

TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y AISLAMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
HELICOBACTER PYLORI EN AGUAS

DAYANA YISETH BARROS DÍAZ

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

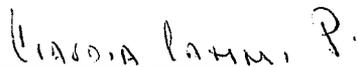
FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ, 2012

TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y AISLAMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
HELICOBACTER PYLORI EN AGUAS

DAYANA YISETH BARROS DÍAZ



Dra. CLAUDIA CAMPOS PINILLA

Jurado
Facultad de ciencias



Dra. ALBA ALICIA TRESPALACIOS

Director de tesis
Facultad de ciencias

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución No 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada en contra del dogma y la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien sea en ella el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

CONTENIDO

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	6
MARCO TEÓRICO.....	7
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
METODOLOGÍA.....	13
RESULTADOS.....	14
• Tabla de resultados.....	15
DISCUSION DE RESULTADOS.....	18
CONCLUSION.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	20

RESUMEN

Helicobacter pylori es un microorganismo que infecta el estómago de los seres humanos y causa gastritis, enfermedad que si llega a complicarse puede ocasionar un cáncer gástrico. Este microorganismo se transmite por vía oral- oral, gastro-oral y oral-fecal, recientes investigaciones afirman que en ésta última ruta de trasmisión *H. Pylori* sobrevive en el agua formando así biopelículas con otros microorganismos. La literatura médica en los últimos años ha desarrollado múltiples experimentos para comprobar la presencia de este microorganismo en el agua. Este trabajo tiene como objetivo hacer un paneo de las diferentes técnicas utilizadas hasta el momento que detectan la presencia de la bacteria en cuerpos de agua. Así mismo, hacer recomendaciones que permitan seleccionar la prueba que mejores características ofrezca para verificar su presencia. El método para cumplir dicho objetivo fue un estudio cualitativo, descriptivo y teórico de la literatura científica. Por tanto, los resultados obtenidos a partir de la revisión muestran que las técnicas inmunológicas y microbiológicas convencionales son menos utilizadas en comparación con técnicas moleculares como la PCR y FISH debido a que éstas presentan falsos resultados en mayor cantidad. Por su parte, las técnicas moleculares son útiles siendo FISH la que presenta mayor precisión y exactitud para la identificación de *H. Pylori* en aguas.

INTRODUCCIÓN

Según la literatura *H. pylori* puede no solo crecer en el estómago sino también en muestras medioambientales como el agua. Lo que indica que este microorganismo es tan versátil que puede crecer en diferentes condiciones estresantes, modificando así sus características de adaptación al medio (6). Un ejemplo de esto, es el cambio de morfología bacilar, el cual posee flagelos polares que se encuentran en el estómago y cuyo metabolismo y virulencia es activa; a la forma cocoide donde su metabolismo es pasivo y su capacidad infectiva es latente, ésta última es la forma de la bacteria como usualmente se encuentra en agua y alimentos. Debido a que las formas cocoides no son cultivables pero si infectantes, muchas técnicas moleculares que se basan en la amplificación de genes conservados en la bacteria, se han utilizado para identificar estas formas en diferentes muestras de agua. En este trabajo se realiza una revisión bibliográfica de las principales técnicas, entre ellas los procedimientos moleculares que actualmente son los más comunes en la identificación del microorganismo en el agua. Así mismo, se señalan otros procedimientos basados en dos técnicas: las inmunológicas y las microbiológicas como el cultivo, las cuales ofrecen información para determinar de forma indirecta o directa la presencia del microorganismo en el agua. Teniendo en cuenta éstas técnicas y los resultados que se encuentran en las publicaciones científicas se puede conocer y valorar cuales son las pruebas que proporcionan una mayor utilidad en la detección *H. pylori* en agua.

JUSTIFICACIÓN

Recientes investigaciones han demostrado la presencia de *Helicobacter pylori* en su forma cocoide en el agua (5), condición que aumenta el riesgo de infección en los seres humanos ya que se suma a otras vías de transmisión como la oral-oral, que deviene del contacto salivar y la gastro-oral por su parte, se obtiene por contacto con vómito o jugo gástrico. La forma de transmisión de *H.pylori* en el agua ha llamado la atención de muchos autores, sobre todo por la destreza manifiesta de la bacteria para aislarse de ambientes acuáticos, protegida por biopelículas (1,3,47) que amparan al microorganismo de las diversas condiciones ambientales y potencian su crecimiento. A partir de ésta habilidad del microorganismo torna necesario encontrar técnicas para su identificación, en procura de hallar la prueba más eficaz (15) y así prevenir la amenaza de este microorganismo para el hombre (37)

MARCO TEORICO

Helicobacter pylori es un microorganismo gram negativo y microaerófilo, que se establece en el estómago humano y puede llegar a causar ulcera péptica y linfomas, asociados muchos de ellos al cáncer,(1,2) especialmente en pacientes con antecedentes de gastritis crónica. Su ruta de transmisión aún no es clara, pero según modelos experimentales se ha encontrado que el agua es una de las principales vías de transmisión, ya que protege al microorganismo de condiciones medioambientales estresantes como la temperatura, la presencia y/o ausencia de luz, la concentración baja de carbono y las altas concentraciones de oxígeno (3,22,17).

Según ensayos médicos, el agua actúa como un reservorio ya que la bacteria se mantiene por largos periodos de tiempo y luego es consumida por los humanos en bebidas o alimentos que pueden tener un alto potencial infectivo (15,16,49). La prevalencia de la infección por *H. pylori* en países en desarrollo es aproximadamente del 80%, mientras que en países desarrollados es del 20 al 50% (5). La premisa anterior indica que el desarrollo de esta infección está estrechamente relacionado con las condiciones de salubridad de cada región del mundo (3,16).

Según recientes publicaciones se ha encontrado que *H. pylori* no sólo se encuentra en el estómago, sino que también puede localizarse en otros medios como la placa dental (36), el plancton y las heces humanas (50), lo que indica que el consumo de agua contaminada con heces humanas podría transmitir el microorganismo(15). Los investigadores (21,23), plantean que esta infección es asintomática (34) y que afecta en su mayoría a la población joven, por tanto, ha habido un aumento dramático del contagio a niños que viven en países en desarrollo (4,20,34).

Las inquietudes de los investigadores por hallar y brindar información sobre las vías de transmisión de la bacteria y las técnicas utilizadas para su aislamiento y detección en el agua han sido diversas. Los estudios, muestran que esta bacteria cambia gradualmente de morfología cuando está en el agua, llevándola finalmente a su forma cocoide (3,5,27). Esto genera que el microorganismo resista a las diversas condiciones medioambientales, de esta manera se ha demostrado que la bacteria en condiciones estresantes modifica la composición de la pared celular por una alta concentración de lípidos entre los que se encuentra el colesterol-6-O-tetradecanoilalfa-D-glucopiranosida y la cardiolipina(6); la bacteria que sufre estos cambios al tomar la forma cocoide, no puede ser cultivada en los medios tradicionalmente utilizados para su recuperación. Dada esta dificultad, en la actualidad, hay métodos diferentes al cultivo para determinar la presencia de la bacteria en las fuentes de agua.

En todo sistema de laboratorio que se emplee técnicas para la detección de los distintos microorganismos, se hace obligatorio conocer cuáles son apropiadas para detectar de forma exacta la presencia de éste, (40) para ello es necesario comparar el procedimiento utilizado con una prueba de oro. Una prueba de oro es un método confiable que evalúa la técnica que se va a utilizar y que ofrece la certeza de que ésta es la correcta a partir de parámetros usados por la comunidad científica (39) Así que; la sensibilidad es la probabilidad de que se detecte la bacteria en las muestras de agua cuando ésta se encuentra realmente allí, mientras que la especificidad por su parte es la probabilidad

de que en una muestra de agua sin la bacteria, se obtenga un resultado negativo, por lo tanto es de importancia conocer las características operativas de las pruebas ya que en toda técnica utilizada se pueden presentar falsos positivos como falsos negativos y el aumento de estos disminuyen notoriamente la calidad de la técnica.

