

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS
DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES *vacA* y *cagA* DE *Helicobacter pylori* EN
AISLADOS DE AGUA DE RIEGO Y AGUA POTABLE

TRABAJO DE GRADUACION PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO(A) EN
MICROBIOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

PRESENTADO POR

LICDA. LORENA GUADALUPE CARDONA LOPEZ

DR. EMERSON DAVID POCASANGRE AGUILERO

JUNIO 2021

SAN SALVADOR, EL SALVADOR CENTROAMERICA

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LIC. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LIC. EUGENIA SORTO LEMUS

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Detección molecular de genes *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en
aislados de agua de riego y agua potable**

MSc. Coralia de los Ángeles González

MSc. Mario Herbert Romero Rivera

Asesores

Dra. Tania Ethel Cuadra

Miembro Tribunal Evaluador

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

Miembro Tribunal Evaluador

COORDINACION DEL PROGRAMA DE POSTGRADO

MSc. Coralia de los Ángeles González

Coordinadora de Maestría

MSc. Edith Alicia Torres de Cantón

Coordinadora de Posgrado

Licda. Lorena Guadalupe Cardona López

Dr. Emerson David Pocasangre Aguilero

Estudiantes

Fecha de entrega: _____ 30 de julio de 2021 _____

Fecha de aprobación: _____ 30 de julio de 2021 _____

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios todopoderoso por cuidarnos hasta el día de hoy y guardarnos en medio de la pandemia del Covid-19.

A la Universidad de El Salvador por tomar a bien continuar brindando este tipo de programas que permite seguir formando profesionales.

A la Universidad Evangélica de El Salvador por el apoyo logístico y financiero, ya que nos permitieron usar las instalaciones para llevar a cabo todas las pruebas, compra de equipos y de insumos.

A nuestros asesores MSc. Mario Herbert Romero y MSc. Coralia de los Ángeles González por guiarnos en la ejecución de este proyecto.

A Israel Leiva, líder comunal del Sub-comité El Astillero por el acompañamiento durante las visitas de campo realizadas.

A las autoridades de AREZA (Asociación de Regantes de Zapotitán) por autorizarnos la recolección de las muestras con las que se llevo a cabo el estudio.

A nuestras familias y amigos por el apoyo incondicional durante todo el proceso.

Emerson Pocasangre y Lorena Cardona.

INDICE

Contenido	Pág. N°
Resumen	
Abstract	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xvii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	20
2.1 Objetivo General	20
2.2 Objetivos Específicos	20
Capítulo III	
3.0 Revisión de literatura	22
3.1 Historia	22
3.2 Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	24
3.2.1 Características moleculares de <i>Helicobacter pylori</i>	28
3.3 Vía de transmisión y epidemiología	29
3.3.1 Transmisión gastro-oral	30
3.3.2 Transmisión oral-oral	30
3.3.3 Transmisión fecal-oral	31
3.3.4 Transmisión iatrogénica	31
3.3.5 Transmisión zoonótica	32
3.3.6 Transmisión por alimentos	33
3.3.7 Transmisión por agua	34
3.3.7.1 Estudios previos	34
3.4 Detección molecular de <i>Helicobacter pylori</i>	37
3.4.1 Desnaturalización	39
3.4.2 Hibridación	39
3.4.2 Extensión	40

3.5	Detección de genes <i>vacA</i> y <i>cagA</i>	40
3.6	Primers	41
3.7	Perfil de resistencia antimicrobiana	42
3.7.1	Agentes antimicrobianos	43
3.7.2	Modo de acción	45
3.7.3	Resistencia antimicrobiana	46
3.8	Ubicación del área de estudio	47
3.8.1	Funcionamiento del Distrito de Riego del Valle de Zapotitán	49
3.8.2	Cultivos	49
Capítulo IV		
4.0	Metodología	52
4.1	Tipo de estudio	52
4.2	Universo y muestra	52
4.3	Fase de campo	52
4.3.1	Puntos de muestreo	53
4.4	Diseño experimental	54
4.4.1	Muestreo de agua	54
4.4.1.1	Codificación de las muestras a evaluar	54
4.4.1.2	Recolección de muestras	55
4.4.2	Proceso de filtración	56
4.4.2.1	Agua potable	56
4.4.2.2	Agua de riego	60
4.4.3	Pruebas bioquímicas	61
4.4.3.1	Prueba de catalasa	61
4.4.3.1	Prueba de oxidasa	62
4.4.4	Extracción de ADN	63
4.4.4.1	Preparación para PCR	63
4.4.4.2	Preparación de master mix	64

