

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* EN AGUA Y ALIMENTOS

Por

M. C. ARTURO ESPINOZA MATA

**Como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología**

San Nicolás de los Garza, N. L.

Abril de 2012

APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMITÉ DE TESIS

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* EN AGUA Y ALIMENTOS

Comité de Tesis:

Dra. Marivel Gómez Treviño
Director de Tesis

Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos
Secretario

Dra. Irma Olivia Martínez Vázquez
Vocal

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal

APROBACIÓN DE TESIS POR COMITÉ ACADÉMICO

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* EN AGUA Y ALIMENTOS

Comité Académico de Doctorado

Dra. Diana Reséndez Pérez
Subdirector de Estudios de Postgrado

LUGAR DE TRABAJO

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* EN AGUA Y ALIMENTOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Médica y Sanitaria de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Marivel Gómez Treviño, la coordinación de la Dra. Irma Olivia Martínez Vázquez y la asesoría de Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos, Dra. Licet Villarreal Treviño y Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León a través del proyecto de investigación: CN1128 -05.

DEDICATORIA

A **Dios** nuestro señor por permitirme cerrar un ciclo mas.

A mi **Padre** (†) y a mi **Madre** por darme el ser y hacer de mi la persona que soy,
gracias **Madre** por tu fortaleza.

A **Pilar** por su entereza, apoyo incondicional y por ser la gran mujer que dicen que camina al lado, no detrás, de un humilde servidor. Gracias por dar la vida a esas dos razones por las cuales luchamos día a día.

A mis hijos, **Arturo** y **Alejandro**, que son la razón de mi existencia y porque saben que los amo.

A mis hermanos **Rutilio, María Elena, Angélica, Martha, Carlos** y **Mireya** porque juntos sigamos alcanzando triunfos.

In Memoriam

Para mi hermano Rodolfo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad Ciencias Biológicas. Por permitirme formar parte de los estudiantes de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Microbiología.

Al programa PAICyT de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo financiero al proyecto de investigación: CN1128 -05.

Para el Dr. Juan Manuel Alcocer González, por su confianza para incluirme en su equipo de trabajo y por estimularme a cerrar este ciclo.

A la Dra. Diana Reséndez Pérez por el consejo emitido que me ayudó a quitar las telarañas que impedían culminar este proceso.

Al Dr. José Ignacio González Rojas por el apoyo brindado durante mucho tiempo en las subdirecciones que ha dirigido.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por el apoyo brindado durante todos tantos años, y sus palabras de aliento para culminar este proceso.

A la entrañable amiga y directora de este trabajo, Dra. Marivel Gómez Treviño, por su apoyo incondicional, sus revisiones y consejos emitidos al mismo, así como por la presión ejercida sin la cual no hubiera sido posible subir este peldaño.

Por sus grandes aportaciones en la revisión de este trabajo de investigación, sus consejos profesionales y personales, agradezco a la Dra. Licet Villarreal Treviño.

A la Dra. Lilia H. Morales Ramos, agradezco su participación en esta investigación, sus aportaciones, revisión del contenido, consejos y ayuda incondicional en esta y otras actividades académicas.

A la Dra. Irma Olivia Martínez Vázquez por su enseñanza y ayuda codo a codo en todo lo referente al trabajo molecular, por su paciencia y tolerancia.

A la Dra. Lydia Rivera, por el apoyo brindado y el tiempo invertido en la revisión y sugerencias emitidas para culminar este trabajo.

A mi gran amiga M.C. Graciela González Cantú por los ánimos brindados para culminar este proyecto.

A la M.C. Esperanza González Castañeda por levantar mi autoestima como docente y soportar los olores de la ciencia cuando analizaba alimentos marinos.

Al M.C. Francisco J. Sánchez Velázquez por su apoyo y colaboración para la culminación de este trabajo de investigación.

A la Dra. Elva Teresa Aréchiga y al M.C. Juan Manuel Adame por la presión ejercida para finalizar este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
PÁGINA DE TITULO	i
APROBACION DE TESIS DOCTORAL POR COMITE DE TESIS	ii
APROBACION DE TESIS POR COMITÉ ACADEMICO.....	iii
LUGAR DE TRABAJO.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vii
TABLA DE CONTENIDO.....	x
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABLAS.....	xv
NOMENCLATURA	xvi
1. RESUMEN Y ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Importancia.....	8
2.2 Originalidad y justificación.....	8
3. HIPÓTESIS.....	10
4. OBJETIVOS	11

Sección	Página
4.1 Objetivo general	11
4.2 Objetivos particulares	11
5. ANTECEDENTES	12
5.1 Aspectos históricos y descubrimiento de <i>H. pylori</i>	12
5.2 Características bioquímicas.....	13
5.3 Mecanismos de patogenicidad y virulencia	14
5.3.1 Componentes de patogenicidad	14
5.3.2 Componentes de virulencia	15
5.4 Prevalencia mundial de la infección.....	17
5.5 Prevalencia y distribución geográfica de <i>H. pylori</i> y su relación con la mortalidad por cáncer gástrico.....	20
5.6 <i>H. pylori</i> en agua y su asociación con la infección en el hombre	24
5.7 Correlación entre la prevalencia de <i>H. pylori</i> y la ingesta de vegetales crudos	30
5.8 <i>H. pylori</i> y el potencial papel de los alimentos en su transmisión.....	33
5.9 Factores ambientales que podrían influir en la transmisión de la Infección.....	35
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
6.1 Material biológico	39
6.2 Selección de iniciadores	39
6.3 Simulación de PCR.....	39
6.4 Procesado de las muestras.....	40
6.4.1 Vegetales.....	40
6.4.2 Aguas frescas sabor limón, piña y melón.....	40
6.4.3 Tacos.....	40

Sección	Página
6.4.4 Agua purificada	40
6.5 Cultivo de cepa de referencia <i>H. pylori</i> ATCC 43504	41
6.5.1 Cultivo en medio sólido.....	41
6.5.2 Cultivo en medio líquido	41
6.6.- Pruebas Bioquímicas	41
6.6.1 Prueba de oxidasa	41
6.6.2 Prueba de catalasa	41
6.6.3 Prueba de ureasa	42
6.7.- Proceso de congelación de cepa	42
6.7.1 A partir de cultivo en medio sólido	42
6.7.2 A partir de cultivo en medio líquido.....	42
6.8 Extracción de ADN de cepa de referencia.....	42
6.9 Reacción de PCR de cepa de referencia	43
6.10 Extracción de ADN de las muestras.....	43
6.10.1 Lechuga, repollo y cilantro.....	43
6.10.2 Aguas sabor limón, piña y melón.....	43
6.10.3 Tacos	43
6.10.4 Agua purificada.....	44
6.11 Reacción de PCR de las muestras	44
6.12 Electroforesis en gel de agarosa	44
6.13 Determinación de la sensibilidad de la metodología empleada.....	45
6.13.1 Conteo de células por diluciones	45
6.13.2 Inoculación de células en muestras vegetales	45
6.13.3 Extracción de ADN y PCR de muestras inoculadas	45
7. RESULTADOS.....	47
7.1 Selección de iniciadores	47
7.2 Simulaciones de PCR.....	48
7.3 Procesado de las muestras	49
7.3.1 Lechuga, repollo y cilantro.....	49
7.3.2 Aguas sabor limón, piña y melón	50

Sección	Página
7.3.3 Tacos.....	50
7.3.4 Agua potable y agua purificada.....	51
7.4 Extracción de ADN	51
7.5 Reacción de PCR directa	52
7.6 Reamplificación de ADN a partir de la PCR directa.....	52
7.7 Determinación de la sensibilidad de la metodología empleada.....	54
7.7.1 Conteo de células por diluciones	55
7.7.2 Inoculación de células en muestras vegetales y PCR.....	54
8. DISCUSIONES.....	57
8.1. Cultivo y detección de <i>H. pylori</i>	57
8.2 Iniciadores para el gen <i>cag A</i> y <i>vac A</i>	58
8.3 Sensibilidad del método para detección de <i>H. pylori</i>	58
8.4 Detección de <i>H. pylori</i> en alimentos y aguas frescas.....	59
8.5 Detección de <i>H. pylori</i> en agua potable y agua purificada.....	61
8.6 Frecuencia de cepas <i>cag A</i> y <i>vac A</i>	62
9. CONCLUSIONES	64
10. LITERATURA CITADA	66

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Variación geográfica de la prevalencia de <i>H. pylori</i> alrededor del mundo.	18
2	Distribución de la mortalidad por cáncer gástrico y la seroprevalencia de <i>Helicobacter pylori</i> en México.	21
3	Región del péptido señal del gen <i>vacA</i> .	48
4	Región intermedia del gen <i>vacA</i> .	48
5	Gen <i>cagA</i> .	48
6	Fragmentos derivados de las reamplificaciones a partir de la PCR directa de las muestras y su genotipificación.	54
7	PCR directa de lechuga, repollo y cilantro artificialmente inoculados.	55
8	Reamplificación de ADN a partir de la PCR directa de lechuga, repollo y cilantro artificialmente inoculados.	56
9	Reamplificación de ADN a partir de agua potable y agua purificada	56

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1	Cantidad de solución filtrada de las muestras vegetales.	49
2	Cantidad de solución filtrada de las aguas de frutas.	50
3	Total de muestras positivas y su porcentaje total e individual.	53
4	Fragmentos de genes amplificados de las muestras positivas.	53

NOMENCLATURA

A	Adenina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión cerebro corazón
cagA	Gen asociado a citotoxicidad
C	Citosina
CISEI	Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas
CO ₂	Dióxido de carbono
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
<i>et al</i>	Y colaboradores
ETA's	Enfermedades trasmitidas por alimentos
FVNC	Formas viables no cultivables
G	Guanina
g	gramos
h	horas
HCl	Ácido clorhídrico
HPSPA	Agar especial para <i>Helicobacter pylori</i>

IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
INEGI	Instituto nacional de Estadística y Geografía
IL	Interleucina
KOAc	Acetato de potasio
Kpb	Kilopares de bases
L	Litro
LiCl	Cloruro de litio
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimol
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	National Center Biotechnological Information
NH ₄ ⁺	Amonio
NL	Nuevo León
p/v	Peso/volumen
Pag	Página
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
®	Marca registrada
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto

rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
spp	Especies
T	Timina
TBE	Solución amortiguadora tris-boratos-EDTA
™	Marca de fábrica
Tris	TRIZMA® Base. Tris[Hidroximetil]aminometano
Tris-HCl	Tris [hidroximetil]aminometano-ácido clorhídrico
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades internacionales
UV	Luz ultravioleta
V	Voltios
vacA	Gen asociado a vacuolización
μ	Micras
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
%	Por ciento
°C	Grados Celsius
+	Positivo
-	Negativo

1. RESUMEN

H. pylori es un bacilo curvo de forma espirilar, Gram negativo, cuyo papel etiológico en el desarrollo de gastritis crónica activa, úlcera péptica, tumores de tejido linfoide asociado a mucosa y adenocarcinoma gástrico, ha sido demostrado claramente mediante estudios epidemiológicos. En México existen reportes que indican seroprevalencia de hasta 82.6% asociada a un bajo nivel socioeconómico, hacinamiento familiar, desnutrición, nadar en ríos o albercas, alimentos contaminados con tierra o agua, consumo de agua de fuentes no municipales, consumo de vegetales crudos, entre otros. Por ello, y con el propósito de detectar ADN procedente de *Helicobacter pylori* en agua potable y purificada, así como alimentos que se expenden en vía pública, se implementó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Se seleccionaron iniciadores validados para la detección y tipificación de los genes *vacA* y *cagA* de variantes genéticas de la bacteria. Las reamplificaciones demostraron ADN de *H. pylori* en el 40% de las muestras de alimentos totales analizadas, no así en las de agua potable y purificada. Se detectó un 30.6% en los vegetales, 50% en aguas frescas y 56% en tacos de carne. El consumo de alimentos callejeros puede contribuir a la incidencia y persistencia de *H. pylori* en el humano, sobre todo si no son preparados bajo las reglas de higiene necesarias.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a curved bacillus with spirillary shape, Gram negative, whose etiologic role in the development of active chronic gastritis, peptic ulcer, tumors of lymphoid tissue mucosa-associated and gastric adenocarcinoma, has been clearly demonstrated by epidemiological studies. In Mexico there are reports indicating up to 82.6% seroprevalence associated with low socioeconomic status, overcrowding, malnutrition, swimming in rivers or pools, food or water contaminated with soil, consumption of municipal water sources, and raw vegetables, among others. Therefore, and in order to detect DNA from *Helicobacter pylori* in drinking and purific water and food that is sold on street, technique Polimerase Chain Reaction (PCR), was implemented. Validated primers were selected for detection and typing of *vacA* and *cagA* gene variants of the bacteria. Amplifies demonstrated *H. pylori* DNA in 40% of the total samples analyzed, but not in drinking and purific water. 30.6% was detected in vegetables, 50% fresh water and 56% in beef tacos. Consumption of street foods can contribute to the incidence and persistence of *H. pylori* in human, especially if they are not prepared under the rules of hygiene required.

2. INTRODUCCIÓN

Características generales:

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo, curvo, de forma espirilar, con aspecto de coma o “S” al microscopio óptico, móvil por la presencia de 4 a 6 flagelos unipolares envainados con un ensanchamiento en el extremo distal y que juegan un papel fundamental en la colonización de esta bacteria en las células gástricas. Mide de 2.5 a 5 μm de longitud y 0.5 a 1.0 μm de ancho. Crece lentamente a 37°C, bajo condiciones de microaerofilia y en medios de cultivo con requerimientos especiales. Es catalasa, oxidasa y ureasa positivo (Catrenich and Makin, 1991; Solnick and Schauer, 2001). Las colonias son pequeñas, de aspecto brillante y tras subcultivos prolongados dan lugar a formas cocoides denominadas formas viables no cultivables las cuales son metabólicamente activas pero sin capacidad para desarrollarse *in vitro* (Bode *et al.*, 1993).

Patogenia y Transmisión:

Estudios realizados en los últimos años han demostrado que *H. pylori* es uno de los agentes infecciosos de mayor prevalencia en el hombre, implicándose en enfermedades como la patología gastroduodenal crónica (Blaser, 1992), enfermedades cardiovasculares (Mendall *et al.*, 1994) y retraso de crecimiento (Patel *et al.*, 1994). El único reservorio en condiciones naturales es el hombre, aunque no es infrecuente el aislamiento en primates. La ruta de transmisión de la infección, no está claramente establecida, aunque numerosos estudios apuntan hacia la vía oral o fecal oral como la más posible. Algunas hipótesis acerca de un mecanismo de transmisión a partir de insectos como las moscas (Grübel *et al.*, 1997) o animales domésticos como los gatos, se han establecido (Stolte *et al.*, 1994; Neiger and Simpson, 2000; Neiger, 2003; Morales *et al.*, 2010; Valdés and Astudillo, 2007). Así mismo, se contempla la iatrogenia, a través de los endoscopios, pinzas de biopsia o equipo médico en general (Akamatsu *et al.*, 1996; Thibaut *et al.*, 2007) sobre todo en personal que los manipulan sin guantes (Mitchell *et al.*, 1989), como también las secreciones bucales por su presencia en la placa

dental (Izzeddin *et al.*, 2010; Scarano *et al.*, 2005; Song *et al.* 1999; Gabera *et al.*, 2004; Cheng *et al.* 1996).

Se considera que la patología que produce es la infección bacteriana crónica más común alrededor del mundo, estimándose que hasta un 50% de la población mundial está infectada y que su prevalencia varía ampliamente de acuerdo al área geográfica, edad, raza, etnia y nivel socioeconómico. En países desarrollados se han reportado incidencias que varían de 20 a 50%, a diferencia de los países subdesarrollados donde los reportes muestran hasta 90% (Brown, L.M. 2000; Dunn, *et al.*, 1997; Van Duynhoven and de Jonge, 2001). En México existen reportes que indican seroprevalencia de hasta 82.6% (Chihu *et al.*, 2005).

H. pylori es capaz de colonizar y persistir en su nicho biológico que es la mucosa gástrica gracias a los factores de patogenicidad que presenta y que contribuyen a los efectos patogénicos de la bacteria (factores de virulencia) y a colonizar y permanecer dentro del huésped (Factores de mantenimiento) (Dunn *et al.*, 1997). Los síntomas iniciales son muy inespecíficos y triviales, a tal punto que resulta muy difícil determinar el momento exacto en el que ocurre la infección. En la mayoría de las ocasiones la infección cursa de manera asintomática y, a pesar de la cantidad de personas que se encuentran colonizadas, la proporción de individuos que desarrollan síntomas es alrededor de 20% (González-Morales *et al.*, 2004). De este porcentaje con sintomatología, 10 a 15% presentará úlcera péptica y hasta un 3% desarrollará cáncer gástrico. Esta estimación sugiere que alrededor del 7% de la población mundial desarrollará eventualmente enfermedades gastroduodenales asociadas a *H. pylori* (Torres *et al.*, 2005).

En la actualidad se sabe que el cáncer gástrico es el cuarto padecimiento más común y la segunda causa de muerte en todo el mundo, y se estima aproximadamente 1 000, 000 de casos nuevos anualmente y más de 850, 000 muertes en el mismo periodo (Chihu *et al.*, 2005; Konturek *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2005). Parece ser que la mucosa gástrica y ectópica (Esófago de Barret y Divertículo de Meckel) humanas son el único reservorio natural de *H. pylori*, aunque su asociación con fuentes no humanas como ganado bovino, ovino, felino, agua, alimentos y vegetales alentó a los investigadores a buscar fuentes de transmisión medioambientales

(Brown, 2000; Gomes and De Martinis, 2004; González-Morales *et al.*, 2004; Herrera, 2004; Luman, 2002).

