencia de luz, observando que *H. pylori* fue la especie que sobrevivió más tiempo en el agua (más de 96 h en la oscuridad a 25 °C), por lo que el agua puede jugar un papel en su transmisión.

Métodos de diagnóstico de *H. pylori* en pacientes y de detección en ambientes acuáticos.

El diagnóstico de infección por *H. pylori* en pacientes con síntomas clínicos puede realizarse a través de métodos directos o endoscópicos o indirectos o no endoscópicos. Los métodos directos incluyen la toma de muestra de biopsia seguida por cultivo y evaluación histológica o detección directa de la actividad ureasa característica de la bacteria. Su costo es elevado y genera molestias a los pacientes. Por otra parte, entre los métodos indirectos se encuentran la prueba del aliento y los métodos serológicos. La prueba del aliento

C¹³ requiere de infraestructura sofisticada, costosa y de experiencia técnica para la realización del estudio, mientras que entre las limitaciones de las pruebas serológicas se encuentra su incapacidad de distinguir entre infecciones activas y pasadas (Boixeday Martín de Argila, 2000)³⁹.

El test de detección de antígenos fecales como herramienta diagnóstica es un ensayo inmunocromatográfico que usa anticuerpos para la detección de antígenos fecales de *H. pylori*. Esta prueba indica infección activa y, entre otras ventajas, no depende de la respuesta inmune del hospedero (Vaira et al., 2002)⁴⁰. En 1997 Meridian Bioscience Inc. introdujo la detección de antígenos fecales para el diagnóstico de *H. pylori*. Premier platinum HpSA fue el primer método inmunoenzimático (ELISA) no invasivo, que utilizó anticuerpos policlonales como anticuerpos de captura para *H. pylori* en heces (Gisbert y Pajares, 2001)⁴¹. La precisión de este método en el diagnóstico de *H. pylori* en pacientes no tratados ha sido evaluada en 89 estudios efectuados en países desarrollados y en países latinoamericanos como Chile, Perú, Brasil y Venezuela, encontrándose una especificidad y sensibilidad promedio de 91 y 93%, respectivamente⁴¹⁻⁴³.

La detección de antígenos fecales es un método de bajo costo comparado con la endoscopia y la histología y ha sido recomendado y aprobado por directrices oficiales europeas y estadounidenses (FDA) para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*⁴⁴. Además, es utilizado para monitorear la respuesta después del tratamiento⁴². Guías europeas recientes recomiendan su uso, ya sea de la detección de antígenos fecales o del test de aliento para el diagnóstico y confirmación de erradicación de la infección hasta cuatro semanas después de finalizado el tratamiento, siempre y cuando este estudio haya sido positivo al inicio del abordaje diagnóstico⁴⁵.

Por otra parte, la detección de este microorganismo en fuentes de agua se ha fundamentado principalmente en diferentes 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*. Sen et al. (2007)²⁶, desarrollaron y estandarizaron una prueba de PCR cuantitativa para la detección de *H. pylori* en agua potable que permite la detección del ADN de la bacteria en concentraciones muy bajas de 5 a 10 células por litro de agua. Janzon et al. (2009)⁴⁶, no lograron detectar ADN de *H. pylori*

en agua potable y ambientes acuáticos de Dhaka, Bangladesh. Por ello, procedieron a desarrollar dos pruebas de PCR en tiempo real específicas para el microorganismo a fin de cuantificar su ADN en el agua, no pudiendo identificar ADN en ninguna de las muestras tomadas. Estos resultados sugieren que en el área estudiada, es poco probable que la ruta predominante de transmisión de *Helicobacter* sea a través del agua. En Karachi, Pakistán Khan et al. (2012)⁴⁷ detectaron por PCR ADN de *H. pylori* en 2 de 50 muestras de agua potable (4%).

Diversos trabajos se han detectado por PCR este patógeno en ambientes acuáticos de distintas partes del mundo, donde existe contaminación fecal animal o humana. Otros 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 ADN⁴⁸⁻⁵⁰. Así mismo, otros autores han propuesto el cultivo, separación inmunomagnética, inmunofluorescencia, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), confirmación de la secuencia del gen 16S del ARNr o la integración de algunas de estas técnicas con el propósito de mejorar la sensibilidad y especificidad de estos ensayos^{51-52,6}. Estos métodos han sido capaces de detectar la presencia de la bacteria en biopelículas y aguas de pozos, ríos y redes de distribución⁵³.

En relación al FISH, esta técnica ha sido efectiva y de gran utilidad para la detección de este patógeno en muestras de agua, permitiendo la visualización de ácidos nucleicos de microorganismos morfológicamente intactos en su ambiente. El proceso involucra marcar sondas de ADN o ARN acopladas a un fluoróforo, seguido de su hibridación con la muestra y finalmente la visualización de las células marcadas usando microscopio de fluorescencia⁶. 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 sodio⁵⁴. 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 ambientales⁶.

El cultivo de *H. pylori* en ambientes distintos al estómago humano ha sido difícil, debido a cambios morfológicos de esta bacteria y al sobrecrecimiento o competencia de otros microorganismos. Se han realizado esfuerzos por cultivar esta bacteria en muestras de

agua usando medios de crecimiento alternativos bajo condiciones microaerófilas variables^{49,51,54,55,56}.

Los resultados negativos del cultivo de *H. pylori* a partir de ambientes marinos reseñados por Carbone *et al.* (2005)⁵⁶, concuerdan con los obtenidos por Moreno *et al.* (2003)⁵⁴, cuyo trabajo tuvo intentos infructuosos por cultivar este microorganismo a partir de muestras de aguas residuales y de río, debido posiblemente a la entrada de la bacteria al estado VNC y a la competencia con otros microorganismos dominantes. Estos autores consideran el cultivo un método inapropiado para la detección de *H. pylori* en muestras ambientales. Sin embargo, los medios de cultivo (agar sangre Columbia y agar Pylori) propuestos en estos dos estudios, no suministran suplementos selectivos y/o factores de crecimiento que pueden ser requeridos para el aislamiento de cepas ambientales de *H. pylori*^{56,57}.

Degnan *et al.* (2003)⁵⁵ desarrollaron un medio selectivo para el aislamiento de esta bacteria de muestras de agua potable que contienen poblaciones microbianas mixtas, formulado para permitir la investigación rutinaria y a gran escala de este patógeno. Inicialmente, probaron 5 medios convencionales, como el agar infusión cerebro corazón suplementado con 7% de suero bovino, agar brucella, agar sangre base Columbia, agar Skirrow *Campylobacter* y el medio HPSPA (Agar *Hp* con peptona especial), todos complementados con suplementos selectivos para *H. pylori* (*Hp*selective supplement, Oxoid Limited) y *Campylobacter* (*Campylobacter*selective supplement S, Becton Dickinson). Utilizaron 8 cepas de microorganismos adquiridos por agua (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*) e incluyeron a *H. pylori*. Se evaluó la recuperación de colonias de *H. pylori* y la inhibición de la microbiota acompañante, determinando que sólo *Acinetobacter*, *E. coli* y *H. pylori* eran capaces de crecer en todos los medios estudiados. En vista del crecimiento muy lento de *H. pylori*, se consideró necesario una mayor inhibición de los organismos competentes, y para ello los investigadores desarrollaron un medio más selectivo que denominaron agar HP, cuya fórmula incluyó una mezcla nueva de suplementos nutricionales, más los antibióticos anfotericina B y polimixina B. Adicionalmente, se incorporó urea, rojo de fenol y ácido clorhídrico 1 N para facilitar la

identificación presuntiva de colonias de *H. pylori* por el cambio de color inducido por la actividad ureasa. Finalmente, la combinación novel de este medio fue evaluada con una muestra de agua de tanque adulterada con las 8 cepas empleadas en el ensayo anterior, cuya microbiota nativa (*Flavobacterium*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pasteurella*, *Ochrobactrum* y *Rahnella*) fue identificada previamente por el sistema API 20E. Se sembraron alícuotas del agua adulterada en el agar HP, observándose sólo colonias de *H. pylori* luego de 7 días de incubación a 37°C en condiciones microaerofílicas, a pesar de la contaminación microbiana presente en la muestra. También se determinó que el sistema indicador de color del agar HP, comparado con los otros medios evaluados, permitió la identificación presuntiva de las colonias de esta bacteria en un tiempo más corto. Este trabajo realizó un aporte significativo en el mejoramiento de las técnicas de cultivo para el aislamiento de este microorganismo difícil de cultivar, permitiendo obtener células viables a partir de muestras de agua potable⁵⁵.

