

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



**ADAPTACIÓN DE *Helicobacter pylori* EN DOS SISTEMAS
ACUÁTICOS: EN AGUAS POTABLES Y EN AGUAS
RESIDUALES
POR
JORGE LUIS VALENCIA VALENCIA**

**MONOGRAFÍA
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

TORREÓN, COAHUILA.

FEBRERO DE 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

MONOGRAFÍA DEL C. JORGE LUIS VALENCIA VALENCIA, QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACION DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES

REVISADA POR EL COMITÉ ASESOR:

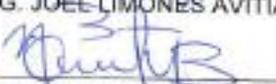
PRESIDENTE:


DR. HÉCTOR MADINAVEITIA RÍOS

VOCAL:

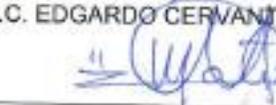

ING. JOEL LIMONES AVITIA

VOCAL:


M.C. NATALIA BELEN ORTEGA MORALES

VOCAL:


M.C. EDGARDO CERVANTES ÁLVAREZ


M.E. VÍCTOR MARTÍNEZ CUETO

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

FEBRERO DE 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

**ADAPTACIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* EN DOS SISTEMAS ACUÁTICOS:
EN AGUAS POTABLES Y EN AGUAS RESIDUALES**

POR:

JORGE LUIS VALENCIA VALENCIA

MONOGRAFÍA:

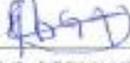
QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ ASESOR COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES

REVISADA POR EL COMITÉ ASESOR:

ASESOR PRINCIPAL: 
DR. HÉCTOR MADINAVEITIA RÍOS

ASESOR: 
ING. JOEL LIMONES AVITIA

ASESOR: 
M.C. EDGARDO CERVANTES ÁLVAREZ

ASESOR: 
BIOL. MARÍA ISABEL BLANCO CERVANTES


M.E. VÍCTOR MARTÍNEZ CUETO

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

FEBRERO DE 2018.



AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer sinceramente por mis asesores de tesis Dr. Héctor Madinaveitia ríos y la Bióloga María Isabel blanco Cervantes, la oportunidad de trabajar con ellos, su esfuerzo y dedicación. Durante el desarrollo la investigación, han sido fundamentales sus conocimientos, sus orientaciones, su persistencia y motivación para mi formación.

Al Dr. Miguel Ángel Urbina Martínez y al ING. Joel Limones Avitia por haberme enseñado y aconsejado en la forma de expresarme.

Durante esta etapa han pasado muchas personas acompañándome en el camino; algunos de ellos son Juan, Derly, Ever, Gabriela, Ricardo, Jesús, Carlos Priscila y todos mis compañeros de grupo. Gracias por todos los momentos de risas, por buenos momentos con ellos, por disfrutar y celebrar los pequeños triunfos durante estos años, en fin gracias por ser mi pequeña familia.

Y quiero agradecer a mi familia por su apoyo continuo en todas mis decisiones, por inculcarme ese espíritu curioso que me ha traído hasta aquí. Gracias.

Y finalmente quiero agradecer a Yuliana Pérez Cervantes que desde que llegó a mi vida me apoyo para ser lo que ahora soy, me convirtió una nueva persona para rescatar mis sueños de seguir estudiando y con las ganas de seguir adelante. Y no podía faltar el agradecer a mi hijo Luis Marcelo valencia Pérez que está por nacer.

DEDICATORIA

A mis padres Inés Valencia Guzmán y Marcelino Valencia García; que siempre estuvieron conmigo y compartiendo sus enseñanzas y experiencias que tuvieron durante las etapas de sus vidas.

A mis hermanos Cirilo Valencia Valencia, Josefina Valencia Valencia y José Carmito Valencia Valencia; gracias por los consejos y enseñanzas que me dieron para seguir adelante.

A mi novia Yuliana Pérez Cervantes que me brindo su compañía, su apoyo y su cariño durante mucho tiempo. Y no puede faltar a mi hijo Luis Marcelo Valencia Pérez que muy pronto estará conmigo.

A los profesores por compartir sus enseñanzas, gracias a ellos pude comprender muchas cosas y mejorar mí el lenguaje para poder expresarme.

Y a todas las personas que me apoyaron y que siempre estuvieron conmigo.

Gracias por todo.

RESUMEN

Helicobacter pylori es una de las bacterias más peligrosas en México y en todo el mundo y que van relacionados con los niveles socioeconómicos. De esta manera, el estatus es el determinante más importante para el desarrollo de la infección por *H. pylori*, siendo las clases sociales más bajas las que exhiben mayor prevalencia por contaminación.

Helicobacter pylori ocupa una posición destacada entre los patógenos humanos emergentes, siendo una de las causas más comunes de infección crónica bacteriana en la humanidad y estrechamente relacionada con la úlcera péptica y el cáncer gástrico. Se ha sugerido que *H. pylori* puede ser adquirido por diferentes vías de transmisión, entre ellas el agua. La creciente demanda de agua debido al aumento de la población mundial y a la concurrente expansión de la industria hace necesario el aprovechamiento de las aguas residuales depuradas. Sin embargo, la resistencia de *H. pylori* a los tratamientos de desinfección del agua constituye un riesgo para la salud.

Esta investigación recopila información sobre la morfología, fisiología y epidemiología de *Helicobacter pylori* así como su presencia y viabilidad de este patógeno en el ambiente acuático como en sistemas de agua residual y potable y las diferentes técnicas para identificación de *Helicobacter pylori*.

Palabras claves: *Helicobacter pylori* en el agua, detección de *Helicobacter pylori*, contaminación por *Helicobacter pylori*.

INDICE

AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA	II
RESUMEN.....	III
INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
<i>Helicobacter pylori</i> , PATÓGENO ACUÁTICO EMERGENTE	3
ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL	3
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA ESPECIE <i>Helicobacter pylori</i>	7
EPIDEMIOLOGÍA Y PATOLOGÍA DE <i>Helicobacter pylori</i>	8
EPIDEMIOLOGIA.....	8
TRANSMICION DE <i>Helicobacter pylori</i>	9
PATOLOGÍA.....	11
CONTAMINACIÓN DE AGUA.....	14
TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i>	18
DETECCIÓN Y AISLAMIENTO POR CULTIVO.....	19
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	21
PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (Q-PCR).....	22
DETECCIÓN DE CÉLULAS VIABLES POR MÉTODOS MOLECULARES	24
DETECCIÓN DE ADN DE CÉLULAS VIABLES MEDIANTE PCR.....	24
RESISTENCIA DE <i>H. pylori</i> A LA CLARITROMICINA.....	26
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIÓN	31
ANEXOS	32
ABREVIATURAS.....	37
BIBLIOGRAFIA	38

ANEXOS

ANEXO A. Estaciones de Depuración de Aguas Residuales (EDAR)

A.1. Fases del proceso de depuración de aguas residuales

ANEXO B. Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAP)

B.1. Fases del proceso de potabilización de agua

ANEXO C. abreviaturas

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del género Helicobacter

Tabla 2. Especies intestinales del género Helicobacter

Tabla 3. Especies gástricas del género Helicobacter

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de Helicobacter pylori.

Figura 2. Distribución de la infección de H. pylori en la población mundial, Vinculada con el grado de desarrollo económico.

Figura 3. Representación gráfica del aumento de la fluorescencia (ΔR_n) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de C_T .

Figura 4: Mecanismo de acción del Propidio Monoazida

Figura 5. Diagrama de bloques del proceso de depuración de agua residual.

Figura 6. Diagrama de bloques del proceso de potabilización de agua

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es reconocido por la organización mundial de la salud como la causa primaria de úlceras pépticas, gastritis crónica y cáncer de estómago, aunque la fuente de la infección humana no está bien entendida.

La presencia de *Helicobacter pylori* se ha investigado en aguas naturales, potables y hasta en aguas residuales como foco de infección por microorganismos, usando métodos para la identificación, uno de ellos método de PCR (reacción en cadena de la polimeriza) desde *Helicobacter pylori* tiene la propensión de presentarse en dos formas: espiral y coccóide (Shin-Yi *et al.*, (2016)).

La prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en algunos países en desarrollo es superior al 80% y 20% en algunos países desarrollados. El hombre se le considera como portador por infección de enfermedades ya que la presencia de *helicobacter pylori* permanece durante toda la vida a menos que se lleve un control para el equilibrio. Sin embargo, varios estudios muestran que el bajo nivel de vida y los hogares son el principal factor de riesgo contratante infección por *Helicobacter pylori*.

En la actualidad esta bacteria están presentes en los alimentos y bebidas el agua es la fuente de vida en todos los seres vivos. En países en vías de desarrollo y subdesarrollo el agua juega un gran papel en la transmisión de enfermedades causadas por microorganismos (Akcarn *et al.*, 2000). El agua es la principal razón de esta situación por el alto costo que representa los puntos de procesos de tratamiento y el mantenimiento de infraestructuras (Langford, 2005).

En este trabajo se aborda la morfología, fisiología y epidemiología de *Helicobacter Pylori* en sistemas de agua potable y residual. Que son los medios principales que emplea este microorganismo para invadir sistemas biológicos.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la morfología, fisiología y epidemiología de *Helicobacter pylori* en el ambiente acuático

ESPECIFICO

Hacer una investigación bibliográfica sobre la morfología, fisiología y epidemiología de *Helicobacter pylori* en ambiente acuático: agua potable y agua residual.

REVISIÓN DE LITERATURA

***Helicobacter pylori*, PATÓGENO ACUÁTICO EMERGENTE**

ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL

A finales del siglo XIX se realizaron las primeras descripciones de microorganismos espirales en el estómago de animales. Durante una ponencia en 1881, Rappin mencionó que había observado una bacteria espiral en el estómago canino, a la que denominó *Spirocheta rappini*. En 1893, Bizzozero publicó varios dibujos de organismos espirales en el estómago de perros, que hoy conocemos como *Helicobacter heilmannii*. Tres años después, Salomon presentó un informe bacteriológico de organismos espirales, probablemente *Helicobacter felis*, en el estómago de perros y gatos, incluyendo su estructura flagelar, motilidad y manejo en el laboratorio (Blum, 1997).

En 1939, Doenges, tras realizar autopsias a un gran número de adultos jóvenes, encontró organismos espirales en el 40% de los estómagos; probablemente se trataba de *Helicobacter pylori*.

Marshall y Warren, en 1982 lograron el primer cultivo de *Campylobacter pyloridis*, el actual *Helicobacter pylori* (Marshall y Warren, 1983), hecho que revolucionó la ciencia de la gastroenterología, y por el que se les concedió el Premio Nobel de Medicina en octubre de 2005. *H. pylori* está hoy en día considerado como el agente infeccioso más extendido en humanos, se distribuye a lo largo de todo el mundo y se estima que alrededor de la mitad de la población humana está infectada con este patógeno.