Incidencia y condiciones de transmisión

La elevada prevalencia reportada en países subdesarrollados se asocia con bajo nivel socioeconómico, hacinamiento familiar, dormitorios compartidos, padres y hermanos infectados, pobre estado nutricional, nadar en ríos o albercas, ausencia de agua potable y presencia de letrinas en casa, alimentos preparados con prácticas de higiene inadecuadas o expuestos a tierra o agua contaminados, consumo de agua de fuentes no municipales, consumo de vegetales crudos y leche de cabra (Brown, 2000; González-Morales *et al.*, 2004; Herrera, 2004; Luman, 2002; Ouaglia *et al.* 2008; Vale and Vitor, 2010) .

En países en desarrollo hay evidencia de que su transmisión puede ser indirecta, involucrando vehículos como alimentos, vegetales o aguas contaminadas (Fox, 1995). En este último caso, se ha encontrado ADN de *H. pylori* en agua para consumo humano, de grifo, pozo, río, mar, presa, estanque y subterránea (Bunn *et al.*, 2002; Cellini *et al.*, 2004; Fujimura *et al.*, 2004; Hegarty *et al.*, 1999; Horiuchi *et al.*, 2001; Hulten *et al.*, 1996; Mazari-Hiriart *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2004). Las aguas residuales tratadas y no tratadas por supuesto que también han sido estudiadas y la incidencia de la bacteria ha sido demostrada por lo que su uso como aguas de riego para cultivo de vegetales y hortalizas puede ser crítico para el humano en México y otros países latinos que llevan a cabo dicha actividad. (Hofman *et al.*, 2004; Mazari-Hiriart *et al.*, 2001; Queralt *et al.*, 2005).

Evidencias de transmisión fecal oral

Los vegetales también han sido implicados en la transmisión de *H. pylori*. Hopkins *et al.*, 1993 relacionó la seroprevalencia de la infección en más de un 60% con el consumo de vegetales crudos usando un análisis de regresión logística y apoyado en estudios anteriores de contaminación de agua de riego con aguas residuales y por ende la contaminación de los cultivos regados con dichas aguas. Los vegetales consumidos crudos y sin desinfección previa pueden ser responsables de la infección por *H. pylori* hasta en un 66.4 a 69%. (Chen *et al.*, 2005, Goodman *et al.*,

1996) Así mismo, se sugiere la posibilidad de que tocar y/o comer vegetales (como pasto o flores) en jardines, los cuales son fertilizados con excremento humano o regados con aguas residuales, podría ser una ruta para adquirir la infección (Herbarth *et al.*, 2001).

Los alimentos preparados bajo condiciones insalubres o expuestos a factores ambientales que puedan contaminarlos juegan un papel importante en la transmisión de la infección, por lo que los utensilios, moscas, agua o tierra contaminados, son cruciales durante el proceso de producción. Con respecto a esto, también se ha asociado la prevalencia de la infección hasta en un 50%, con la ingestión de comida procedente de vendedores ambulantes así como en personas con hábitos higiénicos inadecuados debido a que no lavaban sus manos antes de consumir alimentos (Begue *et al.*, 1998, Brown *et al.*, 2002)

El cultivo de *H. pylori* específicamente de agua y alimentos ha presentado grandes dificultades. Cuando es expuesto a diferentes estímulos ambientales fuera de su nicho sufre cambios morfológicos y fisiológicos que lo llevan a transformarse en formas cocoides viables no cultivables (VNC). Estas formas cocoides no llevan a cabo división celular y no pueden ser cultivadas por métodos tradicionales, incrementando la dificultad en su detección; sin embargo, la viabilidad y virulencia de estas formas ha sido demostrada (Adams *et al.*, 2003; Fei-Fei *et al.*, 2003; Shahamat *et al.*, 2004; Velázquez and Feirtag, 1999).

El aislamiento de *H. pylori* de heces de adultos y niños implica la vía de transmisión fecal oral y apoya la teoría de que los alimentos y agua (vía contaminación fecal) pueden ser una fuente de infección. Además, proporciona evidencia concluyente de que *H. pylori* tiene la habilidad de existir en el medio ambiente como una forma VNC que puede replicarse después de la ingestión por un mamífero, fortaleciendo considerablemente la hipótesis de que el agua y alimentos son importantes fuentes de infección (Fei-Fei *et al.*, 2003; Fox, 1995).

Entre los factores asociados a la infección, además de ser multifactoriales, ya que puede incluir la interacción con fuentes ambientales potencialmente

contaminada, se menciona el bajo nivel socioeconómico, el hacinamiento, los padres y hermanos infectados, familias numerosas, pobre estado nutricional, condiciones insalubres, como ausencia de agua potable y de letrinas en casa, consumo de vegetales crudos, tabaquismo en la madre, asistencia a guarderías, mascotas en el hogar y contacto con borregos (Baker and Hegarty, 2001; Dunn *et al.*, 1997, Goodman *et al.*, 1996). El agua potable local, el nadar en ríos, así como la ingestión de vegetales contaminados con heces se han reportado como factores de riesgo y esto ha originado que se considere a *H. pylori* como una bacteria capaz de sobrevivir en el agua (Morales-Espinoza, 1999). Aún se desconoce el modo de transmisión, pero existen pruebas que nos indican que la transmisión puede ocurrir mediante varias rutas como son la fecal - oral, gastro - oral y oral - oral puede ser directa de persona a persona o indirecta por medio de fomites o por zoonosis. (Bohmler *et al.*, 1996; Dunn *et al.*, 1997; Mapstone, 1993).

Evidencias de la Transmisión Acuática de *H. pylori*

Las primeras evidencias acerca de la transmisión acuática de este patógeno a humanos fueron aportadas por la epidemiología realizada en países latinos en vías de desarrollo como Chile, Perú, Colombia y Venezuela. En Lima, Perú, se demostró la asociación entre la prevalencia de *H. pylori* en niños (48%) y el consumo de fuentes externas de agua (drenaje comunitario) (Klein *et al.*, 1991), mientras que Goodman *et al.*, 1996 determinaron que en niños de un área rural de los Andes Colombianos existía una prevalencia de *H. pylori* del 69%, incrementando la tasa de infección con el uso de arroyos como fuente de agua potable. En Chile, se encontró una seropositividad a la bacteria superior a 60% en los grupos socioeconómicos más bajos, asociada al consumo de vegetales no procesados, los cuales podrían haber sido irrigados con aguas residuales (Hopkins *et al.*, 1993).

En Venezuela (Domínguez-Bello *et al.*, 2002), encontraron una frecuencia de infección por *H. pylori* significativamente alta (96%) durante los meses de lluvia, lo cual podría ser debido a un aumento en la densidad bacteriana o bien a cambios de formas cocoides en estado de latencia a formas bacilares en división celular. Todos estos estudios indican que el agua puede ser un vehículo en la transmisión fecal-oral, actuando como una fuente de infección donde la bacteria puede permanecer por

períodos prolongados antes de ser ingerida como agua potable, accidentalmente durante el baño o a través de alimentos contaminados.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) usualmente son catalogadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como infecciosas o tóxicas debido a agentes microbianos que entran al hospedero a través de la ingestión de alimentos. Estas enfermedades están ampliamente distribuidas y son un problema de salud pública en crecimiento tanto en países en desarrollo como en países desarrollados. Como el uso de un método microbiológico para la detección de este patógeno la mayoría de las veces resulta en fracaso, debido a la particularidad de la bacteria de inducir las formas viables no cultivables, la utilización de un método alternativo para su detección es importante considerando esta característica de la bacteria. El uso de una reacción en cadena de polimerasa, para detección de DNA de *Helicobacter pylori*, puede ser una buena elección para evidenciar su presencia en los alimentos y el agua y así podría pasar a formar parte de los agentes causantes de ETA's.

2.1.- Importancia.

Muchas son las incógnitas que existen con respecto a la forma de transmisión de *H. pylori* al hombre así como los reportes acerca de su presencia en diferentes tipos de agua y alimentos vegetales, sin embargo, en nuestro país existe poca información acerca de su incidencia en este tipo de muestras. La importancia del presente estudio radica en la implementación de un método alternativo que pueda detectar el DNA de la bacteria como la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual será utilizada como prueba tamiz para determinar la incidencia de *H. pylori* en alimentos y agua, como una forma de realizar control microbiológico.

2.2.- Originalidad y justificación.

Los diferentes reportes publicados acerca de la presencia de *H. pylori* en agua y alimentos provienen principalmente de Latinoamérica, sin embargo, en México no hay reportes o son muy pocos los que registran la incidencia de *H. pylori* en los productos alimenticios que la población mexicana consume. Aunque se sabe que la

incidencia de malestares gástricos ha ido en aumento, no se ha llevado a cabo alguna relación de la sintomatología gástrica con la ingesta de alimentos y agua, contaminados con *H. pylori*, por lo que el presente trabajo puede servir como un primer intento que permita determinar la incidencia que esta bacteria puede tener en nuestros productos alimenticios y que sirva como base para posteriormente llevar a cabo estudios de relación entre la enfermedad y el consumo de los alimentos que cada individuo, con sintomatología gástrica, ingiere. La metodología que se propone en el presente proyecto permitirá la detección del patógeno en forma fácil y rápida en alimentos con probabilidad de transmitirlo como los vegetales, frutas y alimentos reportados que ocasionan que el porcentaje de infección se siga manteniendo o incrementando en nuestra población.

3. HIPÓTESIS

Mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se podrá detectar la presencia o ausencia de *Helicobacter pylori* en alimentos y agua.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Implementar un método molecular para la detección de *H. pylori* en agua potable y purificada, vegetales frescos y alimentos que se expendan en vía pública.

4.2. Objetivos particulares.

4.2.1.- Estandarizar la prueba de PCR para la detección de *H. pylori* mediante el uso de la cepa de referencia.

4.2.2.- Estandarizar la prueba de PCR para la detección de *H. pylori* en muestras de agua potable y purificada artificialmente inoculadas.

4.2.3.- Estandarizar la prueba de PCR para la detección de *H. pylori* en alimentos artificialmente inoculados.

4.2.4.- Detectar DNA de *H. pylori* en muestras de campo como agua, vegetales y alimentos que se expendan en la vía pública.

5. ANTECEDENTES

5.1.- Aspectos históricos y descubrimiento de *H. pylori*.

H. pylori es uno de los más antiguos y cercanos acompañantes de la humanidad, le tomó a los científicos más de un siglo reconocerlo. En 1875, anatomistas alemanes encontraron bacterias espirales colonizando la capa de mucus del estómago humano sin embargo, el descubrimiento fue ignorado debido a que el organismo no pudo ser cultivado (Blaser, 1992). En 1893 Bizzozero, seguido por Salomon en 1896, demostraron la existencia de microorganismos espirales en el jugo gástrico de perros y gatos. En 1906 Kariemtz descubrió organismos semejantes en el jugo gástrico de pacientes con cáncer de estómago. En 1938 Doenges, en un análisis de necropsias, encontró organismos espirales en el estómago de 43% de los humanos estudiados. Por primera vez en 1975, la gastritis se asoció con la presencia de una bacteria Gram negativa, en forma de espiral en la mucosa gástrica misma que Warren observó en 1979, en biopsias gástricas localizadas debajo de la capa mucosa (González-Morales, 2004) .

Fue hasta 1982 que los doctores australianos J. Robin Warren y Barry J. Marshall aislaron por primera vez de la mucosa gástrica humana a *H. pylori*. En 1983, Marshall y Skirrow acuerdan el nombre de *Campylobacter pyloridis* ya que el

porcentaje de G más C en su DNA fue de 34% que correspondía al rango normal de *Campylobacter* (Dunn *et al.*, 1997; Konturek *et al.*, 2006).

Para demostrar la patogenicidad de esta bacteria el Dr. Marshall, decidió ingerir una muestra de cultivo obtenido de un hombre de 66 años de edad con diagnóstico de dispepsia no ulcerosa, 14 días después resultó con la misma enfermedad y al cabo de 10 días se demostró histológicamente que se trataba de una gastritis. En 1987 se le denominó *Campylobacter pylori* para adaptarse a la nomenclatura de la época. Finalmente en 1989, Goodwin, gracias a sus trabajos, lo incluye en el género *Helicobacter* con base en la secuencia de bases de la molécula 16S del RNAr. Desde entonces se le denominó *Helicobacter pylori* y se han aislado distintas especies de origen gástrico y no gástrico, del hombre y animales (González-Morales, 2004).

En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, una institución de la OMS, revisó la evidencia disponible y clasificó a *H. pylori* como carcinógeno humano tipo I y en el año 2005, el premio Nobel de Fisiología y Medicina fue otorgado a Barry Marshall y Robin Warren por su descubrimiento de *H. pylori* y estudios acerca de su fisiología y ecología (Enroth *et al.*, 1995; Konturek *et al.*, 2006).

5.2.- Características bioquímicas.

H. pylori en medio sólido forma colonias brillantes y translúcidas de 1-2 mm de diámetro, es positivo a catalasa, oxidasa, ureasa, fosfatasa alcalina, DNasa, leucina y arginina arilamidasa y negativo a hidrólisis del hipurato y reducción de

nitrosos. Después de un cultivo prolongado, las formas cocoides son predominantes y se denominan formas viables no cultivables (FVNC). En microscopio electrónico, las formas cocoides se observan en forma de U. Estas estructuras son metabólicamente activas; sin embargo, no pueden ser cultivadas *in vitro*. (Dunn *et al.*, 1997; Catrenich and Makin, 1991; González-Morales *et al.*, 2004).

5.3.- Mecanismos de patogenicidad y virulencia.

Si definimos la patogenicidad como la capacidad intrínseca de un microorganismo de producir enfermedad y virulencia como la medida o grado de esta enfermedad, ello implica la interacción de un conjunto de factores que le dan al patógeno la capacidad para invadir a su huésped, sobrevivir y multiplicarse dentro de él. Así, cada patógeno utiliza durante este proceso, diferentes mecanismos y estrategias para causar enfermedad siendo para *H. pylori* los que a continuación se citan.

5.3.1.- Componentes de patogenicidad.

- a) Estructura espiralada: Le permite a la bacteria introducirse a través de la capa de moco gástrico actuando de forma similar a un sacacorchos y favoreciendo por lo tanto el acercamiento a las células epiteliales gástricas (Dunn *et al.*, 1997; González-Morales *et al.*, 2004)
- b) Motilidad: Los flagelos le confieren gran movilidad y le permiten introducirse con rapidez en la capa de moco del estómago y no ser eliminado por los mecanismos defensivos del huésped (González-Morales *et al.*, 2004; McGee and Mobley, 2000).

c) Adherencia: Posee una gran variedad de adhesinas que reconocen en forma específica a los receptores de la mucosa gástrica y se unen a ellos comenzando la colonización bacteriana (Dunn *et al.*, 1997; González-Morales *et al.*, 2004).

d) Ureasa: proteína potente que transforma la urea en amonio, el cual produce un microambiente alcalino alrededor de la bacteria que le confiere protección ante la acidez gástrica. La ureasa también tiene propiedades citotóxicas; junto con el amonio dañan la mucosa y proporcionan nutrientes necesarios para la adhesión de la bacteria al epitelio gástrico. Además, el amonio puede ser un precursor de la síntesis proteica de algunas adhesinas de la bacteria (González-Morales *et al.*, 2004; Hofman *et al.*, 2004; Panchal *et al.*, 2003).

e) Otras enzimas: La lipasa y proteasa propician la desintegración del moco gástrico y la pérdida de hidrofobicidad de la mucosa y posiblemente disminuyen la capacidad de las células mucosas para secretar moco; la catalasa y superóxido dismutasa protegen a la bacteria de los metabolitos tóxicos producto de procesos oxidativos de defensa de los macrófagos y neutrófilos; además, produce otras enzimas como la fosfolipasa A2, fosfolipasa C, mucinasa, fosfatasa alcalina y ácida, entre otras (Dunn, *et al.*, 1997; González-Morales *et al.*, 2004).

5.3.2.- Componentes de virulencia.

a) Citotoxina vacuolizante VacA: Tiene un efecto citopático, produce la formación de grandes vacuolas en las células eucariotas. La totalidad de las cepas de *H. pylori* contiene el gen *vacA*, pero sólo el 50% secretan la toxina activa. Se han descrito variantes alélicas de *vacA* principalmente en la región del péptido señal (s1 y s2) y en

la porción central de la proteína (m1 y m2). Las cepas que contienen los alelos s1/m1 (Tipo I), asociado a la presencia de *cagA*, se consideran de alto potencial citotóxico (Ayala *et al.*, 2004; Blaser, 1992; Gomes and De Martinis, 2004; Hofman *et al.*, 2004; McGee and Mobley, 2000; Panchal *et al.*, 2003)

b) Proteína *cagA*: Es codificada por el gen *cagA* (gen asociado a citotoxina), el cual puede estar presente (*cagA* +) o no presente (*cagA* -). Esta proteína podría estar implicada en el proceso de activación de la toxina vacuolizante y podría influir en la respuesta inflamatoria y aumentar la secreción de Interleucina 8 (IL-8) por las células epiteliales, lo que conduce a un estado de inflamación de la mucosa gástrica. Las cepas *cagA*+ y *vacA*+ se relacionan con alto riesgo de causar úlcera duodenal, gastritis atrófica y cáncer gástrico (Blaser, 1992; González-Morales *et al.*, 2004; Hofman *et al.*, 2004; McGee and Mobley, 2000; Panchal *et al.*, 2003).

c) Evasión de la respuesta inmune: La bacteria tiene la habilidad de inducir muerte celular de los linfocitos T. La adherencia de *H. pylori* promueve el desarrollo de autoanticuerpos contra las células parietales, resultando en una gastritis crónica y pérdida de células parietales, así pues el mecanismo involucrado en la producción de autoanticuerpos podría ser un mimetismo molecular entre los lipopolisacáridos expresados constitutivamente en la bacteria y epítopes asociados en las células parietales lo que permite la persistencia de esta bacteria en el epitelio (Hofman *et al.*, 2004; McGee and Mobley, 2000; Panchal *et al.*, 2005) .

d) Alteraciones de la función gástrica: La infección aguda da lugar a un periodo de hipoclorhidria que propicia la colonización por esta bacteria. La infección se

acompaña de elevadas concentraciones basales de gastrina posteriores a la estimulación, y disminución de los niveles de somatostatina. Por lo tanto, la infección eleva las concentraciones basales de ácido estimuladas por la gastrina. Esto da lugar a una descarga ácida en el duodeno y promueve la metaplasia gástrica y la formación de úlcera duodenal (Blaser, 1992; González-Morales *et al.*, 2004).