Los métodos moleculares siguen siendo los de uso regular. Cabe destacar procedimientos de este corte como el PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la hibridación in situ fluorescente (FISH), y otras técnicas como el inmunoensayo y los métodos tradicionales tal como el cultivo el cual ha sido modificado. (18, 25)

La hibridación in situ fluorescente (FISH), se basa en utilizar la sonda de ADN (16SrDNA y 23SrDNA) que ha sido previamente marcada con fluorocromos, la cual se va a unir al DNA bacteriano por complementariedad de las bases nitrogenadas en el momento de la replicación del DNA. La metodología que se utiliza al hibridar ácidos nucleicos es: 1) La preparación de la muestra que va a detectar la presencia de la secuencia diana, 2) la preparación de la sonda, es decir la secuencia complementaria que se desea localizar y que debe ser marcada para permitir su posterior reconocimiento 3) El proceso de hibridación, en el que se facilita la unión de las dos secuencias complementarias (sonda marcada con fluorocromo y cadena del DNA) y, 4) la detección de híbridos es decir cuando se observa la unión de las dos secuencias.(63)

Otro elemento básico de esta técnica es el tipo y marcaje de la sonda. Tres tipos de sonda son los que se usan actualmente. La primera, son las sondas para secuencias repetidas, que están dirigidas a regiones con secuencias cortas en varios cientos de copias. La segunda son las sondas de secuencia única que permite conocer la posición de esas secuencias en una única copia y finalmente la tercera, que son llamadas sondas de pintado cromosómico en el que se usan secuencias de DNA de un cromosoma entero, ésta última es usada para experimentos en seres humanos. El marcaje de la sonda es de dos tipos: uno indirecto (la sonda se une a una molécula que es reconocida por un anticuerpo) y el otro directo (la sonda se une a un fluorocromo) (63). Esta técnica ha demostrado ser efectiva para la visualización de ácidos nucleicos de microorganismos morfológicamente intactos en su ambiente y en aguas. Además permite observar la forma en espiral y las formas cocoides de ésta bacteria al usar un microscopio de fluorescencia. (13,14)

Según los estudios que determinan la presencia de *H. pylori* en aguas con la técnica de FISH, la sensibilidad es de 95% .(33) Sin embargo varía dependiendo del tamaño de la sonda utilizada (entre más corta mayor precisión), los oligonucleótidos fluorescentes, la preservación de los ácidos nucleicos tras la manipulación de la muestra y las condiciones de los reactivos (14). Diferentes ensayos (13, 32) demuestran que esta técnica puede presentar también falsos positivos y falsos negativos por la presencia de material biológico en las muestras ya que pueden emitir autofluorescencia (13); así como también la aparición de otras bacterias que podrían compartir características filogenéticas con *H. pylori* y llevar a la emisión de falsa fluorescencia. Para evaluar la especificidad (14) de la técnica se utilizan otros microorganismos que se encuentren en aguas pero que no emitan fluorescencia al colocar la sonda molecular. Algunas herramientas que aumentan la sensibilidad de la técnica son el método de conteo directo viable (DVC- FISH).

Otra técnica empleada para detectar la bacteria en aguas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); una técnica molecular que se basa en la amplificación de genes específicos a partir de la etapa de replicación del DNA. Los componentes que utiliza una PCR consta de oligonucleótidos de DNA, nucleótidos trifosfatados (NTPs), DNA polimerasa termoestable (*taq* polimerasa), cloruro de magnesio (MgCl₂) y agua ó buffer que actúa como una solución reguladora. A principios de los años 90 esta técnica revolucionó el mundo de la biología molecular ya que con esto se conoció a profundidad la genética humana y microbiana. La estandarización de esta técnica permitió acercarnos más al comportamiento genético y con el tiempo se definieron las fases que son básicas para esta técnica tales como: 1) La etapa de desnaturalización del DNA, 2) hibridación del cebador y 3) extensión del cebador.

En la primera fase, hay una separación del DNA bicatenario de la muestra. Al usar temperaturas iguales ó alrededor de los 95 grados centígrados se puede romper los puentes de hidrógeno que unen las bases nitrogenadas, de esta forma se puede obtener cadenas sencillas del DNA (hebra). Para la segunda fase, los oligonucleótidos ó primers son cadenas de DNA que reconocen una región específica de la hebra sencilla del DNA molde, después de esto, por complementariedad las bases nitrogenadas se unen. Los cebadores usados deben tener el mismo (forward) e inverso (reverse) sentido de la cadena DNA, con el fin de reconocer los fragmentos y pares de bases seleccionadas en cualquier sentido de la cadena. El problema que se presenta regularmente es el encontrar la temperatura adecuada para la unión del cebador a la cadena molde del DNA. Temperaturas entre 45-60 grados han sido las más utilizadas en experimentos con el *H.pylori* (25, 9). Finalmente se llega a la última fase que es la extensión de la cadena de DNA, en donde la DNA polimerasa sintetiza la hebra complementaria. Para ello la *taq* polimerasa (conocida así por la capacidad de ser lábil a altas temperaturas) se usa para facilitar este proceso. (63)

Para aumentar la sensibilidad y especificidad de la PCR convencional se ha modificado la PCR a lo largo del tiempo, sin embargo persiste el mismo procedimiento. Los tipos de PCR que tienen más demanda a nivel internacional por la confianza de detección son: PCR anidada, PCR en tiempo real, PCR múltiple y RT-PCR ó de transcriptasa reversa (62)

La PCR anidada consta de dos grupos de cebadores dirigidos a la misma región de DNA. El primer oligonucleótido reconoce al azar la región diana, el segundo grupo de cebadores por su parte se encuentra dentro del primer cebador, y su tarea consiste en hacer más fácil la detección de la región blanco (15, 43,44). Por otro lado, la PCR múltiple es un método alternativo para la detección de varios microorganismos en un momento específico. (62)

La PCR en tiempo real surgió como respuesta a factores distractores como el tiempo y la temperatura ya que cuando se utilizaba la PCR convencional, el protocolo utilizado podía variar dependiendo de la amplificación de los genes del microorganismo. La duda consistía entonces en si el tiempo en la etapa de calentamiento y enfriamiento tenía un cambio notorio entre fase y fase, para ello se implementó el uso de ventiladores. Otro avance de este tipo de PCR fue la implementación de fluorocromosy el SYBR Green ha sido utilizado para la detección del *H. pylori* en aguas (28,62). Esta PCR, tiene dos modalidades una cualitativa y cuantitativa (29) ésta última es la más usada debido a que permite conocer la concentración de DNA del microorganismo en el agua.

Con la intención de conocer la presencia de *Helicobacter pylori* en aguas, la región *16S rRNA* de la bacteria se ha amplificado ya que ésta secuencia se ha mantenido a lo largo de la evolución y permite observar las características filogenéticas de cada microorganismo (19). Otros genes específicos de *Helicobacter pylori* que se han amplificado son: *ureA* que codifica para la ureasa uno de los factores de virulencia más conocidos por este patógeno, el cual le permite a la bacteria alcalinizar el pH ácido del estómago por medio de la producción de amoníaco y dióxido de carbono. Los genes *hpaA* y *babA*, codifican las adhesinas que son glicoproteínas ó lípidos que median la interacción entre las células epiteliales del estómago y la bacteria. El gen *cag A* (gen que codifica para una proteína inmunodominante de la isla de patogenicidad), ha demostrado ser una proteína que promueve una respuesta exagerada por parte del sistema inmune y conlleva a la inflamación debido a la secreción de interleuquinas como la IL-8, IL-1 e IL-17 (7,23).