Bdigital.ula.ve

ANTECEDENTES

En estudios regionales sobre *H. pylori* realizados en Mucuchíes, municipio Rangel del estado Mérida, se ha reportado una incidencia de 78,7% para la infección, siendo mayor para el género femenino con un 71,1% (Albarracín, 2009)⁵⁸. En un estudio realizado en la misma comunidad, se encontró una asociación positiva entre la ingesta de vegetales crudos, así como de agua directa del grifo o de fuentes ambientales y la infección por *H. pylori* con un valor de Odds Ratio (OR) de 1,47 y 2,29, respectivamente, mientras que no se encontró asociación con el consumo de bebidas alcohólicas o el hábito de fumar (Flores, 2009)⁵⁹. A pesar del tratamiento erradicador indicado a los pacientes, se han encontrado altas tasas de reinfección de hasta 76% como se reporta en el trabajo realizado en esa comunidad por Villarreal (2011)⁶⁰.

Ramírez y Vera (2012)⁶¹ realizaron por PCR convencional el estudio de *H. pylori* en distintas fuentes de agua de consumo de Mucuchíes como posibles fuentes de infección y reinfección en la población estudiada. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de ADN de *H. pylori* en el 16.67% de 30 muestras de agua de grifo tomadas al azar de hogares del casco central y 50% de los tanques que abastecen de agua al casco central⁶¹.

Otros estudios han evaluado la efectividad del FISH comparada con otros métodos de detección, como el cultivo y PCR, encontrando que a partir del cultivo es difícil el aislamiento de *H. pylori* y que la técnica FISH presenta una mayor sensibilidad que la PCR. En este sentido, Moreno et al. (2003)⁵⁴ detectaron *H. pylori* mediante FISH en muestras de agua de río y aguas residuales de Valencia, España.

Gisbert (2001)⁴¹ realizó una revisión de la experiencia del test de antígenos en heces para el diagnóstico de *H. pylori* en adultos y niños. Se ha evaluado el antígeno en heces para el diagnóstico de esta infección con una sensibilidad de 92.4% y especificidad de 91.9%. Se analizaron un grupo de 25 estudios para verificar la erradicación post-tratamiento (mayor a 4 semanas), cuyos resultados proporcionaron 88.3% de sensibilidad y 92% de especificidad. Las conclusiones del estudio indicaron que el antígeno para detección de *H. pylori* es una prueba rápida, fácil de realizar y puede ser considerada como

un método indirecto y preciso en el diagnóstico de pacientes no tratados. Sin embargo, el uso de este método para confirmar erradicación post-tratamiento requiere mayores estudios⁴¹.

Bdigital.ula.ve

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *H. pylori* en fuentes de agua de consumo de la población de Mucuchíes, su asociación con la infección por este patógeno y variables clínicas e higiénico-sanitarias de la población en estudio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cultivar *H. pylori* a partir de muestras de aguas de los tanques principales de abastecimiento de agua potable de la localidad y aguas de grifo de familias voluntarias de las comunidades Renacer y Santa Eduvigis, Mucuchíes.
2. Detectar por Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) la presencia de regiones específicas de la familia *Helicobacteriaceae* y *H. pylori* y morfologías microscópicas asociadas a esta bacteria en cultivos y filtrados de las muestras de aguas obtenidas de tanques principales y domicilios.
3. Cuantificar por FISH el número de células positivas a *H. pylori* en las muestras de aguas en estudio.
4. Determinar la infección por *H. pylori* en los residentes de las casas encuestadas de las comunidades Renacer y Santa Eduvigis de Mucuchíes a través del test de antígenos fecales.
5. Analizar estadísticamente la asociación entre la concentración de *H. pylori* en las muestras de aguas, la presencia de infección en residentes de ambas comunidades y variables clínicas e higiénico-sanitarias de la población.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio.

Se trata de una investigación observacional descriptiva de muestras de agua recolectadas en julio 2014 en las comunidades Renacer y Santa Eduvigis de Mucuchíes, para determinar la presencia y concentración de *H. pylori* así como la infección en los residentes y factores de riesgo asociados.

Área de estudio y muestreo.

Mucuchíes se encuentra ubicada a 48 km de la ciudad de Mérida (coordenadas 8°45' N y 70°55' O), a una altitud de 2.983 m.s.n.m., con temperaturas que varían de los 4 a 12°C y una precipitación promedio de 600 mm. Su paisaje varía entre estrechos valles longitudinales y transversales con fuertes pendientes. Tiene como principal curso de agua el río Chama, al que drenan las quebradas Misintá, La Carbonera, La Musuy, La Toma, El Vergel, El Royal y Mocoa⁶².

En julio de 2014 se realizó un muestreo de las distintas fuentes de aguas de consumo de la población de Mucuchíes seleccionada para este estudio. Un volumen comprendido entre 250ml y 1 L de muestras de aguas fue recolectado de las siguientes localidades:

1. Aguas de grifo de las viviendas de pacientes reclutados para el estudio de los sectores Renacer (n=8) y Santa Eduvigis (n=8). Adicionalmente, se tomaron muestras de aguas provenientes de sistemas de tratamiento como filtración (Pasteur y Renapur) y ozono en aquellas viviendas que contaban con los mismos.
2. Muestras de tanques que surten de agua potable a los sectores estudiados en la población de Mucuchíes:
 - Tanque Renacer que abastece de agua potable a este sector (capacidad 29.000 L).
 - Tanque La Hoyada que abastece de agua potable a la población del casco central de Mucuchíes, incluyendo el sector Santa Eduvigis (capacidad 200.000 L).

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

cavas con hielo hasta ser procesadas en un lapso aproximado de 8 hen el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes.

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

Se filtraron por duplicado volúmenes de 250 ml de las muestras de aguas en membranas Durapore (diámetro 47 mm; tamaño de poro 0,22 μm ; Millipore®) bajo condiciones de esterilidad. Las membranas fueron lavadas con 5 ml de tampón salino fosfato (PBS, por sus siglas en inglés; 0.32 M) a pH 7,2 y este volumen fue destinado para los siguientes ensayos: (1) una alícuota de 0,5 ml fue inoculado en tubos que contenían 4,5 ml de caldo HP para el cultivo de *H. pylori*, (2) otra alícuota de 1 ml fue empleado para ensayos de FISH y (3) el volumen restante fue conservado como respaldo a -80°C .

Cultivo de *H. pylori*.

Se realizó el cultivo de esta bacteria a través del medio HP que incluye medios selectivos y de enriquecimiento para su aislamiento de fuentes de aguas contaminadas⁵⁵. Para ello, una alícuota de 0,5 ml de las muestras de aguas filtradas se inoculó en 4,5 ml de caldo HP en atmósfera microaerofílica con la mezcla de gases 85% N_2 , 10% H_2 y 5% CO_2 y se incubó a 37°C por 5-7 días⁵⁵. Alícuotas de 50 μl de cada uno de los cultivos provenientes de los caldos HP se sembraron en agar HP bajo las condiciones anteriormente descritas por 5-7 días adicionales para el aislamiento de colonias. Posteriormente, se realizaron repiques sucesivos en agar HP para la purificación de colonias y para su selección se les practicó la prueba de ureasa y observación preliminar de tinción Gram por Microscopía óptica.

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

Los análisis de FISH se realizaron siguiendo los protocolos reportados por Trebesius *et al.* (2000)⁶³ y Contreras y col. (2012)⁶⁴. Alícuotas de 1ml de los filtrados de agua (réplicas 1.1 a 17.1) y de los cultivos de agua en caldo HP que presentaron crecimiento a los 7 días (réplicas 2.2, 6.2, 11.2, 13.2, 16.2 y réplicas desde 1.1 a 17.1, excepto 6.1) fueron centrifugados a 8.000 r.p.m. por 15 min. Seguidamente, se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado al precipitado con 500 µl de PBS y se centrifugó a 8.000 rpm por 15 min adicionales. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 100 µl de PBS y 100 µl de etanol absoluto según el protocolo de Samarbaf-Zadeh *et al.* (2006)⁶⁴. Luego se colocó 20 µl por muestra en los 3 pozos de cada fila de la lámina y se dejó secar al aire por toda la noche. Las láminas secas se conservaron a -20°C hasta que se realizó la hibridación. Adicionalmente, una cepa clínica de *H. pylori* (facilitada por la Dra. Mónica Contreras del Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, CBB, IVIC) y una cepa de *Shigella* sp. (ATCC11126) fueron usadas como controles positivo y negativo de los ensayos de FISH, respectivamente.

Hibridación.