5.4. Prevalencia mundial de la infección.

La prevalencia de la infección por *H. pylori* sigue variando mucho entre los países en desarrollo y los países desarrollados según el origen étnico, lugar de nacimiento y los factores socioeconómicos entre las personas que viven en el mismo país. La propagación intrafamiliar parece desempeñar un papel central en la transmisión de la infección, tanto en los países en desarrollo y desarrollados. La infección varía según la región geográfica, pero en general los países industrializados son los que tienen una menor prevalencia, de tal manera que regiones como América del Norte, el Oeste de Europa y Australia tienen una prevalencia menor a 55%. En los países en vías de desarrollo como China y México la incidencia es de 55 a 64%. Para la parte baja de América del Sur, el norte de África, el resto de Asia, España y Portugal es de 65 a 74% y para la parte superior de América del sur, el norte y este de Europa y el sur de África es mayor a 75% (Perez-Perez, 2004; Konturek *et al.*, 2006) (Ver Figura 1).

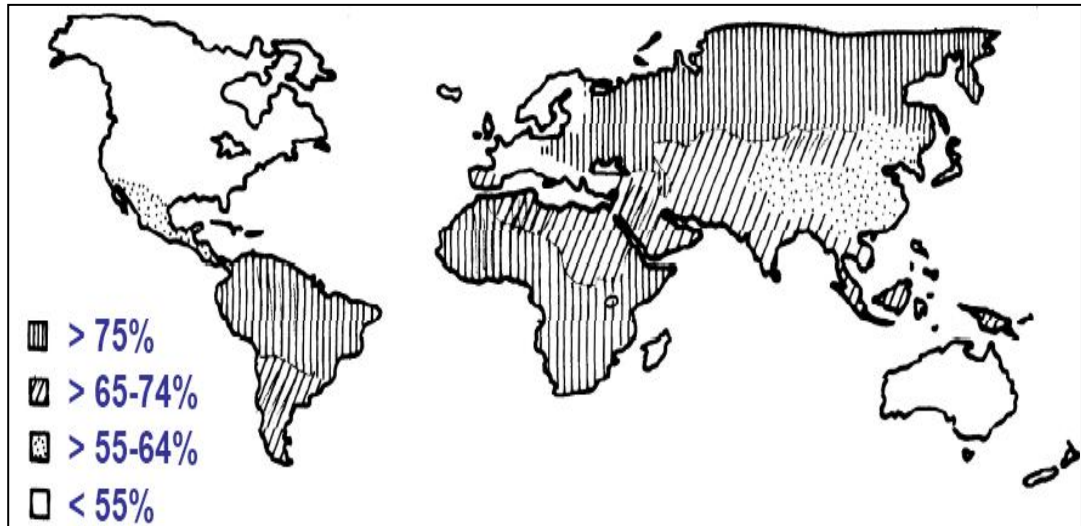


Figura 1. Variación geográfica de la prevalencia de *H. pylori* alrededor del mundo (Tomado de Konturek *et al.*, 2006.)

Thomas *et al.*, 1992, aislaron *H. pylori* de heces humanas de una persona infectada en Gambia, lo cultivaron en medios selectivos después de la concentración de bacterias fecales por centrifugación con una mezcla de gases microaerofílica, logrando observar colonias con las mismas características de crecimiento, apariencia microscópica y actividad enzimática, que las de un aislado gástrico de *H. pylori*. Además, de que preparaciones de proteínas y los perfiles electroforéticos fueron antigénicamente similares (bandas de proteínas principales de 62 y 26 KDa, correspondientes a las subunidades de la enzima ureasa). En 9 niños de 23 seleccionados al azar de entre 3-27 meses, usando la misma técnica se aisló esta bacteria, concluyendo que la transmisión fecal-oral es probablemente importante en la propagación de la infección en esas comunidades.

Ortiz *et al.*, 2003 evaluaron la prevalencia de *H. pylori* en niños y adultos de comunidades indígenas del estado Delta Amacuro, Venezuela, que son diferentes en cuanto a condiciones higiénicas y de alojamiento. Se evaluaron 98 niños (7 ± 3.37

años) y sus madres (33.96 ± 13.77 años) de dos comunidades indígenas de la etnia warao del estado Delta Amacuro, Venezuela. Se determinaron anticuerpos séricos IgG anti-*H. pylori* e IgA secretora total y específicos, además de antígenos de *H. pylori* en heces. Se encontró un 38% de seroprevalencia en la población infantil y un 84% en las madres. En los niños de la comunidad que tiene condiciones sanitarias y ambientales más deficientes, los títulos de anticuerpos IgG específicos y los niveles de IgA secretora total fueron significativamente ($p < 0.0001$) más bajos, encontrándose un alto porcentaje de niños que presentaron antígenos de *H. pylori* en heces ($p < 0.0001$). Los niveles de IgA secretora específica fueron positivos y similares en ambos grupos. Además, los estudios de calidad de agua reflejaron mayor cantidad de bacterias coliformes y sólidos totales en la población de Isla Misteriosa que en Playa Sucia. Los resultados indican que en estas poblaciones existe una alta prevalencia de infección por *H. pylori* y que las condiciones ambientales pueden incrementar el riesgo de infección y el daño en la mucosa gastrointestinal.

Páez *et al.*, 2006 determinaron la prevalencia de la infección con *H. pylori* y el patrón de infección según edad, sexo, estado nutricional y condiciones socioeconómicas, en 170 niños entre 3 y 14 años de edad, de ambos géneros. Se determinó infección por la bacteria (test de aliento con urea-C13), edad, estado nutricional y talla-edad, hemoglobina (cianometahemoglobina), ferritina sérica (ELISA), estrato socioeconómico, condición de vivienda, número de personas y familias que viven en el hogar y calidad de los servicios. El 78,8% de los niños resultaron infectados, no encontrándose correlación significativa con el género pero sí con la edad; 25,9% presentaron déficit nutricional y 46,5% talla baja. El 98,1% de las familias se encontraban en situación de pobreza y 98% de las viviendas presentaban deficiencias sanitarias; en promedio vivían $6,0 \pm 2,4$ personas en el hogar

y 3,2 personas compartían un mismo dormitorio. Se encontró que la probabilidad de infección era mayor en aquellos niños que presentaban déficit de talla y que el estrato socioeconómico, el nivel de instrucción materno, las precarias condiciones de alojamiento y el hacinamiento se asociaban significativamente a la infección. El nivel socioeconómico en la niñez está asociado con una alta colonización por el microorganismo, la edad, el hacinamiento y un bajo nivel de instrucción de la madre pueden aumentar el riesgo a esta infección.

Martínez *et al.*, 2008 estudiaron la presencia de esta bacteria en muestras de biopsia obtenidas mediante endoscopia de 69 pacientes con úlcera duodenal, úlcera gástrica, gastritis crónica y dispepsia. Los diagnósticos de úlcera gástrica y gastritis crónica fueron confirmados histológicamente. Se analizaron 27 úlceras duodenales, 12 úlceras gástricas, 24 gastritis crónicas y 6 dispepsias. Se detectó la presencia de *H. pylori* a través de la amplificación de un fragmento del gen *Ure A* mediante la reacción en cadena de la polimerasa, en el 100 % de las úlceras duodenales, en el 100 % de las úlceras gástricas, en el 83 % de las dispepsias y en el 92 % de las gastritis crónicas, para una prevalencia total del 95,7 %.

5.5.- Prevalencia y distribución geográfica de *H. pylori* y su relación con la mortalidad por cáncer gástrico en México.

En 1998 Torres *et al.*, realizaron un estudio para detectar la infección con *H. pylori* en México donde se analizaron 11,000 muestras de suero colectadas de 1987 a 1988. Las muestras fueron representativas de todas las edades y todas las regiones del país e incluyeron todos los niveles socioeconómicos. La seroprevalencia fue de 20% en niños de hasta un año de edad, casi 50% en niños de diez años. En adolescentes, la prevalencia de la infección se incrementó considerablemente de tal

forma que a la edad de 20 años, 70% de la población estaba infectada. En adultos mayores de 20 años la seroprevalencia fue de 82.6%.

Se analizaron los resultados obtenidos en el estudio de Torres *et al.*, 2005 y se correlacionaron con el índice de mortalidad por cáncer gástrico en México que fue de 6.5 por cada 100, 000 habitantes reportado por el Instituto Nacional de Geografía y Estadística en 1991 (INEGI) (Fig 2). Para el análisis, los 32 estados del país fueron divididos en cuatro grupos de acuerdo a su índice de mortalidad y la seroprevalencia fue calculada por estado, los resultados fueron los siguientes:

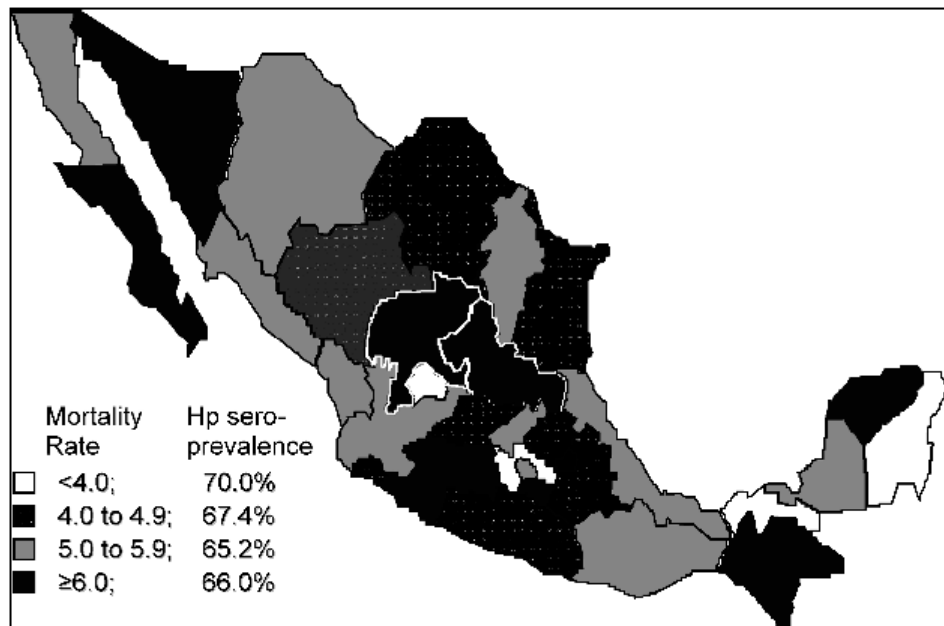


Figura 2. Distribución de la mortalidad por cáncer gástrico y la seroprevalencia de *H. pylori* en México. (Tomado de Torres *et al.*, 2005).

- 1.- Grupo I: 70% seroprevalencia y <4.0 índice de mortalidad: Aguascalientes, Estado de México, Tabasco y Quintana Roo.
- 2.- Grupo II: 67.4% seroprevalencia y 4.0 a 4.9 índice de mortalidad: Coahuila, Durango, Tamaulipas, Guanajuato, Colima, Guerrero, Hidalgo y Puebla.

3.- Grupo III: 65.2% seroprevalencia y 5.0 a 5.9 índice de mortalidad: Nuevo León, Baja California Norte, Chihuahua, Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Querétaro, Veracruz, Oaxaca y Campeche.

4.- Grupo IV: 66.0% seroprevalencia y ≥ 6.0 índice de mortalidad: Baja California Sur, Sonora, San Luis Potosí, Zacatecas, Michoacán, Tlaxcala, Chiapas y Yucatán (Torres *et al.*, 2005).

En el año 2001, el INEGI reportó que el índice de mortalidad por cáncer gástrico había decrecido en los últimos diez años y pasó de 6.5 a 4.9 por cada 100,000 habitantes (Chihu *et al.*, 2005).

Dos años más tarde, Bosques-Padilla *et al.*, 2003 examinaron 261 pacientes con sintomatología gástrica quienes fueron sometidos a endoscopia gastrointestinal en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Monterrey, Nuevo León. Entre los pacientes estudiados, 209 (80.1%) padecían dispepsia no ulcerosa, 30 (11.5%) úlcera péptica y 22 (8.4%) alto grado de displasia o cáncer gástrico. La prevalencia total de *H. pylori* fue de 67.8%.

Ese mismo año, Leal *et al* determinaron la magnitud de la reinfección contra recrudescencia de la infección por *H. pylori* después del tratamiento. Se estudiaron pacientes niños y adultos con síntomas gastrointestinales superiores tratados en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de la Ciudad de México. La infección fue diagnosticada con la prueba de aliento de

la urea (UBT por sus siglas en inglés), histología y cultivo. Los pacientes infectados recibieron terapia triple y aquellos que resultaron UBT negativos después de 4-6 semanas del tratamiento se consideraron con la infección erradicada y fueron incluidos en el estudio. A 141 pacientes que se les erradicó la infección se les monitoreó la reincidencia con la UBT a los 3, 6, 9, 12, 18, y 24 meses. La bacteria fue aislada de biopsias gástricas antes del tratamiento y al tiempo de la reincidencia y los cultivos obtenidos se compararon por genotipificación. Durante este periodo, 32 (22.7%) casos de reincidencia fueron documentados la mayoría ocurrió durante el primer año. En 9 de los 32 (28.1%) casos, la reincidencia fue erradicada espontáneamente, sugiriendo que fueron reinfecciones transitorias. Los aislamientos de *H. pylori* de 12 casos de reincidencia fueron genotipificados; 9 (75%) fueron clasificados como verdaderas reinfecciones y 3 como recrudescencias.

Garza-González *et al.*, 2006 reportaron la genotipificación de los genes *vacA* y *cagA* de 50 aislamientos de *H. pylori* de pacientes de la región noreste del país. Los cultivos fueron caracterizados mediante la PCR y se investigó la correlación entre los genotipos y los diferentes diagnósticos clínicos. El genotipo más frecuente de *vacA* fue s2/m2. De los aislamientos 32 (64%) fueron *cagA* positivos. El genotipo s1/m1 fue asociado con cepas *cagA* negativas. No se encontró relación entre los genotipos de *vacA* y *cagA* y los diagnósticos clínicos.

Vallejos y colaboradores en el año 2009 realizaron un estudio transversal, retrospectivo y descriptivo de revisión de expedientes de enero a diciembre de 2007 sobre pacientes de la tercera edad infectados por *H. pylori* atendidos en el Hospital Regional de Puebla-ISSSTE. De 74 pacientes atendidos en el Servicio de Geriatría en

el tiempo estipulado, se encontraron 27 pacientes (36.48%) infectados por *H. pylori*: 17 hombres (62.96%) y 10 mujeres (37.04%). El rango de edad predominante fue de 80 a 84 años (40.74%) y las lesiones histológicas sobresalientes correspondieron a gastritis crónica en 19 pacientes (70.37%); cinco de ellos (18.52%) con úlcera duodenal; dos (7.41%), con úlcera gástrica y uno (3.7%), con carcinoma gástrico. El tipo de tratamiento predominante fue administración de amoxicilina, omeprazol y claritromicina (66.66%). El grupo de investigación concluyó que la prevalencia de infección por *H. pylori* aumenta considerablemente en la población geriátrica proponiendo continuar las investigaciones en estos pacientes con la exclusión de factores importantes predisponentes de patología digestiva y una evaluación conjunta de las condiciones histopatológicas de la mucosa gastroduodenal a fin de determinar con mayor exactitud el papel etiológico que cumple este microorganismo.

5.6.- *H. pylori* en agua y su asociación con la infección en el hombre.

Parra y Carballo, 1998 mencionan que uno de los primeros ensayos que relacionaron el agua contaminada con el riesgo de infección por *Helicobacter pylori*, se llevó a cabo en una población infantil (de 2 meses a 12 años) en diversas comunidades de Perú mediante un estudio epidemiológico similar al que en 1855 llevó a John Snow para desentrañar los orígenes de una epidemia de cólera en Londres y por el que identificaba la procedencia del agua como el principal factor de riesgo de la misma. El estudio peruano llegó a esta misma conclusión y demuestra que el agua es la variable de riesgo más importante, por encima incluso del estado socioeconómico de los grupos poblacionales.

En 1991, Klein *et al.*, realizaron un estudio epidemiológico en niños que tenían fuentes de agua externa en sus hogares, mismos que fueron tres veces más propensos a estar colonizados por la bacteria que aquellos con provisión de agua interna. Similarmente, en 1995, Fox, J.G. refiere que en estudios epidemiológicos de poblaciones en desarrollo, el agua y los vegetales crudos están relacionados con la transmisión de *H. pylori* y que su aislamiento a partir de heces de adultos y niños era indicativo de que la transmisión de la bacteria se realiza por vía fecal – oral y sostiene la teoría de que los alimentos y el agua pueden ser vehículos de contaminación, debido a que el patógeno tiene la habilidad de existir en el ambiente de una forma viable no cultivable e infectar si es digerida por un hospedero.

Ese mismo año, Enroth y Engstrand utilizaron una técnica de inmunoseparación magnética como tratamiento previo a la PCR para facilitar la detección directa de *H. pylori* en muestras de agua y heces. Produjeron antisuero hiperinmune de conejo y recubrieron perlas magnéticas con inmunoglobulina G purificada, la cual reaccionaba con las formas cocoides y bacilares de *H. pylori* y se unía a ellas. Muestras de agua de río inoculadas con ambas formas fueron tratadas con la técnica resultando positivas por PCR, mostrando que la detección del microorganismo es posible en muestras de agua del medio ambiente.