4.4.4.3	Preparación de la agarosa	65
4.4.4.4	Preparación de la muestra para la electroforesis	66
4.4.4.5	Condiciones de la PCR	67
4.4.5	Perfil de resistencia antimicrobiana	69
4.4.5.1	Preparación de agar Müller Hinton	69
4.4.5.2	Método de suspensión de colonias	69
4.4.5.3	Aplicación de los discos	69
4.4.5.4	Lectura e interpretación de los resultados	70
4.5	Procesamiento y análisis de los datos	70
Capítulo V		
5.0	Resultados y discusión	72
5.1	Aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i>	73
5.2	Pruebas bioquímicas	79
5.3	Reacción en cadena de la polimerasa	81
5.4	Perfil de resistencia antimicrobiana	84
Capítulo VI		
6.0	Conclusiones	89
Capítulo VII		
7.0	Recomendaciones	92
	Referencias bibliográficas	
	Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	A: Micrografía electrónica de <i>Helicobacter pylori</i> . B: Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> en agar Sangre-Columbia.	23
2	A: Vista satelital de la región de Zapotitán. B: Plano del Distrito de Riego de Zapotitán.	48
3	Muestreo de agua potable en hogares seleccionados.	55
4	Aparato de filtración por membrana utilizado en el procesamiento de las muestras.	57
5	Membranas estériles de 0.45 mm utilizadas en el proceso de filtración.	57
6	Procesamiento de muestras de agua potable.	58
7	Caldo Brucella conteniendo la membrana utilizada en el proceso de filtración.	59
8	Siembra de muestras en agar Columbia enriquecido con suplemento DENT y 7% de sangre desfibrinada.	59
9	A: Cultivo solido de 24 horas de la cepa de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504 (forma cocoide). Tinción de Gram. B: Catalasa positiva. C: Oxidasa negativa.	62
10	A. Colonias de <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 en agar sangre Columbia. B. Bacilos curvos Gram negativos de <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637.	73

11	Resultados de muestras de agua potable que presentaron turbidez en etapa de enriquecimiento.	73
12	Resultados de muestras de agua potable sin crecimiento microbiano en agar sangre Columbia.	74
13	Resultados de muestras de agua de riego con crecimiento microbiano en caldo Brucella.	76
14	Crecimiento de colonias sugestivas de <i>Helicobacter pylori</i> aisladas de agua de riego.	77
15	Resultados de muestras de agua de riego con crecimiento microbiano en agar sangre Columbia.	77
16	A. Tinción de Gram B. Prueba de oxidasa y catalasa positiva C. Prueba de ureasa positiva.	80
17	Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RTA-04; carril 7: RTA-05; carril 9: RRT-03; carril 11: RRT-04; carril 13: RRT-05. Banda correspondiente al gen RNA 16s de 110 pb.	81
18	Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RTA-04; carril 7: RTA-05; carril 9: RRT-03; carril 11: RRT-04; carril 13: RRT-05. Banda correspondiente al gen <i>vacA</i> de 290 pb.	82
19	Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RRT-03;	83

	carril 7: RRT-04; carril 9: RRT-05. Banda correspondiente al gen <i>cagA</i> de 300 pb.	
20	Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RTA-04; carril 7: RTA-05. Banda correspondiente al gen <i>cagA</i> de 300 pb.	83
21	Halos de inhibición obtenidos con los antibióticos de prueba.	85

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Pág. N°
1	Resumen de muestras de agua de riego positivas.	78
2	Resultados de tinción al Gram y pruebas bioquímicas	79
3	Halos de inhibición con los antibióticos de prueba sobre <i>Helicobacter pylori</i> .	88

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Infección de <i>Helicobacter pylori</i> a nivel mundial. (Organización Mundial de Gastroenterología, (2010). <i>Helicobacter pylori</i> en los países de desarrollo.)	27
2	Partidores utilizados en la genotipificación del gen <i>vacA</i> y la detección del gen <i>cagA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> . (Martínez, A., González, C., Kawaguchi, F., Montoya, R., Corvalán, A., Madariaga, J., Roa, J., García, A., Salgado, F., Solar, H., y Palma, M. (2001). <i>Helicobacter pylori: análisis de cagA y genotipificación de vacA en Chile. Detección de una cepa s2/m1</i> . Revista médica de Chile, 129 (10), 1147-1153.	41
3	Códigos asignados a las muestras de agua potable y agua de riego en estudio.	54
4	Criterios de clasificación para la respuesta de <i>Helicobacter pylori</i> ante los antibióticos de prueba.	70

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- 1 **A:** Rio Talnique, perteneciente a la Zona 3 de Zapotitán. **B:** Desembocadura de la tubería que alimenta al canal principal. **C:** Canal de distribución RN-4, ubicado en el sub-comité El Astillero.
- 2 Mapa de puntos de muestreo en el sub-comité El Astillero. 1. Rio Talnique. 2. Represa del rio Talnique. 3. Pila de estación de bombeo. 4. Canal Principal. 5. Canal de distribución RN-4.
- 3 Ficha de recolección de muestras de agua en el Distrito de Riego de Zapotitán.
- 4 Muestreo de agua de riego de los puntos seleccionados.
- 5 **A.** Reconstitución de Proteinasa K con buffer para Proteinasa K. **B.** Mezcla de Buffer B5 con etanol grado molecular. **C.** Mezcla de colonias bacterianas con Proteinasa K y Buffer B5 **D.** Incubación en baño maría a 56 °C.
- 6 **A:** Preparación del gel de agarosa para electroforesis con sus respectivos pozos. **B:** Depósito del mix en los pozos del gel de.agarosa.
- 7 Pasos para la evaluación de la resistencia a antimicrobianos mediante la técnica de Kirby Bauer (Antibiograma).