Cabe resaltar que las especies de *Helicobacter spp* que han sido aisladas en el agua hasta el momento no han presentado este gen, por lo que se infiere que su presencia es específicamente de *H. pylori* y puede desarrollarse con la forma bacilar de la bacteria que se encuentra específicamente en el estómago. Además en los últimos años, algunos autores (26,35,45) han podido aislar este gen de *H. pylori* en aguas no tratadas y han concluido que el consumo frecuentemente de aguas conlleva a síntomas asociados como dispepsia que esta ligada a úlceras y carcinomas (8). Por último, el gen *ureC* conocido anteriormente como *glmM*, codifica para una enzima llamada fosfoglucosaminatasa, ésta enzima cataliza la conversión de glucosamina-6-fosfato a glucosamina-1-fosfato, que es transformado finalmente a N-acetilglucosamina la cual es vital para la formación del peptidoglicano, uno de los componentes fundamentales de la pared bacteriana. (9)

La técnica de PCR tiene una sensibilidad de aproximadamente el 90 y el 95% (10,29). Sin embargo si no se utiliza un tipo de PCR adecuado, no se puede conocer la cantidad de microorganismos y conllevaría a un análisis incorrecto sobre la presencia de *H. pylori* en aguas (9). Generalmente para probar la especificidad de este método se usan especies de enterobacterias a partir de esto, se conoce que ésta técnica sólo amplifica genes de *H. pylori*. Los falsos positivos y negativos que se presentan pueden deberse a la inadecuada utilización de primers (12), la presencia de inhibidores en el agua (33) y características operativas del procedimiento como los cambios de temperatura, el tiempo incorrecto, exceso ó aumento de DNA y pipeteo inadecuados. De la misma manera, los métodos de pretratamiento como la filtración de membrana son necesarios para detectar concentraciones bajas de microorganismos en el agua (45).

Algunos de los inconvenientes que pueden presentarse con el método de filtración son el tamaño del poro grande en la membrana además del uso de sales químicas como cloruro de hierro ($FeCl_3$) y sulfato de aluminio ($Al_2(SO_4)_3$) que retienen en su filtro poca cantidad de materia orgánica y coloides que se encuentran en medios acuáticos lo cual imposibilita el adecuado procesamiento en la PCR (38). Adicionalmente, en las técnicas moleculares como FISH y PCR la presencia de ácido húmico (material orgánico que se encuentra en el agua), puede generar falsos positivos y negativos y generar un comportamiento inhibitorio en la *taq polimerasa* al efectuar la PCR (57). Por lo tanto, para eliminar la presencia de éste ácido, los métodos de pretratamiento han cambiado las sales comúnmente usadas y han implementado el uso de etilendiaminoacético (EDTA), siendo ésta sal efectiva para remover metales catiónicos y aniónicos contaminantes que se encuentran en el agua de suelo (61).

Otras técnicas que complementan la sensibilidad de la PCR son dos, la primera es la separación inmunomagnética y la segunda es la microscópica electrónica. La primera permite recuperar células eucariotas y/o procariotas del agua y emplea perlas inmunomagnéticas cubiertas con anticuerpos de antígenos de la bacteria. De esta manera, la bacteria se une a las perlas y forman agregados, luego con un imán se descarta los elementos que pueden generar falsos positivos, aumentando la sensibilidad de esta técnica (60,2).

La segunda por su parte, determina una relación entre morfología y capacidad de crecimiento de la bacteria en muestras de agua, para ello utiliza un kit conocido como LIVE/DEAD *baclight* que reconoce las células viables (verdadero crecimiento y presencia de la bacteria) de las no viables (células muertas) usando así los reactivos como yoduro de propidio y SYTO 9. Este procedimiento se corrobora en el microscopio de fluorescencia al identificar la presencia y morfología de la bacteria (48,58,47).

Otras técnicas como el inmunoensayo son usadas para detectar, identificar y cuantificar antígenos en diferentes muestras especialmente en heces humanas. (44) Se basa en mostrar la presencia de antígenos típicos de este microorganismo utilizando anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos que van dirigidos únicamente contra estos antígenos. A finales de los años noventa, en las muestras de agua se encontró que los anticuerpos dirigidos contra *Helicobacter pylori* eran específicos contra este microorganismo y no emitían fluorescencia a otras especies de enterobacterias (24). Lo cual permite inferir la buena especificidad de esta técnica, sin contar con las nuevas tecnologías utilizadas en el campo de la inmunología donde se adquirió mayor sensibilidad y especificidad con la citometría. Esta técnica permite determinar el tamaño y el número de microorganismos en una pequeña cantidad de muestra (29)

Las técnicas menos utilizadas según los modelos experimentales son los cultivos ya que es difícil aislar las formas cocoides de *Helicobacter pylori* que se conoce por los investigadores como células viables pero no cultivables (VBNC) provenientes de ambientes acuáticos. Estas formas cocoides tienen la capacidad de promover su metabolismo y crecer lentamente. Algunos autores (25,18) han logrado crear medios de cultivo, como HP y MCUA que se basan en la alta concentración de urea y rojo de fenol con el fin de evidenciar la enzima ureasa (específica del *H. pylori*), el objetivo de esta iniciativa es que al resuspender la bacteria que se halla en el agua se pueda evidenciar el crecimiento de la bacteria y así predecir que tanto porcentaje de sobrevivencia a tenido, siendo el conteo de la bacterias una ventaja que ofrece el cultivo frente a la PCR.

Los medios de cultivo comunes manejan agar Columbia con sangre de caballo desfibrinizada que oscila entre el 5-7%, medios líquidos como brucella complementado con suero de caballo e incluso sulfato ferroso, (34) que le brindan al microorganismo elementos necesarios para su crecimiento como el carbono y el nitrógeno, y de la misma manera se hace obligatorio emplear la presencia de antibióticos como vancomicina, cefsulodina, trimetropin, cicloheximida, ácido nalidíxico (42,14) que inhiben el crecimiento de otros patógenos como hongos ó bacterias.

De los experimentos que han realizado los investigadores para aislar *Helicobacter pylori* en aguas, solamente Lu Y. et al (2) han podido aislarla de manera satisfactoria lo que indica que es tedioso encontrar un medio de cultivo apto para el crecimiento e identificación de formas cocoides de *Helicobacter pylori*. A raíz de esto, los métodos de cultivo han sido modificados con componentes específicos que ofrece el ambiente estomacal como la presencia de fumarato/formiato, aminoácidos como metionina, glutamato, bicarbonato (59), con el objetivo de simular las condiciones estomacales en donde las formas cocoides viables no cultivables pasan a la forma bacilar cultivable.

Se ha encontrado que en aguas residuales, aguas de río, aguas de grifo, agua de tanque, aguas de mar ó aguas subterráneas e incluso en aguas potables de diversos países (en desarrollo y desarrollados) se encuentra la presencia de *H. pylori* lo que indica que esta bacteria tiene una estrecha relación con aguas contaminadas y con la resistencia a desinfectantes comunes como el cloro y el ozono (1,32). Puede ser que esta bacteria tenga un mutualismo con ciertos microorganismos como *E.coli* (38,11), *Legionellapneumophila*(51), *Vibrio spp*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *PseudomonasyKlebsiella*, Además de parásitos como *Giardiaintestinalis*(53,54) y *Acantamoebacastellani*(52) levaduras como *Candidasp*(56)y con el virus de la hepatitis A (55). Todo esto nos lleva a pensar que *H. pylori* puede comportarse como un patógeno del agua (33,10,47) relacionado con enfermedades gastrointestinales. Al tener el *H. pylori* contacto con estos tipos de microorganismos se puede disminuir la sensibilidad de las técnicas denominadas y pasar desapercibida en algunas ocasiones.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN: ¿Qué técnicas de detección y aislamiento son actualmente utilizadas para identificar *Helicobacter pylori* en aguas?