Las células fijadas en láminas portaobjeto se deshidrataron con etanol al 50%, 80% y 98% por 3 minutos para cada concentración de etanol. En oscuridad, se añadió para cada pozo de las muestras 18 µl de tampón de hibridación (0,9 M NaCl; 0,02 M Tris/HCl, pH 8,0; 0,01% SDS) conteniendo 30% formamida (12µl) y 5 ng/µl de las sondas en estudio (5 µl). Se utilizaron cuatro sondas fluorescentes dirigidas al gen 16S ARNr bacteriano: la sonda EUB338 marcada con el fluoróforo Alexa488N-5' para detectar eubacterias, es decir, todas las bacterias presentes en las muestras (fluorescencia verde), dos sondas específicas de *Helicobacter* HEL274 y HEL717 ambas marcadas con el fluoróforo Cy3-5' (fluorescencia roja) y una sonda específica de *H. pylori* Hpy-1 marcada igualmente con el fluoróforo Cy3-5' (fluorescencia roja). La hibridación se llevó a cabo en una cámara húmeda a 54°C por 2 h y 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, se secaron al aire y se incubaron por 10 min en oscuridad con la tinción 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, por sus siglas en inglés) a 0,5 µg/ml. El DAPI se une a regiones enriquecidas

en adenina y timina de las secuencias de ADN (Porter y Feig, 1980)⁶⁵ y se utilizó en los ensayos de FISH como marcador fluorescente del total de células. Se realizó un lavado con PBS y se colocó a los pozos de las láminas medio de montaje para su visualización 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 (filtro de excitación: 450-490 nm) y filtro triple (filtro de excitación: 320- 580). Las imágenes fueron digitalizadas con una cámara Nikon Coolpix 8700. Hibridaciones positivas fueron visibles como células naranjas o rojas para *Helicobacter* o *H. pylori* y células verdes para eubacterias. Se cuantificó el número de células positivas a *H. pylori* en un mínimo de 10 campos y se expresó en porcentaje en función del número total de células bacterianas por L determinadas en una cámara de Thomas para conteo de células.

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

Adicionalmente, en este estudio se determinó cualitativamente el estado de infección por *H. pylori* en voluntarios de las comunidades Renacer y Santa Eduvigis en la población de Mucuchíes con previo consentimiento informado. Para ello, se utilizó el kit CERTEST *H. pylori* + transferrin (CERTEST BIOTEC S.L.) para la determinación de antígenos de *H. pylori* en un número de 39 muestras de heces de los participantes en el estudio. Esta prueba fue realizada por el Laboratorio de la Clínica SANATRIX en la ciudad de Caracas siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Recolección de datos epidemiológicos.

Se realizaron encuestas a voluntarios residentes en los sectores Renacer y Santa Eduvigis quienes suministraron muestras de heces y aguas de grifo de sus viviendas para los fines del estudio. Se recolectaron los siguientes datos clínicos e higiénico-sanitarios:

Variables clínicas:

- Síntomas gastrointestinales.
- Antecedentes de cáncer gástrico familiar de 1er grado.
- Infección previa por *H. pylori* y tratamiento en algún miembro del grupo familiar.

Variables higiénico-sanitarias:

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

Análisis estadístico de los datos.

Se realizó un análisis exploratorio de los datos para determinar el tipo de distribución de las variables clínicas e higiénico-sanitarias evaluadas en la población encuestada en Mucuchíes. Las variables utilizadas fueron de tipo categóricas (método de tratamiento del agua de consumo y tipo de paciente) y una variable continua que correspondió al conteo de células positivas a *H. pylori* por FISH. Se evaluó si hubo diferencias entre los conteos de *H. pylori* entre los dos sitios muestreados utilizando la prueba no paramétrica Mann-Whitney. Además, se evaluó si hubo diferencias en el conteo de células de *H. pylori* en las aguas de grifo en relación a los métodos de tratamiento del agua y grupos de pacientes, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Finalmente, se desarrollaron modelos lineales generalizados para determinar las variables que mejor explicaron la incidencia de *H. pylori* en la población evaluada.

RECURSOS.

1.- Recursos humanos

- Tutores y Asesores.
- MSc. Galo Buitrón.
- Personal del Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal y Servicio de Microscopía de Luz del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

2.- Recursos Institucionales:

- Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal y Servicio de Microscopía de Luz, IVIC.
- Laboratorio Clínico de la Clínica Sanatrix, Caracas.
- Universidad de Los Andes y sus dependencias.
- Recursos bibliográficos y hemerográficos locales, nacionales e internacionales.

Bdigital.ula.ve

RESULTADOS

1. Parámetros físico-químicos del agua de los tanques evaluados en Mucuchíes.

Para la fecha del muestreo los parámetros fisicoquímicos del agua de los tanques Renacer y La Hoyada comprendieron valores promedio de oxígeno disuelto de 7,83 y 8,55 mg/L, temperatura de 15,0 y 12,1°C y pH de 5,3 y 5,0, respectivamente. 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 (aguas que desde el punto de vista sanitario pueden ser acondicionadas con la sola adición de desinfectantes), cuyos valores de oxígeno disuelto deben ser mayores a 4,0 mg/l y pH en el rango de 6,0 a 8,5 (Decreto 883, 1995)⁶⁶. Los resultados del pH evaluado en aguas del sub-tipo 1A de este estudio se encontraron por debajo del rango permitido, mientras que los de oxígeno disuelto estuvieron dentro de los límites establecidos. Las temperaturas determinadas en las muestras de agua de los tanques se corresponden con la altura de los sitios y las horas de muestreo (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros físico-químicos del agua de los tanques evaluados en Mucuchíes.

Sector	Fecha	Ubicación geográfica	Altura (m.s.n.m)	Oxígeno disuelto (mg/L)	Temperatura (°C)	pH
Renacer	13/07/14	N 08°45,187'; O 70°55,080'	3043	7,83	15,0	5,3
La Hoyada		N 08°45,027'; O 70°28,5'	3026	8,55	12,1	5,0

2. Cultivo de *H. pylori* partir de muestras de aguas de Mucuchíes.

Inicialmente, se observó turbidez en 16 cultivos en caldo HP de las muestras de aguas de los tanques y grifos de las viviendas de Mucuchíes luego de 7 días de incubación. El cultivo en placas de agar HP permitió el aislamiento de 5 colonias diferentes a partir de las muestras de aguas del tanque La Hoyada (réplicas 2.1 y 2.2) y grifos de viviendas de Renacer (réplica 6.2 correspondiente a la familia número 6) y Santa Eduvigis (réplicas 11.2

y 13.2 correspondiente a las familias 11 y 13 respectivamente). Entre estas colonias, sólo el aislado de la muestra 11.2 resultó positivo al test de ureasa, cuya actividad enzimática ocasionó alcalinización en el medio por la producción de amoníaco y CO₂ que se evidencia con el cambio de color amarillo a rojo-fucsia del indicador rojo de fenol presente en el medio(Figura 1).

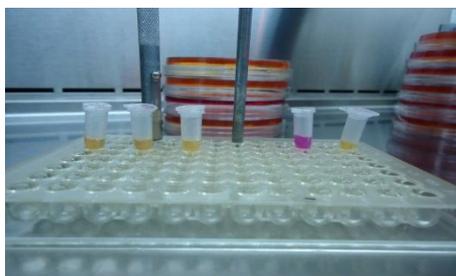


Figura 1. Visualización del test de ureasa aplicado a 5 colonias obtenidas del cultivo de muestras de aguas del tanque La Hoyada (réplicas 2.1 y 2.2) y grifos de viviendas de Renacer (réplica 6.2 correspondiente a la familia número 6) y Santa Eduvigis (réplicas 11.2 y 13.2 correspondientes a las familias número 11 y 13, respectivamente). Se observa producción de ureasa en la muestra 11.2 (cuarto tubo de izquierda a derecha) que se evidencia por el cambio de color del medio de amarillo a rojo-fucsia.

La observación microscópica preliminar por tinción Gram indicó en los aislados 2.1 y 2.2 la presencia de cultivos mixtos con morfologías de cocos y bacilos Gram positivos y Gram negativos, mientras que en los aislados 6.2, 11.2 y 13.2 se observaron predominantemente cocos y bacilos rectos Gram negativos. En estos cultivos en agar no se pudo obtener el aislamiento de colonias cuyas morfologías celulares fuesen observadas al microscopio con la morfología bacilar curva o espiral característica de *H. pylori*. En los otros cultivos no se obtuvo continuidad en el crecimiento luego de repiques sucesivos. En vista de la imposibilidad de aislar colonias presuntivas de *H. pylori* partir de las muestras de aguas utilizando el agar HP, se continuó trabajando con los cultivos de aguas en caldo HP para la determinación de esta bacteria por FISH.