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue detectar molecularmente los genes *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en aislados de agua de riego y agua potable del subcomité El Astillero en el distrito de riego del Valle de Zapotitán. La investigación se desarrolló en el periodo de septiembre del 2019 a enero del 2021; Se realizaron 10 visitas al Valle de Zapotitán para la recolección de las muestras de agua, periodo de tiempo en el cual se aisló *Helicobacter pylori* en las muestras de agua de riego, comprobando la presencia de genes *vacA* y *cagA* mediante PCR (Reacción en cadena de polimerasa) de punto final y determinando su perfil de resistencia a los antimicrobianos.

Aunque no se encontró el microorganismo en estudio en las muestras de agua potable, los resultados del estudio de las aguas de riego confirman la supervivencia de *Helicobacter pylori*. Cepas a las cuales se les confirmó la presencia de los genes *vacA* y *cagA*. Además, se realizaron pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos mediante la técnica de Kirby Bauer, confirmando que todas las cepas aisladas mostraron sensibilidad a Claritromicina, sensibilidad intermedia a Levofloxacina y resistencia a Amoxicilina en la mayoría de aislados, en cuanto a Metronidazol, fue el único que mostró 100% de resistencia.

Se comprobó la viabilidad de la bacteria fuera de su hábitat natural, convirtiéndola en una posible vía de transmisión para los cultivos de hortalizas de la zona, considerando así la necesidad de iniciar con un plan de tratamiento de las aguas de riego y evaluar determinar esta bacteria patógena para el humano en esta matriz alimentaria.

ABSTRACT

The objective of this research was to molecularly detect the *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in irrigation water and drinking water isolates from the El Astillero sub-committee in the Zapotitán Valley irrigation district. The research was developed in the period from September 2019 to January 2021; Ten visits were made to the Zapotitán Valley to collect the water samples, a period of time in which *Helicobacter pylori* was isolated in the irrigation water samples, checking the presence of *vacA* and *cagA* genes by PCR (Chain reaction of polymerase) endpoint and determining its antimicrobial resistance profile.

Although the study microorganism was not found in the drinking water samples, the results of the irrigation water study confirm the survival of *Helicobacter pylori*. Strains in which the presence of the *vacA* and *cagA* genes was confirmed. In addition, antimicrobial susceptibility tests were performed using the Kirby Bauer technique, confirming that all the isolated strains showed sensitivity to Clarithromycin, intermediate sensitivity to Levofloxacin and resistance to Amoxicillin in most isolates, as for Metronidazole, it was the only one that showed 100% resistance.

The viability of the bacteria outside its natural habitat was verified, making it a possible route of transmission for vegetable crops in the area, thus considering the need to start with a treatment plan for irrigation water and evaluate to determine this bacterium. pathogenic for humans in this food matrix.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La infección por *Helicobacter pylori* representa uno de los problemas más comunes a nivel mundial. La infección producida por esta bacteria Gram negativa micro-aerobia, se ha demostrado como uno de los factores causales en el desarrollo de enfermedad ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma primario de células B. En 1994, el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos de América (NIH por sus siglas en inglés) reconoció a *Helicobacter pylori* como causa de úlceras gástricas y duodenales. Posteriormente la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) lo declaró como carcinógeno humano del grupo I para adenocarcinoma gástrico.

Se ha descrito que la transmisión de la bacteria ocurre mayormente, de persona a persona a través de vía fecal-oral y oral-oral, así como también por el consumo de agua contaminada.

Es importante empezar a esclarecer las vías de transmisión del *Helicobacter pylori* para evitar la infección, la cual tiene el alcance de ser mortal; ya que la información disponible en nuestro país se limita a diagnóstico y tratamiento médico, quedando descubiertas las explicaciones de cómo se contrae esta bacteria.

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue determinar mediante técnicas microbiológicas la presencia de *Helicobacter pylori* en estado viable, en agua de riego y agua potable del Sub- comité El Astillero en el Distrito de Riego de Zapotitán, y que ahora se consideran una fuente de transmisión; además se verifico si son portadores de genes *vacA* y *cagA* mediante PCR de punto final.

En la presente investigación se confirmó mediante PCR la presencia de *Helicobacter pylori*, en muestras de agua del Sub-comité El Astillero. Se recolectaron 25 muestras de agua de riego, se tomaron 5 muestras en cada uno de los siguientes puntos: en el curso medio del Rio Talnique, represa del rio

Talnique, pila de la estación de bombeo, canal principal y canal RN-4 del sistema de riego. Además 25 muestras de agua potable que fueron recolectadas en viviendas que poseían el servicio y que fueron seleccionadas aleatoriamente.

Posteriormente estas muestras se trasladaron al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina en la Universidad Evangélica de El Salvador, donde fueron procesadas por técnica de filtración por membrana, utilizando caldo Brucella y agar Columbia enriquecido con 7% de sangre desfibrinada de carnero más suplemento DENT para el aislamiento de *Helicobacter pylori*.

A las colonias presuntivas de *Helicobacter pylori*, se les realizó la extracción de ADN y mediante PCR de punto final se amplificaron los genes de interés para su confirmación y posteriormente evaluar así su perfil de resistencia antimicrobiano.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar molecularmente los genes *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en aislados de agua de riego y agua potable.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Aislar *Helicobacter pylori* de agua de riego y agua potable mediante técnicas bacteriológicas.

2.2.2 Caracterizar mediante pruebas bioquímicas y técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los aislados positivos de *Helicobacter pylori* en agua.