El camino hasta su clasificación taxonómica actual ha sido largo. En 1989, el análisis del rRNA y el estudio de ultra estructurales dieron como resultado el establecimiento del género *Helicobacter*, transfiriéndose las especies *Campylobacter pylori* (anteriormente *Campylobacter pyloridis*) y *Campylobacter mustelae* (anteriormente *Campylobacter pylori* subesp. *mustelae*) (Goodwin et al., 1989). Las claves para el descubrimiento de los microorganismos al género fueron: bacterias curvadas Gram negativos, móviles mediante un flagelo

envainado, capaces de formar estructuras de cocos, microaerofilicas, quimiorganótrofas, incapaces de fermentar u oxidar carbohidratos, con crecimiento óptimo a 37 °C e incapaces de crecer a 25 °C (Percival et al., 2004). Según la clasificación descrita en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology on line*, (Euzéby, 2016), el género *Helicobacter*, junto con *Sulfurimonas*, *Thiovulum* y *Wolinella*, se agrupan formando la familia *Helicobacteraceae* (Vandamme, 2000), que junto a la familia *Campylobacteraceae*, *Nautiliaceae* e *Hydrogenimonaceae* conforman el orden *Campylobacterales* de las *Proteobacterias* (Trust et al., 1994). La Tabla 1 muestra la taxonomía de *Helicobacter*.

Tabla 1. Taxonomía del género *Helicobacter*

DOMINIO	BACTERIA
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	Epsilonproteobacteria
Orden I	Campylobacterales
Familia I	<i>Campylobacteraceae</i>
Género I	<i>Campylobacter</i>
Género II	<i>Arcobacter</i>
Género III	<i>Sulfurospirillum</i>
Familia II	<i>Helicobacteraceae</i>
Género I	<i>Helicobacter</i>
Genero II	<i>Sulfurimonas</i>
Género III	<i>Thiovulum</i>
Género IV	<i>Wolinella</i>
Familia III	<i>Nautiliaceae</i>
Familia IV	<i>Hydrogenimonaceae</i>

Euzéby, 2016 (LPSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. [www. baterio.net](http://www.baterio.net))

Dentro del género *Helicobacter*, las especies pueden clasificarse en dos grupos en función de su reservorio, el estómago o el intestino. Existen algunas especies como *Helicobacter aurati*, *Helicobacter bilis* y *Helicobacter muridarum*, que pueden ser aisladas tanto del estómago como del intestino.

Las Tablas 2 y 3 muestran las distintas especies del género, según el reservorio donde se encuentran y los hospedadores de los que se han aislado.

Tabla 2. Especies intestinales del género *Helicobacter*

NOMBRE	HOSPEDADOR	REFERENCIA
<i>H. aurati</i>	hamsters	Patterson <i>et al.</i> (2002)
<i>H. bilis</i>	ratones, perros y hombre	Fox <i>et al.</i> (1997)
<i>H. canadensis</i>	hombre	Fox <i>et al.</i> (2002)
<i>H. canis</i>	perros, hombre	Stanley <i>et al.</i> (1994)
<i>H. cholecystus</i>	hamsters	Franklin <i>et al.</i> (1997)
<i>H. cinaedi</i>	hombre, hamsters y macacos	Totten <i>et al.</i> (1988); Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<i>H. equorum</i>	caballos	Moyarert <i>et al.</i> (2007)
<i>H. fennelliae</i>	hombre	Totten <i>et al.</i> (1988); Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<i>H. ganmani</i>	ratones, perros y hombre	Robertson <i>et al.</i> (2001)
<i>H. hepaticus</i>	ratones, perros y hombre	Fox <i>et al.</i> (1994)
<i>H. macacae</i>	monos	Fox <i>et al.</i> (2013)
<i>H. mesocricetorum</i>	hamsters	Simmons <i>et al.</i> (2000)
<i>H. muridarum</i>	ratones, ratas	Lee <i>et al.</i> (1992)
<i>H. pametensis</i>	aves, cerdos	Dewhirst <i>et al.</i> (1994)
<i>H. pullorum</i>	pollos, hombre	Stanley <i>et al.</i> (1995)
<i>H. rodentium</i>	ratones	Shen <i>et al.</i> (1997)
<i>H. trogonum</i>	ratas	Mendes <i>et al.</i> (1996)
<i>H. typhlonius</i>	ratones	Franklin <i>et al.</i> (2002)
<i>H. valdiviensis</i>	pájaros	Collado <i>et al.</i> (2014)

Euzéby, 2016 (LPSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. www.bacterio.net)

Tabla 3. Especies gástricas del género *Helicobacter*

NOMBRE	HOSPEDADOR	REFERENCIA
<i>H. acinonychis</i>	guepardos	Eaton et al. (1993)
<i>H. baculiformis</i>	gatos	Baele et al. (2008)
<i>H. bizzozeronii</i>	perros	Hänninen et al. (1996)
<i>H. cynogastricus</i>	perros	Van de Bulck et al. (2006)
<i>H. felis</i>	gatos, perros	Paster et al. (1991)
<i>H. heilmanni</i>	gatos, hombre	Smet et al. (2012)
<i>H. himalayensis</i>	marmotas	Hu et al. (2015)
<i>H. mustelae</i>	hurones	Fox et al. (1988); Goodwin et al. (1989)
<i>H. nemestriae</i>	macacos	Bronsdon et al. (1991)
<i>H. pylori</i>	hombre, macacos	Marshall et al. (1985); Goodwin et al. (1989)
<i>H. salomonis</i>	perros	Jalava et al. (1997)
<i>H. suis</i>	cerdos	Baele et al. (2008)

Euzéby, 2016 (LPSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. www.bacterio.net)

Las especies descritas en las tablas 2 y 3 son especies validadas para el género *Helicobacter*. Actualmente existen otras especies que no cumplen los criterios para ser consideradas como especies, en muchos de los casos debido a la imposibilidad de obtener su cultivo, por lo que pasan a ser *Candidatus*. La categoría *Candidatus* se propuso para designar provisionalmente especies de procariontes de descripción incompleta (Murray y Stackebrandt, 1995). Actualmente encontramos como especies *Candidatus* del género *Helicobacter* a *Helicobacter marmotae* (Fox et al., 2006), *Helicobacter mastomyrimus* (Shen et al., 2006), *Helicobacter brantae* (Fox et al., 2006), *Helicobacter anseris* (Fox et al., 2006) y *Helicobacter centorum* (Harper et al., 2006).

CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA ESPECIE

Helicobacter pylori

El género *Helicobacter* agrupa 31 especies, caracterizadas por ser bacilos Gram-negativos, helicoidales, espirales o rectos, de 0.3-1.0 μm de ancho y de 1.5-5 μm de largo. Presenta extremos redondeados y cuando son curvados muestran periodicidad espiral (Vandamme et al., 1991). Pueden tener un único flagelo polar (*Helicobacter cinaedi* y *Helicobacter fenneillae*) o múltiples flagelos laterales, unipolares o bipolares (*H. pylori*), con una protuberancia terminal, de 30 μm de longitud y 2.5 μm de grosor, Confiriéndoles movilidad. (Owen, 1993).

Son bacterias microaerófilas, con metabolismo de tipo respiratorio. No utilizan carbohidratos.

En los medios de cultivo típicos para *Helicobacter*, de 2-5 días de incubación a 37 °C, se forman colonias no pigmentadas, translúcidas, de 1-2 de diámetro. Crecen a 30 °C pero no a 25 °C. Son catalasa y oxidasa positivo. Producen H₂S y no son capaces de hidrolizar el hipurato (es un compuesto orgánico aromático que puede ser hidrolizado enzimáticamente originando benzoato y glicina). Las especies gástricas son productoras de enzima ureasa. Su contenido en varía entre 35 y 44% (Vandamme et al., 1991).

Helicobacter pylori es la principal especie del género y la más importante en patología humana por su estrecha relación con la úlcera péptica y el cáncer gástrico (Dunn et al., 1997). En el estómago aparece como bacilos cortos espirales o en forma de S, de 0.5 a 1 μm de ancho y aproximadamente 3 μm de largo (Figura 1).

El nicho ecológico de *Helicobacter pylori* es la mucosa gástrica, presenta características peculiares y únicas. Para alcanzar este microambiente la bacteria debe pasar a través de la cavidad oral y el tracto del esófago. Cuando llega al píloro, el pH en el lumen del estómago es mucho más bajo, con valores de entre 1 y 4, condiciones que desnaturalizan la mayoría de las proteínas. *Helicobacter pylori* sobrevive a estas condiciones ya que es capaz de establecer el pH en su zona, debido a que sintetiza la enzima ureasa.

El amoníaco actúa como un neutralizador de la acidez, aumentando el pH de alrededor de la bacteria y permitiendo que el microorganismo sea capaz de sobrevivir en la mucosa gástrica a pesar de la acidez del lumen.



Figura 1. Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori* (ASM MicrobeLibrary)

EPIDEMIOLOGÍA Y PATOLOGÍA DE *Helicobacter pylori*

EPIDEMIOLOGIA

La infección por *Helicobacter pylori* es una de las infecciones crónicas más comunes en la humanidad (Graham et al., 1991). En 1983, se han efectuado en diferentes localizaciones numerosos estudios epidemiológicos, con los objetivos de determinar la prevalencia de la infección, identificar factores de riesgo que pudiesen participar en su adquisición y detectar el modo de transmisión. De este modo, se ha estimado que esta infección afecta al menos al 50 % de la población mundial. En general, dos patrones epidemiológicos definen su extensión: en los países con condiciones higiénico-sanitarias se presentan tasas elevadas de infección en la infancia (70-80 %), mientras que en la mayor parte de los países desarrollados la infección se concentra en la edad adulta, con una prevalencia entre el 10 y el 60 % (Bassily et al., 1999). Percival (2004) indicaron que el riesgo

de infección, en ambos casos, va disminuyendo a lo largo de generaciones sucesivas.

Algunos estudios han descrito una serie de factores que están asociados a un aumento del riesgo dentro una comunidad (Malaty y Niren, 2003; Michel y Mégraud, 2002; Eusebi, 2014). Las principales fuentes fueron en la edad y la clase social, encontrándose una mucosa gástrica normal con el 50 % de los sujetos menores de 30 años, pero sólo el 20 % en los mayores de 60 años. El 65 % fueron pertenecientes a clases sociales altas mostrando una histología normal, comparados con el 27.5% de las clases bajas (Graham et al., 1991).