3. Detección por FISH de *Helicobacterspp.* y *H. pylori*.

Los ensayos de FISH mostraron evidencias de *Helicobacterspp.* y *H. pylori* en los filtrados y cultivos de aguas de los tanques Renacer y La Hoyada y aguas de grifo de viviendas de las familias estudiadas en estas dos localidades de Mucuchíes. En las Figuras 2 y 3 se presentan microfotografías de células rojas cocoides (forma más frecuentemente observada), coco-bacilares y bacilares positivas (fluorescencia roja) a las sondas específicas de *Helicobacter* (primera columna) y *H. pylori* (fluorescencia amarilla) asociada a eubacterias o bacterias generales (fluorescencia verde) presentes en estas muestras. La tercera columna de estas figuras corresponde a un pozo control negativo destinada para cada muestra con el fin de descartar interferencias en la visualización de la fluorescencia o falsos positivos del ensayo.

Bdigital.ula.ve

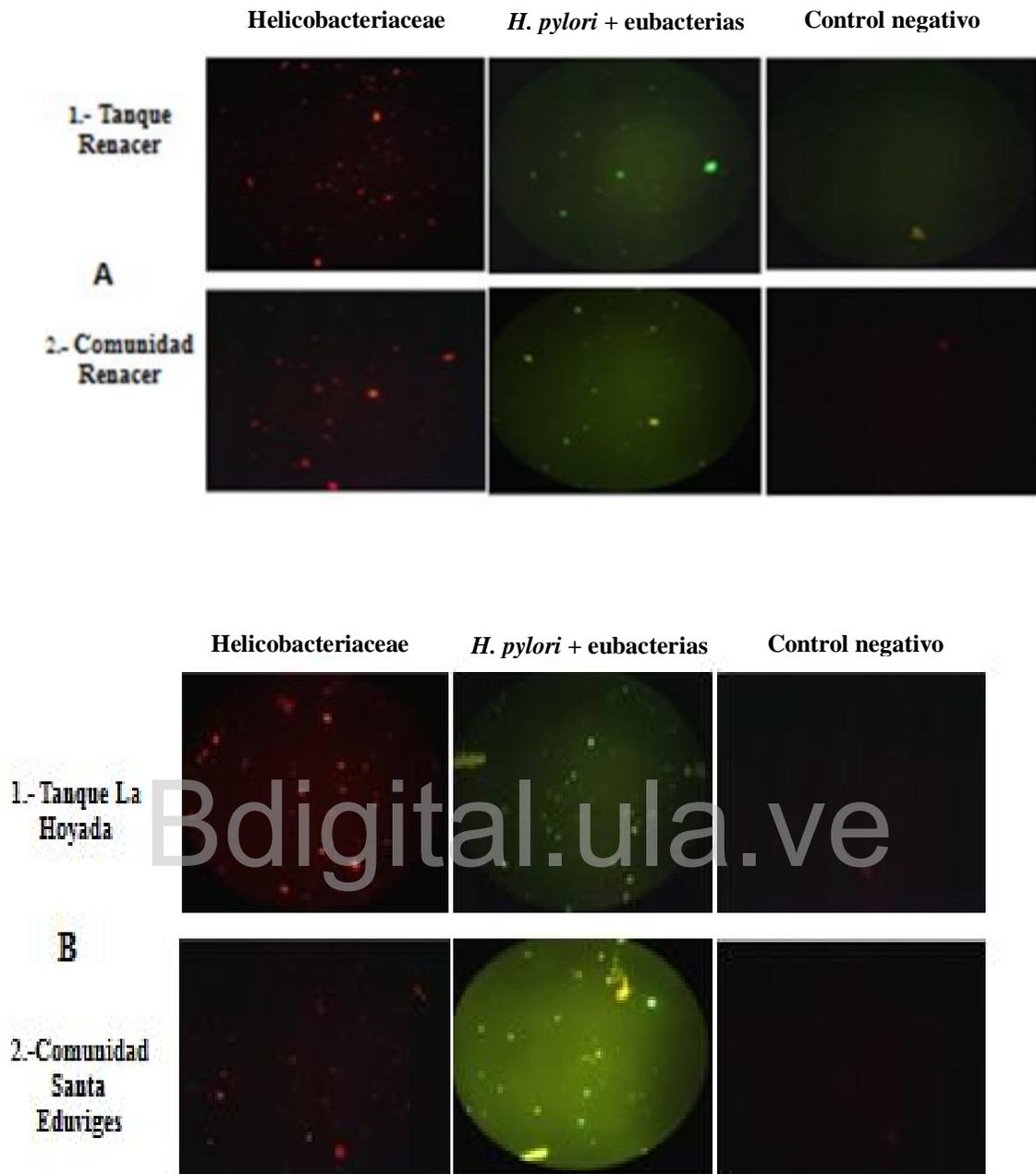


Figura2. Imágenes representativas de FISH que demuestran la presencia de células positivas a *Helicobacterspp.* (fluorescencia roja con filtro G2A) y *H. pylori* (fluorescencia amarilla con filtro triple) asociada a otras bacterias generales (fluorescencia verde con filtro triple) en filtrados de aguas de los tanques principales (Tanque Renacer y La Hoyada) y grifos de viviendas de las comunidades Renacer (muestra 3.1, familia número 3) (A) y Santa Eduvigis (muestra 11.1, familia número 11) (B).

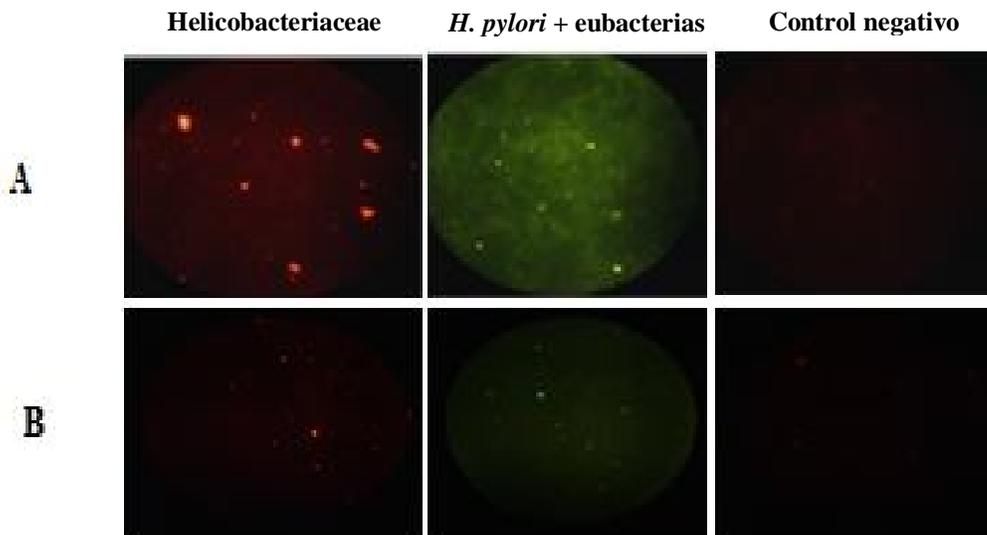


Figura 3. Imágenes representativas de FISH que demuestran la presencia de células positivas a *Helicobacterspp.* (fluorescencia roja con filtro Cy3) y *H. pylori* (fluorescencia amarilla con filtro triple) asociada a otras bacterias generales (fluorescencia verde) en cultivos de aguas de grifo de viviendas de (A) Renacer (muestra 6.2, familia número 6) y (B) Santa Eduvigis (muestra 13.1, familia número 13).

Adicionalmente, se presentan microfotografías del ensayo de FISH con cepas de referencias usadas como controles positivo (cepa clínica de *H. pylori* facilitada por la Dra. Mónica Contreras del Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, CBB, IVIC) y negativo (cepa de *Shigella* sp. ATCC11126) que muestran en el control positivo morfologías características de *H. pylori* y en el control negativo la ausencia de células confirmando la especificidad y sensibilidad de las sondas empleadas (Figura 4).

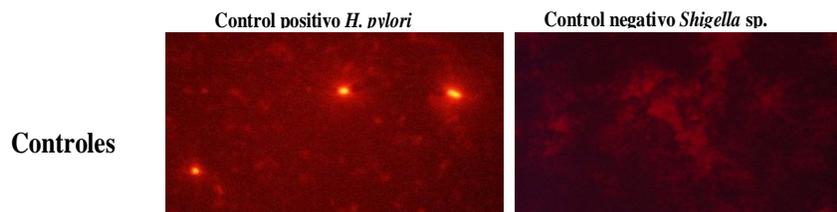


Figura 4. Controles positivo (cepa clínica de *H. pylori*) y negativo (*Shigella* sp. ATCC11126) empleados para evaluar la sensibilidad y especificidad de los ensayos de FISH en la detección *Helicobacterspp.* y *H. pylori* en filtrados y cultivos de aguas.