OBJETIVO GENERAL

Proveer un conocimiento general sobre las técnicas y procedimientos utilizados para la identificación de *H. pylori* en muestras de aguas a partir de los artículos científicos con el fin de encontrar una técnica adecuada para su detección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar que técnicas y métodos son actualmente utilizados para la identificación de *H. pylori* en aguas
- Evaluar de acuerdo a los artículos citados que técnica es la más adecuada para identificar la presencia de *H. pylori* en muestras de agua.

METODOLOGÍA

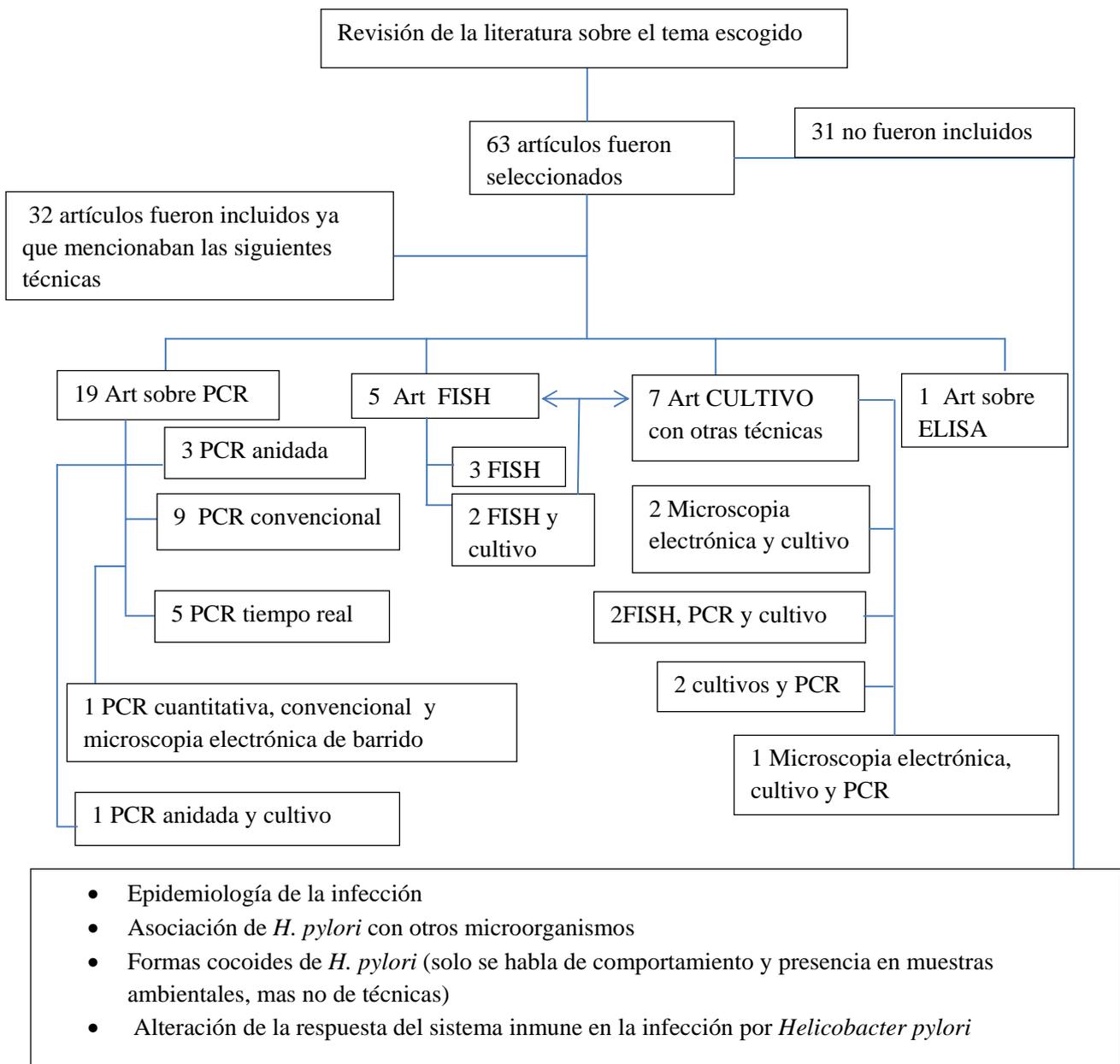
- DISEÑO

Revisión de la literatura de diferentes fuentes de información científica como Medline, Academicsearch complete (EBSCO), Biomed central, sciencedirect (elselvier) y otras fuentes literarias. Para ello, se buscó por campos específicos como palabras claves, título del artículo y autores relacionados. Como criterios de inclusión se contemplaron estudios comprendidos entre los años 1993-2012 en donde se evalúen diferentes técnicas utilizadas en muestra de agua para la detección de *Helicobacter pylori*, además de artículos en inglés en español que hablarán sobre el tema, en cuanto a los criterios de exclusión se tuvieron en cuenta publicaciones hechas antes de 1993, así como artículos relacionados con técnicas usadas en otros tipos de muestra diferente a aguas y por último artículos en idiomas diferentes al inglés y el español

Palabras clave: agua, *Helicobacter pylori*, identificación en formas cocoides, PCR, inmunofluorescencia, hibridación in situ, cultivo, sensibilidad, especificidad

RESULTADOS

A partir de los artículos seleccionados de la revisión del tema se presenta a continuación un resumen gráfico de las técnicas usadas comúnmente para la detección de *Helicobacter pylori* en aguas



En la siguiente tabla se muestran los artículos incluidos para la evaluación de *H. pylori* en aguas, haciendo referencia a la técnica utilizada, los falsos positivos y negativos que presenta la prueba, así como la técnica estándar para la exactitud de la misma.