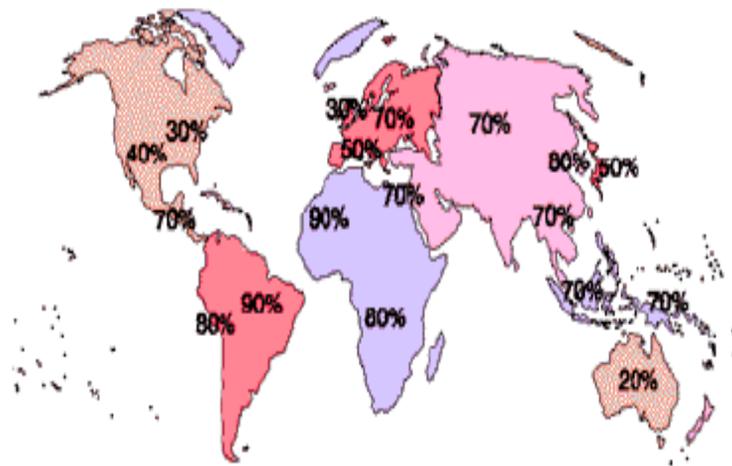


Figura 2. Distribución de la infección de *H. pylori* en la población mundial, vinculada con el grado de desarrollo económico, (www.helico.com, 2014).

TRANSMICION DE *Helicobacter pylori*

El hecho de que la infección de *Helicobacter pylori* esté tan extendida a nivel mundial sugiere que *H. pylori* puede ser adquirido por múltiples vías, y plantea la posibilidad de diferentes rutas de transmisión, entre ellas, oral-oral, gastro-oral, fecal-oral, alimentos y agua (Percival et al., 2009).

Transmisión persona-persona: Una de las rutas que se ha establecido como la más probable es el contacto directo persona-persona, siendo las posibles vías de propagación de *H. pylori* la vía oral-oral, la vía gastro-oral y la vía fecal-oral. Algunos autores sugieren que la ruta oral-oral se limita a la transmisión intrafamiliar, debido al hecho de que cepas procedentes de miembros pertenecientes a la misma familia ya que son genéticamente indistinguibles, mientras que las cepas aisladas de personas no relacionadas entre sí presentan perfiles únicos (Marshall, 2000). Sin embargo, otros autores opinan que la cavidad oral es el principal reservorio extragástrico y la ruta oral-oral la principal forma de dispersión del microorganismo (Nabwera y Logan, 1999).

Transmisión por alimentos: En los últimos años, varios estudios han abordado el papel de la alimentación en la transmisión de *H. pylori*. Los principales alimentos analizados han sido leche y las verduras. Jiang y Doyle (2002) comprobaron que *H. pylori* puede sobrevivir en leche cruda esterilizada inoculada con 106 u.f.c. /mL durante 6 días. En 2012, Rahimi y Kheirabadi realizaron un estudio, en Irán, sobre la presencia de *H. pylori* en leche cruda de vaca, oveja, cabra, camello y búfalo. Detectaron la presencia del gen ureC de *H. pylori* mediante PCR, en 56 de las 448 muestras analizadas (12.5%). En ninguno de los casos se consiguió el aislamiento de la bacteria.

Se ha descrito que los individuos que consumen verduras son más propensos a adquirir *H. pylori*. Dicha asociación sugiere la posible presencia de *H. pylori* en el agua utilizada para el riego de las hortalizas. Además, hay que remarcar que hoy en día existe una demanda creciente de consumo de vegetales con un mínimo proceso de tratamiento de la materia prima (Atapoor et al., en 2014).

Transmisión por aguas: Aunque el hábitat natural de *H. pylori* es el estómago humano, para su transmisión indirecta el organismo necesita sobrevivir en el medio ambiente externo. Mientras que la principal ruta de transmisión queda muy lejos de aclararse, la prevalencia de la infección por *H. pylori* muestra una fuerte

correlación con el acceso del agua. La transmisión de *H. pylori* por el agua puede ser muy mala particularmente en regiones del mundo donde la calidad del agua es baja, pudiendo ocasionar la diferencia de prevalencia de *H. pylori* entre países desarrollados y en vías de desarrollo (Bunn et al., 2002).

PATOLOGÍA

Helicobacter pylori se asocia específicamente con la mucosa gástrica produciendo una gastritis de tipo inflamatorio. Sin embargo, en la mayoría de los casos esta inflamación resulta asintomática (Dunn et al., 1997). La presencia de *Helicobacter pylori* está asociada también con la aparición de gastritis crónica con un tipo superficial y/o úlcera gástrica, aunque no todos los pacientes afectados de gastritis inflamatoria puede desarrollan finalmente una úlcera gástrica.

Kreiss (1995), estableció que una compleja interacción entre distintos mecanismos, como los factores de virulencia, la respuesta por parte del hospedador y los factores ambientales, se originan como conductores hasta el proceso final de la úlcera. Los síntomas más comunes cuando los individuos presentan manifestaciones clínicas de gastritis o úlcera son náuseas, dolor abdominal, acidez o sangrado. La mayoría de los síntomas desaparecen rápidamente tras la erradicación de la bacteria mediante terapias con antibióticos. Hoy en día existe controversia sobre el mecanismo de infección de *Helicobacter pylori* en el ser humano. Se conoce que el hospedador desarrolla una respuesta inmune que es inefectiva para eliminar esta bacteria, pero que puede tener un papel fundamental en la evolución de la infección hacia distintas formas clínicas tan variadas como una gastritis superficial leve a una ulceración gastroduodenal (Pakodi et al., 2000)

Existen también factores genéticos del hospedador que aumentan o disminuyen el riesgo de la infección. Parece ser que algunos individuos pueden ser más susceptibles a presentar úlcera péptica en el desarrollo de la gastritis activa por *Helicobacter pylori* (Wyatt, 1992). Los antígenos del grupo sanguíneo de Lewis están asociados con la adhesión a la superficie de las células epiteliales (Boren et al., 1993).

Si *Helicobacter pylori* permanece en la mucosa gástrica durante años puede conducir a la producción de cáncer gástrico (Cover y Blaser, 1995). *Helicobacter pylori* en la actualidad es la única bacteria con acción carcinógena demostrada. En 1994 fue clasificado como carcinógeno humano de Clase I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, por su estrecha relación con el cáncer gástrico y el linfoma gástrico de tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosas).

También ha surgido una nueva hipótesis sobre la relación entre infección en la niñez y el riesgo del cáncer gástrico en adultos, lo que ha llevado a propugnar la necesidad de programas preventivos para reducir la infección en niños y adolescentes (Iwanczak, et al., 2014). A pesar de ello, la misma IARC señala que en estos momentos ningún país ha implementado algún tipo de estrategia de prevención, debido en gran parte al desconocimiento existente sobre su epidemiología.

Hasta el momento, lo que se conoce sobre los mecanismos de patogenicidad del microorganismo que nos lleva a pensar que probablemente su intervención en estas enfermedades se han indirecta, Sin embargo, aún están muy lejos de conocer exactamente con qué enfermedades se relaciona, por qué mecanismos interviene en su producción y qué nivel de riesgo aporta la infección (Eusebi, 2014; Lin and Koskella, 2015).

Dado que la infección por *Helicobacter pylori* constituye un problema sanitario, con una alta prevalencia de infección a nivel mundial, (Suerbaum et al., 2002).

Helicobacter pylori exhibe la diversidad genética entre cada una y con diferentes patogenicidad y distribuciones en diferentes partes del mundo o entre los seres grupos étnicos. Esta variación es al menos parcialmente, de varios factores conocidos de virulencia que no son presente en todas las cepas, incluyendo la actividad ureasa que facilita la colonización gástrica y los flagelos que son esenciales para moverse a través de la capa gástrica mucosa. Los estudios han demostrado que las tasas de infección por *H. pylori* son mayores en los países en desarrollo con una mala infraestructura higiénica o mala gestión de los

recursos hídricos por el consumo humano, lo que sugiere que las factores facilitan la transmisión de *H. pylori*.

Un obstáculo importante para la detección de *H. pylori* es la dificultad de su aislamiento en las muestras ambientales utilizando métodos tradicionales de cultivo. Esta es una probablemente consecuencia de la transformación de *H. pylori* en muestras de agua de una forma cultivable, en espiral a una coccóide. Para superar este problema, se han desarrollado métodos para el análisis de desarrollo para muestras ambientales, tales como inmune y la prueba de la actividad ureasa, y diferentes métodos basados en el ADN, incluyendo la fluorescencia *hibridación in situ* (FISH) y PCR (ez et al., 2008).

Los agentes patógenos transmitidos por el agua pueden causar enfermedades agudas o crónicas la investigación del agua como vector de la enfermedad requiere evaluar la presencia de patógenos en las fuentes de agua potable. Recientemente ha utilizado la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (DPCR) para las bacterias en el agua y otras en muestras ambientales. Este enfoque racionalizado evita la recuperación de células o la extracción de ADN mediante PCR.

La colonización con *H. pylori* no es una enfermedad en sí, pero es una condición que afecta el riesgo relativo a desarrollar varios desórdenes en el tracto gastrointestinal superior y posiblemente en el tracto hepatobiliar. *H. pylori* es moderadamente invasivo, que coloniza la superficie de la mucosa gástrica. El microorganismo se adapta fuertemente al nicho ecológico de esta mucosa, debido a sus características que le permiten entrar dentro del moco, nadar, atacar a las células epiteliales, evadir la respuesta inmune y como resultado, la colonización y transmisión persistentes.

Aunque la colonización gástrica con *H. pylori* induce gastritis en todos los individuos afectados, sólo una minoría desarrolla los síntomas propios de la colonización. Otras enfermedades asociadas con *H. pylori* son; gastritis aguda, gastritis crónica, hemorragia digestiva alta y cáncer gástrico. Adicionalmente, *H. pylori* se ha relacionado con una variedad de desórdenes extragástricos, como enfermedades coronarias, anemia por deficiencia de hierro, migraña, púrpura

trombocitopenica, diabetes mellitus, encefalopatía hepática, urticaria crónica, tiroiditis autoinmune, entre otras patologías, posiblemente generadas por los desórdenes autoinmunes a los que conduce la infección con este microorganismo (Alba-Posse *et al.*, 2006).

CONTAMINACIÓN DE AGUA

En la historia de la humanidad, los centros culturales siempre fueron fundados en áreas con un suministro de agua dulce. A medida que aumentaba la población, el suministro natural de agua se hizo muy limitada, y todas las grandes culturas desarrollaron sofisticadas técnicas y sistemas para obtener acceso a nuevos depósitos de agua (por ejemplo, perforación de pozos y construcción de acueductos) y distribuir agua para regar y beber. Inicialmente, las comunidades en desarrollo descubrieron que suministrar y distribuir un volumen suficiente de agua potable presentaba grandes problemas. De pronto hubo complicaciones derivadas de la presencia de zonas de alta densidad de población, como el aumento de los residuos, y otros tipos de contaminación, que ponían en peligro el acceso al agua potable fresca y segura. (Szewzyk *et al.*, 2000).