Los ensayos de FISH mostraron en todos los filtrados de aguas y cultivos estudiados la presencia de células con fluorescencia positiva a eubacterias (fluorescencia verde), familia *Helicobacteriaceae* y *H. pylori* (fluorescencia roja) utilizando los filtros B2A y G2A, respectivamente, y la co-localización de células con fluorescencia amarillo-naranja positivas a *H. pylori* y células con fluorescencia verde positivas a eubacterias mediante el uso del filtro triple.

4. Cuantificación por FISH de *H. pylori* en filtrados de aguas estudiados en Mucuchíes.

A partir del FISH cuantitativo realizado en los filtrados de aguas de los dos tanques y en las viviendas de las familias en estudio fue posible determinar una concentración elevada de células positivas a *H. pylori* en el agua del Tanque Renacer y las aguas de grifo de las familias número 6 y 7 de esta comunidad, mientras que en Santa Eduvigis se encontraron concentraciones de uno a dos órdenes de magnitud inferior en el Tanque La Hoyada y las aguas de grifo de las familias número 11 y 13 de esta comunidad (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación por FISH de *H. pylori* en filtrados de aguas de los tanques principales y aguas de grifo de viviendas de Renacer y Santa Eduvigis

Comunidad estudiada en Mucuchíes	Identificación filtrado de agua	Concentración de células de <i>H. pylori</i> /L de agua
Renacer	1.1. Tanque Renacer	554563107
	3.1. Familia	23430079
	4.1. Familia	90207715
	5.1. Familia	291881188
	6.1. Familia	1346746988
	7.1. Familia	1205919662
	8.1. Familia	158490566
	9.1. Familia	82000000
	10.1. Familia	47505633
	Santa Eduvigis	2.1. Tanque la Hoyada
11.1. Familia		826979472
12.2. Familia		73813600
13.2. Familia		92128800
14.1. Familia		63673200
15.1. Familia		73813600
16.2. Familia		29091200
17.1. Familia		29091200
18.1. Familia		73813600

5.- Detección de antígenos fecales de *H. pylori* en voluntarios de Mucuchíes y variables clínicas e higiénico-sanitarias evaluadas en esta población.

En la Tabla 3 se presentan los resultados del test de antígenos fecales de *H. pylori* realizado en muestras de heces de voluntarios residentes de las comunidades Renacer y Santa Eduvigis, así como las variables clínicas encuestadas a estas personas. Se determinó por este test un número total de 17 (43,59%) individuos positivos a *H. pylori* para familias de las dos comunidades (7 individuos de Renacer y 10 de Santa Eduvigis), y de este total 7 (17,95%) personas reportaron infección pasada y tratamiento para *H. pylori* (3 de Renacer y 4 de Santa Eduvigis). Entre estas personas con infección previa, un número de 4 (1 habitante de la familia número 5 de la comunidad Renacer y 1 de la familia número 13, 15, 17 de la comunidad Santa Eduvigis, ver Anexo 5) presentan infección actual, es decir, se encuentra una tasa de reinfección por este patógeno de 10,26% en estas dos comunidades

para la fecha del estudio. Adicionalmente, sólo 2 familias (1 de cada comunidad) manifestaron antecedente familiar de cáncer gástrico (12,5%).

Tabla 3. Infección por *H. pylori* y variables clínicas en voluntarios de Mucuchíes.

Comunidad	Familia	Detección actual de antígenos fecales de <i>H. pylori</i>		Infección previa a Julio/2014		Tratamiento para <i>H. pylori</i>		Antecedente familiar de cáncer gástrico	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	SI	NO	SI	NO
Renacer n=22	Familia 3 n=3	1	2	1	2	X			X
	Familia 9 n=2	1	1	0	2		X		X
	Familia 8 n=2	0	2	0	2		X		X
	Familia 6 n=4	0	4	0	4		X		X
	Familia 7 n=3	2	1	0	3		X		X
	Familia 4 n=3	0	3	0	3		X	X	
	Familia 5 n=2	1	1	1	1	X			X
	Familia 10 n=3	2	1	1	2	X			X
	Familia 16 n=4	3	1	0	4		X		X
	Familia 12 n=1	0	1	1	0	X			X
Santa Eduviges n=17	Familia 14 n=1	1	0	0	1		X		X
	Familia 13 n=2	1	1	1	1	X			X
	Familia 17 n=2	1	1	0	2		X		X
	Familia 15 n=3	3	0	1	2	X			X
	Familia 11 n=2	1	1	1	1	X		X	
	Familia 18 n=2	0	2	0	2		X		X

En la Tabla 4 se describen las variables higiénico-sanitarias encuestadas a las familias voluntarias residentes de las comunidades Renacer y Santa Eduviges. Se determinó un mayor número de familias de Renacer con consumo de agua hervida y directa del grifo, en comparación a Santa Eduviges con mayor número de familias que consumen

el agua tratada por filtración y ozono. En general, predominó el agua hervida en 15 (38.46%) de los individuos estudiados frente a 10 (25.64%) que no utilizó ningún método de desinfección y consumen agua directamente del grifo, 9 (23.07%) utilizaron ozono y 5 (12.8%) agua filtrada. En relación al tratamiento de los vegetales, las familias de Renacer reportaron principalmente lavado con agua de grifo y adición de vinagre y agua hervida, mientras que en Santa Eduviges predominó el lavado con agua directo del grifo o ningún tratamiento previo a su consumo. Un número de 23 (58.97%) individuos de los estudiados utilizaron diferentes métodos de tratamiento como el agua hervida acompañada de cloro, vinagre frente a 16 (41.02%) que utilizaban agua del grifo para el lavado de los mismos.

Tabla 4. Variables higiénico-sanitarias encuestadas en las familias de Renacer y Santa E.

Comunidad	Familia	Método de desinfección o tratamiento del agua potable				Método de desinfección de vegetales				
		Filtrado	Hervido	Ozono	Ninguno (consumo del grifo)	Agua de grifo (AG)	AG más vinagre	Agua hervida	Otros	Ninguno
Renacer n=22	Familia 3 n=3		X		X	X				X
	Familia 9 n=2	X					X			
	Familia 8 n=2				X		X			
	Familia 6 n=4		X				X			
	Familia 7 n=3				X		X			X
	Familia 4 n=3		X				X			
	Familia 5 n=2		X			X	X	X		
	Familia 10 n=3		X			X	X			
Santa Eduviges n=17	Familia 16 n=4			X		X				X
	Familia 12 n=1	X				X	X			
	Familia 14 n=1				X	X				X
	Familia 13 n=2			X		X	X			
	Familia 17 n=2				X	X				X
	Familia 15 n=3	X				X				X
	Familia 11 n=2				X	X				X
	Familia 18 n=2		X			X				X

6.-Análisis estadístico de los datos.

A partir del análisis exploratorio se determinó que todos los datos del estudio son de tipo frecuencia (resultados de antígenos fecales de *H. pylori* y datos clínicos e higiénico-sanitarios de la población obtenidos en las encuestas), a excepción de la concentración de células de *H. pylori* determinadas en los filtrados de aguas de los tanques principales de las comunidades y grifos de las viviendas considerada como una variable continua. Adicionalmente, se encontró que la distribución de estos datos no es normal y presenta varianzas heterogéneas.

En vista del tamaño de muestra ($n=39$) de personas voluntarias que participaron en el estudio, cuyo número fue limitado por el costo y disponibilidad de reactivos para los análisis de antígenos fecales y ensayos de FISH, se evaluaron modelos de variables generalizadas solamente para tres variables seleccionadas del total incluidas inicialmente en el estudio:

1. Detección de antígenos fecales (variable respuesta de tipo binomial) que indica infección activa de *H. pylori*.
2. Tipo de paciente (variable categórica): pacientes nunca infectados, con infección previa o antecedente familiar de cáncer gástrico.
3. Método de desinfección del agua (variable categórica): ninguno, filtrado, ozono, hervido.

En la Figura 5 se demuestra que la variable respuesta (incidencia de infección de *H. pylori* en la población de estudio) se explica por el tratamiento del agua de consumo. Las personas que no emplean ningún tratamiento tienen mayor concentración de *H. pylori* en las fuentes de aguas de grifo de sus viviendas. Las aguas que reciben tratamiento con ozono tienen una mediana más baja que el tratamiento de filtrado seguido por hervido del agua y una probabilidad menor de infección por *H. pylori* en las aguas de consumo.