TABLA DE RESULTADOS

Art	Autores Año	técnica empleada	resultados		Técnica estándar
			Detecta ó no	Falsos positivos ó falsos negativos	
24	HEGARTY J, P. Et al. 1999	inmunología	Si, en 42 muestras 25 fueron positivas para <i>H. pylori</i>	Posibilidad de reacción cruzada con otros microorganismos diferentes a <i>H. pylori</i> , la reducción del colorante cloruro tetrazoilocianotidol (CTC) no prueba realmente la presencia de viable- infecciosa de <i>H. pylori</i>	Anticuerpos monoclonales, reducción del CTC
11	KEYA SEN, et al. 2007	qPCR, utilizando el gen <i>ureA</i>	Si, la qPCR permite cuantificar el número de células de <i>H. pylori</i> alrededor de 20 células por cada 300 células de <i>E.coli</i> .	El uso de plásmidos recombinantes de <i>E. coli</i> puede generar falsos positivos ya que al aumentar la cantidad de células de <i>E. coli</i> hay presencia de <i>H. pylori</i> (reactividad cruzada) e inhibidores de la PCR	UFC/ML, diluciones
58	KONISHI K, et al. 2007	microscopia electrónica de barrido (SEM) y cultivo	Si, se observaron formas en espiral y coccoides de <i>H. pylori</i> en el medio de cultivo y en el microscopio electrónico	Es necesario identificar el medio de cultivo que recupera de forma adecuada las formas en espiral y cocoide de la bacteria ya que el caldo brucella no es el adecuado.	UFC/ML, SYTO-9 y yoduro de propidio (Baclight)
48	ADAMS B.L, et al. 2003	Microscopia epifluorescencia (SEM) y cultivo	Con el cultivo no se aísla <i>H. pylori</i> por la incapacidad de formar colonias. Si, detecta 33% de formas coccoides después de 10 días con SEM	cultivos con baja cantidad de fosforo e inadecuada temperatura conllevan a un bajo crecimiento de la bacteria y pobre penetración del colorante	coloración fluorescente SYTO-9, yoduro de propidio (Baclight) UFC/ML
47	QUERALT N y ARAUJO R. 2007	microscopia electrónica de barrido (SEM), PCR y cultivo	Si, se pudo detectar formas coccoides por SEM el día 14 en el cultivo y por PCR al día 21 fue positivo para gen <i>ureA</i>	Necesario utilizar la tinción de fluorescencia lo más pronto posible por la pérdida de luz y por la pérdida de viabilidad celular	coloración fluorescente SYTO-9 y yoduro propidio. UFC/ML, dilución
9	SHAHAMAT M, et al. 2004	PCR genes <i>glmM</i> y <i>16SrRNA</i> región hipervariable	Si, detecta <i>H. pylori</i>	No se nombra.	diluciones
38	ZHANG Y, et al. 2012	Método de filtración y PCR	Si, la PCR detecta <i>H. pylori</i> entre 6-60 cel/ml por el método de filtración por membrana ya que es útil como pretratamiento para la PCR	Usar un filtro de policarbonato genera mayores errores de recuperación del DNA. Es necesario usar filtros de celulosa. Usar un kit de purificación mucho más específico	método filtración con FeCl3 ó Al2(SO4)3. Diluciones
33	TWING K, 2011	PCR genes <i>23SrRNA</i> , <i>16SrRNA</i> , <i>vacA</i> , <i>ureA</i>	Si, detecta <i>H. pylori</i> superior a un 20%	Al utilizar varios primers entre la subunidad <i>16SrRNA</i> , <i>ureA</i> y <i>cagA</i> puede disminuir la detección de <i>H. pylori</i> ya que algunos se encuentran dentro del ADN otros del plásmido	Diluciones con concentraciones conocidas
45	MAZARI-HIRIART M, et al. 2001	PCR <i>16SrRNA</i> y <i>cagA</i>	Si de las 77 muestras positivas para <i>H. pylori</i> , 16 son positivas para el gen <i>16SrRNA</i> , 5 muestras	No se nombra	método de filtración, dilución

			son positivas para el gen <i>cagA</i>		
26	YÁNEZ, M. Et al. 2008	PCR en tiempo real <i>cagE</i>	Si, la PCR en tiempo real encontró 3 células de <i>H. pylori</i> en 40 muestras de agua.	Puede haber en el agua otras cepas de <i>H. pylori</i> que no presenten este gen. Ineficiente proceso de preparación de las muestras	Diluciones
46	HULTEN K.1996	PCR gen <i>16SrRNA</i> y gen adhesina específica de <i>H. pylori</i>	Si, 24 muestras fueron positivas para <i>16SrRNA</i> y 11 muestras de ellas para adhesina de <i>H. pylori</i>	No se nombra	diluciones, southernblot
27	LINKE, S. Et al. 2010	PCR tiempo real cuantitativa	La QRTPCR según el estudio son positivas para <i>H. pylori</i>	Al analizar las biopelículas tienen una baja recuperación de células de <i>H. pylori</i> y un alto número de células de otras bacterias. Importante utilizar más cepas que se encuentren en muestras medioambientales para aumentar la especificidad	Dilución
44	FUJIMORA S. 2004	PCR anidada para gen <i>ureA</i> y PCR semi-anidada para <i>cagA</i> y cultivo	SI, se encontró el gen <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i> en los cuatro ríos, mientras que el gen <i>cagA</i> en 3 ríos	Es importante determinar el método para eliminar los inhibidores de la PCR y excrementos de las muestras de río porque generan contaminación con otros microorganismos	Dilución
28	NAYAK A. K y ROSE J.B. 2007	PCR cuantitativa utilizando el gen <i>vacA</i> , PCR convencional y microscopia electrónica de barrido (SEM)	Si, 20 de las 23 muestras fueron positivas para <i>H. pylori</i> utilizando la técnica SEM y PCR tiempo real cuantitativa	Pérdida de membrana celular al utilizar una PCR, presencia de inhibidores lo que conlleva a un aumento de falsos negativos. No fue encontrada la presencia de <i>H. pylori</i> por PCR convencional	coloración fluorescente SYBR green, diluciones
15	CELLINI L. Et al. 2004	PCR anidada, gen <i>glmM</i>	Si, hay una fuerte correlación entre la presencia de <i>H. pylori</i> y el plancton	La relación de microorganismos eucariotas ó procariontas puede formar biopelículas que de forma indirecta dificulta la detección de <i>H. pylori</i>	dilución
43	QUERALT N, et al. 2005	PCR semi-anidada, gen <i>ureA</i>	Si, se encuentra <i>H. pylori</i> en aguas residuales (66%) y de río (11%)	No se nombra	dilución
42	MAZARI-HIRIART M, et al. 2008	PCR <i>16SrRNA</i> y <i>cagA</i>	44% fueron positivas para <i>16SrRNA</i> y de estas 14% fueron positivas para <i>cagA</i>	La variedad de especies de enterobacterias en aguas residuales pueden aveces encubrir el crecimiento de <i>H. pylori</i> .	diluciones
10	BENSON, J. Et al. 2004	PCR para gen <i>ureA</i>	Si, en aguas contaminadas las diluciones más concentradas eran positivas para <i>H. pylori</i>	No se obtuvo la presencia de la bacteria cuando no se diluían bien las muestras y la presencia de inhibidores en el agua. Poca cantidad de células de <i>H. pylori</i>	diluciones
30	BUNN, J.E.G.,Et al. 2002	PCR	Si, utilizando el gen <i>16SrRNA</i> de <i>H. pylori</i> cepa (HPC7058)	Se hace necesario utilizar una concentración estándar del microorganismo y identificar la calidad de los reactivos	diluciones
29	A.E MCDANIELS, et al. 2005	QRTPCR utilizando el gen <i>ureA</i> , citometría	Si, gracias a la citometría de fase sólida y QRTPCR se pudo encontrar <i>H. pylori</i>	Se debe tener en cuenta el estado de los fluorocromos (pérdida de emisión de luz) y los componentes inhibidores de la PCR.	diluciones
21	SAMRA Z,et al. 2011	PCR y cultivo medio HP	Si, se encontró la presencia de <i>H. pylori</i> en muestras de agua por PCR	No se nombra	diluciones, UFC/ML