Posteriormente, Hulten *et al.*, 1996 colectaron 48 muestras de agua para beber en Pueblo Jóvenes, cerca de Lima, Perú. Ellos usaron perlas magnéticas recubiertas con inmunoglobulina G anti *H. pylori* para concentrar la bacteria y dos ensayos de PCR, uno para detectar el gen codificante de la adhesina y otro previamente validado para detectar el gen de la subunidad 16 del ácido ribonucleico

ribosomal (ARNr 16S). Se amplificó el fragmento del gen de la adhesina de 24 muestras y se amplificaron los fragmentos de ambos genes de 11 muestras. Concluyeron que los resultados confirmaron la presencia del patógeno en agua para beber en Perú y que fueron consistentes con las conclusiones de estudios epidemiológicos anteriores de la misma población.

Años después en los Estados Unidos de Norteamérica, Hegarty *et al.*, 1999, utilizaron anticuerpos monoclonales anti *H. pylori* para detectar al patógeno, encontrando bacilos vegetativos en la superficie y a poca profundidad de la mayoría de las 62 muestras de agua subterránea analizadas.

Horiuchi *et al.*, 2001 emplearon la PCR para detectar *H. pylori* en 10 muestras de agua de grifo, 6 de pozo, 10 de río y 10 de mar. Las muestras fueron filtradas en membranas con poro de 0.05 a 0.22 μm . La PCR fue hecha para amplificar el gen de la adhesina específica de la bacteria y el gen *ureA*. También se realizó una PCR tiempo real utilizando iniciadores para el gen ARNr 16S. Ninguna de las muestras de grifo, río o mar fueron positivas para algún gen, pero 2 de las muestras de pozo amplificaron el fragmento de gen ARNr 16S. Algunos de los usuarios del agua de pozo habían padecido infección por *H. pylori* en el pasado. El mismo año, Mazari-Hiriart *et al.*, 2001 se valieron del gen ARNr 16S para detectar *H. pylori* en 5 sistemas de agua de la Ciudad de México. Las muestras fueron tomadas entre 1997 y 2000 de pozos de extracción (sistema 1), presas usadas como fuente de agua para uso humano, antes y después de tratamiento (sistemas 2 y 3), aguas residuales tratadas (sistema 4) y no tratadas (sistema 5). La detección del gen se llevó a cabo usando PCR anidado en 139 muestras. Los resultados mostraron la

presencia del microorganismo en 58 (42%) de las muestras totales con prevalencia de 68% en el sistema 1, 100% en el 2, 0% en el 3, 17% en el 4 y 20% en el 5.

Baker y Hegarty, 2001 detectaron *H. pylori* en agua para consumo humano de pozos de extracción mediante el uso de métodos moleculares, la presencia de este patógeno se correlacionó con la infección en consumidores y con la presencia de *Escherichia coli*, indicador de contaminación fecal.

Bunn *et al.*, 2002, demostraron la relación existente entre la colonización por *H. pylori* en infantes menores de un año con el consumo de agua contaminada. Este grupo de investigadores detectaron el ADN de *H. pylori* en biopelículas presentes en agua para beber almacenada en ollas en una villa de Keneba, Gambia. El ADN fue 95% homólogo al gen ARNr 16S de una cepa de referencia.

Al igual que otros microorganismos que producen biopelículas como una forma de protegerse en sus nichos, *Helicobacter* spp. también es capaz de realizar este tipo de ambientes para soportar condiciones inadecuadas para su supervivencia como agotamiento de fuentes de carbono, temperaturas inadecuadas, entre otras; esto ha quedado demostrado por las investigaciones de Park *et al.*, 2001 quienes analizaron una sección de la pipa de distribución de unas cañerías removida de un ambiente urbano en el noreste de Escocia durante un trabajo de mantenimiento de rutina. Al retirarla, recolectaron una capa de biopelícula. Realizaron el análisis para detectar la presencia del DNA de *H. pylori* empleando PCR y éste produjo un resultado positivo.

Watson *et al.*, 2004 investigaron los sistemas de distribución de agua en Inglaterra como una fuente de infección. Las muestras de agua y biopelículas que ellos estudiaron fueron obtenidas de 11 propiedades domésticas, 7 educativas, de hidrantes y reservas de agua. Las muestras fueron cultivadas en medio no selectivo con antibióticos, combinado con separación inmunomagnética. No fueron aisladas bacterias viables en ninguna de las 151 muestras pero detectaron ADN de *H. pylori* en 26% de las muestras de propiedades domésticas, escuelas e hidrantes con la frecuencia más alta en biopelículas (42%). Watson concluyó que las biopelículas en las superficies de los sistemas de distribución podrían actuar como sitios para la acumulación pasiva del microorganismo o como reservorio potencialmente importante de la infección.

Fujimura *et al.*, 2004, colectaron muestras de agua de 4 ríos en Japón en tres puntos de cada uno, corriente arriba, a la mitad de su trayecto y corriente abajo. Se buscó ADN de *H. pylori* utilizando un PCR anidado y también se incluyeron 224 niños que vivían cerca de alguno de los ríos para medir la prevalencia de la infección. El ADN de la bacteria fue detectado en la parte media y corriente abajo de los 4 ríos. La prevalencia en los niños fue de 9.8% en aquellos que vivían cerca de la parte media y 23.8% corriente abajo, ambas fueron mayores que el valor en áreas distantes de los ríos (0%). Krumbiegel *et al.*, 2004, realizó dos estudios independientes. En el primero de ellos, determinó la prevalencia de *H. pylori* en niños de segundo año de dos condados rurales de las afueras de la ciudad de Leipzig, Alemania. Les realizó un cuestionario completo a los padres indagando detalles de las condiciones y estilo de vida incluyendo preguntas sobre beber agua de fuentes no públicas, nadar en aguas naturales, etc. El segundo estudio consistió en detectar ADN

de *H. pylori* en 157 muestras de agua de pozos privados utilizados en ambos condados. Los resultados mostraron que en el condado I, 5.7% de los niños dieron positivo y en el condado II, 6.6%. El análisis de grupo del cuestionario en ambos condados apuntó a “beber agua de fuentes no municipales”, como la variable asociada más cercana a la infección. La PCR mostró fragmentos de ADN del patógeno en 10.8% de las pozos en el condado I y 9.2% en el condado II.

Un estudio similar fue realizado por Cellini *et al.*, 2004 para determinar la presencia de *H. pylori* libre y asociado al plancton; ellos colectaron mensualmente agua de la costa Italiana del mar Adriático la cual primeramente filtraron utilizando redes de nailon con poro de 200 y 64 μm y posteriormente a través de membranas con poro de 0.22 μm . Utilizaron un PCR anidado con iniciadores dirigidos al gen *ureC*. La secuenciación del ADN de productos amplificados confirmó la especificidad del ensayo. La sensibilidad del PCR anidado fue de 62 unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 ml en muestras de agua inoculadas; de las 12 muestras colectadas mensualmente, 7 dieron positivas a la presencia del patógeno por lo que sugieren que el plancton puede ser un significativo reservorio y una ruta de transmisión potencial para el microorganismo.

Un año después, Queralt *et al.*, 2005 usó un PCR semianidado para detectar *H. pylori* en el noreste de España en heces humanas y muestras de agua del ambiente con alto rango de contaminación fecal, ambas matrices con una biota compleja. Se usaron antígenos para detectar la bacteria en heces y fue detectado en 33% de 36 muestras de heces, en 66% de aguas residuales y 11% de río. La contaminación fecal fue probada por la presencia de organismos indicadores.

Giao *et al.*, 2008, 2010 estudiaron el efecto de parámetros adversos sobre la persistencia y cultivo de *H. pylori* en biopelículas formadas en agua de beber; para ello, formaron biopelículas que posteriormente inocularon con el patógeno. El total de células de *H. pylori* se determinó usando un péptido del ácido nucleico 16S rRNA, mientras que el cultivo se realizó en un medio selectivo en el que no se detectó a la bacteria en ninguno de los tiempos analizados. Sin embargo, la transformación morfológica persistió y en los aglomerados no se detectó una disminución en el total de células que se inocularon a los 31 días de haber iniciado el estudio. Por el contrario, cuando el patógeno se colocó como cultivo puro, se obtuvo una disminución de la población total inoculada, lo que sugiere que la población autóctona juega un papel importante en la permanencia del patógeno, posiblemente por la formación de ambientes de microaerofilia o enlazando las biomoléculas a las cuales se adhiere. Por lo tanto, concluyen que los biofilms ofrecen no solo un refugio seguro para la bacteria sino también un mecanismo de concentración cuyo desprendimiento libera constantemente una especie de pastilla de células con carácter infeccioso por lo que es un motivo de preocupación para la salud pública; además, estudios posteriores llevados a cabo en el 2010 demostraron que *H. pylori* puede persistir en biopelículas expuestas a bajas concentraciones de cloro (0,2 – 1,2 mg/l) durante 26 días aunque sin recuperarse células viables lo que sugiere que la bacteria puede sobrevivir a la cloración.

5.7.- Correlación entre la prevalencia de *H. pylori* y la ingesta de vegetales crudos.

En México y América del Sur es común llevar a cabo el riego de cultivos vegetales para consumo humano con aguas residuales, de ahí que los vegetales pueden ser un vehículo importante de transmisión de infecciones gastrointestinales,

especialmente aquellos que crecen a nivel de suelo. Diversos estudios relacionados con la incidencia de *H. pylori* y el consumo de vegetales han sido realizados; Hopkins *et al.*, 1993 utilizaron una prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti *H. pylori* en 1815 Chilenos menores de 35 años de edad. La seroprevalencia fue mayor al 60% en grupos de bajo nivel socioeconómico y mediante un análisis de regresión logística, se relacionó su presencia a personas de mayor edad, bajo nivel socioeconómico y al consumo de vegetales crudos. Estudios previos habían sugerido que la contaminación de aguas de riego por aguas residuales y la subsiguiente contaminación de vegetales que se comen crudos es un factor clave en la transmisión de patógenos entéricos en Chile.

Goodman *et al.*, 1996 reportan una prevalencia de *H. pylori* de 69%, la cual se incrementó de 53% en niños de 2 años de edad a 87% en niños de 9 en una comunidad rural de los Andes Colombianos. Los niños que nadaban en ríos y albercas, bebían agua de río, tenían contacto con ovejas y consumían vegetales crudos fueron más propensos a tener la infección.

Herbarth *et al.*, 2001 realizaron la prueba UBT a 3,347 personas de la ciudad de Leipzig, Alemania. La prevalencia fue de 6.5 % en la ciudad y 5.7 % en condados rurales. Encontró que la infección con *H. pylori* en condados se incrementó considerablemente cuando los niños bebían agua de fuentes no municipales y señaló la posibilidad de que tocar y/o comer vegetales (pasto o flores) de jardines que son fertilizados con excremento humano puede ser una ruta de adquisición de la infección.

Para evaluar la supervivencia de *H. pylori* artificialmente inoculado en muestras de lechuga y zanahoria sanitizadas y/o esterilizadas, Gomes y De Martinis, 2004, tomaron porciones de 25 g y las inocularon con aproximadamente 10^6 UFC/g (de una cepa de referencia y un aislado clínico por separado), las empacaron bajo atmósfera normal y modificada (3% O₂, 10% CO₂, y 87 % N). Las muestras fueron almacenadas a 8 °C, con enumeración de colonias diariamente en Agar Sangre Columbia (CBA) y Agar Peptona Especial para *H. pylori* (HPSPA). Cuando se usó CBA con antibióticos, el microorganismo fue detectado hasta por 72 h en lechuga y zanahoria sanitizadas. En zanahorias esterilizadas, permaneció viable hasta por 96 h. El CBA sin antibióticos permitió la recuperación de la cepa de referencia de zanahorias almacenadas en ambas atmósferas hasta por 120 h. Los investigadores concluyen que con estos datos se refuerza aún más la transmisión de este patógeno a través de alimentos.

Recientemente Buck y Oliver, 2010 determinaron la capacidad de *H. pylori* para sobrevivir en una forma viable pero no cultivable (VBNC) cuando se asocia con espinacas encontrando que las células de *H. pylori* se convirtieron rápidamente en no detectables mediante siembra, sin embargo, las transcripciones de mRNA se detectaron 6 días después de que las células se introdujeron a la espinaca. Se encontró que la exposición a la luz blanca rápidamente inducía el estado viable no cultivable en la bacteria, lo que sugiere que la luz del sol puede ser un factor en la pérdida de la capacidad para ser cultivada. Esto, mencionan los investigadores, indica que las células de *H. pylori* asociadas a estos vegetales pueden permanecer viables y virulentas a pesar de su incapacidad para ser cultivados y explicar porque se dificulta su aislamiento a partir de fuentes ambientales

Chen *et al.*, 2005 realizó un estudio epidemiológico para evaluar la incidencia de la infección en zonas rurales y urbanas de Shangai, China. Analizó a 1925 personas, 976 hombres y 949 mujeres de entre 26 y 48 años de edad. Colectó sangre periférica para detectar anticuerpos anti *H. pylori*. El rango de infección fue de 66.4% en general; 68.4% en mujeres y 64.3% en hombres. La prevalencia de la infección se relacionó con factores como ingerir vegetales crudos y frutas sin previa desinfección.

5.8.- *H. pylori* y el potencial papel de los alimentos en su transmisión.

Bohmler *et al.*, 1996 inocularon grandes cantidades de *H. pylori* en leche y algunos productos lácteos. En las muestras de leche refrigeradas, la bacteria pudo ser reaislada después de 6 días a una densidad de hasta 10^3 UFC/ml. A 37 °C, el patógeno pudo ser detectado en leche por 3 o 4 días. En yogurt el agente permaneció viable solamente por 3 h, mientras que en kefir por 24 h y en queso con pH neutro por 10 h.

H. pylori ha sido cultivado de biopsias gástricas en medios que contienen agentes mínimamente selectivos. Sin embargo, se requiere de medios más selectivos para aislarlo de fuentes que contienen un mayor número de microorganismos contaminantes. Por ello, Stevenson *et al.*, 2000 realizaron un estudio para desarrollar técnicas de detección que fueran suficientemente selectivas en el aislamiento de la bacteria de fuentes potenciales de alimentos y animales. El patógeno creció bastante bien en HPSPA suplementado con 10 mM de urea a pH 4.5, pero este pH no inhibió suficiente el crecimiento de contaminantes. Entonces, se compararon varias

combinaciones de antibióticos, y la combinación de 10 mg/l de vancomicina, 5 mg/l de anfotericina B, 10 mg/l de cefsulodine, 62 000 IU/l de sulfato de polimixina B, 40 mg/l de trimetoprim, y 20 mg/l de sulfametoxazol resultó ser altamente selectivo pero aún permitió el crecimiento de colonias robustas de *H. pylori*.

En otro estudio de supervivencia, Poms y Tatini, 2001 inocularon 10^4 UFC de una cepa de referencia de *H. pylori* en varios alimentos frescos y semiprocados listos para consumirse y en pollo crudo. Los alimentos fueron almacenados a 4 °C. Las células fueron concentradas por dos ciclos de centrifugación seguidos por cultivo en agar sangre selectivo hecho de agar Wilins-Chalgren suplementado con 5% de sangre de caballo, y 30 mg/l de colistin metasulfonato, 100 mg/l ciclohexamida, 30 mg/l ácido nalidíxico, 30 mg/l trimetoprim, y 10 mg/l vancomicina. La bacteria fue recuperada de leche pasteurizada y tofu hasta por 5 días y de hojas de lechuga y pollo crudo por 2, no así de yogurt. El mismo año, Dore *et al.*, 2001, quien previamente habían demostrado una prevalencia de casi 100% en pastores de una comunidad, detectó la presencia de *H. pylori* en leche y tejido gástrico de ovejas. Se efectuaron cultivos y PCR de las muestras utilizando 3 pares de iniciadores, uno para el gen ARNr 16S y dos para *vacA*. Se encontró ADN en 60% (38/63) de las muestras de leche y 30% (6/20) de tejido gástrico. También se cultivó la bacteria de ambas muestras.

Brown *et al.*, 2002 realizaron un estudio para determinar la infección en 3288 adultos de la provincia de Shandong, China. Encontraron que 1994 personas fueron seropositivos, 1019 seronegativos y 275 indeterminados. La seroprevalencia fue elevada para aquellos que no se lavaban las manos antes de comer sugiriendo que los

alimentos pueden ser un vehículo para transmitir la infección. En el mismo año, Fujimura *et al.*, 2002 demostraron la presencia de *H. pylori* en leche de vaca mediante el uso de PCR semianidado, cultivo y micrografía electrónica. El PCR semianidado demostró presencia del gen *ureA* del patógeno en 13 de 18 (72.2%) muestras de leche sin procesar y en 11 de 20 (55%) de leche comercial pasteurizada. Se demostró la presencia de formas bacilares y cocoides de la bacteria unidas a perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti *H. pylori* a través de microscopía electrónica. Además, se cultivó el patógeno de una muestra de leche sin procesar, no así de muestras pasteurizadas.

En el 2004, Gomes y de Martinis, evaluaron la sobrevivencia de cepas clínicas y de referencia de *H. pylori*, inoculadas artificialmente en 25 g de muestra de lechugas y zanahorias (10^6 CFU/g) y empacadas bajo atmosferas normales y modificadas (3% Oxígeno, 10% Dióxido de Carbono y 87% Nitrógeno). Las muestras fueron incubadas a 8 °C y se cuantificó diariamente la población de la bacteria en agar sangre Columbia con y sin antibióticos (CBA). Los resultados mostraron recuperación del patógeno en CBA hasta por 72 h en lechuga y zanahoria sanitizadas, mientras que en zanahoria esterilizada permaneció viable hasta por 96 h mientras que en el medio de cultivo sin antibióticos la recuperación fue hasta por 120 h; resultados similares fueron obtenidos en ambas atmósferas de empaque.