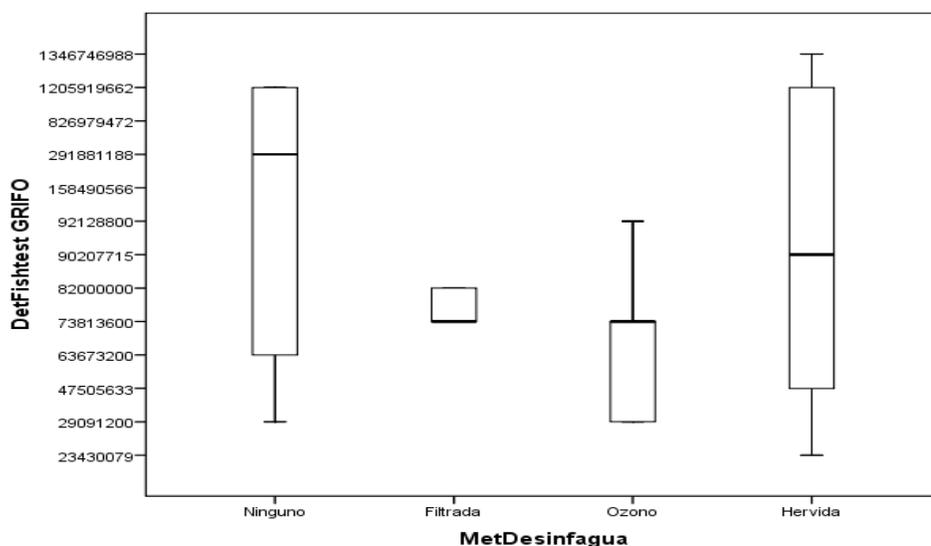


Figura 5. Análisis exploratorio de variables evaluadas en el tratamiento del agua que responden a la concentración de *H. pylori* en las aguas de consumo de Mucuchíes.

Por la prueba de Kruskal Wallis se evaluó si hubo diferencias en el conteo de células de *H. pylori* en las aguas de las dos comunidades en relación a los métodos de tratamiento del agua, no encontrándose diferencia significativa entre Renacer ($p=0,768$) y Santa Eduvigis ($p=0,273$). Por la prueba Mann-Whitney, se encontró diferencia significativa ($p=0,033$) al comparar los contajes de concentraciones de *H. pylori* en las aguas de grifo de las dos comunidades (Figura 6).

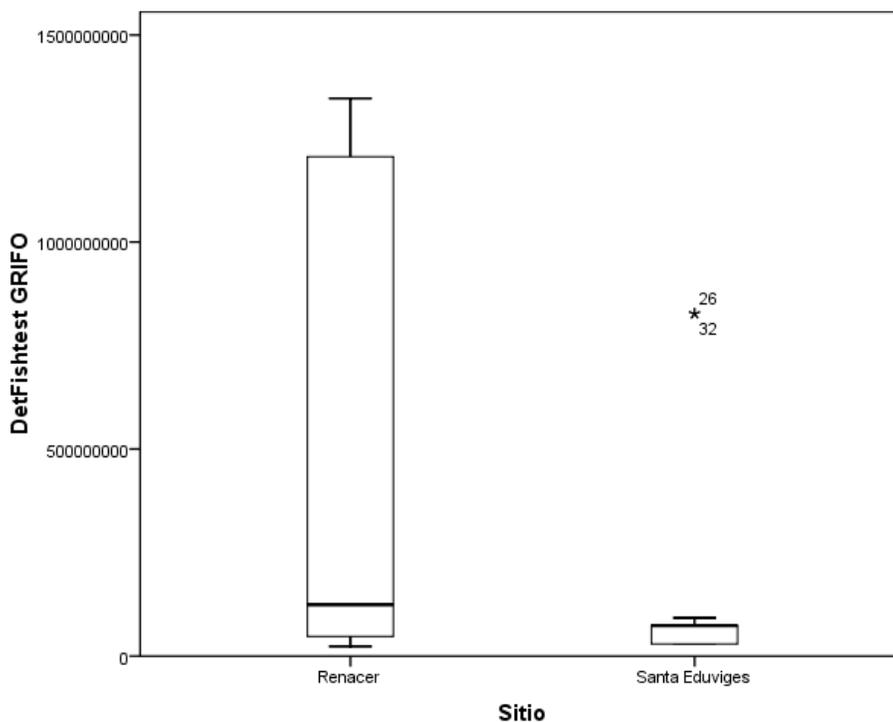


Figura 6. Análisis de Mann-Whitney que muestra diferencia significativa ($p=0,033$) entre los contajes de concentraciones de *H. pylori* en las aguas de grifo de las comunidades Renacer y Santa Eduvigis.

Finalmente, se empleó un análisis de modelo lineal generalizado para determinar si la frecuencia de infección por *H. pylori* en la población de estudio está mejor explicada por el método de tratamiento del agua, tipo de paciente o número de células de *H. pylori* cuantificadas por FISH en las aguas de grifo de las dos comunidades estudiadas en Mucuchíes. Este análisis indicó que la variable o modelo que mejor explica la frecuencia de infección de *H. pylori* en la población de Mucuchíes es el método de tratamiento del agua dado por un índice AIC (Criterio de Información de Akaike) de 54,984 menor al modelo nulo y los otros modelos evaluados (AIC entre 56,477 y 59,2).

DISCUSIÓN

La infección por *H. pylori* constituye un problema de salud pública relevante con una prevalencia a nivel mundial del 50% (Brown, 2000)⁶⁷. En Venezuela la prevalencia alcanza 62% mientras que en Mucuchíes-Mérida se ubica en 75%⁹. Así mismo estudios previos realizados, Villarreal (2011)⁶⁰ mostraron una tasa de re-infección del 76% en pacientes previamente tratados.

Varios estudios han mostrado una asociación entre la prevalencia de la infección y la fuente de agua potable (Percival et al., 2004)⁶⁸. Duarte (2013)⁶⁹ determinó la presencia de *H. pylori* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y FISH cualitativo en distintas fuentes de aguas potables y aguas de riego de Mucuchíes. Los resultados de este estudio sugirieron que las aguas de consumo de esta población pudiesen estar involucradas en la transmisión fecal-oral como fuente de infección o re-infección de *H. pylori*.

En el presente trabajo el estudio de los parámetros físico-químicos de las aguas de los tanques de distribución en las comunidades Renacer y Santa Eduvigis cuyo medio de desinfección es la cloración, reportaron valores de pH inferiores al rango permitido. La cloración es el método más frecuente para la desinfección del agua potable; sin embargo, algunos estudios han analizado la resistencia de *H. pylori* a los niveles habituales de cloro en los sistemas distribución del agua^{36,70}.

Después de obtener el acceso a sistemas de distribución de agua, *H. pylori* puede permanecer viable en la forma viable no cultivable en agua potable durante el tiempo suficiente para llegar a los puntos de consumo de la población³⁵. También se ha demostrado que las células de *H. pylori* formas agregados adhiriéndose a la superficie de las tuberías. Por lo tanto, es posible que si el organismo entra en un sistema de distribución, puede sobrevivir al tratamiento de desinfección dentro de la matriz de biopelículas³⁶.

No se logró el aislamiento de *H. pylori* por el agar HP, posiblemente debido a su entrada al estado VNC o a la competencia de otros microorganismos. El estado VNC fue confirmado por FISH a través de la observación de células predominantemente cocoides positivas a *H. pylori* y la presencia de bacterias generales.

El cultivo presenta muchas limitaciones para la identificación y cuantificación de este patógeno en fuentes de agua. FISH demuestra mayor sensibilidad que el cultivo y otros métodos moleculares para la detección de formas VNC de esta bacteria en muestras ambientales.

La implementación de FISH cuantitativo permitió identificar una concentración mayor de *H. pylori* en las aguas de grifo de las familias de Renacer, posiblemente relacionado con un menor uso de métodos de tratamientos de las aguas de consumo por esta comunidad. Por primera vez, se reporta un análisis cuantitativo de FISH para la detección de células cultivables y VNC de *H. pylori* en las muestras de agua. Otros estudios sólo han detectado *H. pylori* por FISH cualitativo en ambientes acuáticos (Moreno y cols. 2003, Fernández-Delgado y cols. 2008). Esta técnica se propone como un método altamente sensible y específico de mayor alcance que otros métodos moleculares para la determinación fidedigna de este patógeno en fuentes de agua.

No existe en la literatura valores comparables por FISH de número de células de *H. pylori* en fuentes de agua. Las normativas ambientales no han establecido valores aceptados de este patógeno en cuerpos de agua. Sin embargo, *H. pylori* está propuesto como candidato para indicador de contaminación fecal por la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de EE.UU).