2.2.3 Determinar las propiedades de resistencia a los antimicrobianos de los aislados previamente genotipificados por técnica Kirby Bauer.

CAPITULO III
REVISION DE LITERATURA

3.0 REVISION DE LITERATURA

3.1 HISTORIA

Las primeras descripciones de microorganismos espirales en el estómago de animales se realizaron a finales del siglo XIX. A lo largo de esta época, ocurrieron diferentes acontecimientos, de los cuales los más relevantes fueron:

1881: Rappin mencionó que había observado una bacteria espiral en el estómago canino, a la que denominó *Spirocheta rappini*.

1893, Bizzozero publicó varios dibujos de organismos espirales en el estómago de perros, que hoy conocemos como *Helicobacter heilmannii*.

1896: Salomón presentó un informe bacteriológico de organismos espirales, probablemente *Helicobacter felis*, en el estómago de perros y gatos, incluyendo su estructura flagelar, motilidad y manejo en el laboratorio.

1939: Doenges, tras realizar autopsias a un gran número de adultos jóvenes, encontró organismos espirales en el 40% de los estómagos; probablemente se trataba de *Helicobacter pylori*.⁽³⁴⁾

1982: Warren JR y Marshall BJ publican un artículo que facilitó el entendimiento de varias patologías gástricas, donde encontraron un bacilo curvo no identificado en biopsias de pacientes con gastritis crónica activa, al bacilo llamado subsecuentemente, *Campylobacter pylori* y con la nomenclatura de hoy, *Helicobacter pylori*. Fue considerado por la OMS carcinogénico gástrico el año 2001, hecho que revolucionó la ciencia de la gastroenterología, y por el que se les concedió el Premio Nobel de Medicina en octubre de 2005.⁽²⁹⁾ Warren observó la bacteria que relacionó con la inflamación de la mucosa gástrica o gastritis, por primera vez el 11 de junio de 1979.⁽⁴²⁾

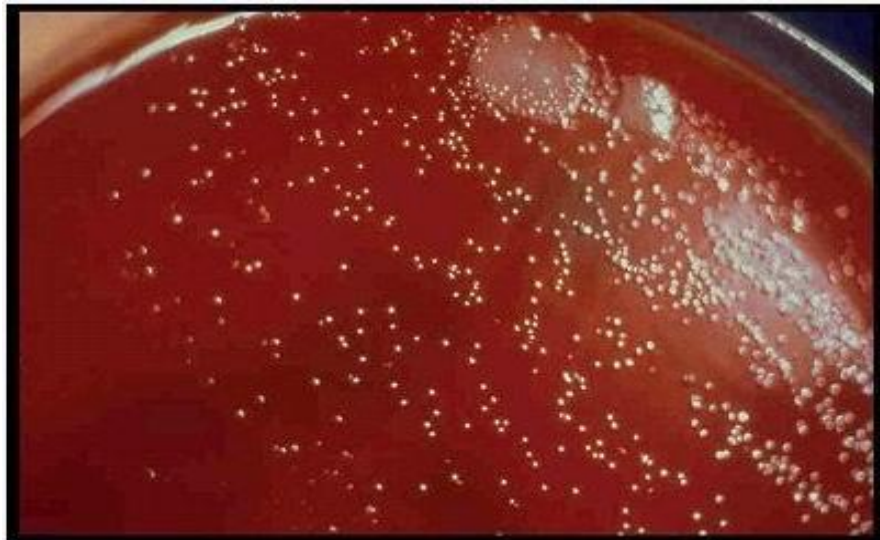
Durante los 18 meses siguientes, estudió y recogió más casos en los que la bacteria acompañaba siempre a las lesiones histológicas de gastritis. Ensayó con

la tinción de Wartin y Starry, colorante argéntico, el más adecuado para espiroquetas, obteniendo unas imágenes negras de las bacterias. Posteriormente, examinó con el microscopio electrónico, observando los cuerpos bacterianos adheridos con firmeza a la superficie del epitelio (Ver Figura N° 1).

(26)



A



B

Figura N° 1. A: Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori*. B: Cultivo de *Helicobacter pylori* en agar Sangre- Columbia

Marshall, todavía escéptico, lo manda examinar con ME. Las imágenes muestran bacterias curvas, como el *Campylobacter*, del que difería por la existencia de cuatro flagelos en forma de palillo de tambor, salientes de una de las extremidades, lo que sugería que se trataba de una nueva bacteria. Sin embargo, inicialmente recibió el nombre de «*Campylobacter pilory-like*», por su parecido y por localizarse, preferentemente, en la mucosa pilórica. Su definitivo nombre sería *Helicobacter*. Con algunas modificaciones metodológicas logran incrementar el número de crecimientos y eliminar los falsos positivos.