5.9.- Factores ambientales que podrían influir en la transmisión de la infección.

La existencia de la vía fecal-oral en la transmisión de *H. pylori* depende parcialmente de la habilidad de este microorganismo para sobrevivir al menos por un tiempo limitado en el ambiente. Cuando la bacteria es expuesta a condiciones

adversas, su morfología cambia de bacilos viables a formas cocoides viables no cultivables, las cuales siguen siendo infectivas y con una resistencia tal que cuando llegan a un ambiente propicio, revierten su estado a formas viables que pueden infectar, estos aspectos son sustentados en trabajos de investigación en donde se establece que las moscas, debido a su constante contacto con la materia fecal del hombre y de los animales, está involucrada con frecuencia en la diseminación de bacterias de importancia en salud pública, como las causante de cólera, shigelosis y salmonelosis. Algo similar se puede presentar cuando la bacteria forma biopelículas para protegerse de algún ambiente hostil que se le pueda presentar. (Greenberg, 1965; Greenberg, 1971; Fotedar *et al.*, 1992; Grübel *et al.*, 1997; Andersen and Rasmussen, 2009).

Dado que las moscas habitualmente producen y se alimentan de excremento, es posible que actúen como vectores en la transmisión de *H. pylori* si cargan la bacteria y contaminan los alimentos del hombre. Grübel *et al.*, 1997 realizaron un experimento donde desinfectaron pupas de mosca (*Musca doméstica*) y las moscas resultantes fueron expuestas a cultivos frescos de *H. pylori*. Al contrario de las moscas control, bacterias viables pudieron ser aisladas del cuerpo de las moscas expuestas hasta por 12 h y del intestino y excreta hasta por 30 h. Análisis histológicos revelaron organismos parecidos a *Helicobacter spp.* en el lumen y adheridos a células epiteliales del intestino. Otro factor importante y que puede influir en la diseminación de la bacteria es cuando las moscas vierten enzimas para digerir los alimentos antes de tragarlos, ya que si la bacteria esta presente en el intestino, hay posibilidad de que en las enzimas que vierte al alimento también vaya la bacteria.

Se han realizado varios estudios con el propósito de demostrar la viabilidad de las formas cocoides no cultivables de *H. pylori*. Uno de los primeros trabajos encaminados a este propósito fue realizado por Adams *et al.*, 2003 investigaron la capacidad de este microorganismo para desarrollar cuando se sembraba en un medio de cultivo simple como el agar para cuenta en placa; verificando su viabilidad y morfología mediante tinción con ensayos BacLight de vida/muerte en cultivos de laboratorio y ambientes acuáticos naturales. Los resultados mostraron que, a pesar de la pérdida de células cultivables en todas las condiciones ambientales probadas, un gran número de células permanecieron viables.

Fei-Fei *et al.*, 2003 demostraron que las formas cocoides de *H. pylori* presentes en agua son capaces de colonizar la mucosa gástrica y causar gastritis en ratones. Para ello, convirtieron tres cepas aisladas de biopsias gástricas en formas cocoides al exponerlas 40 días a agua de grifo estéril. Después, infectaron ratones con 0.4 ml (10^9 UFC/ml) de una suspensión de las formas cocoides y bacilares por separado. La colonización fue comprobada con la prueba de ureasa en la mucosa gástrica, cultivo y micrografía electrónica. De los ratones infectados con bacilos, 93% (15/16) dieron positivo en la prueba de ureasa y de 87.5% (14/16) se cultivó la bacteria. De los ratones infectados con formas cocoides, 50% (8/16) y 68.8% (11/16) respectivamente. Los resultados demuestran que, aunque la virulencia de las formas cocoides inducidas por agua disminuye, estas aún retienen una considerable actividad de ureasa y habilidad de adherirse a células del epitelio gástrico. Además, los flagelos fueron todavía observados como componente celular de las formas cocoides en el microscopio electrónico.

Sasaki *et al.*, 1999 intentaron detectar la bacteria en el ambiente natural en una región de Japón con alto índice de infección. Para ello colectaron agua de grifo y pozo así como tierra de los alrededores de residencias de personas que habían dado positivo en un estudio epidemiológico anterior y muestras de agua de ríos y estanques, moscas y heces de vaca en la región. Los resultados fueron totalmente satisfactorios ya que encontraron ADN de *H. pylori* en todas las muestras utilizando un PCR anidado para su detección.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.- Material Biológico.

Un total de 226 muestras de agua y alimentos se analizaron para la detección de *H. pylori*. 126 muestras de alimentos consistieron de vegetales hortícolas frescos como lechuga, repollo y cilantro; aguas frescas sabor limón, piña y melón; así como tacos que se expenden en la vía pública a base de carne picada, cilantro y cebolla. Todas se remitieron al laboratorio, bajo condiciones de refrigeración, para su estudio. Las muestras de agua, correspondientes a 100 en total, consistieron de agua purificada, agua de la red, agua de pozo y agua de río que, de igual forma, fueron remitidas a la zona de trabajo en condiciones controladas de baja temperatura.

Se utilizó como control positivo la cepa de referencia de *H. pylori* ATCC 43504, procedente del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) perteneciente al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), Cuernavaca, Morelos, y crioconservó hasta su uso como cepa testigo y para continuar obteniendo cultivos nuevos.

6.2.- Selección de iniciadores.

Se seleccionaron aquellos iniciadores que amplificaran secuencias del genoma de *H. pylori* y que estuvieran reportados en el Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos de América. Se analizaron también secuencias de nucleótidos reportadas para *H. pylori*.

6.3.- Simulación de PCR.

Se realizaron simulaciones de la reacción en cadena de la polimerasa a través del programa AmplifiX 1.37 para seleccionar los iniciadores que presentaron una mejor alineación y aquellos que resultaron mas adecuados fueron seleccionados para realizar su síntesis e iniciar su uso en las pruebas correspondientes.

6.4.- Procesado de las muestras.

6.4.1.- Vegetales

La lechuga (*Lactuca sativa*), el repollo (*Brassica oleraceae var. viridis*) y el cilantro (*Coriandrum sativum*), se procesaron pesando 50 g de cada una de ellas los cuales se lavaron con solución salina fisiológica estéril con agitación manual durante 30 segundos. El agua de lavado resultante se filtró a través de gasa estéril con la finalidad de eliminar los sólidos remanentes del enjuague; la solución obtenida se filtró nuevamente a través de una membrana estéril (Millipore) cuyo tamaño de poro correspondió a 0.22 μm . Se recuperó la membrana del portafiltras y se cortó en trozos pequeños para introducirlos en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y a partir de ellos se llevó a cabo la extracción de ADN de los microorganismos retenidos.

6.4.2.- Aguas frescas sabor limón, piña y melón.

Fueron homogeneizadas en el recipiente de colecta y enseguida se tomaron 100 ml para filtrarlos a través de gasa estéril. Del filtrado obtenido se tomaron 20 ml y se diluyeron con 180 ml de solución salina fisiológica, se homogeneizó esta dilución para posteriormente ser filtrada con membrana estéril misma que se procesó de igual forma que en el apartado 6.4.1.

6.4.3.- Tacos.

Las muestras fueron sometidas a lavado con 100 ml de solución salina estéril, la solución resultante se filtró a través de la gasa estéril para eliminar todos los residuos de la muestra. Del agua de lavado se realizó una dilución de 10^{-1} la cual se volvió a filtrar a través de la membrana estéril misma que se procesó siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 6.4.1.

6.4.4 Agua purificada.

Un litro de agua de diferentes marcas fueron filtrados a través de una membrana estéril (Millipore) cuyo tamaño de poro correspondió a 0.22 μm ; posteriormente, la membrana se cortó en pedazos pequeños mismos que se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml y a partir de ellos se llevó a cabo la extracción de ADN de los posibles patógenos buscados y retenidos en la membrana de celulosa.

6.5.- Cultivo de cepa de referencia *H. pylori* ATCC 43504.

6.5.1.- Cultivo en medio sólido.

Se descongeló en hielo un criotubo que contenía cepa congelada a -70°C en caldo BHI con 30% de glicerol, se tomaron 200 μl utilizando micropipeta y puntillas estériles y se agregaron en diferentes zonas de una placa con agar soja tríptica (DifcoTM) adicionado con 5% sangre de caballo (OXOID) y vancomicina (FLUKA) 10 mg/l; posteriormente se esparció mediante movimientos laterales de la placa. Se incubó en atmósfera microaerofílica (10% de CO_2) a 37°C de 48 a 72 horas, hasta 4 días. Después de la incubación se realizaron pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa y ureasa) y tinción de Gram. Si las pruebas bioquímicas resultaban positivas, la tinción de Gram negativa y la morfología bacilar espirilada se levantaba el crecimiento bacteriano utilizando asa bacteriológica y se estriaba en todo el agar de una placa nueva. Se incubó de 48 a 72 horas y se realizaron de nuevo pruebas bioquímicas y tinción de Gram.

6.5.2.- Cultivo en medio líquido.

Con un hisopo estéril se levantó el crecimiento bacteriano de una placa de agar sangre de 48 a 72 horas de incubación y se inoculó en 25 ml de caldo Brucella (BBLTM) adicionado con suplemento selectivo (*Helicobacter pylori* Selective Supplement (OXOID): Vancomicina 10 mg/l; Cefsulodine 5 mg/l; Trimetroprim 5 mg/l; Anfotericina B 5 mg/l) y 10% de suero fetal bovino (GIBCO) contenido en tubos cónicos de 50 ml. Se incubó en atmósfera microaerofílica durante 48 a 72 horas en agitación constante. Finalmente se centrifugó por 20 minutos a 10,000 gravedades a 4°C y se realizaron pruebas bioquímicas y tinción de Gram.

6.6.- Pruebas Bioquímicas

6.6.1.- Prueba de Oxidasa: En un cuadro de una placa de Dry Slide Oxidase se colocó una porción pequeña de cultivo; en un tiempo breve, ocurrió una reacción que dio coloración azul cuando la bacteria fue oxidasa positiva e incolora cuando fue oxidasa negativa.

6.6.2.- Prueba de catalasa: En un portaobjetos se colocó una gota de peróxido de hidrógeno y se le adicionó una pequeña asada del cultivo, cuando se produjeron burbujas la prueba se consideró positiva.

6.6.3.- Prueba de ureasa: En una placa de 96 pozos se colocaron 200 μ l de urea 6M pH 6 con rojo fenol por pozo y se agregó una asada de cultivo, si la enzima ureasa se encontraba presente la urea se degradaba a CO_2 y NH_4^+ , este último alcalinizó el medio provocando el viraje a rosa intenso, indicando un resultado positivo.

6.7.- Proceso de congelación de cepa.

6.7.1.- A partir de cultivo en medio sólido.

Con un hisopo estéril se levantó todo el crecimiento bacteriano, se disolvió en un criotubo con 1 ml de caldo BHI (BactoTM) con 30% de Glicerol (Analytika[®]) y se congeló a -70 °C.

6.7.2.- A partir de cultivo en medio líquido.

Los tubos cónicos que contenían el medio con crecimiento bacteriano fueron centrifugados a 10, 000 gravedades por 20 minutos a 4 °C. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml de caldo BHI con 30% de Glicerol. Empleando micropipeta y puntilla estéril se transfirió a un criotubo y se congeló -70 °C.

6.8.- Extracción de ADN de cepa de referencia.

De las cajas Petri con cultivo bacteriano se tomaron un par de asadas y se resuspendieron en 400 μ l de solución de extracción A (Tris HCl pH 7.5, 0.1 M; EDTA 0.1 M; NaCl 0.1 M; SDS 0.5 %) contenido en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se incubó a 65 °C por 30 min, se atemperó la muestra por 5 min y posteriormente se le agregaron 800 μ l de solución de extracción B (LiCl 6M; KOAc 5M, en proporción 10:4) y se mezcló por inversión. Enseguida se incubó en hielo de 10 min a 2 horas, luego se centrifugó 15 min a 14,000 rpm para posteriormente transferir 1 ml del sobrenadante a un tubo nuevo. Se volvió a centrifugar 15 min a 14000 rpm y se decantó el sobrenadante a un tubo nuevo. A continuación, se agregaron 500 μ l de isopropanol frío y se mezcló por inversión, luego se incubó a -20 °C por 20 min. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó nuevamente 15 min a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante, los tubos se colocaron en posición invertida sobre papel absorbente para permitir evaporar los restos de isopropanol. La pastilla de ADN se lavó con 200 μ l de etanol al 70 %. Después se centrifugó 5 min a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante utilizando micropipeta. El exceso de etanol se secó a 37 °C sin permitir que se secara totalmente la pastilla de

ADN. Finalmente se resuspendió el ADN en 20 µl de agua mili-Q y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

6.9.- Reacción de PCR de cepa de referencia.

El protocolo de amplificación fue: en un tubo de reacción de 500 µl se mezclaron 25 pmol de cada iniciador específico para cada gen, 5 µl de solución de reacción 10X (NH₄ sin MgCl₂), 2.5 µl de MgCl₂ 25 mM, desoxinucleótidos en concentración final de 200 µM cada uno, 2.5 unidades de la enzima BiolaseTM DNA polimerasa (Bioline). Se agregaron 2 µl de DNA templado y se completó con agua mili-Q estéril a un volumen de 25 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador ThermoHybaid con un programa de temperaturas de 5 minutos de predesnaturalización a 94 °C, seguido de 30 ciclos, cada uno de los cuales incluyó un paso de desnaturalización de 50 segundos a 94 °C, uno de alineamiento de 55 segundos a 67 °C y uno de polimerización de 50 segundos a 72 °C, finalmente se incubó por 5 minutos a 72 °C.

6.10.- Extracción de ADN de las muestras.

6.10.1.- Lechuga, repollo y cilantro.

A las membranas resultantes del procesado de las muestras de vegetales se les realizó la extracción de ADN según protocolo del apartado 4.1.

6.10.2.- Aguas sabor limón, piña y melón.

A las membranas resultantes del procesado de las muestras de aguas de frutas se les realizó la extracción de ADN según protocolo del apartado 4.2.

6.10.3.- Tacos.

A las membranas resultantes del procesado de las muestras de tacos se les realizó la extracción de ADN según protocolo del apartado 4.3, pero se agregó un lavado con 0.6 volúmenes de cloroformo antes de agregar el isopropanol para eliminar el exceso de materia orgánica. Se agregaron 600 µl de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó 5 minutos a 10, 000 rpm, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se procedió según el protocolo.

6.10.4.- Agua purificada

Las membranas cortadas y colocadas en el tubo Eppendorf se resuspendieron en 400 μ l de solución de extracción A (Tris HCl pH 7.5, 0.1 M; EDTA 0.1 M; NaCl 0.1 M; SDS 0.5 %) contenido en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se incubó a 65 °C por 30 min, se atemperó la muestra por 5 min y posteriormente se le agregaron 800 μ l de solución de extracción B (LiCl 6M; KOAc 5M, en proporción 10:4) y se mezcló por inversión. Enseguida se incubó en hielo de 10 min a 2 horas, luego se centrifugó 15 min a 14,000 rpm para posteriormente transferir 1 ml del sobrenadante a un tubo nuevo. Se volvió a centrifugar 15 min a 14000 rpm y se decantó el sobrenadante a un tubo nuevo. A continuación, se agregaron 500 μ l de isopropanol frío y se mezcló por inversión, luego se incubó a -20 °C por 20 min. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó nuevamente 15 min a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante, los tubos se colocaron en posición invertida sobre papel absorbente para permitir evaporar los restos de isopropanol. La pastilla de ADN se lavó con 200 μ l de etanol al 70 %. Después se centrifugó 5 min a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante utilizando micropipeta.

6.11.- Reacción de PCR de las muestras.

Para realizar las PCR de las muestras se procedió conforme a la metodología descrita en el apartado 9, solo que la cantidad de ADN templado (2 μ l) se sustituyó por un volumen de 7 μ l de extracto crudo de la muestra a analizar. Además, para su correcta visualización en gel de agarosa, se debió reamplificar en una segunda PCR con estas mismas condiciones utilizando como ADN templado el contenido en la primera PCR, aunque la cantidad de ADN templado (7 μ l) se sustituyó por 4 μ l.

6.12.- Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez terminada la reamplificación, los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) (AMRESCO) disuelta en solución amortiguadora TBE 1X (445 mM Tris-borato, 10 mM EDTA pH 8).

Del producto reamplificado, o del producto de la PCR directa en el caso de la cepa de referencia, se tomaron 5 μ l y se mezclaron con 1 μ l de jugo azul (Xilen cianol más azul de bromofenol). El volumen total se depositó en el gel y en un extremo 5 μ l del marcador de peso molecular. El gel permaneció sumergido en una cámara de electroforesis (Labnet) que contenía solución amortiguadora TBE 1X, la migración de

los fragmentos se realizó a un flujo eléctrico de 90 V y cuando el frente del corrimiento (dado por la banda azul del colorante) llegó a $\frac{3}{4}$ partes del gel, se eliminó la corriente y el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.005 $\mu\text{g/ml}$) por 8 minutos. Pasado el tiempo de tinción el gel se colocó sobre la superficie de un transiluminador (UV Transilluminator UVP Model 20) para observar las bandas de DNA teñido por el bromuro de etidio y el tamaño de los fragmentos obtenidos se comparó con los del marcador de peso molecular preestablecido. Finalmente los geles fueron fotografiados con una cámara Olympus C-4000 Zoom adaptada con filtro para luz ultravioleta.

6.13.- Determinación de la sensibilidad de la metodología empleada.

6.13.1.- Conteo de células por diluciones.

A partir de una caja de agar con crecimiento de *H. pylori* se tomó cepa y se disolvió en caldo BHI adicionado con suplemento selectivo hasta ajustar su absorbancia a 0.100 a 600 nm de longitud de onda (Espectrofotómetro SP-830 TURNER®). Se realizaron diluciones hasta 10^7 . De las diluciones 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 se inocularon por triplicado 100 μl en agar soja tríptica adicionado con 7.5% sangre de caballo más suplemento selectivo y se incubaron en microaerofilia a 37 °C por 10 días. Al pasar el tiempo de incubación se contaron las colonias típicas de *H. pylori* por cada dilución y se les realizó pruebas bioquímicas y tinción de Gram.