El control de riesgos biológicos originados por bacterias o virus patógenos en el agua y los alimentos supone un importante reto para la prevención de la salud. A nivel mundial, las enfermedades transmitidas a través de aguas y alimentos contaminados representan un problema que en las últimas décadas se ha complicado considerablemente. Entre los factores determinantes se pueden señalar, el crecimiento de la población, la urbanización en los países subdesarrollados, la pobreza, la limitación de recursos naturales y la demanda de producción de alimentos. Durante siglos el hombre ha utilizado los recursos de agua, tanto superficiales como subterráneos. La industrialización, el crecimiento de la población y las exigencias crecientes de la sociedad han incrementado de manera espectacular, reduciendo en su calidad y en su capacidad al natural de auto purificación. La naturaleza, a través del ciclo del agua, actúa limpiándola como si fuese un filtro natural; sin embargo, en la

actualidad este proceso natural no es suficiente para eliminar todos los contaminantes existentes en el agua. El agua es una fuente de calidad que satisface las necesidades humanas y hoy en día es un recurso que cada vez se está agotando, ya que constituye un factor esencial de civilización. Por otra parte, muchos de los ríos que sirven como fuentes de consumo humano transportan cantidades variables de aguas de desecho, que se ven incrementadas en los urbanización de los países desarrollados y de los que se encuentran en vía de desarrollo que han dado lugar a problemas graves en el suministro de agua.

Debido a la creciente demanda de fuentes de agua utilizable, ya que es provocado por el aumento de la población mundial y la continua expansión de la industria, la reutilización de las aguas residuales urbanas se perfila como una fuente adicional de agua que sirve como segunda opción en tratamientos de aguas para el consumo humano.

Las aguas residuales sin tratamientos suponen un foco de contaminación, por lo que se hace necesaria la depuración de éstas para su posterior vertido o reutilización.

El acceso a fuentes mejoradas de agua potable y un mayor control de los vertidos de aguas residuales domésticas han sido los mayores logros alcanzados por la comunidad internacional en los últimos 10 años. Más de 2.5 mil millones de personas han obtenido suministros desde 1990, con un dato del 91% de la población mundial goza ahora de agua potable de mejor calidad, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015).

La construcción de sistemas de saneamiento y potabilización de agua ha supuesto un triunfo en la lucha contra enfermedades de transmisión hídrica. Pero el agua potable que circula por estos sistemas de distribución en los centros urbanos presenta niveles altos de contaminación. Por ello, se hace necesario una continua vigilancia de los sistemas de distribución de agua potable para evitar riesgos en la salud de la población que la consume (Ingerson-mahar y Reid, 2012). Esto está forzando a los suministradores y a la comunidad investigadora a mejorar el control de la calidad del agua dentro de los sistemas de distribución y a buscar nuevas alternativas de tratamiento (Cohn et al., 2002)

AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales se pueden definir como aquellas que de forma natural o por uso de la población representan un peligro para la comunidad viviente y que deben ser desechadas (Espigares y Pérez, 1985). Si bien los sistemas de recolección de aguas residuales han disminuido, con esta práctica sólo se transportan desechos, donde se aplican tratamientos de depuración (Anejo D.1). El factor que más influye sobre el proceso de depuración del agua residual es su composición (Metcalf y Eddy, 2003). En este sentido, la procedencia de un agua residual es un aspecto determinante en gran parte, de sus características físicas, químicas y biológicas. Según su origen, las aguas residuales pueden ser clasificadas en: domésticas o urbanas, industriales, agropecuarias, de origen incontrolado (vertidos ilegales, infiltraciones) y pluviales.

Las aguas residuales de origen doméstico tienen una composición muy variada debido a la naturaleza de la población residente. La mayor parte de la contaminación tiene su origen en los excrementos humanos y animales y, en menor proporción, en las aguas resultantes del lavado de ropa, preparación de alimentos y duchas. Por otra parte, las aguas pluviales o de lavado de calles de las zonas urbanas aportan altas fuentes de contaminación por el arrastre de materia sólida inorgánica en suspensión y materia orgánica soluble e insoluble (Espigares y Pérez, 1985). La elevada cantidad de materia orgánica presente en las aguas residuales ofrece un sustrato idóneo para el desarrollo de toda clase de microorganismos, muchos de los cuales son causantes de enfermedades (Metcalf y Eddy, 2003).

La mayoría de los países, con mayor o menor grado de industrialización tienen grandes problemas para garantizar un adecuado suministro de agua, así como para asegurar la protección de las fuentes de suministro frente a la creciente contaminación de las aguas. Estos problemas en su conjunto han servido como catalizadores al concepto de regeneración y reutilización del agua y lo han

elevado a un plano de gran importancia, considerándolo como una prioridad en el ámbito internacional. (Seguí, 2004).

Uno de los usos más comunes es el empleo de aguas residuales para riego agrícola. Sin embargo, el riego con aguas residuales no tratadas o sometidas a un proceso de depuración ineficiente ha provocado la aparición de brotes epidémicos importantes a lo largo del último siglo.

La reutilización de aguas residuales exige, por tanto, la adopción de medidas de protección de la Salud Pública, ya que en todo proceso de recuperación y reutilización de aguas residuales existe riesgo por exposición a agentes infecciosos.

El tratamiento de las aguas residuales para su reutilización tiene como enfoque principal la reducción de dichos agentes, como bacterias, virus, protozoos o helmintos, además de la eliminación de malos olores u otras sustancias que pudiesen tener un efecto negativo durante su reutilización. (Calduch-Broseta et al., 2003).

EL AGUA POTABLE

El acceso al agua está reconocido por la ONU (Organización de las Naciones Unidas) como un derecho económico, social y cultural; y conseguir la mejor calidad del agua para poder suministrarla a la población ya que se convierte en una de las principales demandas de las sociedades avanzadas. Pero por desgracia no todos los habitantes del mundo pueden acceder al agua potable con tanta facilidad. La calidad del agua potable es una cuestión que preocupa en países de todo el mundo, por su repercusión en la salud de la población.

El agua de bebida salubre (agua potable), según la OMS, no ocasiona ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda una vida, teniendo en cuenta las diferentes sensibilidades que pueden presentar las personas en las distintas etapas de su vida. El término se aplica al agua que ha sido tratada para consumo humano según unos estándares de calidad determinados por las autoridades locales e internacionales (OMS, 2014).

El agua potable es un producto que se “fabrica” a partir de agua natural o cruda captada en ríos, lagunas, pozos o manantiales. Estas aguas pueden contener cantidades apreciables de polvo, polen, microorganismos, esporas y productos químicos tóxicos. Debido a esto, es de suma importancia realizar un tratamiento de potabilización al agua (descrito en el Anejo E.1) antes del consumo humano, para evitar que sea un riesgo para la salud.

Por todo ello y teniendo en cuenta que el agua es una vía de transmisión de enfermedades infecciosas, está adecuado con el control de la eficacia del tratamiento depurador de las aguas residuales y el proceso de potabilización, así como el control de la calidad del agua a lo largo de las redes de distribución que suministran el agua para consumo, con el fin de evitar brotes infecciosos a la población y la aparición de focos de contaminación ambiental.

TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori*

El método de aislamiento por cultivo, es la técnica de elección para detectar cualquier microorganismo patógeno, si no que no solo permite asegurar su presencia, sino que en la cultivabilidad se considera prueba eficiente de su capacidad. Por otra parte, y de acuerdo a los postulados de Koch, la infectividad de una muestra contaminada por un microorganismo, solo se considera probada si éste es capaz de crecer en un medio de cultivo apropiado.

Sin embargo, en la elección de un medio apropiado, los requerimientos gaseosos, el tiempo necesario para su crecimiento y la pérdida de cultivabilidad debido a las condiciones de estrés, son los principales problemas derivados de la utilización del método por cultivo para la detección de diversos microorganismos. Para evitar estas limitaciones se han desarrollado metodologías alternativas de diagnóstico rápido y seguro, basadas en el análisis de los ácidos nucleicos.

Entre estos, destacan dos técnicas moleculares, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por su extrema sensibilidad y versatilidad, y la técnica de Hibridación in situ con Sondas Fluorescentes (FISH), puesto que permite examinar las secuencias de ácidos nucleicos dentro de las células, sin alterar su morfología o la integridad de sus compartimentos (J.Engberg *et al.*, 2000).

DETECCIÓN Y AISLAMIENTO POR CULTIVO

El método tradicional por excelencia para la detección e identificación de microorganismos es la observación de su crecimiento en sustancias nutritivas preparadas en el laboratorio. La capacidad de recuperación de bacterias a partir de una muestra viene determinada principalmente por la técnica empleada, la naturaleza de la muestra, el número de microorganismos presentes en ella y el estado fisiológico de las células presentes.

Los medios de cultivo se basan su utilidad en la combinación de antibióticos para inhibir el crecimiento de la microbiota acompañante, y la adición de nutrientes para estimular el crecimiento del microorganismo a detectar. El aislamiento se consigue con la técnica de siembra por triple estría en medios de cultivos sólidos. Una vez sé que obtienen colonias del patógeno, se siembran en un medio de mantenimiento para conseguir un cultivo masivo. Posteriormente se realizan los ensayos para su identificación.

Jiang y Doyle (2002) realizaron estudios para evaluar la supervivencia y crecimiento de *H. pylori* en medios de enriquecimiento, probando distintos suplementos como mucina, sulfato férrico o piruvato sódico, lo que aumenta el nivel de microorganismos detectados. Degnan. (2003) desarrollaro un nuevo medio con una nueva mezcla de suplementos de crecimiento al que añadieron *anfotericina B*, *polimixina B* y un indicador rojo fenol para detectar la producción de ureasa. Fernández. (2006). realizo estudios para ver la selectividad de dicho medio selectivo en muestras de agua de mar y moluscos, y concluyeron que era apropiado para el aislamiento de *H. pylori* en muestras de agua de mar.

A pesar de todas estas modificaciones, todavía no existe ningún medio óptimo para el aislamiento de *Helicobacter pylori* en muestras ambientales, ya que la microbiota acompañante enmascara la bacteria.

Para el aislamiento a partir de muestras altamente contaminadas, como es el caso de las muestras ambientales o de alimentos, es necesaria una primera fase de enriquecimiento, que consiste en incubar la muestra en un medio líquido selectivo, para eliminar parte de la microbiota acompañante, durante un periodo de 24-48 horas en las condiciones ambientales adecuadas, según el tipo de microorganismo. En el caso de *Helicobacter pylori*, se incuba en condiciones de microaerofilia (10 % de dióxido de carbono, 5 % de oxígeno y 85% de nitrógeno) a una temperatura de 37 °C durante 24-48 horas.

Los medios de cultivo basan su utilidad en la combinación de antibióticos para inhibir el crecimiento de la microbiota acompañante, y la adición de nutrientes para estimular el crecimiento del microorganismo a detectar. El aislamiento se consigue con la técnica de siembra por triple estría en medios de cultivos sólidos. Una vez se obtienen colonias del patógeno, se siembran en un medio de mantenimiento para conseguir un cultivo masivo. Posteriormente se realizan los ensayos para su identificación. Se han empleado una gran variedad de medios de cultivo, selectivos o no selectivos, para el aislamiento de helicobacter gástricos. Uno de los medios más usados para el primer aislamiento en muestras de biopsia fue el medio de Skirrow, que contiene Agar Brucella Sangre suplementado con trimetoprim, vancomicina, polimixina B y anfotericina B.