Recientemente, un estudio reportó estimaciones menores 1 organismo/litro para *H. pylori* como Nivel de Contaminante Máximo (MCL) en agua potable, basado en modelos matemáticos calculados en datos experimentales de infección por *H. pylori* en monos y humanos en UFC/ml (Ryan et al.2014)⁷³.

La probabilidad de adquirir infección por *H. pylori* está más estrechamente relacionada con el tratamiento del agua. Independientemente del número de células de *H. pylori* presentes en las aguas de grifo, el tratamiento del agua va a controlar o minimizar la probabilidad de infección.

Otros factores no considerados en el estudio podrían influir en la frecuencia de infección por *H. pylori* en la población estudiada en Mucuchíes.

Se requieren futuros estudios que incluyan un número mayor de muestra en los análisis estadísticos.

Por otra parte, los intentos para aislar *H.pylori* de heces humanas han demostrado que el microorganismo o partes de él pueden estar presentes en estas muestras y el tracto gastrointestinal humano. Por ello, distintas casas comerciales han desarrollado una prueba de diagnóstico indirecta para la detección del antígeno bacteriano en las heces⁴². La prueba de antígenos fecales es fácil, simple y rápida para llevar a cabo. La muestra de heces puede ser almacenada a 2-8°C hasta por 3 días o indefinidamente a -20°C antes de la prueba. CerTest *H. pylori* + transferrina es una prueba cualitativa en inmunocromatografía para la detección de *H.pylori* y transferrina en muestras de heces. El límite de detección de CerTest *H.pylori* + transferrina es 6.25×10^3 UFC/ml. Distintos estudios han determinado por ensayos inmunoenzimáticos sensibilidad y especificidad elevadas para este test con el fin de detectar *H.pylori* y transferrina humana en heces^{71,72}.

Bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

- 1.- La dificultad en el cultivo y aislamiento de *H. pylori* de fuentes de agua potable de Mucuchíes probablemente fue debido a su entrada al estado VNC.
2. Se comprobó por FISH la presencia de *H. pylori* en muestras de aguas de los tanques y grifos de las comunidades Renacer y Santa Eduvigis en Mucuchíes.
- 3.- Por primera vez, se reporta con el uso de FISH concentraciones del patógeno en ambientes acuáticos.
- 4.- *H. pylori* se encuentra principalmente en forma cocoide o VNC en las fuentes de agua potable de las comunidades estudiadas en Mucuchíes y podría ser responsable de la transmisión de esta infección.
- 5.- El test de antígenos fecales para *H. pylori* demostró ser un método rápido, sensible, específico y no invasivo para la detección de la infección por *H. pylori* en la población estudiada en Mucuchíes.
- 6.- El análisis estadístico indicó que el tratamiento del agua es el mejor modelo que explica la incidencia de infección de *H. pylori*.
- 7.- Esta investigación representa una contribución significativa al conocimiento de la transmisión acuática de *H. pylori*.

RECOMENDACIONES

- En vista de los resultados reportados en nuestro estudio se sugiere mejorar el sistema de tratamiento de las aguas de distribución para consumo de la población de Mucuchíes, debido a que el tratamiento con cloración no es suficiente para garantizar la eliminación de este patógeno.
- Fomentar campañas de concientización en la población de Mucuchíes para estimular hábitos de higiene como el consumo de agua hervida y de ser posible previamente filtrada y tratada con ozono.
- Estudiar otras comunidades con distintas prevalencias de infección de *H. pylori* a fin de comparar estos resultados y determinar si predominan otras rutas de transmisión.

Bdigital.ula.ve

REFERENCIAS

- 1.Hoda M, Malaty and OlofNyrená. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Department of Medicine at Baylor College of Medicine, Houston, TX; USA; Department of Medical Epidemiology and Biostatistics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden 2002.
2. López-Brea M, Alarcón T. Aspectos microbiológicos (de la infección por Helicobacter). Gastroenterología y Hepatología Continuada 2005;4:53-6.
- 3.López Brea M, Correa P, Skirrow MB, Marshall BT. “Helicobacter pylori retos para el siglo XXI”. Revista de postgrado de la cátedra de medicina 138. Argentina. Octubre 2004;11-17.
- 4.Rothembacher D, Brenner H. Burden of Helicobacter pylori and H. pylori related diseases in Developpe countries: recent developments and future implications. Microbes Infect 2003;5:693-70.
- 5.Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med. 2002;347 (15) 1175-1186.
- 6.Fernández-Delgado M, Contreras M, García-Amado M, Michelangeli F, Suárez P, Evidencias de la Transmisión Acuática de Helicobacter pylori. Interciencia 2008; 33 (6): 412- 417.
- 7.Casanova G. Temas de Gastroenterología. Vol. I. Publicaciones Facultad de Medicina. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela; 2002. p. 98-116.
- 8.De Sousa L y cols. Características clínicas y epidemiológicas de la infección por Helicobacter pylori en una población de los andes venezolanos. Revista de la Facultad de Farmacia 2004; 46(2).

9. De Faría A, Casanova G, Milano M, Torres A. Relación entre Histología y Prueba de Aliento Cuantitativa en Gastritis Folicular (*Helicobacter pylori*), Mucuchíes-Mérida. GEN 2012; 66(3): 166-170.
10. Silva R. Comparación entre el test de aliento y la densidad histológica en el antro gástrico, en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. (Trabajo Especial de Grado). Mérida, Universidad de los Andes; 2008.
11. Pereira J. Correlación histopatológica y serológica en pacientes con infección por *H. pylori* y dispepsia en el Municipio Mucuchíes. (Trabajo Especial de Grado). Mérida, Universidad de los Andes; 2007.
12. López Brea M. *Helicobacter pylori* Microbiología, Clínica y Tratamiento. Madrid. Editorial Mosby; 1995. p. 266.
13. Feldman A, Eccersley AJ, Hardie JM. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. British Medical Bulletin 1988; 54(1): 39-53.
14. Magalhanes D, Lizza F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2006; 11 Supl 1: 1-5.
15. Mitchell H. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2002; 7 Supl 1: 8-16.
16. Kivi M, Ylva T, Mikael J. Concordance of *Helicobacter pylori* Strains within Families. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41 (12): 5604-5608.
17. Perez Perez G, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2004; 9 Supl 1: 1-6.
18. Song Q, Lange T, Sphar A. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *Journal of Medical Microbiology* 2000; 49: 349-353.

19. Berroteran A, Perrone M, Correnti M. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. *Journal of Medical Microbiology* 2002; 51:764-770.
20. Suzuki N, Masahiro Y, Toru N. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the saliva of patients complaining of halitosis. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57.
21. Alonso A., Avendaño M. Conglomerados de cáncer gástrico en el estado Mérida. Venezuela. *Interciencia* 2009;34(9):617-622.
22. Gemmato A.M, Casanova G, García M, Noboa D, Parlapiano D, Martínez D. 2005. Relación entre infección por *Helicobacter pylori* y lesiones preneoplásicas gástricas. *GEN* 59 (2) 93-98.
23. Jian-Ping Yuan, Tao Li, Hua-Biao Chen et al. Analysis of gene expression profile in gastric cancer cells stimulated with *Helicobacter pylori* isogenic strains. *J Med Microbiol* 2004; (53):965-974.
24. Marshal B J, Warren J R. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1984;1:1311-1315.
25. Johannes G, Arnoud H, Ernst J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *ClinMicrobiol Rev* 2006;19:449-490.
26. Sen K, Schable NA, Lye DJ. Development of an internal control for Evaluation and Standardization of a Quantitative PCR Assay for detection of *Helicobacter pylori* in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73 (22): 7380-7387.
27. Dawn I, Peek R. The Role of Persistence in *Helicobacter pylori* Pathogenesis: *Helicobacter pylori* and the host immune response. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22 (1): 3-7.
28. Fernández M, Contreras M, Suárez P, Gueneau P, García M. Use of HP selective medium to detect *Helicobacter pylori* associated with other enteric bacteria in seawater and marine mollusks. *Appl Microbiol* 2007; 45: 213-218.