Marshall dirige el ensayo clínico. Anima a los clínicos a participar en el estudio, enviando pacientes para completarlo. Finalizado, reúne todos los documentos del protocolo y los lleva, junto a su familia, a un pueblo alejado de Perth, donde debería practicar un año de médico rural. Examinados los informes comprueba la presencia de la bacteria en trece pacientes de Úlcera Duodenal (UD), y en 24 de 28 examinados de Úlcera Gástrica (UG). Por lo que concluye que la bacteria «*Campylobacter-like*» estaba presente en gastritis crónica activa, podía cultivarse y se relacionaba al cien por cien con la UD y en menor proporción con la UG. ⁽²⁸⁾

3.2 GENERALIDADES DE *Helicobacter pylori*.

Hoy en día dentro del género *Helicobacter* se han descubierto 31 especies, por su morfología y reacción a la coloración al Gram, se clasifican como bacilos Gram-negativos, curvos o rectos, de 0.3-1.0 μm de ancho y de 1.5-5 μm de largo. Presenta extremos redondeados y cuando son curvados muestran periodicidad espiral. La especie más patógena para el ser humano (*Helicobacter pylori*), posee múltiples flagelos laterales (lofótrico), envainados con una protuberancia terminal, de 30 μm de longitud y 2.5 nm de grosor, confiriéndoles movilidad. Se ha sugerido que la vaina del flagelo es una adaptación para vivir y moverse a través de la mucosa y protegerse contra el ácido del estómago. ⁽³⁴⁾

Santiago, C. P., (2016) sostiene que el género *Helicobacter* lo constituyen bacterias microaerófilas, con metabolismo de tipo respiratorio. No utilizan carbohidratos. En los medios de cultivo típicos para *Helicobacters* originan, tras 2-5 días de incubación a 37 °C, colonias no pigmentadas, translúcidas, de 1-2 mm de diámetro. (Ver Figura N° 1). Crecen a 30 °C pero no a 25 °C. Son catalasa y oxidasa positivo. Producen H₂S y no son capaces de hidrolizar el hipurato. Las especies gástricas son productoras de ureasa. Su contenido en G+C varía entre 35 y 44%. ⁽³⁴⁾

Hasta el momento se ha demostrado que la especie *pylori* del género *Helicobacter* es la de mayor importancia clínica por su estrecha relación con la gastritis, úlcera péptica y el cáncer gástrico. En el estómago aparecen como bacilos cortos curvos en forma de "S". Las bacterias cultivadas *in vitro* son menos espirales y aparecen más como bacilos curvados. Generalmente presentan entre de 4 a 6 flagelos en posición lofótrica. En cultivos con mayor tiempo pueden aparecer formas cocoides. Es inactivo frente a la mayoría de las pruebas bioquímicas, no utiliza carbohidratos ni por la vía fermentativa ni oxidativa. Produce catalasa y citocromo oxidasa, pero en mucha mayor cantidad ureasa y fosfatasa alcalina.

El nicho ecológico de *Helicobacter pylori*, la mucosa gástrica, presenta características peculiares y únicas. La entrada de la bacteria al cuerpo humano es a través de la cavidad oral y cuyo destino es el píloro, donde el pH en el lumen del estómago es mucho más bajo, con valores de entre 1 y 4, condiciones aptas y diseñadas fisiológicamente para desnaturalizar la mayoría de las proteínas. *Helicobacter pylori* sobrevive a estas condiciones ya que es capaz de tamponar el pH en su zona más próxima, por su capacidad de sintetizar la enzima ureasa (peso molecular 550 kDa) que junto con el cofactor níquel, catalizan la hidrólisis de urea del jugo gástrico, formando dióxido de carbono y amoníaco ((NH₂)₂CO + H₂O → CO₂ + 2NH₃). El amoníaco actúa como neutralizador de la acidez,

aumentando significativamente el pH circundante a la bacteria por lo que le permite invadir y sobrevivir en la mucosa gástrica a pesar de la acidez del lumen.

(34)

En los últimos años la prevalencia de esta bacteria ha ido en aumento y se ha demostrado que es una enfermedad Cosmopolita, se ha comprobado que está presente en casi la mitad de los habitantes del mundo por lo que se establece que es una de las enfermedades infecciosas más comunes. (9)

No todos los portadores de la bacteria presentan alguna enfermedad: 85 por ciento nunca experimentan síntomas, pero 15 por ciento corre el riesgo de desarrollar alguna patología grave. (9)

Dentro de información disponible en el mundo de la microbiología, la mayor parte de esta hace referencia a la variabilidad genética que poseen algunas cepas de *Helicobacter pylori*, por lo que existen teorías que sugieren que hay diferentes características dependientes propiamente del huésped sin dejar a un lado su entorno que incluye factores de riesgo y predisposición genética. (25)

La prevalencia es variada, en países considerados en desarrollo es más alta en comparación de los países desarrollados siendo en estos mucho más baja; además, este mismo fenómeno se manifiesta en habitantes de diferentes estratos económicos de un mismo país. (25)

La OMS sostiene que la transmisión de *Helicobacter pylori* tiene lugar fundamentalmente por las vías oral-oral o fecal-oral teniendo como factores contribuyentes a la infección con esta bacteria: la falta de una adecuada higiene, agua potable no segura, y superpoblación por mencionar algunas. (25)

- La prevalencia mundial de la infección por *Helicobacter pylori* es mayor a 50% y puede variar significativamente entre los países.
- En general, las tasas de seropositividad de *Helicobacter pylori* aumentan progresivamente con la edad.

- En los países en desarrollo, la infección por *Helicobacter pylori* es marcadamente más prevalente en edades más jóvenes que en los países desarrollados (Ver Tabla N° 1)

Tabla N° 1. Infección de *Helicobacter pylori* a nivel mundial. (Organización Mundial de Gastroenterología, (2010). *Helicobacter pylori* en los países de desarrollo.)