Para favorecer la eliminación de esta microbiota se han desarrollado técnicas alternativas, utilizadas previamente al cultivo en medio sólido. Dos de las técnicas de eliminación de microbiota acompañante más usadas en el aislamiento de *H. pylori* son la separación inmunomagnética (IMS) y el tratamiento ácido (Eaton *et al.*, 1991).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las bases para el método de amplificación in vitro de ácidos nucleicos que fueron establecidas en 1981 por Kleppe, quien describió una síntesis extensiva de ADN catalizada por ADN polimerasas. Pero fue K. Mullis, científico de la compañía Cetus, quien en 1983 desarrolló un proceso de amplificación in vitro de ácidos nucleicos, apoyándose en la teoría de la síntesis automatizada de oligonucleótidos, patentándola en 1987 (Mullis, 1990.).

La PCR es un método enzimático que permite copiar de forma exponencial una zona concreta de un genoma, pudiéndose obtener millones de copias de ella. Este proceso se lleva a cabo cíclicamente. En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello, se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97 °C). La re-naturalización se producirá cuando la temperatura disminuya. En el segundo paso (hibridación) los iniciadores se unen a las zonas una 3° complementaria que flanquean el fragmento que se desea amplificar. En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla, produciéndose un fragmento de doble cadena por complementariedad, en la dirección 5'→ 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio, siguiendo la cadena molde.

Una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original: al final del segundo ciclo se tienen 4, al final del tercero 8, y así sucesivamente. Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica. Los productos de la PCR, llamados amplicones, se detectan normalmente por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan en forma de bandas bajo luz ultravioleta.

Entre las ventajas de esta técnica destacan su sencillez, rapidez y sensibilidad. Además, se requiere muy poco material biológico de partida, mientras que la mayoría de análisis químicos precisan de grandes cantidades.

Debido a la sencillez de la técnica, su uso en los laboratorios clínicos ha supuesto una revolución en el concepto de la detección microbiológica. Problemas tales como la dificultad de detección de determinados virus y la imposibilidad de aislamiento de algunos microorganismos por su dificultad o incapacidad para desarrollarse in vivo, pueden obviarse mediante la PCR, lo que ha hecho que esta técnica suponga una alternativa a veces obligada para su uso en microbiología. Además, la versatilidad de esta técnica ha permitido su aplicación a otros campos de interés económico como es el caso de la medicina forense, identificación genética o control de calidad de las industrias (Kabir, 2004).

Un aspecto importante para el éxito de la PCR es el diseño de los iniciadores. Son moléculas de ADN monocatenario de entre 15 y 30 nucleótidos que la polimerasa emplea para comenzar a polimerizar, de forma que el punto de inicio de la síntesis de nuevas moléculas de ADN lo establece la posición del iniciador. Es condición indispensable que los iniciadores sean específicos del ADN que se vaya a amplificar. En la mayoría de los casos, conocer la secuencia completa del microorganismo de interés es muy complicado y por lo tanto es habitual recurrir a la información recopilada por otros investigadores y almacenada en bases de datos. La recopilación de varias secuencias de 16S y del 23S en los bancos de datos es una excelente ayuda a los investigadores en el desarrollo de nuevos iniciadores para la detección mediante PCR (Bou *et al.*, 2011).

PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (Q-PCR)

Durante la PCR para la cuantificación del ADN presente en la muestra. Hoy en día existen metodologías que permiten esta cuantificación en cada ciclo de amplificación: en la PCR a Tiempo Real o PCR Cuantitativa (q-PCR) la amplificación y el análisis ocurren al mismo tiempo. Es una herramienta poderosa, simple y rápida, y está destinada a sustituir a muchas técnicas tradicionales en los laboratorios de microbiología.

La fluorescencia es el indicador elegido para la PCR cuantitativa. Esta técnica detecta la señal de fluorescencia emitida tras la excitación del o los fluoróforos utilizados, ciclo por ciclo, durante el proceso de amplificación, siendo esta señal proporcional al número de copias generadas en cada ciclo (Figura 4). Estableciendo el nivel umbral sobre la señal de fluorescencia basal, es posible determinar el ciclo en el que se inicia la fase exponencial de la amplificación del ADN (ciclo umbral, C_T), el cual está relacionado directamente con la cantidad de ADN inicial y es el parámetro utilizado en la cuantificación (Higuchi, 1993; Heid, 1996; Nazarenko, 1997).

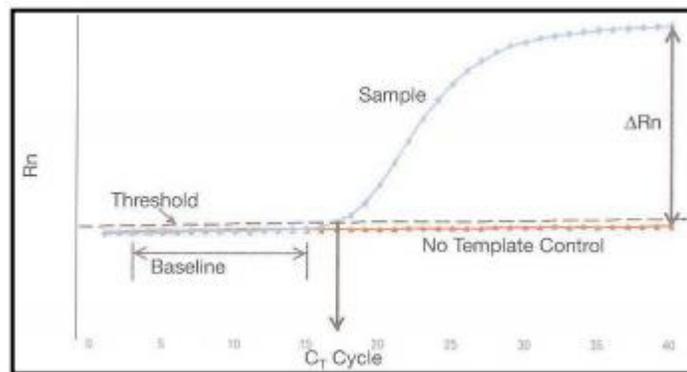


Figura 3. Representación gráfica del aumento de la fluorescencia (ΔRn) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de C_T .

Esta técnica puede emplearse para dos tipos de detección: En la detección cualitativa, los ciclos de temperatura se emplean para amplificar las moléculas diana, de forma que puedan ser fácilmente detectadas. La fluorescencia de las sondas unidas al ADN se monitoriza en cada ciclo de PCR. Las reacciones son reconocidas como positivas por algoritmos que analizan los cambios de fluorescencia en cada ciclo. En la detección cuantitativa, la construcción de una curva estándar o recta patrón a partir de concentraciones conocidas de ADN diana permite la cuantificación de la muestra problema, mediante la interpolación de los valores obtenidos.

DETECCIÓN DE CÉLULAS VIABLES POR MÉTODOS MOLECULARES

Las primeras definiciones de viabilidad de una población celular se referían a la proporción de células capaces de multiplicarse tras la incubación en condiciones microbiológicas estándar. Se consideraría que una bacteria está muerta cuando no muestra crecimiento visible en un medio bacteriológico en un tiempo determinado. El método clásico para determinar la viabilidad es, por tanto, el recuento en placa (Villarino *et al.*, 2000.).

Esta definición de viabilidad celular cuenta con muchas limitaciones, puesto que no todas las especies bacterianas de muestras ambientales pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio. Además, en el estado Viable pero No Cultivable (VNC) las células habrían perdido su capacidad de formar colonias bajo condiciones de análisis, por lo que no serían detectadas. Por ello, ha sido necesario desarrollar varios métodos alternativos para determinar la viabilidad celular. Algunos métodos se basan en la demostración de actividad metabólica, como la reducción de sales de tetrazolio como indicador de un transporte activo de electrones (Rodríguez, 2011).

DETECCIÓN DE ADN DE CÉLULAS VIABLES MEDIANTE PCR

Las técnicas PCR y q-PCR tienen una alta sensibilidad de detección de microorganismos pero poseen la desventaja de no poder diferenciar entre células viables y no viables. Para solucionar la detección por PCR o q-PCR de células viables se han desarrollado diferentes tipos de métodos, como el uso de un agente intercalante del ADN, el fluoróforo Propidio Monoazida (PMA) (Nayak y Rose, 2007b).

La membrana celular es impermeable al agente intercalante PMA, por lo que éste se unirá selectivamente con el ADN de las células cuyas membranas están dañadas, y por tanto no sean viables (**Figura 4**). El PMA es capaz de ser ligado foto químicamente al ADN por un enlace covalente de nitrógeno-carbono estable.

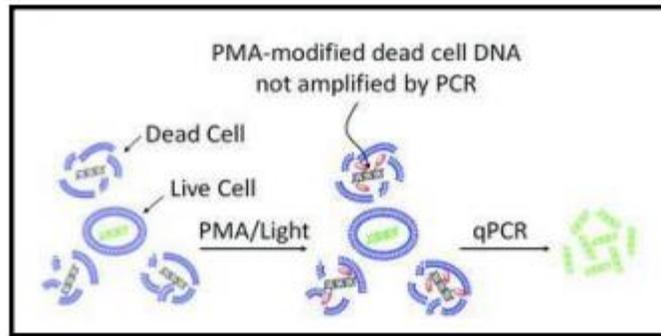


Figura 4: Mecanismo de acción del Propidio Monoazida

Ésta modificación del ADN inhibe la acción de la polimerasa, por lo que el ADN de las células comprometidas, no viables, no es amplificado en la q-PCR o PCR. Por lo tanto, mediante el uso de las técnicas PCR o q-PCR después del tratamiento con PMA, la detección, identificación y cuantificación, teóricamente, se limita a las células con membranas celulares intactas, consideradas células viables.

Existe controversia en la definición de células viables, puesto que algunos autores establecen dicha definición a células que presentan únicamente integridad de membrana, mientras que otros autores establecen que además las células debe presentar actividad metabólica. Nocker y Camper, en el 2009, advirtieron que la técnica de q-PCR combinada con PMA es una técnica rápida para detectar integridad de la membrana celular pero que se debería combinar con otras técnicas de viabilidad para determinar la actividad metabólica de la célula y así descartar la posible detección de células que mantienen su integridad de membrana pero no su actividad metabólica (Nocker *et al.*, 2009.).

RESISTENCIA DE *H. pylori* A LA CLARITROMICINA

La claritromicina y el metranidazol son los antibióticos más frecuentemente usados en la terapia de erradicación de *H. pylori*. Sin embargo, la resistencia a la claritromicina ha aumentado en los últimos años, lo que ha provocado una disminución en la velocidad de su erradicación (Vallejo *et al.*, 2007).

El mecanismo de acción de la claritromicina consiste en inhibir la síntesis de proteínas al unirse directamente al ARN ribosoma 23S. Análisis genéticos realizados demuestran la aparición de diversas mutaciones puntuales en el dominio V de este gen, específicamente, en la región que afecta la actividad péptida transferida. Dichas mutaciones generan una disminución de la capacidad de unión del antibiótico al ribosoma, de modo que la síntesis de proteínas no se ve inhibida. La detección de estas mutaciones se utiliza en microbiología clínica para la detección de las formas resistentes de *H. pylori* mediante técnicas moleculares (Trebesius *et al.*, 2000).

DISCUSIÓN

Esta investigación se ha centrado en la detección e identificación de células viables de *Helicobacter pylori* en agua. Concretamente, se ha buscado su presencia en 2 tipos de matrices acuáticas: agua residual y agua potable. Estos estudios tienen como finalidad esclarecer la posible transmisión de *H. pylori* mediante el agua y su potencial de infección en el ser humano. El estudio de la presencia en agua residual queda justificado ya que el tipo de transmisión del patógeno es fecal-oral. En el caso de agua potable, es de suma importancia la determinación de la presencia de *H. pylori* en las misma ya que esta podría ser fuente de contaminación directa por ingestión continuada. Del mismo modo, el estudio de la supervivencia de *H. pylori* a los diferentes tratamientos de depuración realizados en las EDARs, permite evaluar la eficacia de los mismos en la eliminación del patógeno, de máxima importancia cuando el efluente es reutilizado en el riego de cultivos.