29. Klein PD, Graham DY., Gaillour A, Opekun AR y O'Brian E. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *The Lancet* 1991; 337: 1503-1506.
30. Goodman KJ, Correa P, Tengana H et al. *Helicobacter pylori* Infection in the Colombian Andes: a population- based Study of Transmission Pathways. *Am J Epidemiol* 1996; 144(3):290-299.
31. Bunn JE, Mackay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT. Detection of *H. pylori* DNA in drinking waters biofilms: implications for transmission in early life. *Letters in Applied Microbiology* 2002; 34:450-454.
32. Shiotani A, Nurgalieva ZZ, Yamoka Y, Grafam DY. *H. pylori*. *Med Clin North Am* 2000; 84:1125-1136.
33. Giao MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW. Effect of Chlorine on Incorporation of *Helicobacter pylori* into Drinking Water Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76:1669-1673.
34. Domínguez M, Beker B, Guelrud M et al. Short report: socioeconomic and seasonal variations of *Helicobacter pylori* infection in patients in Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2002; (66)1:49-51.
35. Bellack NR, Koehoorn MW, MacNab YC, Morshed MG. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiol Infect* 2006; 134:439- 449.
36. Baker KH, Redmond B, Reed NA, Herson DS. Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine and ozone) on *H. pylori*. *Appl. Environ. Microbiol* 2002. 68, 981-984.
37. Adams BL, Bates TC, Oliver JD. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69 (12):7462-7466.
38. Azevedo N F, 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.

39. Boixeda D, Martín de Argila C. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud 2000; 24: 141-146.
40. Vaira D, et al. The stool antigen test for detection of *Helicobacter pylori* after eradication therapy. *Ann Intern Med*. February 19, 2002;136:280-7.
41. Gisbert JP, Pajares JM. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by stool antigen determination: a systematic review. *Am. J. Gastroenterol* 2001; 96:2829-2838.
42. Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter* 2004; 9: 347-368.
43. Urrestarazu MI, Serrano N, Uzcátegui A, Díaz L, Ávila M, Lunar M, Piñero R, Cavaza ME. Evaluación de un ensayo inmunoenzimático para la detección de *Helicobacter pylori* en muestras de heces. *Rev. Soc. Ven. Microbiol* 2001; 21:23-25.
44. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C et al. European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG) (2002) Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht 2- 2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther*. 16:167-180.
45. Demiray E, Yılmaz Ö, Şarkış C, et al. Comparison of invasive methods and two different stool antigen tests for diagnosis of *H. pylori* infection in patients with gastric bleeding. *World J Gastroenterol* 2006;12:4206-10.
46. Janzon A, Sjoling A, Lothigius A et al. Failure to detect *Helicobacter pylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive Real Time PCR Assays. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(10):3039-3044.
47. Khan A, Farooqui A, Urooj Kazmi S. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water of Karachi, Pakistan. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6: 251-255.
48. Enroth H and L Engstrand. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:2162-2165.
49. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH et al. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterol* 1996; 110 (4):1031-5.

50. Hulten K, Enroth H, Nystrom T, Engstrand L. Presence of Helicobacter species DNA in Swedish water. *J Appl Microbiol* 1998;85(2):282-6.
51. Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A and Goodman K. Isolation and genotyping of Helicobacter pylori from untreated municipal wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68:1436-1439
52. Cellini L, Del Vecchio A, Di Candia M, Di Campli E, Favaro M. and Donelli G. Detection of free and plankton-associated Helicobacter pylori in seawater. *J. Appl. Microbiol.* 2004;97(2):285-92.
53. Engstrand, L. Helicobacter in water and waterborne routes of transmission. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 90:80-84.
54. Moreno Y, Ferrus MA, Alonso J, Jimenez A, Hernández J. Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of Helicobacter pylori in water. *Water Research*. 2003;37:2251-2256.
55. Degnan A, Sonzogni W, Standridge J. Development of a plating medium for selection of Helicobacter pylori from water samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69:2914-2918.
56. Carbone M, Maugeri TL, Gugliandolo C, La Camera E, Biondo C and Fera MT. Occurrence of Helicobacter pylori DNA in the coastal environment of southern Italy (Straits of Messina). *Journal of Applied Microbiology* 2005; 98(3):768-774.
57. Park SR, Mackay WG and Reid DC. Helicobacter sp. recovered from drinking water biopelícula sampled from a water distribution system. *Water Research*. (2001); 35:1624-1626.
58. Albarracín Z, Casanova G, García M. Comparación de la eficacia de dos terapias para la erradicación del Helicobacter pylori en Mucuchíes, estado Mérida. *Postgrado de Gastroenterología-Universidad de los Andes*; 2009.

59. Flores Y, Casanova G. Características clínico-epidemiológicas de la infección por *Helicobacter pylori* en la población de Mucuchíes estado Mérida. Postgrado de Gastroenterología-Universidad de los Andes; 2009.
60. Villarreal L. Tasas de reinfección de *Helicobacter pylori*, hallazgos endoscópicos e histopatológicos posterior a una terapia de erradicación efectiva. Mucuchíes-Estado Mérida. Post grado de Gastroenterología Universidad de Los Andes; 2011.
61. Ramírez P, Vera G. Presencia de *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y vegetales de cultivo. Mucuchíes, municipio Rangel estado Mérida. Venezuela. Postgrado de Gastroenterología. Universidad de Los Andes 2012.
62. Infante A. Lugar del frío: propuesta para un turismo ecológico en la comunidad de Mucuchíes estado Mérida. Trabajo Especial de Grado. Colegio Universitario Hotel Escuela. Mérida; 2008.
63. Trebesius K, Leitritz L, Adler K, Schubert S, Autenrieth IB & Heesemann J. 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.
64. Samarbaf-Zadeh AR, Tajbakhsh S, Moosavian SM, Sadeghi-Zadeh M, Azmi M, Hashemi J, Masjedi-Zadeh A. Application of fluorescent in situ hybridization (FISH) for the detection of *Helicobacter pylori*. *Med. Sci. Monit* 2006;12:426-430.
65. Porter KG, Feig S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 1980;25:943-948.
66. Decreto 883. Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos. Gaceta Oficial 5021. Caracas 1995.
67. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev.* 2000;22(2):283-97.
68. Percival SL, Chlamers RM, Embrey MJ, Wyn-Jones (Eds), 2004. *Microbiology of Waterborne Pathogens*. Elsevier, London.
69. Duarte N, Casanova G, Fernández M. Detección de *H. pylori* en aguas de consumo humano y sistemas de riego de Mucuchíes, Municipio Rangel, Edo Mérida. Postgrado de Gastroenterología Universidad de los Andes; 2013.

70. Johnson C, Rice EW, Reasoner DJ. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Appl. Environ. Microbiol* 1997;63: 4969-4970.
71. Bruce E, Hartley Cohen, Martin J. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev* 10 Oct 1997;(4)720-774.
72. John L. Telford et al. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infections. *Current Opinion in immunology* 1997;498-503.
73. Michael R, Kerry H, Michael H, Charles H. Evaluating the potencial for a *Helicobacter pylori* Drinking Water Guideline. *Risk Analysis* 2014.1-12.

Bdigital.ula.ve

ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____, CI: _____ Jefe de mi grupo familiar, por medio de la presente confirmo que se me ha informado acerca de mi participación en el proyecto de investigación “Asociación entre infección por H. pylori y el consumo de agua potable en la población de Mucuchíes, Estado Merida”

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

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

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

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

NOMBRES Y APELLIDOS DEL PACIENTE FECHA

FIRMA

NOMBRES Y APELLIDOS DE TESTIGO FECHA

FIRMA

NOMBRES Y APELLIDOS DEL INVESTIGADOR FECHA

FIRMA

ANEXO 2: FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES – UNIDAD DE
GASTROENTEROLOGÍA.

FECHA: _____

Casa #:

Dirección _____

Número de Teléfono _____

I. Datos del Jefe del Grupo Familiar

Nombres y apellidos _____

II. Medidas Higiénico-sanitarias:

Métodos de desinfección del agua:

Filtro _____

Hierven el agua _____

Directo del tubo _____

Compran aguas envasadas _____

Vegetales Crudos: Si _____ **No** _____ **Cuáles?** _____

Método de desinfección de vegetales crudos:

Ninguno _____

Agua Corriente directa del tubo _____

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

Agua Hervida _____

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

Sí_____ Cuántos: _____

No_____

¿Por qué?

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

Sí_____ No_____

¿Recibió tratamiento?: Sí_____ No_____

¿Hay antecedentes de Cáncer Gástrico en la familia?

Sí_____ No_____

Parentesco_____

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

Náuseas_____ Regurgitación _____ Odinofagia_____ Pirosis_____

Vómitos_____ Disfagia: _____ Meteorismo_____ Distensión

abdominal_____ Eructos_____ Anorexia: _____ Pérdida de

peso_____

Nombre y apellidos de pacientes sintomáticos:

Anexo 3: Tanque Renacer (tanque de abastecimiento comunidad Renacer)



Anexo 4 : Tanque La Hoyada (tanque de abastecimiento comunidad Santa Eduviges)