12	JANZON A, et al. 2009	PCR- tiempo real	NO detecta la presencia de <i>H. pylori</i> en muestras de agua.	Puede deberse a la cepa escogida de <i>Helicobacter pylori</i> J99 como control positivo, degradación formas coccoides en el agua a largo plazo.	diluciones
35	CARBONE M, et al. 2005	PCR usando genes <i>16SrRNA</i> , <i>ureA</i> y <i>cagA</i>	SI, detecta por PCR <i>H. pylori</i> en aguas costeras	Pérdida de DNA de <i>H. pylori</i> que puede deberse a las repeticiones para confirmar la verdadera presencia de este microorganismo	diluciones
31	PIQUERES P, et al. 2006	DVC-FISH	Si, para ello se utilizó el método de conteo directo viable (DVC)-FISH	Es importante tener en cuenta las formas no elongadas de la bacteria como positivas	Conteo directo viable, microscopia
32	MORENO Y, et al. 2007	DVC-FISH	Si, para ello se utilizó el método de conteo directo viable (DVC)-FISH	Agregados celulares que pueden emitir falsa fluorescencia, problemas en la definición de estado viable pero no cultivable ya que hay pérdida de definición de muerte bacteriana (cambios en fluorescencia)	Conteo directo viable, microscopia
57	MORENO Y FERRUS A. 2012	cultivo, FISH, PCR,	45 del total de muestras, 6 fueron positivas en cultivo a pesar de que estaban contaminadas con microbiota. 21 muestras para PCR y 26 por FISH	Muchas ocasiones la PCR no detecta totalmente las muestras que son positivas para <i>H. pylori</i> , esto puede deberse a la presencia de ácido húmico en el agua y que inhibe la PCR. Contaminación con microbiota del agua por parte del cultivo	dilución, UFC/ML, conteo directo viable (DVC)
14	MORENO Y, et al. 2003	FISH, PCR y cultivo	De las 15 muestras, 3 muestras por FISH fueron positivas para <i>H. pylori</i> . Para PCR 1 muestra	la muestra fue positiva por PCR y en el cultivo no se encontró la presencia de <i>H. pylori</i>	conteo en placa, UFC/ML, dilución
13	BRAGANRA, M. Et al. 2007	FISH	Si, hay presencia de <i>H. pylori</i> en aguas profundas contaminadas donde se puede encontrar biopelículas	Presencia de metales pesados como hierro e el agua y otros materiales biológicos que interfieren en la fluorescencia	conteo directo viable (DVC)
3	GIAO M. S, et al. 2008	cultivo y FISH	Si, crecimiento en el medio HP de <i>H. pylori</i> en muestras de agua. Se detectó <i>H. pylori</i> por técnica de FISH	Autofluorescencia de plancton y material biológico por la técnica de FISH con el colorante DAPI, el cultivo recuperó <i>H. pylori</i> sin otros microorganismos concomitantes	UFC/ML y DVC
17	AZEVEDO N.F, et al.2008	cultivo, hibridación <i>16SrRNA</i>	Si, el cultivo detectó <i>H. pylori</i> en condiciones de poca luz y a 25°C. La hibridación encontró la presencia de <i>Helicobacterspp</i> y <i>H. pylori</i>	no se nombra	UFC/ML, DVC
2	LU Y, et al. 2002	IMS, cultivo y PCR <i>16SrRNA</i> y <i>vacA</i>	Por los tres métodos se encontró la presencia de <i>H. pylori</i> que permitió concluir la variedad de gen <i>vacA</i> (alelos)	no se nombra	UFC/ML, perlas inmunomagnética
25	AL- SULAMI A., et al. 2012	Cultivo (medio HP Y MCUA) y PCR <i>16SrRNA</i>	Si, los medios MCUA, HP y la PCR son efectivos para encontrar <i>H. pylori</i> de agua	Al utilizar el gen <i>16SrRNA</i> en la PCR puede generar falsos positivos ya que se comparte filogenéticamente en las bacterias.	Dilución, UFC/ml

DISCUSION DE RESULTADOS

De los 63 artículos escogidos para esta revisión de literatura, solo 32 fueron incluidos ya que hablaban específicamente sobre las técnicas de detección del DNA libre (42,43) o las formas cocoides de *H. pylori* en aguas (47,48). Como se observa en la tabla de resultados la técnica más utilizada es la PCR. La principal ventaja que presenta, es una rápida identificación de la bacteria porque utiliza cebadores para la amplificación de los siguientes genes *cagA*, *vacA*, *16SrRNA*, *ureA* e incluso *cagE* (25, 26, 9, 46).

Los tipos de PCR más usados según estos artículos han sido la PCR convencional, la PCR anidada y la PCR en tiempo real cuantitativa. Cellini et al, 2004 (15), Fujimora et al, 2004 (44) y Queralt et al, 2005 (43) han usado la PCR anidada y sus resultados revelan que los genes de *H. pylori* *ureC*, *ureA* y *cagA* han sido encontrados en plancton y ríos respectivamente. Un descubrimiento importante es que donde nacen los ríos (los que se encuentran cerca a las montañas) la cantidad de enterobacterias y de *H. pylori* es nula, lo que indica que el contacto de estas aguas con los humanos es lo que propicia la contaminación con estos microorganismos (44, 43).

Otros investigadores han utilizado la PCR en tiempo real (11,38,27,12,28) y explican que la utilización de fluorocromos facilita la cuantificación del microorganismo en aguas y por ende la detección del DNA bacteriano como lo indican Nayak y Rose, 2007 (28). Sin embargo, dentro de las desventajas que presenta este tipo de PCR como lo señala Janson et al, 2009 (12) está la degradación de las formas cocoides en el agua, la poca especificidad de la secuencia de los primers escogidos y la presencia de biopelículas en el agua como lo explica Linke et al, 2010 (27) así como también la reactividad cruzada con otros microorganismos como *E. coli* que menciona KeyaSen et al, 2007 (11).

Para esto como lo exponen otros científicos es necesario seguir rigurosamente el protocolo estandarizado, usar diferentes cepas de *Helicobacter pylori* y de enterobacterias como controles que permitan aumentar la especificidad de la prueba (27). En cuanto a la PCR convencional los resultados han sido buenos, pero autores como Shahamat et al, 2004 (9) y Twing et al, 2011 subrayan que es importante utilizar varios genes de la bacteria para amplificarlos en muestras de agua, con el objetivo de aumentar la sensibilidad de este tipo de PCR, ya que pueden presentarse falsos resultados. Igualmente investigadores como Moreno y Ferrus, 2012 (57) nombran la presencia de partículas en el agua que corresponden a material orgánico, en especial el ácido húmico, que puede llegar a ser inhibidor de la PCR. Por lo tanto el proceso ineficiente de preparación de las muestras puede disminuir la sensibilidad de la técnica como lo señala Benson et al, 2004 (10), de igual manera la prueba puede verse afectada por la calidad de los reactivos.

Otra técnica molecular que ha tenido un auge en los últimos años es la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH). Moreno et al 2007 (32), Piqueres et al 2006 (31), han utilizado esta técnica

para la identificación de *H. pylori* en muestras de agua. Indican que incluso el sistema de FISH permite reconocer efectivamente la presencia de esta bacteria mucho mejor que la PCR ya que en dos de los experimentos realizados (32,57) hubo muestras positivas para *H. pylori* que la PCR no reconoció.

Brangara et al, 2007(13) y Giao et al, 2008(3), encontraron en sus ensayos de FISH la presencia de *H. pylori*, sin embargo mencionan que el material biológico y/o metales como el hierro en el agua y el tipo de colorante influyen en la fluorescencia de esta técnica. Como herramientas complementarias que aumentan la sensibilidad de la prueba también se ha utilizado la microscopia electrónica de barrido para observar la morfología y realizar el conteo de bacterias de *H. pylori* viables. Para mejorar la especificidad de esta prueba Moreno et al, 2003 (14) recomiendan utilizar otras enterobacterias que pueden encontrarse en el agua. Así como revisar la autofluorescencia antes de empezar una prueba, verificando la calidad y preservación de los reactivos y el oligonucleótido usado.

El método de cultivo para aislar *H. pylori* en aguas no ha sido una estrategia satisfactoria. Con excepción de Lu. et al, 2002 (2) que pudo cultivar efectivamente *H. pylori* gracias a diferentes métodos como la separación inmunomagnética y PCR; casi siempre las estrategias de cultivo deben ir complementadas con técnicas de detección del DNA de la bacteria en el agua por métodos moleculares como la PCR (57). Otros autores como Adams, et al (48) según sus ensayos explican que la cantidad de los nutrientes del medio de cultivo como el fosforo y los cambios de temperatura influyen en el correcto crecimiento de *H. pylori*. Según Konishi (58) *H. pylori* crece en aguas profundas y ríos de manera satisfactoria pero al colocarla en medios de cultivo como agar ó caldo brucella el crecimiento se inhibe. Cabe preguntarse si hay algún componente en el agua que favorezca su apto desarrollo, esto hasta el momento no ha sido aclarado.