Se ha sugerido que *Helicobacter pylori* es capaz de sobrevivir en biopelículas cuando crece bajo altas condiciones de C: N (Percival, 2004), esta asociación de *H. pylori* con comunidades de biopelículas dentro de un sistema de distribución de aguas podría ofrecer a la bacteria protección frente a la desinfección y a la predación por protozoos (Watson, 2004). Se ha demostrado que *H. pylori* presenta mayor resistencia a la cloración que otros indicadores de contaminación fecal. Por tanto, aguas consideradas potables a nivel legislativo podrían contar con la presencia del patógeno. De hecho, es concebible que *H. pylori* sea capaz de persistir durante largos periodos de tiempo en sistemas de distribución de agua que contengan bajos niveles de cloro residual (Moreno, 2007). Estudios previos indican que esta bacteria pierde su cultivabilidad en contacto con cloro durante periodos de tiempo cortos (1-5 min), aunque permanece en estado VNC (viable no cultivable).

La capacidad de algunos microorganismos, como *H. pylori*, de pasar a una fase viable no cultivable, ha hecho necesario el desarrollo de técnicas para su detección en muestras ambientales. Mediante éstas técnicas se evitan los

problemas que presentan los métodos tradicionales de recuento, como la elección del medio de cultivo adecuado, la generación de atmósferas controladas y los largos períodos de incubación.

Dada a la dificultad para aislamiento de *Helicobacter* en muestras ambientales, diversos autores han intentado mejorar los medios de cultivo y permitir un mejor aislamiento de la bacteria, sobre todo en muestras muy contaminadas, como es el caso de aguas o alimentos (Dent, 1987; Eaton, 1991; Jiang y Doyle, 2002; Degnan, 2003; Fernandez, 2006). A pesar de todas las modificaciones realizadas durante los últimos años en los medios de cultivo, en la actualidad no existe ningún medio óptimo para el aislamiento de *Helicobacter* en muestras ambientales, ya que la microbiota acompañante enmascara, en el caso de la presencia de *H. pylori*, su crecimiento. En este trabajo se evaluaron dos metodologías de siembra diferentes y dos medios de cultivo con distinta base.

Una de las limitaciones para aislar este patógeno debido a la baja concentración en la que se puede encontrar, es conseguir la máxima eficiencia en la recuperación de la bacteria desde las membranas de filtración en el procesado de muestra bruta. Para ello se realizó la evaluación de diferentes metodologías

Algunos estudios epidemiológicos los datos sugieren que el agua es una posible ruta de transmisión. En el medio ambiente, *H. pylori* se transforman en forma coccóide, que con frecuencia resulta en la falta de identificación de estas bacterias en las muestras ambientales por medio de técnicas de cultivo. Para superar las limitaciones con enfoques moleculares basados en el ADN la amplificación por PCR se desarrollaron y se utiliza para detectar *H. pylori* en muestras clínicas y ambientales.

Uno de los grandes inconvenientes que presenta la PCR es su susceptibilidad frente a inhibidores presentes en este tipo de muestras, lo que puede ocasionar la obtención de falsos negativos, por la inhibición de la acción de la Taq-polimerasa. Las aguas pueden contener sustancias inhibitorias de la PCR como ácidos fémicos, ácidos húmicos, poli fenoles, metales pesados entre otros, que provocan la inhibición de la reacción enzimática y con ello la pérdida de

sensibilidad de la técnica. Por ello, es necesario controlar la presencia de estos inhibidores para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos (Schrader, 2012). Sin embargo, *H. pylori* no son aislados del medio ambiente mediante técnicas de cultivo. Las formas cocóides de *H. pylori* contienen poli fosfato como una fuente de energía, que proporciona la energía necesaria para ciertos niveles de metabolismo intercelular para salvar el ADN Y ARN y construir configuraciones tales como pared celulares y membrana durante al menos tres meses. La degradación de la estabilidad de las formas cocóides y la de esta, forma a los bacilos. Por lo tanto, muchas investigaciones se centran en el estado fisiológico identificación y capacidad de infección de las formas cocóides de estas bacterias. Los investigadores demostraron que los pacientes infectados con las formas cocóides de *H. pylori* en el estómago son diagnosticados con cáncer de estómago y Úlceras. También es un hecho probado que la virulencia de degradación de las formas cocóides inoculadas en agua tiene actividad de ureasa y capacidad de adherencia a células epiteliales como hacen las formas en espiral (Chamanrokh *et al.*, 2015).

Debido al crecimiento excesivo de organismos interferentes en medios ricos utilizados para este organismo. Además, *H. pylori* ha demostrado que entra en un estado VNC en agua (Hegarty *et al.*, 1999).

Un avance científico se produjo en 1982, cuando JR Warren y B. Marshall aislaron una bacteria y demostraron que causa gastritis y úlceras estomacales que afectan a millones en todo el mundo. Hoy esta etiología ha sido probada en la medida en que los Institutos Nacionales de Salud dan tratamiento con antibióticos para todos los pacientes con úlceras, que se atribuyen casi exclusivamente a la infección por la bacteria *Helicobacter pylori* (Degnan *et al.*, 2003). *H. pylori* inducida, se caracteriza histológicamente por infiltración crónica de neutrófilos. *Helicobacter pylori* estimula la producción de ROS por los neutrófilos podría ser relativa en el daño gástrico de la mucosa (Shimoyama *et al.*, 2003).

DPCR proporciona un método rápido para la detección de *H. pylori* en el agua que es más simple que las alternativas. Detección de *H. pylori* en las aguas subterráneas se disparó con *H. pylori* indica que DPCR sería un método valioso para probar las fuentes de agua para la contaminación por esta bacteria. Su utilidad es demostrada por la detección de *H. pylori* en muestras de agua potable.

El uso de PCR cuantitativa ha sido reportado por Horiuchi, que utilizaron el ARNr 16S como blanco, y McDaniels et al., Que utilizaron una región conservada de la gen *de urea*, que es específico para *H. pylori* y codifica la Ureasa Una subunidad de la proteína ureasa. Una sensibilidad de detección De 100 células / ml en el estudio anterior, mientras que 10 células por litro de agua fue demostrado por este último. Porque el número de células en el agua potable puede ser pequeña, con *H. pylori* ADN se detecta mediante amplificación por PCR sólo después de grandes volúmenes de agua potable), y Porque la dosis infecciosa del organismo no se conoce, Se hace necesario cuantificar números muy bajos.

El propósito de este estudio era investigar controles internos de amplificación (IC) que con el ensayo desarrollado por McDaniels por varios laboratorios para estudios de validación de métodos de los estudios de ocurrencia (Keya et al., 2007).

La importancia de la detección de *H. pylori* en el agua potable agua en este trabajo o en un estudio anterior se desconoce ya que se probaron pocas muestras. es posible que *H. pylori* está presente en muchas fuentes de agua potable y el agua podría ser una fuente de infección (J.A. Benson et al., 2004). Sólo los sistemas de agua superficial o de tierra-Sistemas de agua bajo la influencia directa del agua superficial para desinfectar sus aguas. Sin embargo, MDEQ (Michigan Departamento) Calidad ambiental sugirió en 2005 la desinfección como posible mecanismo para el tratamiento de los microorganismos agua bajo la actual regla de aguas subterráneas. Esta regla requiere que los sistemas de agua subterránea que están en riesgo; Para tomar medidas correctivas para reducir la Casos de enfermedades y muertes debidas a la exposición a micro- Patógenos biliares (Nayak y Rose, 2007a).

CONCLUSIÓN

En la vida real aprendemos sobre los factores de virulencia que han hecho *Helicobacter pylori* como un patógeno exitoso. Conocimiento adecuado de los embalses y modos de transmisión de *H. pylori* podría ayudar a explicar la Alta prevalencia de las bacterias. La incidencia de *H. pylori* es Países en desarrollo (90%), mientras que en los países en desarrollo países industrializados, la cifra es inferior (50%) y tiende a disminuir.

Los datos del presente estudio demostró que *H. pylori* puede ser detectado en el agua de cualquier charco de agua y podría estar asociada con la presencia de colonización del organismo.

El aislamiento de *H. pylori* a partir de las fuentes de agua por método de cultivo y consecuente identificación por PCR representa una clara señal presencia de este patógeno peligroso pero ilusorio en nuestra Consumible. Ciertamente, afectará nuestra búsqueda de una mejor comprensión epidemiológica y medidas de controlar. El método de cultivo no es adecuado para el aislamiento e identificación de *H. pylori* en aguas residuales, depuradas y potables, por su falta de especificidad. La técnica de “siembra sobre membrana” permite eliminar la microbiota acompañante y mejorar la detección del patógeno.

Los resultados de este estudio sugieren que la transmisión de persona a persona es la ruta plausible de la infección *por H. pylori* en esta población, pero al agua Merece una investigación más profunda de progresión de las lesiones gástricas precancerosas (Linda *et al.*, 2002).

Estos hallazgos son los estudios previos de los autores, pero se requiere una investigación más avanzada para determinar si *H. pylori* es de alta prevalencia en detección de los sistemas acuáticos.(Ramin *et al.*, 2017).

ANEXOS

ANEXO A: ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDAR)

Según la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales (EPSAR), es necesario tratar y depurar las aguas para evitar enfermedades y ayudar a la naturaleza en su proceso de depuración, que no es más que un conjunto de sistemas que nos permiten acelerar los procesos naturales para que podamos devolver al medio el agua en las debidas condiciones. Este proceso de depuración se divide en cuatro fases: pre-tratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario. A continuación se destacan sus principales características.

ANEXO A.1. FASES DEL PROCESO DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

Pre-tratamiento: Consiste en una sucesión de etapas físicas y mecánicas destinadas a separar las materias voluminosas en suspensión que de entrar en el proceso, podrían comprometer gravemente el buen funcionamiento de las instalaciones. Además consta de instalaciones para contener las avalanchas de excesos de caudal de agua que se producen en las poblaciones que no cuentan con red separada de aguas pluviales.

Tratamiento primario. Durante este proceso se lleva a cabo la sedimentación de los materiales suspendidos, mediante la utilización de tratamientos físicos o físico-químicos (decantación primaria), que no se han conseguido retirar durante el pre-tratamiento. En ocasiones dejando simplemente las aguas residuales un tiempo en grandes tanques o, en el caso de los tratamientos primarios mejorados, añadiendo al agua contenida en estos grandes tanques, sustancias químicas que permitan la unión de pequeñas partículas, formando unas mayores y que, de esta forma, puedan sedimentar con mayor facilidad.