País	Edad	Prevalencia
África		
Etiopía	2-4	48%
Etiopía	6	80%
Etiopía	Adultos	> 95%
Nigeria	5-9	82%
Nigeria	Adultos	91%
Nigeria	Adultos	70%–90%
América Central		
Guatemala	5-10	51%
Guatemala	Adultos	65%
México	5-9	43%
México	Adultos	70%–90%
América del Norte		
Canadá	5–18	7.1%
Canadá	50–80	23.1%
EEUU y Canadá	Adultos	30%
América del Sur		
Bolivia	5	54%
Brasil	6-8	30%
Brasil	10-19	78%
Brasil	Adults	82%
Chile	3-9	36%
Chile	Adultos	72%
Chile	Adultos	70%–90%
Asia		
Bangladesh	0–2	50-60%
Bangladesh	0-4	58%
Bangladesh	8-9	82%
Estonia	25–50	69%
Alemania	50–74	48.8%
Islandia	25–50	36%
Países Bajos	2–4	1.2%
Serbia	7–18	36.4%
Suecia	25–50	11%
Suiza	18–85	26.6%
Suiza	18–85	11.9%
Medio Oriente		

País	Edad	Prevalencia
Bangladesh	Adultos	> 90%
Hong Kong	6–19	13.1%
India	0-4	22%
India	10-19	87%
India	Adultos	88%
India, Sur	30–79	80.0%
Japón, 3 áreas	20–70+	55.4%
Japón, Occidental	Adultos	70.1%
Siberia	5	30%
Siberia	15-20	63%
Siberia	Adultos	85%
Corea del Sur	16	56.0%
Corea del Sur	≥16	40.6%
Sri Lanka	6-19	67%
Sri Lanka	Adultos	72%
Taiwan	9–12	11.0%
Taiwan	13–15	12.3%
Taiwan	≥25	45.1%
Taiwan	Adultos	50%–80%
Australasia		
Australia	1–59	15.4%
Australia	Adultos	20%
Europa		
(Oriental)	Adultos	70%
(Occidental)	Adultos	30%–50%
Albania	16–64	70.7%
Bulgaria	1–17	61.7%
República Checa	5–100	42.1%
Egipto	3	50%
Egipto	Adultos	90%
Libia	1-9	50%
Libia	10-19	84%
Libia	Adultos	94%
Arabia Saudita	5-9	40%
Arabia Saudita	Adultos	80%
Turquía	6-17	64%
Turquía	Adultos	80%

3.2.1 Características moleculares de *Helicobacter pylori*

Los genomas de *Helicobacter pylori* que más han sido estudiadas son las cepas 26695 y J99, éstas se secuenciaron a partir de cromosomas circulares que contenían 1, 667,867 y 1, 643,831 pb, respectivamente. ⁽³⁹⁾

La secuencia promedio dentro del genoma bacteriano es de G + C, que cubre aproximadamente el 39% de su secuencia completa, pero cinco regiones en el genoma de la cepa 26695 y nueve en la cepa J99, salen de lo antes mencionado en relación a la composición G + C. La región 2 (35% G + C) de la cepa 26695 es la isla de patogenicidad de *cagA* asociada con la producción del antígeno *CagA* y la regulación positiva de la interleucina 8. Las otras cuatro regiones aún no se han caracterizado experimentalmente al momento. Las regiones 1 y 3 (33% G + C) contienen copias de la secuencia de inserción IS605, genes *5S rRNA* y una repetición de 521 pb. Además, la región 1 es compartida por otras bacterias, como, por ejemplo, contiene el gen *virB4*, que codifica la proteína implicada en la transferencia del ADN-T en *Agrobacterium tumefaciens* y participa en la secreción de la toxina de *Bordetella pertussis*. La Región 4 (43% G + C) contiene genes *rpoB* y *rpoC* fusionados que codifican las subunidades β y β' de la ARN polimerasa. Finalmente, la región 5 (33% G + C) contiene dos sistemas de restricción / modificación. ⁽³⁹⁾

Se han encontrado ocho familias repetidas, con una identidad de secuencia superior al 97% en el ADN de *Helicobacter pylori*. Se localizan en regiones intergénicas (una familia) o dentro de secuencias de codificación, donde pueden representar duplicaciones de genes. ⁽³⁹⁾

Tomb *et al* (1997), identificaron 1,590 marcos de lectura abiertos (ORF), que representan el 91% del cromosoma de *Helicobacter pylori* de la cepa 26695, y años más tarde, en 1999 identificaron 1,495 ORF, que representan el 90.8% del cromosoma de la cepa J99. Las regiones no codificantes de la cepa 26695 (9%)

se dividen en tres clases. Las secuencias intergénicas representan el 6% de las regiones no codificantes, mientras que las repeticiones no codificantes representan el 2.3% y el ARN estable representa el 0.7%. Entre los 1,590 ORF, se encontró que 1,091 tenían contrapartes en otros organismos, lo que les permite asignarles roles biológicos supuestos, aunque no todos tienen ortólogos de función conocida. Los 499 ORF que no exhibieron coincidencias en la base de datos pueden considerarse en este momento como específicos de *Helicobacter pylori*. En la reanotación de este genoma el número de ORF en la cepa 26695 es de 1.552, de los cuales 1.185 tienen ortólogos encontrados en otras especies, 367 son específicos de *Helicobacter pylori* y 69 son específicos de la cepa 26695. La proporción de genes huérfanos en *Helicobacter pylori* es similar a lo encontrado en otras bacterias secuenciadas hasta la fecha. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los genes ortólogos de algunos de estos ORF probablemente se identificarán cuando más genomas completos se secuencian por completo. ⁽³⁹⁾