6.13.2.- Inoculación de células en muestras vegetales.

Se inocularon 1-2, 15, 30 y 45 células de *H. pylori* en muestras de 25 g de lechuga y repollo y 10 g de cilantro previamente desinfectadas según Jonson *et al.*, 1997. Las muestras se mantuvieron a temperatura de refrigeración durante 168 horas hasta procesarlas.

6.13.3.- Extracción de ADN y PCR de muestras inoculadas.

Se procesaron las muestras según protocolo del apartado 4 y se realizó extracción de ADN a las membranas resultantes, pero las muestras inoculadas con 1-2 células se resuspendieron en 10 μl de agua mili-Q y las inoculadas con 15, 30 y 45 células en 20 μl . Posteriormente se llevó a cabo la PCR directa utilizando 10 μl de ADN templado para reducir a la mitad la cantidad de ADN obtenido, por lo que teóricamente fueron 1-2, 7-8, 15 y 22-23 células las que se intentó detectar, y se visualizaron los productos en gel de agarosa al 1.5 %. Se efectuó una segunda PCR para reamplificar ADN a partir de

la primera utilizando 2 μ l de ADN templado y se visualizaron los productos en gel de agarosa al 1.5%.

7. RESULTADOS

7.1.- Selección de iniciadores.

Se seleccionaron iniciadores previamente validados para la detección y tipificación de variantes genéticas de *H. pylori* asociadas a la enfermedad gastroduodenal. Para la tipificación de los genes *vacA* y *cagA* se utilizaron iniciadores modificados a partir de los reportados por Zamudio *et al.*, 2002. Para la región del péptido señal del gen *vacA* se utilizaron los iniciadores VA1FM (5'GGAAATACAACAAACACACCGC3') y VA1xR (5'CCTGARACCGTTCCTACAGC 3'). Para la región intermedia del gen *vacA* se utilizaron los iniciadores HPMGF (5'CACAGCCACTTTCAATAACGA3') y HPMGR (5'CGTCAAAATAATTCCAAGGG3'). Para detectar la presencia del gen *cagA*, se emplearon CagAF (5'TTGACCAACAACCACAAACCG3') y CagAR (5'CTTCCCTTAATTGCGAGATTCC3').

7.2.- Simulaciones de PCR.

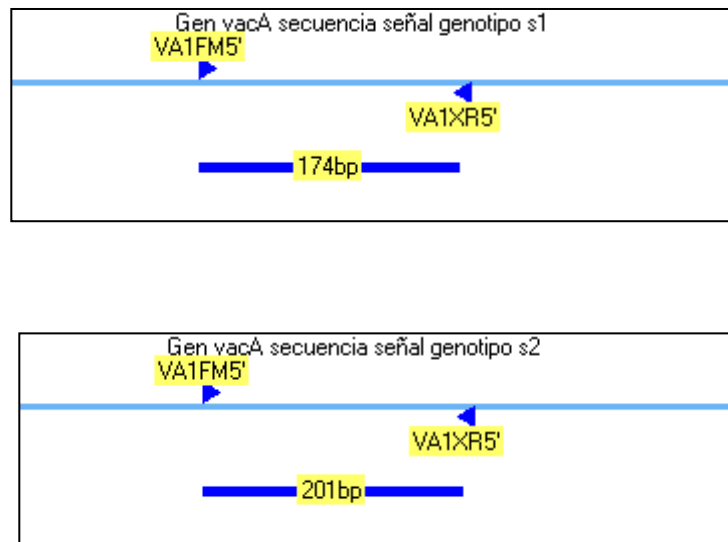


Fig. 3. Región del péptido señal del gen *vacA*.

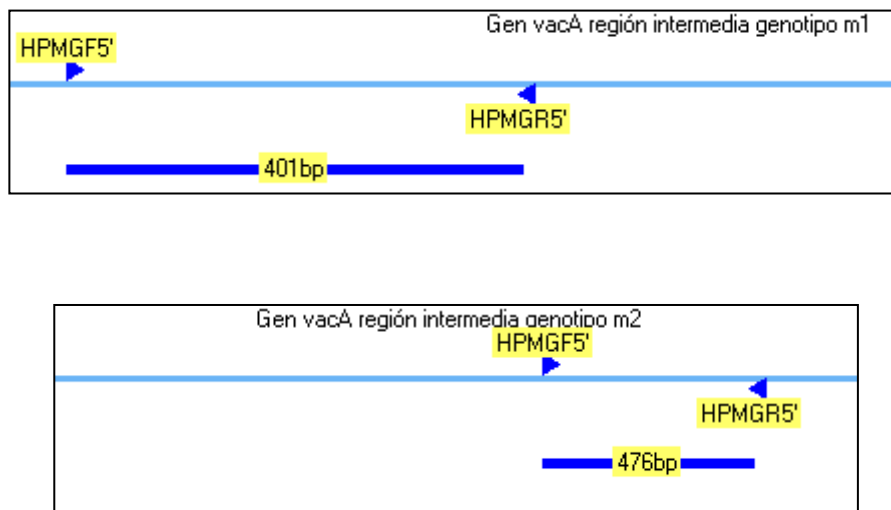


Fig 4. Región intermedia del gen *vacA*.

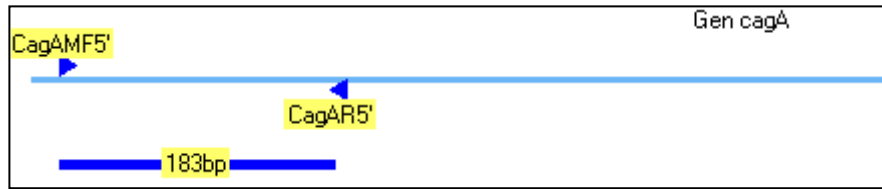


Fig 5. Gen *cagA*.

7.3.- Procesado de las muestras.

7.3.1.- Lechuga, repollo y cilantro.

Para solucionar que se taparan las membranas cuando se quiso filtrar una dilución del vegetal que fue homogeneizada en licuadora, las muestras de vegetales fueron colocadas en un vaso de precipitado estéril de 1000 ml en donde se realizó un lavado de cada una de las muestras y el agua resultante se filtró a través de una membrana milliporo de 0.2 μ misma que fue utilizada posteriormente para la extracción del DNA.

Para las muestras de repollo la cantidad de solución filtrada fue mayor que para las muestras de lechuga y cilantro, esto debido a que el repollo es un vegetal de consistencia más rígida que la lechuga al ser remojados en solución y con ello desprende menor cantidad de fibra, además de que no liberó grandes cantidades de pigmentos como el cilantro. Ambas situaciones, la fibra y los pigmentos, fueron la causa de que se filtrara menos solución en las muestras de lechuga y cilantro que en las de repollo (Tabla 1).

Tabla I. Cantidad de solución filtrada de las muestras vegetales.

Vegetal	Cantidad de solución filtrada (ml)
Lechuga	63.3
Repollo	79.6
Cilantro	65.0

7.3.2.- Aguas sabor limón, piña y melón.

Para poder filtrar las aguas sabor limón y piña se llevó a cabo una dilución 10^{-1} mientras que para las aguas sabor melón se realizó una dilución más (10^{-2}), pese a esto la cantidad de solución filtrada fue 33% menor (Tabla 2). La causa de ello fue la misma que para la lechuga y el cilantro, la gran cantidad de fibra y pigmentos liberados en la preparación del producto obstruyó con facilidad los poros de las membranas.

Tabla II. Cantidad de solución filtrada de las aguas de frutas.

Aguas de frutas	Dilución	Cantidad de solución filtrada (ml)
Limón	10^1	75
Piña	10^1	70
Melón	10^2	50

7.3.3.- Tacos.

Los tacos tuvieron una mayor cantidad de componentes lo que dificultó aún más su procesamiento. Además de la fibra producto del licuado de las salsas y de la carne y tortilla al ser remojadas en solución, las muestras presentaban gran cantidad de grasa

líquida. Para lograr filtrar en promedio la mitad de la solución (50 ml) primero se lavó, luego se diluyó (10^1) y finalmente se utilizaron dos membranas para filtrar.

7.3.4.- Agua potable y agua purificada.

En el caso de las muestras de agua que fueron analizadas no se presentó dificultad alguna para su proceso, sin embargo, no se logró demostrar amplificación de DNA de *H. pylori* en ninguna de ellas.

7.4.- Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN de todas las muestras y de la cepa de referencia se utilizó la técnica de precipitación con cloruro de litio, la cual implica la desestabilización de membranas con un agente quelante (EDTA) y un detergente (SDS) y posteriormente la formación de poros a bajas temperaturas. Las primeras muestras procesadas fueron los vegetales, se extrajo ADN de los microorganismos atrapados en las membranas utilizadas en el proceso de filtración y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar si había ADN lo cual, y a pesar de la tinción con bromuro de etidio no se lograron visualizar las bandas que denotaran la presencia de ADN, por lo que se decidió, en lo posterior, no verificar la presencia de ADN en los extractos crudos y realizar directo la PCR.

El proceso de extracción de ADN se vio afectado por la fibra y pigmentos liberados por las muestras, no obstante esto se disminuyó al agregar un paso más de centrifugación en el caso de vegetales y aguas de frutas y además otro de separación de

componentes orgánicos con cloroformo en el caso de los tacos. A pesar de esto, quedaron trazas de ambos componentes al resuspender el ADN extraído.

7.5.- Reacción de PCR directa.

La PCR directa no demostró ADN de *H. pylori* en ninguna de las muestras analizadas por lo que se tomaron como negativos. Sin embargo, los productos de PCR de las muestras de agua sabor limón evidenciaron la presencia de fragmentos de ADN de tamaño similar al esperado, aunque en forma de barrido que no permitió distinguir con claridad las bandas de ADN. Por lo anterior, se decidió realizar una reamplificación a partir de la PCR directa de las aguas sabor limón. La reamplificación permitió observar claramente las bandas de ADN esperadas por lo que también se reamplificó a partir de las PCR directas de las muestras de lechuga, repollo, cilantro, aguas sabor piña, melón y de tacos.

7.6.- Reamplificación de ADN a partir de la PCR directa.

Las reamplificaciones demostraron la presencia de ADN de *H. pylori* en el 41.26% de las muestras totales analizadas: 5 de 25 muestras de lechuga, 9 de 25 de repollo y 9 de 25 de cilantro. También en 8 de 10 muestras de agua sabor limón, 6 de 10 sabor piña y 1 de 10 sabor melón. Además, en 14 de 25 de las muestras de tacos. En las muestras de agua potable y agua purificada no se logró detectar amplificación en ninguna de las muestras analizadas (Tabla 3 y IV) (Figura 6 y 9).

Tabla 3. Total de muestras positivas y su porcentaje total e individual.

Tipo de muestra	Número de muestras positivas	Porcentaje (%)
Lechuga	5/25	20
Repollo	9/25	36
Cilantro	9/25	36
Agua sabor limón	8/10	80
Agua sabor piña	6/10	60
Agua sabor melón	1/10	10
Tacos	14/25	56
Agua potable	0/25	0%
Agua purificada	0/25	0%
TOTAL	52/180	28.8%

Tabla 4. Fragmentos de genes amplificados de las muestras positivas.

Tipo de muestra	<i>vacA</i> (+)	<i>cagA</i> (+)	<i>vacA</i> y <i>cagA</i> (+)
Lechuga	-	5	-
Repollo	-	8	1
Cilantro	1	8	-
Agua sabor limón	-	8	-
Agua sabor piña	-	6	-
Agua sabor melón	-	1	-
Tacos	-	14	-
Agua potable	-	-	-
Agua purificada	-	-	-

Nota: De las 52 muestras positivas, una de cilantro amplificó solo el fragmento m2 del gen *vacA*; una de repollo amplificó el fragmento del gen *cagA* y el fragmento m1 del gen *vacA*; las restantes muestras amplificaron solo el fragmento del gen *cagA*.

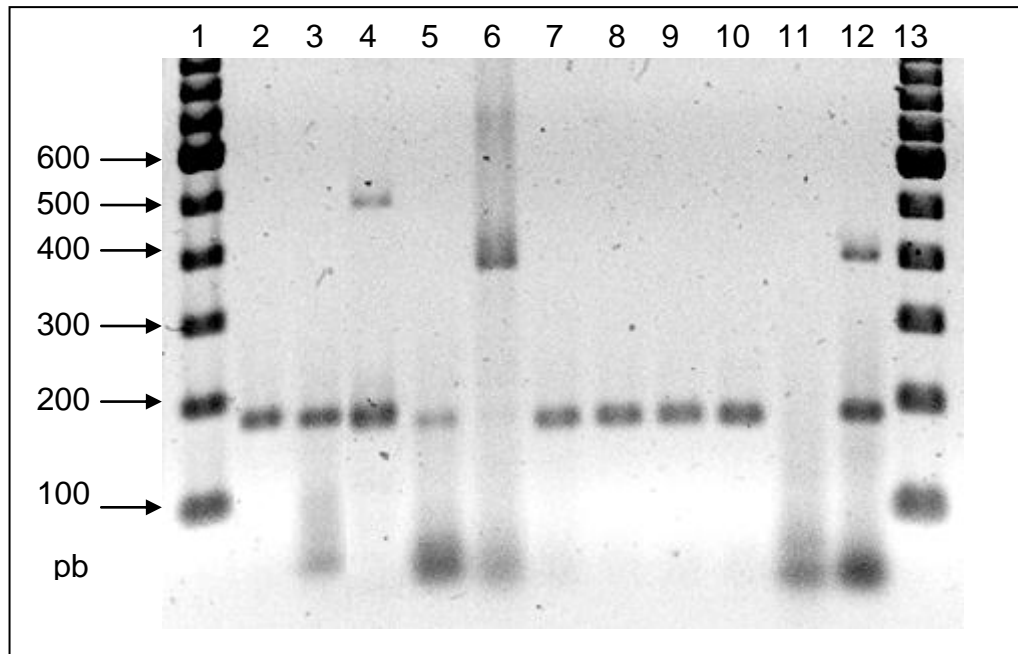


Figura 6. Fragmentos derivados de las reamplificaciones a partir de la PCR directa de las muestras y su genotipificación. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: lechuga *cagA* (+); carriles 3: repollo *cagA* (+); carril 4: repollo *cagA* (+), *vacA* m2 (+); carriles 5: cilantro *cagA* (+); carril 6: cilantro *vacA* m1 (+); carril 7: agua sabor limón *cagA* (+); carril 8: agua sabor piña *cagA* (+); carril 9: agua sabor melón *cagA* (+); carril 10: tacos *cagA* (+); carril 11: control negativo; carril 12 control positivo; carril 13: marcador de peso molecular.

7.7.- Determinación de la sensibilidad de la metodología empleada.

7.7.1.- Conteo de células por diluciones.

Se observaron colonias de *H. pylori* en las 3 placas inoculadas con 100 μ l de la dilución 10^4 . El promedio de colonias positivas fue de aproximadamente 15 por placa.

7.7.2.- Inoculación de células en muestras vegetales y PCR.

De las muestras de lechuga, repollo y cilantro inoculadas con 1-2, 15, 30 y 45 células, la PCR directa evidenció ADN de *H. pylori* en 1 de 3 cuando se usaron 7-8 cadenas de ADN templado, 2 de 3 cuando se usaron 15 y 3 de 3 cuando se usaron 22-23, sin

embargo los fragmentos se observaron tenues (Figura 7). La reamplificación permitió observar con mayor claridad ADN de *H. pylori* en cada una de las muestras inoculadas con 15, 30 y 45 células, no así en las muestras inoculadas con 1-2 células, por lo que el límite de detección fue de 7 a 8 células (Figura 8).

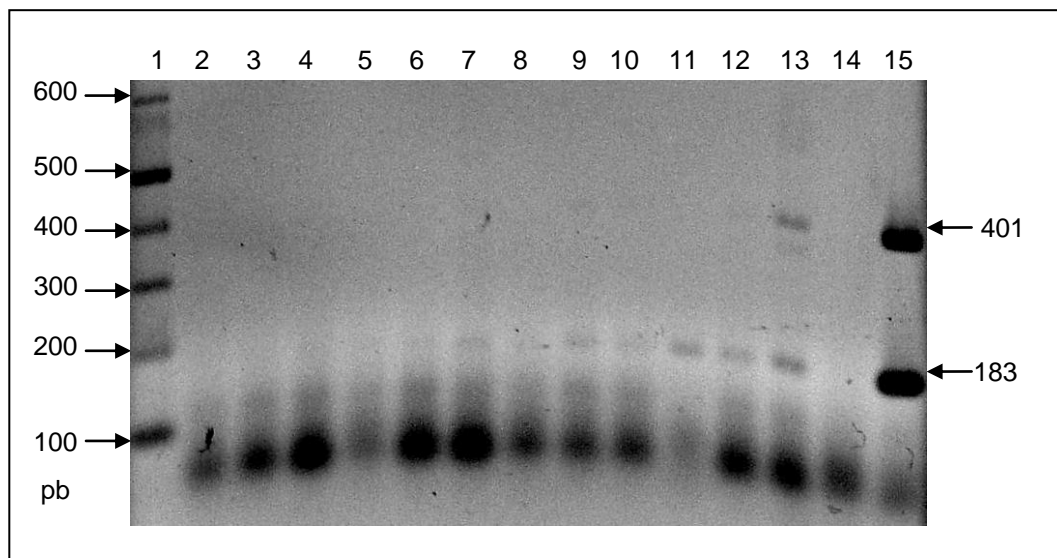


Figura 7. PCR directa de lechuga, repollo y cilantro artificialmente inoculados. Carril 1: marcador de peso molecular; Carriles 2 a 4: vegetales inoculados con 1-2 células; carriles 5 a 7: vegetales inoculados con 15 células; carriles 8 a 10: vegetales inoculados con 30 células; carriles 11 a 13: vegetales inoculados con 45 células; carril 14: control negativo; carril 15: control positivo.