Tratamiento secundario: El efluente proveniente del tratamiento anterior es sometido a un tratamiento secundario, también llamado tratamiento biológico. En

este proceso se eliminan las partículas coloidales y disueltas; así como la retención de sólidos en suspensión. El proceso secundario más habitual es de carácter biológico y se lleva a cabo mediante la oxidación de la materia orgánica por vía aerobia a través del uso de lodos activos. Consta básicamente de dos unidades: el reactor y el decantador. Los reactores están diseñados especialmente para mantener los microorganismos bajo condiciones controladas, acelerando el proceso natural de descomposición y neutralización de los residuos. En los decantadores se produce la separación de los lodos mediante sedimentación, que pasarán a la línea de tratamiento de fangos.

Tratamiento terciario: Constituye un complemento a la depuración del agua residual para eliminar compuestos no biodegradables o microorganismos patógenos que hayan sobrevivido a los anteriores procesos. Los componentes de este tratamiento son todos de carácter opcional y van en función del tipo de contaminante que se desee eliminar para los cuales tenemos: filtración, coagulación, nitrificación-desnitrificación, absorción por carbón, intercambio iónico, irradiación con luz ultravioleta, ósmosis inversa y desinfección por cloración u ozonización.

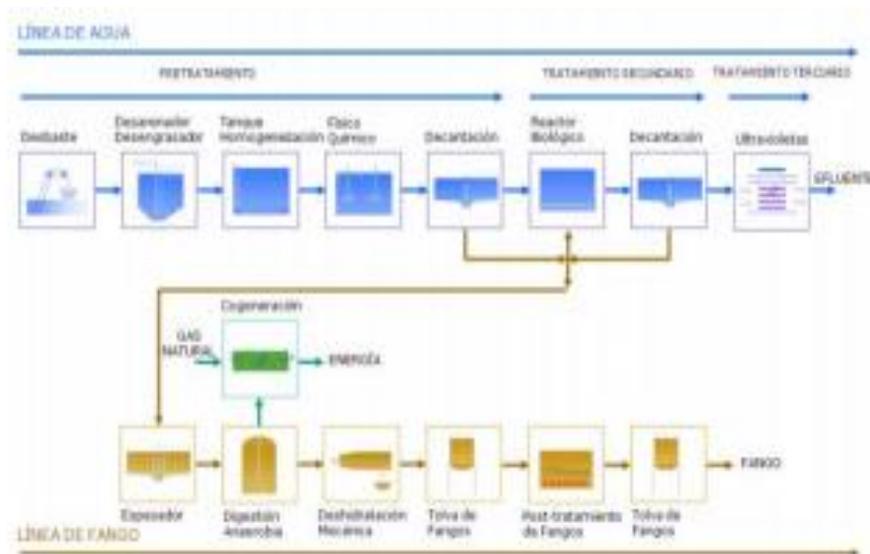


Figura 5. Diagrama de bloques del proceso de depuración de agua residual.

ANEXO B. ESTACIONES DE TRATAMIENTO DE AGUA POTABLE (ETAP)

Se denomina potabilización al proceso por el cual se convierte un agua en mayor o menor medida contaminada, en un agua apta para el consumo humano. El agua potable debe pues estar ausente de microorganismos patógenos y sustancias tóxicas.

Las potabilizadoras o Estaciones de tratamiento de agua potable (ETAP), son las instalaciones donde se trata el agua para hacerla potable. El proceso de potabilización de agua cruda, consiste en la eliminación de turbidez y de impurezas de distinto tipo, para obtener agua potable, apta para el consumo humano. Este proceso tiene distintas fases, desde la misma toma de captación de agua cruda hasta antes de la salida del agua potable de la ETAP, mediante el sistema de bombeo, a la red de distribución.

Los diferentes tipos de estaciones de tratamiento de agua potable (ETAP) para potabilizar el agua pueden clasificarse en:

ETAP de tecnología convencional: incluye los procesos de decantación, filtración, coagulación y floculación.

ETAP de filtración directa: incluye los procesos de coagulación-decantación y filtración rápida.

ETAP de filtración en múltiples etapas: incluye los procesos de filtración gruesa dinámica, filtración gruesa ascendente y filtración lenta en arena.

ANEXO B.1. FASES DEL PROCESO DE POTABILIZACIÓN DE AGUA

Fases del proceso de potabilización del agua en la ETAP: Procesos Físico-Químicos de purificación del agua.

Coagulación: Proceso en que se emplean coagulantes que se utilizan para desestabilizar la carga exterior de las partículas coloidales, evitando la repulsión entre ellas, y favoreciendo las reacciones entre ellas, formándose coágulos de

mayor densidad, lo que acelera su precipitación. Esta fase está influida por la calidad del agua bruta, agitación de la mezcla, dosis y tipo de coagulantes empleados (sales de hierro y aluminio).

Floculación: Proceso en que se emplean floculantes para la eliminación de sustancias que se encuentran presentes en las aguas en forma coloidal, por si solas no sedimentan de forma rápida, puesto que se agrupan formando flóculos. La adición de reactivos floculantes, hacen que los flóculos formados sean más voluminosos y pesados, aumentando la velocidad de sedimentación de éstos y favoreciendo su precipitación.

Decantación: Proceso por el que se produce la eliminación de sólidos presentes en el agua, por la acción de la gravedad.

Filtración: Proceso de finalización de la clarificación del agua. El agua se hace pasar a través de un lecho filtrante, de arena, grava de distinta granulometría o carbón activado. Mediante la filtración se retiene la materia que aún queda en suspensión en el agua, después de los procesos de decantación. Además en el lecho se adsorben partículas que podrían producir olores y sabores en el agua. Par evitar atascamientos, la retención de partículas debe producirse en la superficie del lecho.

Cloración o Desinfección: El objetivo de la desinfección, es la eliminación de los organismos patógenos que pueda llevar el agua, garantizando así sanitariamente su consumo. Así se establece en la reglamentación técnica sanitaria, en el apartado de suministro y distribución de las aguas potables, donde se articula que las aguas potables de consumo público, deberán contener a lo largo de toda la red de distribución, y en todo momento, cloro residual libre o combinado, u otros agentes desinfectantes, en las concentraciones que determine la Administración (Valores de concentración de cloro libre residual entre 0,2 y 0,6 ppm en la red de distribución).

La elección de los agentes desinfectantes depende de diversos factores como el tiempo de contacto, calidad del agua, instalaciones y recursos disponibles. El desinfectante más generalizado para potabilizar el agua, es el cloro y sus derivados (dióxido de cloro, hipocloritos). También se utiliza como desinfectando el ozono, aunque se producción y aplicación requiere una tecnología más costosa de instalar, explotar y mantener que la de dosificación de cloro, por ello su aplicación como agente desinfectante es menor en las estaciones de potabilización de agua.

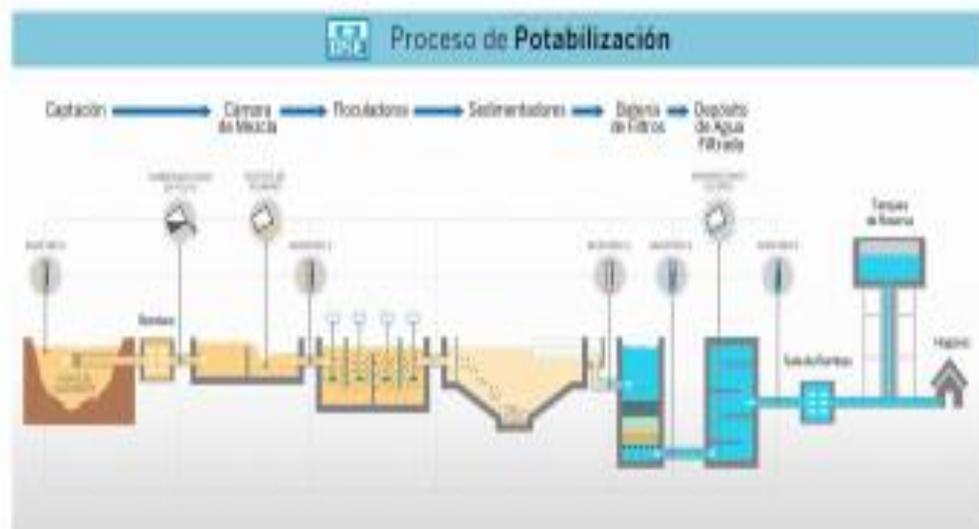


Figura 6. Diagrama de bloques del proceso de potabilización de agua

ABREVIATURAS

- * ADN: **Ácido Desoxirribonucleico.**
- * (CWI) **Un índice de agua limpia**
- * CagA: **Antígeno asociado a citotoxina**
- * C: N: **Relación Carbono/ Nitrógeno**
- * EDAR: **Estación Depuradora de Aguas Residuales**
- * EDTA: **Ácido entilendiaminotetracético**
- * EPA: **Environmental Protection Agency (Agencia de Protección del Medio Ambiente)**
- * EPSA: **Entidad Pública de Saneamiento de Aguas**
- * EPSAR: **Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales.**
- * FISH: **Hibridación in situ con Sondas Fluorescentes**
- * IARC: **International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer)**
- * LNA: **Locked Nucleic Acid (Ácidos Nucleicos Cerrados)**
- * LAMP: **técnica de amplificación isotérmica**
- * OMS: **Organización Mundial de la Salud**
- * ONU: **Organización de las Naciones Unidas**
- * PCR: **Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**
- * PFA: **Paraformaldehído**
- * PMA: **Propidio Monoazida**
- * q-PCR: **Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real**
- * RNA: **Ácido Ribonucleico**
- * RRNA: **Ácido Ribonucleico ribosómico**
- * VNC: **Viable No Cultivable**
- * Mm: **micrómetro**
- * MALT: **tejido linfoide asociado a mucosas**
- * µg: **Microgramo**

BIBLIOGRAFIA

- A. A. Al-Sulami, T. A. A. Al-Edani y A. A. Al-Abdula 2012. "Culture Method and PCR for the Detection of *Helicobacter pylori* in Drinking Water in Basrah Governorate Iraq." *Gastroenterology Research and Practice*.
- Ahmad, R. B., R. Ebrahim y G. S. Hajieh 2013. "Detection of *Helicobacter pylori* in City Water, Dental Units' Water, and Bottled Mineral Water in Isfahan, Iran." *The Scientific World Journal*: 5.
- AL-SULAMI, A., T. AL-EDANI y A. AL-ABDULA 2012. "Culture method and PCR for the detection of *Helicobacter pylori* in drinking water in Basrah Governorate—Iraq." 27.
- Alba-Posse, R., R. Toledo y M. Viana 2006. "Helicobacter pylori: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento." *Rev Post Vía Cat Med*: 9-12.
- Azevedo, N. F., A. P. Pacheco, C. W. Keevil y M. J. Vieira 2006. "Adhesion of water stressed *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces." *The Society for Applied Microbiology* 718-724.
- Akcam, Y., Ersan S., Alper M., Bicik Z., and Aytug, N. 2000. The transmission of *Helicobacter pylori* via exposure to common sources outweighs the person- to- person contact among spouses in developing countries. *The American Journal of Gastroenterology*. 95: 317-319.
- Blum, A. L. 1997. An historical overview of *Helicobacter*-associated disorders. *The Immunobiology of H. pylori*. New York. XIV-XIX.
- Blaser, M. J. 2005. "An Endangered Species in the Stomach." *Scientific American* 2: 38-45.
- Bou, G., A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáez-Nieto y S. Valdezate 2011. "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*." 29 (8):601-608.
- Bunn, J. E. G., M. G. MacKay, J. E. Thomas, D. C. Reid y L. T. Weaver 2002. "Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life." *Letters in Applied Microbiology* 34.