3.3 VIA DE TRANSMISION Y EPIDEMIOLOGIA

Aún después de su primer aislamiento en 1982, la comunidad científica sigue luchando por comprender la(s) forma(s) en que *Helicobacter pylori* se transmite dentro de la población humana. Existen evidencias que sugieren la transmisión persona a persona, por ingesta de alimentos y agua contaminada. La transmisión persona a persona dentro de las familias parece ser el modo predominante, lo que indica que el contacto íntimo es importante. No obstante, las infecciones con *Helicobacter pylori* a veces se presentan como epidemias, sugiriendo un origen común como puede ser los alimentos o el agua. ⁽²⁶⁾

En base a evidencias epidemiológicas y microbiológicas, varias vías de transmisión han sido propuestas. Las rutas gastro-oral, oral-oral y fecal-oral constituyen las vías más relevantes de la transmisión. La lactancia materna y la

transmisión iatrogénica también se incluyen como formas alternativas para la difusión del agente patógeno. Además, hay al menos tres posibles vectores que se han sugerido para mantener la forma viable de la bacteria: agua, alimentos, y animales. ⁽⁴⁾

3.3.1 Transmisión gastro-oral

Esta posibilidad se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con manejo y desinfección inadecuada de gastroscopios. Los endoscopistas suelen estar expuestos a las gotitas microscópicas de los jugos gástricos durante la manipulación del endoscopio. Tal posibilidad llevaría también a relacionarlo con el vómito (*Helicobacter pylori* se ha encontrado en tasas elevadas), lo que en cierta medida podría explicar las altas tasas de infección en niños, entre los cuales los vómitos y el reflujo gastro-esofágico son comunes y más frecuentes que en los adultos, además de que constantemente se llevan objetos a la boca. Sin embargo, aunque los episodios de vómitos pueden causar un aumento en el riesgo de la presencia de *Helicobacter pylori* en la cavidad oral, los estudios al respecto no discriminan si la transmisión es gastro-oral u oral-oral. ⁽⁴⁾

3.3.2 Transmisión oral-oral

La cavidad oral se ha considerado como un reservorio apropiado para la subsistencia de *Helicobacter pylori* y la transmisión oral-oral, por lo tanto, se ha sugerido que pueda producirse con besos u otro tipo de contacto con saliva infectada, con el uso de palillos chinos o, como ocurre en algunos grupos étnicos, de madres a bebés, ya que ellas pre-mastican sus alimentos. Asimismo, constituyen un apoyo para esta propuesta el hallazgo de *Helicobacter* en placa dental, en saliva o bien la identificación de su genoma en esta secreción. ⁽³¹⁾

La posibilidad de transmisión a través del contacto oral-oral íntimo se ha sugerido indirectamente por el hecho de que los cónyuges y los hijos de individuos infectados con *Helicobacter pylori* resultan a menudo más seropositivos que los

cónyuges y los hijos de las personas no infectadas.⁽³¹⁾ El papel de la cavidad oral ha sido ampliamente revisado, no obstante, las conclusiones de los diferentes trabajos son controvertidas y hasta ahora no se conoce si existe una colonización transitoria de la cavidad oral.

3.3.3 Transmisión fecal-oral

Otra posible vía es la fecal-oral. Los argumentos para esta ruta de transmisión están basados en estudios que muestran que *Helicobacter pylori* puede ser cultivada a partir de heces humanas. Esta bacteria ha sido aislada de las heces de niños infectados, sin embargo, el aislamiento a partir de heces de adultos ha sido raro. ⁽³⁵⁾

La identificación del genoma de esta bacteria en agua potable, tanto en países en desarrollo como en países industrializados, apoya la transmisión fecal de este agente. Otro argumento a favor de la ruta fecal-oral, lo constituye el hecho de que estas infecciones se esparcen más fácilmente entre niños en quienes *Helicobacter pylori* es comúnmente adquirida. Se ha señalado, adicionalmente, que las personas que trabajan en la asistencia sanitaria, y por tanto entran en contacto con la materia fecal de individuos institucionalizados, con alguna discapacidad, representan un importante factor de riesgo para la transmisión *Helicobacter pylori*. Asimismo, el agua y los alimentos contaminados con heces pueden constituir una fuente de infección. ⁽²⁶⁾

3.3.4 Transmisión iatrogénica

Debido a la detección de *Helicobacter pylori* en heces, secreciones orales y jugos gástricos, la endoscopia puede ser una ruta de transmisión para algunos individuos. Esta forma constituye la transmisión iatrogénica, en la que los tubos o los endoscopios que han estado en contacto con la mucosa gástrica de un individuo son utilizados para otro paciente. La infección con *Helicobacter pylori* puede ocurrir tanto en pacientes como en miembros del personal de salud. En

los primeros por el inadvertido uso de equipos descontaminados inadecuadamente y en los segundos por el contacto con secreciones infectadas de los pacientes. ⁽²⁶⁾