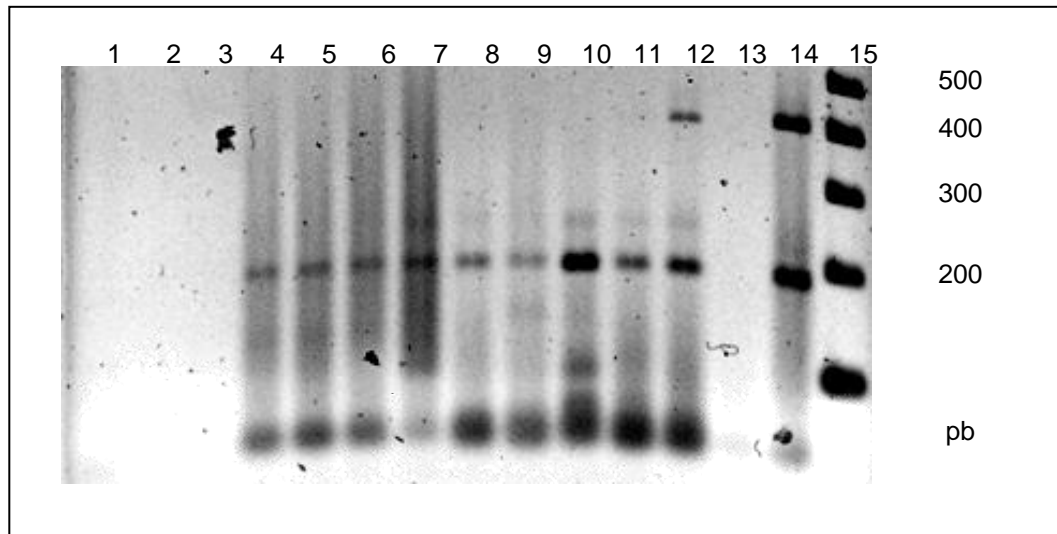


Figura 8. Reamplificación de ADN a partir de la PCR directa de lechuga, repollo y cilantro artificialmente inoculados. Carril 1 a 3: vegetales inoculados con 1-2 células; carriles 4 a 7: vegetales inoculados con 15 células; carriles 7 a 9: vegetales inoculados con 30 células; carriles 9 a 12: vegetales inoculados con 45 células; carril 13: control negativo; carril 14: control positivo; carril 15: marcador de peso molecular.

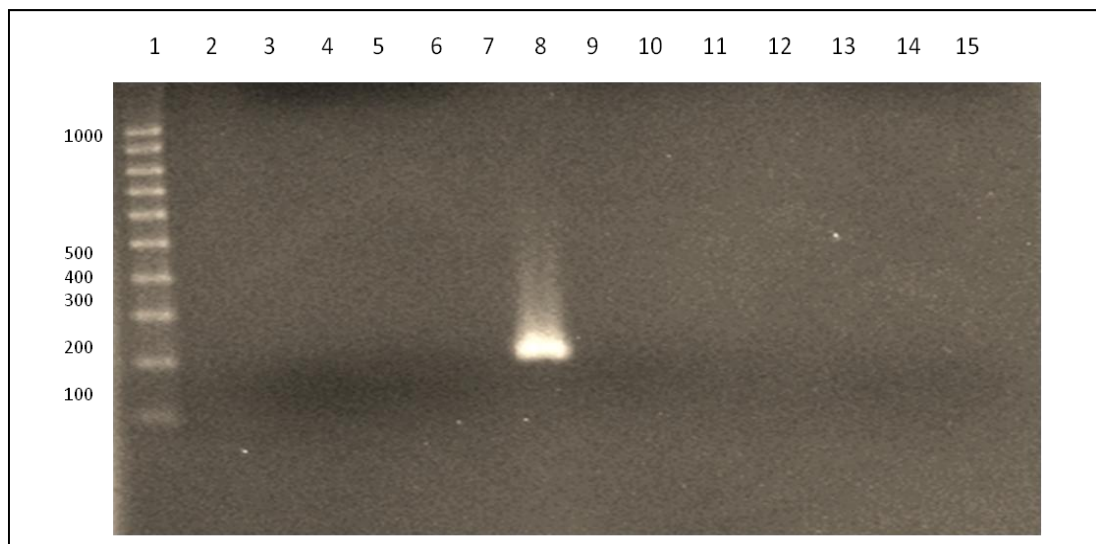


Figura 9. Reamplificación de ADN a partir de agua potable y agua purificada. Carril 1: marcador de peso molecular; carriles 2-7: muestras de agua purificada; carril 8: testigo positivo (201 pb gen *vacA*) ; carriles 9-14 agua potable; carril 15: testigo negativo.

8. DISCUSIONES

8.1. Cultivo y detección de *H. pylori*

La dificultad para el aislamiento de *H. pylori* fue quizás uno de los principales obstáculos para demostrar que este microorganismo espirilado estaba verdaderamente implicado en un cuadro clínico que afecta a una gran cantidad de personas en todo el mundo; hubo de transcurrir mucho tiempo para que los estudiosos de la bacteria pudieran demostrar que era el agente causal. Muchos han sido los argumentos emitidos acerca de los requerimientos nutricionales de este patógeno exigente con respecto a las condiciones de transporte, atmósfera y tiempo de incubación y ninguno de ellos resulta gratuito a la hora de conseguir el crecimiento en un medio de cultivo sólido o líquido. Uno de los medios empleados y con el que se ha obtenido mejor resultado para el desarrollo de esta bacteria ha sido el medio de Brain Heart suplementado con 7 % de sangre de caballo y una mezcla de antibióticos que contiene vancomicina, trimetoprim, cefsulodina y anfotericina B. Algunos investigadores mencionan el adecuado crecimiento y aislamiento de este microorganismo en medio de Agar Sangre (Hachem *et al.*, 1995).

Cuando se trata de biopsias gástricas, la mucosa puede estar colonizada por otros gérmenes, que fácilmente pueden tener un crecimiento más rápido que *H. pylori*, lo que representa un impedimento para el aislamiento cuando las placas se incuban por un período de 7 a 10 días. Esta misma situación se puede presentar en los alimentos estudiados en este trabajo, en donde las condiciones de higiene durante la preparación de los mismos en ocasiones no es de lo más adecuada y en consecuencia, pueden estar presentes una gran diversidad de microorganismos que pueden interferir en su detección.

Muchos de los trabajos reportados han sido realizados utilizando métodos moleculares para su detección, pocos de ellos se han llevado a cabo utilizando medios de

cultivo y estos han sido medios de cultivo muy elaborados con sustratos adecuados para el patógeno, inhibidores para otros microorganismos no deseados, atmósferas de incubación específicas, etc. Por ello el uso de sondas de DNA para hibridización, inmunoblot o reacción en cadena de la polimerasa se usan con mayor frecuencia.

8.2. Iniciadores para el gen *cagA* y *vacA*

Considerando esto, los tres pares de iniciadores seleccionados para la realización de este trabajo fueron modificados a partir de los reportados por Zamudio *et al.*, 2002 para la detección y tipificación de los genes *cagA* y *vacA* involucrados en las patologías gástricas ligadas a *H. pylori*. Sin embargo, los fragmentos derivados de los iniciadores CagAMF y CagAR dirigidos al gen *cagA* y VA1MF y VA1XR dirigidos a la región del péptido señal del gen *vacA* tuvieron tamaños muy similares, 183 y 174 pb respectivamente, lo que hizo difícil su visualización en geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones al igual que en agarosa. Lo anterior impidió utilizar ambos pares de iniciadores en una misma reacción de PCR por lo que se decidió no usar los iniciadores VA1MF y VA1XR. No obstante, el gen *vacA* fue detectado con el uso de los iniciadores HPMGF y HPMGR dirigidos a la región media del gen y con un tamaño suficiente para visualizar ambos fragmentos en una sola reacción de PCR sin dificultades.

Antes de realizar la PCR directa la calidad del ADN obtenido de las muestras no fue corroborada por ningún método, por lo que con la finalidad de conocer la condición de la muestra y no tener falsos negativos al llevar a cabo la detección y tipificación de los genes *vacA* y *cagA* se recomienda realizar previamente una PCR para amplificar el gen codificante 16S rRNA, cuya secuencia entera de nucleótidos ya ha sido determinada y es característica de las bacterias (Zamudio *et al.*, 2002).

8.3. Sensibilidad del método para detección de *H. pylori*

Previo a la inoculación de la bacteria en muestras vegetales para determinar la sensibilidad de la metodología, se llevó a cabo el ajuste de células. El experimento se efectuó dos veces disolviendo la bacteria en solución salina, pero esta no creció en

ninguna ocasión. Sin embargo, cuando la bacteria se disolvió en caldo BHI sí se observaron y comprobaron colonias de *H. pylori*, este experimento se realizó en un par de ocasiones.

La PCR directa de las muestras inoculadas evidenció con claridad y consistencia los fragmentos del gen *cagA* cuando se utilizaron teóricamente 22-23 cadenas de ADN templado de *H. pylori*, y en una de tres muestras el fragmento del gen *vacA*. Cuando se emplearon 7-8 y 15 cadenas de ADN se observaron con poca claridad fragmentos del gen *cagA* en 1 de 3 y 2 de 3 muestras respectivamente, no así fragmentos del gen *vacA*. No se observaron fragmentos de ningún gen cuando se usaron 1-2 cadenas molde. Lo anterior indica que cuando se realiza una PCR directa y se visualizan a simple vista los productos, la metodología utilizada en esta investigación detecta con seguridad 22-23 células de *H. pylori* usando como blanco el gen *cagA* y que, cuando se usa como blanco el gen *vacA* la cantidad de células debe ser mayor.

Para determinar con mayor exactitud la sensibilidad del método y evitar falsos negativos se reamplificó ADN a partir de la PCR directa. La reamplificación mostró con certeza fragmentos del gen *cagA* en todas las muestras, excepto en aquellas inoculadas con 1-2 células estableciendo así que el límite de detección de la metodología empleada es de 7-8 células cuando se usa este gen como blanco. Además, reafirmó que para detectar consistentemente el gen *vacA* se necesitan más de 22-23 células.

8.4. Detección de *H. pylori* en alimentos y aguas frescas

En lo que respecta a las muestras analizadas, las aguas sabor limón obtuvieron el mayor porcentaje de positividad seguidas por las aguas sabor piña con un porcentaje similar, además de que ambas fueron también las más contaminadas ya que la PCR directa evidenció, aunque en forma de barrido, fragmentos de ADN de tamaño similar al del gen *cagA*, del cual se confirmó su presencia en la reamplificación. El barrido observado en la PCR directa de ambas muestras sugiere un exceso de ADN templado y de sales. De manera contraria, las aguas sabor melón obtuvieron el menor porcentaje de positividad lo que nos podría indicar que *H. pylori* sobrevive con mayor facilidad en

aguas de frutas ácidas de acuerdo a sus características bioquímicas, sin embargo debe tomarse en cuenta que al procesar las aguas sabor melón se realizó una dilución más y se filtró menor cantidad y con ello se disminuyó considerablemente la cantidad de organismos contaminantes reduciendo así la posibilidad de detectar el patógeno. Estos resultados indican que beber aguas frescas de frutas preparadas y ofrecidas en la vía pública es un riesgo para adquirir la infección ya sea porque *H. pylori* se encuentra intrínsecamente en el agua de dudosa procedencia con que son preparadas o porque los vendedores son quienes contaminan el producto; además, son consistentes con los resultados obtenidos por Bunn *et al.*, 2004 quien demostró la relación entre el momento de la infección en infantes con el inicio del consumo de agua contaminada con la bacteria; así mismo, los estudios reportados por Hulten *et al.*, 1996; Horiuchi *et al.*, 2001; Baker y Hegarty, 2001; Krumbiegel *et al.*, 2004; y Fujimura *et al.*, 2004 quienes relacionaron la infección al hecho de beber agua de fuentes municipales y/o ambientales; Mazari-Hiriart *et al.*, 2001 y Watson *et al.*, 2004 quienes detectaron ADN en fuentes de agua para uso y consumo humano y Hegarty *et al.*, 1999, quien detectó la bacteria metabólicamente activa en el mismo tipo de muestra.

De los vegetales analizados la lechuga y repollo crecen a nivel de suelo y en ocasiones son regados con aguas residuales sin tratar en las cuales se ha detectado ADN de *H. pylori* por Mazari-Hiriart *et al.*, 2001, y Queralt *et al.*, 2005. Además, también se ha detectado en aguas de río por Fujimura *et al.*, 2004 y Queralt *et al.*, 2005; de presa por Mazari-Hiriart *et al.*, 2001 y estanque por Sasaki *et al.*, 1999, las cuales son continuamente utilizadas como aguas de irrigación para cultivos. Ninguno de los productos de la PCR directa evidenció fragmentos de ADN. Posteriormente en la reamplificación, una quinta parte de las muestras de lechuga resultaron positivas y poco más de la tercera parte lo fue para las muestras de repollo y cilantro. Lo anterior revela que este tipo de muestras tuvieron una menor cantidad de células de *H. pylori* debido quizá al tiempo que transcurre desde que los cultivos son regados hasta que son ofertados al consumidor (tiempo de cosecha, almacenaje, transporte, revisión y adquisición por los comerciantes).

El hecho de haber detectado al patógeno en vegetales que se consumen crudos como lechuga, repollo y cilantro, favorece considerablemente la idea de que su consumo sin previa desinfección adecuada es una ruta de adquisición de la infección sugerida por Hopkins *et al.*, 1993; Goodman *et al.*, 1996 y Chen *et al.*, 2005.

Las condiciones antihigiénicas en las cuales los alimentos son preparados y ofrecidos por vendedores ambulantes son bien conocidas y han sido previamente implicadas como puntos de inicio de enfermedades gastrointestinales (Ries *et al.*, 1992, Begue *et al.*, 1998). Además de esto, están expuestos a factores ambientales como moscas o tierra contaminados los cuales pueden servir como vectores según Grübel *et al.*, 1997 y Sasaki *et al.*, 1999. En nuestra investigación más de la mitad de las muestras de tacos analizadas resultaron positivas para el fragmento del gen *cagA*. Este hallazgo, los de Dore *et al.*, 2001, Fujimura *et al.*, 2002 quienes aislaron *H. pylori* y detectaron su ADN en leche de oveja y vaca respectivamente y el de Brown *et al.*, 2002 quien relacionó una alta prevalencia de la infección con las personas que frecuentemente no lavaban sus manos antes de comer, fortalecen la idea de que a través de los alimentos se puede transmitir la bacteria.

8.5. Detección de *H. pylori* en agua potable y agua purificada

Aunque no se logró la amplificación de material genético a partir de las aguas que se analizaron, muchos trabajos apuntan a que existe mucha probabilidad de que el agua sea una forma de transmisión de la bacteria; sin embargo, como en todos los microorganismos causantes de enfermedades siempre es importante las condiciones de insalubridad que prevalezcan, para que exista la posibilidad de que el agua u otro producto que se consuma presente contaminación biológica. Desafortunadamente para este trabajo, las condiciones de higiene de las redes de agua potable en la ciudad de Monterrey, N.L. al parecer se encuentran óptimas, al igual que los procesos de purificación del agua, motivo por el cual no se tuvo el éxito que se esperaba para verificar la incidencia de *H. pylori* y apoyar lo reportado por Hulten *et al.*, 1996 en su estudio de incidencia de la bacteria en agua potable. Definitivamente las condiciones en

las que se encuentren los sistemas de distribución del agua potable pueden influir en la presencia de bacterias sobre todo si existen daños en las tuberías que permitan la entrada de contaminantes procedentes del suelo contaminado con materia fecal.

8.6. Frecuencia de cepas *Cag A* y *Vac A*

Del total de 52 muestras positivas, una resultó *cagA* negativo y el resto *cagA* positivo; además una resultó con *vacA* genotipo m1 y otra con m2. Esto último en particular concuerda con los resultados obtenidos por Van Doorn *et al.*, 1998; Morales-Espinoza *et al.*, 1999 y De Guzman *et al.*, 2000 quienes obtuvieron 50% de genotipos m1 y m2. Sin embargo, difiere de los hallazgos de Zamudio *et al.*, 2002; Rudi *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1999 y Alarcón *et al.*, 1999 quienes detectaron el gen *vacA* en la totalidad de las muestras positivas. Este hecho tal vez se pueda explicar con la procedencia de los ADN templados, de muestras clínicas en el caso de los autores mencionados y de muestras que ofrecieron condiciones sumamente adversas a la bacteria lo que la indujo a transformarse en formas VNC en el caso de nuestra investigación. Ha sido probado por Narikawa *et al.*, 1997 que estas formas disminuyen su cantidad de ADN, y que además este sufre rupturas lo que podría conducir a la pérdida de la integridad de algunos genes y de la capacidad para multiplicarse. Pese a esto, la capacidad infectiva de estas formas ha sido claramente demostrada por Adams *et al.*, 2003 y Fei-Fei *et al.*, 2003.

Hasta la fecha no se ha reportado la detección de ADN de *H. pylori* en muestras de alimentos como vegetales frescos, aguas de frutas o tacos, este trabajo es el primero en hacerlo. En general los resultados obtenidos en esta investigación apoyan la hipótesis de que los alimentos, vegetales y agua contaminados son un importante reservorio de *H. pylori* y que juegan un papel importante en la adquisición de la infección. De igual manera, parece ser que la teoría fecal-oral de transmisión y/o reinfección es por mucho la más factible. Asimismo, los resultados muestran que el gen *vacA*, el cual se encuentra en todas las cepas de *H. pylori*, no se puede amplificar regularmente con seguridad de muestras de vegetales hortícolas, aguas de frutas y tacos. Contrariamente, el gen *cagA* si

se puede amplificar con certeza de este tipo de muestras, sin embargo no se encuentra presente en todas las cepas.