- Chamanrokh, P., M. H. Shahhosseiny, M. M. Assadi, T. Nejdassattari y D. Esmaili 2015. "Three Tests Used to Identify Non-Culturable Form of *Helicobacter pylori* in Water Samples." Jundishapur J Microbiol.
- Degnan, A. J., W. C. Sonzogni y J. H. Standridge 2003. "Development of a Plating Medium for Selection of *Helicobacter pylori* from Water Samples." American Society for Microbiology 69: 2914-2918.
- Diane, E. T. 1992. "GENETICS OF CAMPYLOBACTER AND HELICOBACTER." MICROBIOLOGY: 35-64.
- Calduch, J. V., Segarra, M. M., Colomina, J., Llorca, C., and Pascual, R. 2003. *Vibrio cholerae* no-01 en paciente inmunodeprimida. Anales de Medicina Interna. 20: 630-632.
- Espigares M. and Pérez J. A. 1985. Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. Capítulo 1. Aguas Residuales, su composición. Universidad de Granada. Servicio de Publicaciones. Granada. EPA, United States Environmental Protection Agency. www.epa.gov, Water Research On-line 2015.
- Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan y S. Krakowka 1991. "Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets." Infection and Immunity.: 2470-2475.
- Emma, L. W. 2016 "Helicobacter pylori's road to colonization." biomedical journal: 139.
- ez, M. A. Y. n., V. M. Barbera', E. Soria y V. Catalán 2008. "Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the *cag* pathogenicity island gene, *cagE*." Journal of Applied Microbiology.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., and Bray, F. 2014. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International Journal of Cancer doi:10.1002/ijc.29210. Published online 9 Oct 2014.
- Fernández, M., Contreras M., Suárez P., Gueneau P., García-Amado M. A. 2007. Use of HP selective medium to detect *Helicobacter pylori* associated with

- other enteric bacteria in seawater and marine molluscs. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 213-218.
- Goodwing, C., and Armstrong A. J. 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) from the human gastric mucosa. *Journal of Medical Microbiology*. 9: 1-13.
- Graham, D. Y., Malaty, H. D., Evans, D. G., Evans, D. J., Klein, P. D., and Adam, E. 1991. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. *Gastroenterology*. 100: 1495-1501.
- Giaño, M. S., N. F. Azevedo, S. A. Wilks, M. J. Vieira y C. W. Keevil² 2008. "Persistence of *Helicobacter pylori* in Heterotrophic Drinking-Water Biofilms." *American Society for Microbiology* 74: 5898-5904.
- Hegarty, J., M. Dowd y K. Baker 1999. "La aparición de *Helicobacter pylori* en el agua superficial en el Estados Unidos." *Journal of Applied Microbiology* 697-701.
- Ingerson, M, M. and A. Reid. 2012. The microbiology of water distribution systems a report on an American Academy of microbiology colloquium. Boulder, Colorado. April 2012.
- J.A. Benson, K. A. Fode-Vaughan y M. L. P. Collins 2004. "Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR." *Letters in Applied Microbiology*: 221-225.
- Jiang, X., and Doyle, M. P. 2002. Optimizing enrichment conditions for detecting *Helicobacter pylori* in foods. *Journal of Food Protection*. 65: 1949-1954.
- J.Engberg, S. L. On, C. S. Harrington y P. Gerner-Smidt 2000. "Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. ." *Journal of Clinical Microbiology*: 286-291.
- JG Kusters, MM Gerrits, JAG Van Strijp, Vandenbroucke-Grauls y CMJE. 1997. "Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death." *Infect Immun*. 9: 3672-3679.

- Kabir, S. 2004. "Detection of *Helicobacter pylori* DNA in faeces and saliva by Polimerase Chain Reaction." 115-123.
- Keya, S., A. S. Nancy y J. L. Dennis 2007. "Development of an Internal Control for Evaluation and Standardization of a Quantitative PCR Assay for Detection of *Helicobacter pylori* in Drinking Water " APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY Vol. 7: 7380-7387
- Khalifa MM, Sharaf RR y A. RK. 2010. "*Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen." Gut Pathog 2: 2-12.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., and Faucher, S. P. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 5 (258).
- Leif, P. A. y R. Lone 2009. "*Helicobacter pylori* coccoid forms and biofilm formation." *Clinical Microbiology*: 112-115.
- Linda, M. B., L. T. Terry, Chang Yun-sheng, Usted Wei-cheng, Liu Wei-dong, Zhang Lian y P. David 2002. "*Helicobacter pylori* en la China rural." *International Journal of Epidemiology* 638-646.
- M Fernández-Delgado, M Contreras , MA García-Amado, F Michelangeli y P. Suárez 2008. "Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*." *Interciencia*.: 412-417.
- Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J. L., Jiménez, A., González, A., and Ferrús, M. A. 2007. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Research*. 41: 3490-3496.
- Marshall, B. J., and Warren, R. J. 1983. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* I: 1273-1275.
- Metcalf and Eddy. 2003. *Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización*. 30 edición: McGraw-Hill Inc., Interamerica de España S.A.
- Maria, S. G., F. A. Nuno, A. W. Sandra, J. V. Maria y W. K. Charles 2011 "Interaction of *legionella pneumophila* and *helicobacter pylori* with bacterial species isolated from drinking water biofilms." Gião et al. *BMC Microbiology*: 11-57.

- Mullis, K. B. 1990. "The unusual origin of the polymerase chain reaction." *Scientific American* 56-65.
- Nayak, A. K. y J. B. Rose 2007a. "Detection of *Helicobacter pylori* in sewage and water using a new quantitative PCR method with SYBR green." *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* 1931-1941.
- Nayak, A. K. y J. B. Rose 2007b. "Detection of *Helicobacter pylori* in sewage and water using a new quantitative PCR method with SYBR_ green." *Journal of Applied Microbiology*: 1364-5072.
- Nocker, A., M. Burr y A. K. Camper 2009. "Syntesis document on molecular techniques for the drinking water industry. ." *Water Research Foundation*. : ISBN 978-1-60573-057-8.
- Owen R.J. 1993. *Helicobacter*-species classification and identification. *British Medical Bulletin*. 54:17-30.
- Pakodi, F., Abdel-Salam, O. M., Debreceni, A., and Mózsik, G. 2000. *Helicobacter pylori*., one bacterium and a broad spectrum of human disease. *Journal of Physiology-Paris*. 94:139–152.
- Percival, S. L., Chalmers, R. M., Embrey, M., Hunter, P. R., Sellwood, J., and Wyn-Jones, P. 2004. *Microbiology of Waterborne Pathogens*. Ed: Elsevier Academic Press. London.
- Ramin, A., B. Shahram, K. Mahsa, H. Banafsheh, P. Hamid, G. Abolfazl, A. Mohsen y A. Amirhooshang 2017. "Detection of *Helicobacter pylori* in DrinkingWater by Loop-Mediated Isothermal Amplification." *Jundishapur J Microbiol*.
- Reza, R., K. Faham, J.-J. Nematollah y R. Ebrahim 2016. "Helicobacter pylori in bottled mineral water: genotyping and antimicrobial resistance properties." *BMC microbiology*: 16-40.
- Rivas-Traverso, F. y H. F. 2000. "Helicobacter pylori: Factores de virulencia, patología y diagnóstico." *Rev Biomed*. 3: 187-205.

- Rodriguez, R. 2011. "Use of fluorescence in situ hybridization technique to visualize microorganisms." *Salud UIS.* : 43 (3):307-316.
- Shimoyama, T., S. Fukuda, Q. Liu, S. Nakaji, Y. Fukuda y K. Sugawara 2003. "Helicobacter pylori water soluble surface proteins prime human neutrophils for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production." 348-351.
- Shin-Yi, D., W. Hung-Jung, C. Hsin-Hung, C. Sheng-De, W. L. Hui-Ching y W. Wen-Ching (2016). "Cholesterol glucosylation by Helicobacter pylori delays internalization and arrests phagosome maturation in macrophages." *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 49: 636-645.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology.* 113: 1014-1026.
- Szewzyk, U., R. Szewzyk, W. Manz y K.-H. Schleifer 2000. "MICROBIOLOGICAL SAFETY OF DRINKING WATER." 81-127.
- Takao, H., O. Toshifumi, W. Mamoru, K. Daisuke, M. Hiroto y E. Yoshinobu 2001. "*Helicobacter pylori* DNA in Drinking Water in Japan." *Microbiol. Immunol* 7: 515-519.
- Trebesius, K., K. Panthel, S. Strobel, K. Vogt, G. Faller, T. Kirchner, M. Kist, J. Heesemann y R. Haas 2000. "Rapid and specific detection of Helicobacter pylori macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation." 46:608-614.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., and de Ley, J. 1991. Revision of Campylobacter, Helicobacter, and Wolinella taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of Arcobacter gen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 41: 88-103.
- Vallejo, C., L. Garrido, D. Cáceres, A. M. Madrid, C. Defilip, C. Defilippi y H. Toledo 2007. "Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina

- y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la Región Metropolitana." *Revista Médica Chile*: 135:287-293.
- Van Duynhoven YT y d. J. R. 2001 "Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food?" *Bull World Health Organ*. 5: 455-460.
- Villarino, A., O. M. M. Bouvet, B. Regnault, S. Martin-Delautre y A. D. Grimont 2000. "Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat-or UV-killed cells." 151: 755-760.
- Watson, C. L., Owen, R. J., Lai, S., Lee, J. V., Surman-Lee, S., and Nichols, G. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 690-698.
- ZHANNA, T. Z. N., M. M. HODA, Y. G. DAVID, R. ALMUCHAMBETOVA, A. MACHMUDOVA, D. KAPSULTANOVA, L. S. O. MICHAEL, F. BLAINE HOLLINGER y Z. ABAI 2002. "*HELICOBACTER PYLORI* INFECTION IN KAZAKHSTAN: EFFECT OF WATER SOURCE AND HOUSEHOLD HYGIENE
- " *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*: 201-206.
- Zohra, A., T. Sana, F. Daoud, I. Rachdi, B. Lilia, B. D. Besma y B. Fatma 2016. "Cutaneous vasculitis associated with *Helicobacter pylori*." *ScienceDirect Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery* 20: 132-134.