El único método inmunológico que utiliza un ELISA indirecto fue el de Hegarty, et al (24). Según sus resultados en muestras de agua se encuentra *H. pylori*, sin embargo él menciona que muchos falsos positivos se pueden encontrar. Por ejemplo, puede haber una posible reacción cruzada con otros microorganismos a pesar de que el anticuerpo utilizado sea específico para *H. pylori*, y además la presencia de células viables- infecciosas no siempre reducen el colorante cloruro-tetraizocianotidol (CTC) a si posean actividad metabólica y respiratoria. Sería importante rectificar estos ensayos con otras pruebas inmunológicas como la citometría y técnicas moleculares como lo nombra McDaniels et al, 2005 ya que según este autor la complementación de estas dos técnicas y en especial de la PCR tiene una sensibilidad de un 95%. (29)

CONCLUSION

Las técnicas utilizadas para la detección de *H. pylori* en aguas son microbiológicas como el cultivo; inmunológicas como la ELISA y moleculares como PCR y FISH. Las técnicas que menos sensibilidad y especificidad poseen son el cultivo y el ELISA por lo tanto no es recomendable utilizarlas para encontrar *H. pylori* en aguas. Las técnicas moleculares son útiles. La PCR es una buena prueba para encontrar *H. pylori* y los tipos de PCR que actualmente se usan en el ámbito científico son la PCR anidada y PCR en tiempo real, en especial esta última porque permite conocer la cantidad de DNA del microorganismo en el agua. Otras técnicas sirven como complemento para la PCR, ofrecen seguridad y exactitud de los resultados como es el caso de la microscopia electrónica de barrido y la separación inmunomagnética. Sin embargo, la técnica de FISH es la que se recomienda para detectar *H. pylori* por su adecuada sensibilidad y especificidad, además que con ella se puede evaluar la viabilidad, morfología y cantidad del microorganismo presente en las muestras de agua.

BIBLIOGRAFÍA

1. GIL M. S, AZEVEDO N. F, WILKS S. A, VIEIRA M. J, KEEVIL C. W. 2010 *Effect of Chlorine on Incorporation of Helicobacter pylori into Drinking Water Biofilm*, applied and environmental microbiology, Vol. 76, No. 5, pp. 1669–1673.
2. LU Y, Et al. 2002 *Isolation and Genotyping of Helicobacter pylori from Untreated municipal Wastewater*, applied and environmental microbiology, Vol. 68, No. 3, pp. 1436–1439.
3. GIL M. S, AZEVEDO N. F, WILKS S. A, VIEIRA M. J, KEEVIL C. W. 2008 *Persistence of Helicobacter pylori in Heterotrophic Drinking-Water Biofilms*. applied and environmental microbiology, Vol. 74, No. 19, pp. 5898–5904
4. CELLINI, L. Et al, 2010 *Detection of helicobacter pylori in saliva and esophagus*. New microbiologic, Vol 33, pp. 351-357.
5. ANDERSEN, LP et al. 2009 *Helicobacter pylori- coccoid forms and biofilms formation*. Immunology and medical microbiology, Vol 56, No 2, pp. 112-115
6. SHIMOMURA H. Et al. 2004 *Alteration in the composition of cholesterylglucosides and other lipids in Helicobacter pylori undergoing morphological change from spiral to coccoid form*, FEMS microbiology letters. Vol 15, pp. 407-413
7. EVANS D. Et al. 1998 *Helicobacter pylori Cag A status and s and m alleles of VacA in isolates from individuals with a variety of H. pylori: Associated gastric disease*. J clinic microbiology, Vol 36, pp. 3435-3437.
8. CHUNG W. Et al. 2010 *The detection of helicobacter pylori cag pathogenicity islands (PAIs) and expression of matrix metalloproteinase -7 (MMM-7) in gastric epithelial dysplasia and intramucosal cancer*. Gastric cancer, Vol 13, No 3, pp. 162-169.

9. SHAHAMAT, M. Et al. 2004 *Development of Two PCR-Based Techniques for Detecting Helical and Coccoid Forms of Helicobacter pylori*. Journal of clinical microbiology, Vol. 42, No. 8, pp. 3613–3619.
10. BENSON, J. Et al. 2004 *Detection of helicobacter pylori in water by direct PCR*. left and applied microbiology, Vol 39, pp.221-225
11. SEN K. Et al. 2007 *Development of an internal control for evaluation and standardization of a quantitative PCR assay for detection of helicobacter pylori in drinking water*. Applied and environmental microbiology, Vol 73, No 22, pp. 7380-7387
12. JANZON, A. Et al. 2009 *Failure to detect Helicobacter pylori DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive real time PCR assays*. Applied and environmental microbiology, Vol 75, No 10, pp. 3039-3044
13. BRAGANRA, M. Et al. 2007 *Use of fluorescent in situ hybridization for the visualization of Helicobacter pylori in real drinking water biofilms*. Water science and technology: a journal of international association on water pollution research, vol 55, No 8-9 pp. 387-393
14. MORENO, Y Et al. 2003 *Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence H. pylori in water*. Water research, Vol 37, No 9, pp. 2251-2256
15. CELLINI L. Et al, 2004 *Detection of free and plankton-associated Helicobacter pylori in seawater*. J. appl. Microbiology, Vol 97, No 2, pp. 285-292
16. BELLACK N.R, et al. 2006 *Review articles A conceptual model of water's role as a reservoir in Helicobacter pylori transmission: a review of the evidence*. Epidemiol. Infect. Vol 134, No 3, pp. 439–449.
17. AZEVEDO N.F, ALMEIDA C, FERNANDEZ I, CERQUEIRA L, DIAS S, KEEVIL C W y VIEIRA M J. 2008 *Survival of Gastric and Enterohepatic Helicobacter spp. in Water: Implications for Transmission*, Applied and environmental microbiology. Vol 74, No 6, pp. 1805–1811.
18. DEGNAN, J. Et al. 2003 *Development of a plating medium for selection of Helicobacter pylori from water samples*, applied and environmental microbiology. Vol 69, No 5, pp. 2914-2918.
19. RODICIO, M. Et al. 2004. *Identificación bacteriana mediante secuenciación del RNAr 16S: Fundamento metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Enferminfeccmicrobialclin, Vol 22, No 4, pp. 238-245
20. TRAVIS Penny, et al. 2010 *The association of drinking water quality and sewage disposal with Helicobacter pylori incidence in infants: the potential role of water-borne transmission*. Journal of water and health, Vol 1, No 8. pp. 1-13.
21. SAMRA Z, et al. 2011 *PCR assay targeting virulence genes of Helicobacter pylori isolated from drinkingwater and clinical samples in Lahore metropolitan, Pakistan*. Journal of water and health. Vol 9, No 1, pp. 1-9
22. NILSSON Hans-Olof, et al. 2001 *Effect of Cold Starvation, Acid Stress, and Nutrients on Metabolic Activity of Helicobacter pylori*. Applied and environmental microbiology, vol 68, No 1, pp. 1-9.
23. KABIR S, 2011. *The role of interleukin-17 in the H.pylori induced Infection and immunity*. Helicobacter, Vol 16, No 1, pp. 1-8.