9. CONCLUSIONES

- La prueba de PCR para la detección de *H. pylori* en la cepa de referencia ATCC 43504, fue estandarizada satisfactoriamente en este trabajo.
- Se implementó la metodología para extraer ADN en los alimentos que fueron artificialmente inoculados con la cepa testigo.
- Se estandarizó la metodología para extraer ADN en muestras de alimentos expendidos en vía pública.
- Se estandarizó la prueba de PCR para la detección de *H. pylori* en alimentos artificialmente inoculados.
- Mediante la reacción en cadena de la polimerasa implementada, se logró detectar porciones de DNA de *H. pylori* en un 20% (5/25) de las muestras de lechuga, 36% (9/25) de repollo y 36% (9/25) de cilantro; así mismo, 80% (8/10) en muestras de agua sabor limón, 60% (6/10) sabor piña y 12.5% (1/8) sabor melón y en un 60.8% (14/23) de las muestras de tacos.
- No se detectó DNA de la bacteria en las muestras de agua potable y purificada.
- Se demostró que cuando se usó el gen *cagA* como blanco de detección de *H. pylori*, el número mínimo detectable de células fue de 7-8. En cambio cuando se usó el gen *vacA*, la mínima cantidad de células requeridas fue de 22-23.

- El fragmento del gen *vacA* fue amplificado en el 3.8% (2/52) de las muestras positivas y el gen *cagA* en el 98% (51/52).
- El gen *cagA* puede o no estar presente, por lo que no se recomienda utilizarlo como blanco para determinar presencia o ausencia de *H. pylori*.

LITERATURA CITADA

1. Adams BL, Bates TC, Oliver JD. 2003. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7462-7466.
2. Akamatsu T, Tabata K, Hironaga M, Kawakami H, Uyeda M. 1996. Transmission of *H. pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am. J. Infect. Contr.* 24: 396-401.
3. Alarcón T, Domingo D, Martínez MJ, López-Brea M. 1999. *cagA* gene and *vacA* alleles in spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. *Immunol. Med. Microbiol.* 24:215-219.
4. Andersen L, Rasmussen L. 2009. *Helicobacter pylori*- coccoid forms and biofilm formation. *Immunology and Medical Microbiology.* 56:112-115
5. Argyros FC, Ghosh M, Huang L, Masubuchi N, Cave DR, Grübel P. 2000. Evaluation of a PCR primer based on the isocitrate dehydrogenase gene for detection of *Helicobacter pylori* in feces. *J. Clin. Microbiol.* 38:3755-3758.
6. Ayal G, Chihu L, Perales G, Fierros-Zárate G, Hansen LM, Solnick JV, Sánchez J. 2004. Quantitation of *H pylori* cytotoxin mRNA by real-time RT-PCR shows a wide expression range that does not correlate with promoter sequences. *Microbial Pathogenesis* 37:163-167.
7. Baker KH, Hegarty JP. 2001. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water is associated with clinical infection. *Scand. J. Infect. Dis.* 33:744-746.
8. Bague RE, Gonzáles JL, Correa-García H. 1998. Dietary risk factors associated with the transmission of *Helicobacter pylori* in Lima, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:637-640.
9. Blaser MJ. 1992. *Helicobacter pylori*: Its role in disease. *Clinical Infectious diseases.* 15:386-396-45.
10. Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. 1993. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect.* 111:483-490.

11. Bohmler G, Gerwert J, Scupin E, Sinell HJ. 1996. The epidemiology of helicobacteriosis in humans; studies of the survival capacity of the microbe in food. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 103:438-443.
12. Bosques-Padilla FJ, Tijerina-Menchaca R, Pérez-Pérez GI, Flores-Gutiérrez JP, Garza-González E. 2003. Comparison of *Helicobacter pylori* prevalence in symptomatic patients in northeastern Mexico with the rest of the country: its association with gastrointestinal disease. *Arch. Med. Res.* 34:60-63.
13. Brown LM. 2000. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev.* 22:283-297.
14. Brown LM, Thomas TL, Ma JL, Chang YS, You WC, Liu WD, Zhang L, Pee D, Gail M.H. 2002. *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int. J. Epidemiol.* 31:638-645.
15. Buck A, Oliver JD. 2010. Survival of spinach-associated *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state. *Food Control.* 21: 1150-1154
16. Bunn JEG, MacKay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT. 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett. Appl. Microbiol.* 34:450-454.
17. Catrenich CE, Makin K.M. 1991. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. *Scand. J. Gastroenterol.* 181: 58-64.
18. Cellini L, Del Vecchio A, Di Candia M, Di Campli E, Favaro M, Donelli G. 2004. Detection of free and plankton-associated *Helicobacter pylori* in seawater. *J. Appl. Microbiol.* 97:285-292.
19. Chen SY, Liu TS, Fan XM, Dong L, Fang GT, Tu CT, Gu XY, Wang JY. 2005. Epidemiological study of *Helicobacter pylori* infection and its risk factors in Shanghai. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 85:802-806.
20. Cheng LHH, Webberley M, Hanson N, Brown R. 1996. *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric mucosa. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 81:421-423.
21. Chihu L, Ayala G, Mohar A, Hernández A, Herrera-Goepfert R, Fierros G, González-Márquez H, Silva, J. 2005. Antimicrobial resistance and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from mexican adults and clinical outcome. *J. Chemother.* 17:12-18.
22. De Gusmao VR, Nogueira E, De Magalhaes DM, Aguar G, Camargos AM, Ramadan AA. 2000. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from

- children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol.* 38:2853-2857.
23. Domínguez-Bello MG, Beker B, Guelrud M, Vivas J, Peraza S, Pérez ME, Pericchi LR. 2002. Short report: socioeconomic and seasonal variations of *Helicobacter pylori* infection in patients in Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 49-51.
 24. Dore MP, Sepulveda AR, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, Nieddu AM, Realdi G, Graham DY. 2001. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans. *Am. J. Gastroenterol.* 96:1396-1401.
 25. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:720-741.
 26. Enroth E, Engstrand L. 1995. Immunomagnetic Separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33:2162-2165.
 27. Fei-Fei S, Jian-Yin L, Juan-Yan L, Cheng H, Dong-Hui S. 2003. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World J. Gastroenterol.* 9:516-520.
 28. Fotedar R, Banerjee U, Singh S, Shrinivas, Verma AK. 1992. The housefly (*Musca domestica*) as a carrier of pathogenic microorganisms in a hospital environment. *J Hosp Infect.* 20:209-215.
 29. Fox JG. 1995. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9:93-103.
 30. Fujimura S, Kato S, Kawamura T. 2004. *Helicobacter pylori* in Japanese river water and its prevalence in Japanese children. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:517-521.
 31. Fujimura S, Kawamura T, Kato S, Tateno H, Watanabe A. 2002. Detection of *Helicobacter pylori* in cow's milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 35:504-507.
 32. Gabera ECE, Pannuti C, Faria CM, Mayer MPA, Lima LAPA. 2004. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *19:277-280.*
 33. Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, Tijerina-Menchaca R, Pérez-Pérez GI. 2006. Characterization of *Helicobacter pylori* isolates from the northeastern region of Mexico. *Clin Microbiol Infect.* 12:97-98.

34. Giao MS, Azevedo NF, Wilks SA, Viera MJ, Keevil CW. 2008. Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking-water biofilms. *Appl Environ Microbiol.*74:5898-5904.
35. Giao MS, Azevedo NF, Wilks SA, Viera MJ, Keevil CW. 2010. Effect of chlorine on incorporation of *Helicobacter pylori* into drinking water biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 76: 1669-1673.
36. Gomes BC, De Martinis ECP. 2004. Fate of *Helicobacter pylori* artificially inoculated in lettuce and carrot samples. *Brazilian J. Microbiol.* 35:145-150.
37. Gomes BC, De Martinis ECP. 2004. The significance of *Helicobacter pylori* in water, food and environmental samples. *Food Control* 15:397-403.
38. González-Morales JE, Leal-Villareal L, Guzmán-López S, Guzmán-Treviño GM, González-Martínez NA. 2004. *Helicobacter pylori* y enfermedad. *Rev Alergia México* 51:218-225.
39. Goodman KJ, Correa P, Tengana Aux HJ, Ramírez H, Delany JP, Guerrero-Pepinosa O, López-Quinines M, Collazos-Parra T. 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol.* 144:290-299.
40. Greenberg B. 1965. Flies and disease. *Sci. Am.* 213:92-99.
41. Greenberg B. 1971. Flies and diseases. Princeton University Press, Princeton, N.J.
42. Grübel P, Hoffman JS, Chong FK, Burstein NA, Mepani C, Cave DR. 1997. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 35:1300-1303.
43. Hachem CY, Clarridge JE, Evans DG, Graham DY. 1995. Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol.*48:714-716.
44. Hegarty JP, Dowd MT, Baker KH. 1999. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *J. Appl. Microbiol.* 87:697-701.
45. Herbarth O, Krumbiegel P, Fritz GL, Ritcher M, Schlink U, Muller DM, Rithcher T. 2001. *Helicobacter pylori* prevalence and risk factors among school beginners in a german urban center and its rural county. *Environ. Health Perspect.* 109:573-577.
46. Herrera AG. 2004. *Helicobacter pylori* and food products: a public health problem. *Methods Mol. Biol.* 268:297-301.

47. Hofman P, Waidner B, Hofman V, Bereswill S, Brest P, Kist M. 2004. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9:15-22.
48. Hopkins RJ, Vial PA, Ferreccio C, Ovalle J, Prado P, Sotomayor V, Russel RG, Wasserman SS, Morris JG. 1993. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. *J. Infect. Dis.* 168:222-226.
49. Horiuchi T, Ohcusa T, Watanabe M, Kobayashi D, Miwa H, Eishi Y. 2001. *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiol. Immunol.* 45:515-519.
50. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, Evans DG, Engstrand L, Graham DY, El-Zaatari FA. 1996. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 110:1031-1035.
51. Izzeddin R, Toro R, Izzeddin R. 2010. Técnica de PCR como estrategia biotecnológica para detección de *Helicobacter pylori* en placa dental. *Biotecnología*. 14:25-36
52. Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. 1991. Water source as a risk factor for *Helicobacter pylori* in peruvian children. *Lancet* 337:1503-1506.
53. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. 2006. Gastric Cancer and *Helicobacter pylori* infection. *J. Physiol. Pharmacol.* 57:51-65.
54. Krumbiegel P, Lehmann I, Alfreider A, Fritz GJ, Boeckler D, Rolle-Kampczyk U, Richter M, Jorks S, Muller L, Richter MW, Herbarth O. 2004. *Helicobacter pylori* determination in non-municipal drinking water and epidemiological findings. *Isotopes Environ. Health Stud.* 40:75-80.
55. Leal-Herrea Y, Torres J, Monath TP, Ramos I, Gomez A, Madrazo-de la Garza A, Dehesa-Violante M, Munoz O. 2003. High rates of recurrence and transient reinfections of *Helicobacter pylori* in a population with high prevalence of infection. *Am. J. Gastroenterol.* 98:2395-2402.
56. Luman, W. 2002. *Helicobacter pylori* transmission: is it due to kissing? *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 32:275-279.
57. McGee DJ, Mobley HLT. 2000. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 16:23-31
58. Mapstone NP. 1993. PCR identification of *H pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet* 341:447.
59. Martínez M, Ferreira R, González M. 2008. *Helicobacter pylori* en pacientes con diferentes enfermedades gastroduodenales.

60. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Calva J.J. 2001. *Helicobacter pylori* in water systems for human use in Mexico City. *Water Sci. Technol.* 43:93-98.
61. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Camm AJ, Northfield TC. 1994. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *British Heart Journal.* 71:437-439.
62. Mitchell, HM. 1999. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol.*241:11-30.
63. Morales AA, García F, Bermúdez VM. 2010. El Género *Helicobacter* en los animales domésticos: una revisión. *INHRR.* 41:63-70.
64. Morales-Espinoza R, Castillo-Rojas G, González-Valencia G, Ponce de León S, Cravioto A, Artherton JC. 1999. Colonization of mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with diferente *vacA* and *cagA* genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 37:3001-3004.
65. Narikawa S, Kawai S, Aoshima H, Kawamata O, Kawaguchi R, Hikiji K, Kato M, Iino S, Mizushima Y. 1997. Comparison of the nucleic acids of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 4:285-290.
66. Neiger R. 2003. *Helicobacter* infection in dogs and cats. *Waltham Focus.* 13: 10-14.
67. Neiger R, Simpson K. 2000. *Helicobacter* Infection in dogs and cats: facts and fiction. *J. Vet. Intern. Med.* 14: 125-133.
68. Ortiz PD, Cavazza ME, Rodríguez O, Hagel I, Correnti M, Convit J. 2003. Prevalencia de la infección por *helicobacter pylori* en comunidades de la etnia warao del estado delta amacuro, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 98: 7221-725.
69. Ouaglia N, Dambrosio A, Normando G, Parisi A, Patrono R, Ranieri G, Rella A, Celano G. 2008. High ocurrence of *Helicobacter pylori* in raw gota, sheep and cow milk inferred by glmM gene: a risk of food-borne infection?. *Int J Food Microbiol.* 124: 43-7.
70. Páez MC, Barón MA, Solano L, Nadaff G, Boccio J. y Barrado A. 2006. Infección por *Helicobacter pylori* (13C-UBT) y factores nutricionales y socioeconómicos asociados en escolares de estratos bajos de la ciudad de Valencia. Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 56: 342-349
71. Panchal PV, Forman JS, Blumberg DR, Wilson KT. 2003. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 19:4-10.

73. Park SR, Mackay WG, Reid DC. 2001. *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Research*. 35: 624-1626
74. Parra T, Carballo F. 1998. Reservorios y vías de transmisión de la infección por *Helicobacter pylori*. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 21:1-3
75. Patel P, Mendall MA, Khulusi S, Northfield TC, Strachan DP. 1994. *Helicobacter pylori* infection in childhood: risk factors and effect on growth. *BMJ*. 309:1119-1123
76. Pérez-Pérez GI, Rothenbacher D, Brenner H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 9:1-6.
77. Scarano PGA, Correia MA, Marques MS, Chimenos EK, De Castro R, Perdomo M. 2005. Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental y en mucosa gástrica de pacientes sometidos a endoscopia digestiva. *Acta Odontol. Venez.* 43: 113-118.
78. Song Q, Haller B, Schmid RM. 1999. *Helicobacter pylori* in dental plaque. *Digestive Diseases and Sciences*. 44:479-84.
79. Poms RE, Tatini SR. 2001. Survival of *Helicobacter pylori* in ready to eat foods at 4 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* 63:281-286.
80. Queralt N, Bartolome R, Araujo R. 2005. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J. Appl. Microbiol.* 98:889-895.
81. Ries AA, Vujia DJ, Beingolea L, Palacios AM, Vazquez E, Wells JG, Vaca NG, Swerdlow DL, Pollak M, Bean NH, Seminario L, Tauxe RV. 1992. Cholera in Piura: a modern urban epidemic. *J. Infect. Dis.* 166:1429-1433.
82. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR. 1998. Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J. Clin. Microbiol.* 36:944-948.
83. Sasaki K, Tajiri Y, Sata M, Fujii Y, Matsubara F, Zhao M, Shimizu S, Toyonaga A, Tanikawa K. 1999. *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scand. J. Infect. Dis.* 31:275-279.
84. Shahamat M, Alavi M, Watts JEM, Gonzalez JM, Sowers KR, Maeder DW, Robb FT. 2004. Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 42:3613-3619.

85. Solnick J, Schauer D. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev.* 14: 59-97.
86. Stevenson TH, Lucia LM, Acuff GR. 2000. Development of a selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:723-727.
87. Stolte M, Wellens E, Bethke B, Ritter M, Eidt H. 1994. *Helicobacter heilmannii* (formerly *Gastrospirillum hominis*) gastritis: an infection transmitted by animals? *Scand J Gastroenterol.* 29:1061-1064.
88. Thibaut J, Paz V, Paredes E, Ernst S. 2007. Determinación de la presencia de *Helicobacter* spp. en perros, mediante biopsia gástrica obtenida por endoscopia. *Rev Cient.* 17: 35-39
89. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 340:1194-1195.
90. Torres J, López L, Lazcano E, Camorlinga M, Flores L, Muñoz O. 2005. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:1874-1877.
91. Torres J, Leal-Herrera Y, Pérez-Pérez G. 1998. A community-based seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J. Infect. Dis.* 178:1089-1094.
92. Valdés A, Astudillo M. 2007. *Helicobacter pylori* y organismos *Helicobacter heilmannii*-like: que rol juegan en perros y gatos? *Avances en Ciencias Veterinarias.* 22:72-83
93. Vale FF, Vitor JMB. 2010. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of food microbiology.* 138: 1-12
94. Vallejos MC, Enríquez MA, López MR, Valdez JA, Pérez Pría KP. 2010. *Helicobacter pylori* en pacientes de la tercera edad atendidos en un hospital de Puebla. *Enf Inf Microbiol.* 29: 131-134
95. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W. 1998. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 115:58-66.
96. Van Duynhoven YT, de Jonge R. 2001. Transmission of *Helicobacter pylori*: a role of food?. *Bull. World Health Organ.* 79:455-460.

97. Velázquez M, Feirtag JM. 1999. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. Int. J. Food Microbiol. 53:95-104.
98. Watson CL, Owen RJ, Said B, Lai S, Lee JV, Surman-Lee S, Nichols G. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilms samples from drinking water distribution systems in England. J. Appl. Microbiol. 97:690-698.
99. Zamudio MR, Huguet J, Suárez V, Morón C, Vargas G, Soriano C, Frisancho O, Bussalleu A. 2002. Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para la tipificación de *Helicobacter pylori*. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública 19:202-205.