24. HEGARTY J, P. Et al. 1999 *Occurrence of Helicobacter pylori in surface water in the United States*. J appl microbiology, Vol 87, No 5, p. 697-701.
25. A.A AL- SULAMI, Et al. 2012 *Culture method and PCR for the detection of Helicobacter pylori in drinking water in Basrahgovernate, Iraq*. Gastroenterology research and practice. Vol 2012, pp. 1-5
26. YÁNEZ, M. Et al. 2008 *Quantitative detection of Helicobacter pylori in water samples by real-time PCR amplification of the cag pathogenicity island gene, cagE*. J. appl microbiology, vol 107, No 2, pp. 416-424
27. LINKE, S. Et al. 2010 *Detection of Helicobacter pylori in biofilms by real-time PCR*. International journal of hygiene and environmental health, Vol 213, No 3, pp.176-182
28. NAYAK A.K y ROSE J.B. 2007 *Detection of Helicobacter pylori in sewage and water using a new quantitative PCR method with SYBRgreen*. J. appl microbiology, Vol 103, No 5, pp. 1931-1941.
29. MC- DANIELS A.E, Et al. 2005 *Evaluation of quantitative real time PCR for the measurent of Helicobacter pylori at low concentrations in drinking water*, Water research, Vol 39, No 19, pp. 4808-4816.
30. BUNN J.E.G. Et al. 2002 *Detection of Helicobacter pylori DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life*, Letters in applied microbiology, vol 34, No 6, pp. 450-454.
31. PIQUERES P, et al. 2006 *A combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization for estimating Helicobacter pylori cell viability*, Research in microbiology. Vol 157, No 4, pp. 345-349
32. KHAN A, et al. 2012 *Presence of Helicobacter pylori in drinking water of Karashi, Pakistan*, J Infect Dev Ctries. Vol 6, No 3, pp 251-255.
33. TWING K, et al. 2011 *Temporal study of Helicobacter pylori presence in coastal freshwater, estuary and marine waters*. Water research Vol 45, No 4, pp1897-1905.
34. GOMES B.C y DE MARTINIS E.C.P 2004 *The significance of Helicobacter pylori in water, food and environmental samples*. Food control Vol 15, pp. 397-403
35. CARBONE M, et al. 2005 *Occurrence of Helicobacter pylori DNA in the coastal environment of southern Italy (Straits of Messina)*. Journal of Applied microbiology Vol 98, No 3, pp. 768-774
36. PERCIVAL S y THOMAS J. 2009 *Transmission of Helicobacter pylori and the role of water and biofilms*. Journal of water and health. Vol 7, No3, pp. 469-474
37. MUHAMMAD JS, et al. 2012 *Epidemiological ins and outs of Helicobacter pylori: a review*. J pak med assoc, vol 62, No 9, pp 955-959
38. ZHANG Y, et al. 2012 *Determination of low-density Escherichia coli and Helicobacter pylori suspensions in water*, Water research, Vol 46, No 7, pp 2140-2148
39. RUIZ A y MORILLO L. *Epidemiología clínica: investigación clínica aplicada*. 1^{ra} edición, 2004. Editorial medica panamericana, pp 111-122

40. HERNANDEZ AGUADO I, GIL A, DELGADO M, BOLÚMAR F, BENAVIDES F, PORTA M, ALVAREZ-DARDET C, LUMBRERAS B. *Manual de epidemiología y salud pública para grados en ciencias de la salud*, 2011 2^{da} edición, editorial médica panamericana, PP. 87-90
41. VELAZQUEZ, M y FEIRTAG J M. 1999 *Helicobacter pylori: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water*. International journal of food microbiology. Vol 53, pp 95-104
42. MAZARI-HIRIART M, et al. 2008 *Microbiological implications of periurban agriculture and water reuse in Mexico city*. PLoS one, vol 3, No 5, pp1-8
43. QUERALT N, et al. 2005 *Detection of Helicobacter pylori DNA in human heces and water with different levels of fecal pollution in the north-east of Spain*, Journal of applied microbiology, vol 98, No 4, pp 889-895
44. FUJIMORA S, et al. 2004 *Helicobacter pylori in japanese river water and its prevalence in Japanese children*, letters in applied microbiology, vol 38, No 6, pp 517-521
45. MAZARI-HIRIART M, et al. 2001 *Helicobacter pylori and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico city*. Archives of medical research, vol 32, No 5, pp 458-467
46. HULTEN K, et al. 1996 *Helicobacter pylori in the drinking water in Peru*, Gastroenterology, Vol 110, No 4, pp 1031-1035
47. QUERALT N y ARAUJO R. 2007 *Analysis of the survival of H. pylori within in a laboratory based aquatic model system using molecular and classical techniques*, Microbial ecology, Vol 54, No 4, pp 771-777
48. ADAMS B.L, et al. 2003 *Survival of Helicobacter pylori in a natural freshwater environment*, applied and environmental microbiology, vol 69, No 12, pp 7462-7466.
49. SHE F.F, et al. 2003 *Virulence of water- induced coccoid Helicobacter pylori and its experimental infection in mice*, World journal gastroenterology. Vol 9, No 3, pp 516-520
50. SAFAEI H.G, et al. 2011 *Helicobacter pylori as a zoonotic infection: the detection of Helicobacter pylori antigens in the milk and faeces of cows*, Journal of research in medical science. Vol 16, No 2, pp 184-187
51. GIAO M, et al. 2011 *Interaction of Legionella pneumophila and Helicobacter pylori with bacterial species isolated from drinking water biofilms*. BMC microbiology , Vol 11, No 57, pp 1-10
52. WINIECKA-KRUSNELL J, et al. 2002. *Free-living amoebae promote growth and survival of Helicobacter pylori*. Scandinavian Journal of infectious disease. Vol 34, No 4, pp 253-256
53. MOREIRA ED, et al. 2005, *Association of Helicobacter pylori infections and giardiasis: result from study of surrogate markers for fecal exposure among children*. World journal of gastroenterology, Vol 11, No 18, pp 2759-2763
54. ANKARKLEV J, et al 2012, *Common coinfections of Giardia intestinalis and Helicobacter pylori in non-symptomatic Ugandan children*. PLoS neglected tropical disease, Vol 6, No 8, pp 2-8
55. BIZRI, A.R et al. 2006, *Association between hepatitis A virus and Helicobacter pylori in a developing country: the saga continues*. Journal of Gastroenterology and hepatology Vol 21, No 10, pp 1615-1621

56. SALMANIAN A.H. 2008 *Yeast of the oral cavity is the reservoir of helicobacter pylori*. Journal of oral pathology and medicine Vol 37, No 6, pp 324-328
57. MORENO Y y FERRUS A. 2012, *Specific detection of cultivable Helicobacter pylori cells from wastewater treatment plants*. Helicobacter: Vol 17, No 5, pp 327-332
58. KONISHI K, et al. 2007, *Helicobacter pylori: longer survival in deep ground water and sea than in a nutrient- rich environment*. APMIS. Vol 115, No 11, pp 1285-1291
59. TESTERMAN T, McGEE D y MOBLEY H. 2001. *Helicobacter pylori growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture*. Journal of clinical microbiology. Vol 39, No 11, pp 3842-3850
60. ENROTH H y ENGSTRAND L. 1995, *Inmunomagnetic separation and PCR for detection of Helicobacter pylori in water and stool specimens*. Journal of clinical microbiology. Vol 33, No 8, pp 2162-2165
61. ZHANG T, et al. 2012, *Simultaneous extraction of Cr(VI) and Cu (II) from humic acid with new synthesized EDTA derivates*. Chemosphere. Vol 88, No 6, pp 730-735
62. WINN, ALLEN, JANDA, KONEMAN, PROCOP, SCHRECKENBERGER, WOODS *Diagnóstico microbiológico texto y atlas en color*. 6^{ta} edición. Editorial médica panamericana. paginas 147-148.
63. BADÍA, RUÍZ GONZÁLEZ. *Técnicas en histología y biología molecular*. 1^{ra} edición, editorial Elseviermasson, año publicación 2009, páginas 149-179