3.3.5 Transmisión zoonótica

En algunos animales, principalmente aquellos que viven en ambientes humanos, se ha sospechado de la existencia de *Helicobacter pylori* en su estómago y por lo tanto se han involucrado en la transmisión de esta bacteria. Entre los vectores considerados se incluyen vacas, ovejas, animales domésticos, cucarachas y moscas. Los dos últimos pueden actuar como vectores de transmisión al contaminar los alimentos. Esta hipótesis puede ser la de mayor importancia en las zonas del mundo con pobre saneamiento. ⁽²⁴⁾

Los estudios epidemiológicos muestran resultados contradictorios en relación con el riesgo de la presencia de animales domésticos en el hogar. *Helicobacter pylori* no se ha encontrado en perros, pero existen fuertes argumentos a favor de un reservorio felino. Esto es potencialmente importante para la transmisión a humanos, porque los gatos son populares animales domésticos con un significativo contacto humano. Además, ellos ocasionalmente vomitan y están continuamente auto-limpiándose.

Otros animales incriminados han sido los cerdos y los monos, no obstante, se ha establecido que los cerdos no constituyen un reservorio para *Helicobacter pylori*. En contraste, este microorganismo ha sido aislado de algunos primates, tales como los monos macacos. Debido a que el contacto entre los seres humanos y otros primates es raro, es poco probable que estos animales jueguen un papel importante en la transmisión de *Helicobacter pylori*. ⁽²³⁾

Recientemente se ha demostrado que *Helicobacter pylori* tiene la capacidad de sobrevivir en medios inhóspitos como en las uñas de los dedos y también en

cavidad oral, específicamente en placa dentobacteriana, indicando que puede ser un reservorio. ⁽³³⁾

3.3.6 Transmisión por alimentos

Los alimentos que presentan factores intrínsecos como una actividad de agua superior a 0,97 y un pH entre 4,9 y 6,0; teóricamente pueden proporcionar las condiciones para la supervivencia de *Helicobacter pylori*. Sin embargo, es poco probable que *Helicobacter pylori* crezca en la mayoría de los alimentos, pero puede sobrevivir en una forma viable no cultivable. ⁽²⁴⁾

En las últimas 2 décadas han surgido diversos estudios que abordan el papel de la alimentación como transmisión de *Helicobacter pylori* tales como la leche y verduras. Santiago Cuellar cita las siguientes investigaciones:

En 1988 se inoculó artificialmente *Campylobacter pylori* (renombrado como *Helicobacter pylori*) en muestras de leche, posteriormente almacenadas a temperatura ambiente y bajo refrigeración (4 °C). El cultivo de la bacteria se realizó durante ocho días. Los resultados revelaron que *Helicobacter pylori* no pudo multiplicarse en este tipo de alimento, pero logró sobrevivir con una disminución constante de un log en cuatro días, para ambas temperaturas. ⁽²⁶⁾

En 1998, se determinó que *Helicobacter pylori* mostraba una supervivencia en ambientes de baja acidez y alta humedad. Mientras que, la microbiota presente en el yogurt (*Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*), inhibe la viabilidad de *Helicobacter pylori* comprobaron además que *Helicobacter pylori* puede sobrevivir en leche cruda esterilizada inoculada con 10^6 UFC/mL durante aproximadamente 6 días. ⁽³³⁾

En cuanto a la transmisión de la bacteria por el consumo de verduras, se mencionan los siguientes aportes:

Atapoor et al., (2014), detectaron la presencia de *Helicobacter pylori* en vegetales de procedencia iraní sin lavado previo. De 460 vegetales muestreados detectaron mediante la técnica de PCR el gen ureC en 50 de las muestras e identificaron colonias de *Helicobacter pylori* en el 9.56%. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0,5$) con respecto a los vegetales que se les realizaba tratamientos antes del consumo sugiriendo que su contaminación podía ser proveniente de aguas de riego contaminadas. ⁽³³⁾

3.3.7 Transmisión por aguas

Para poder llegar al ser humano, cuyo principal hábitat es el estómago, el *Helicobacter pylori* debe de provenir del medio externo, y aunque la principal ruta de transmisión queda lejos de estar clara, la prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* muestra una fuerte correlación con el acceso al agua, como lo demuestran estudios en países donde la calidad del agua es baja, siendo correlacionados con la economía de los países.

3.3.7.1 Estudios previos

A lo largo de los años, se han realizado diversos estudios que dejan en evidencia que el agua es una vía de transmisión de *Helicobacter pylori*, a continuación, se citan algunos.

Helicobacter pylori en agua mineral embotellada: Genotipificación y Propiedades de Resistencia Antimicrobiana. (*Helicobacter pylori* in bottled mineral water: genotyping and antimicrobial resistance properties).

Se examinaron un total de 450 muestras de agua mineral embotellada para detectar la presencia de *Helicobacter pylori*, sus genotipos y sus propiedades de resistencia a los antimicrobianos. De 450 muestras de agua mineral embotellada recogidas, 8 muestras (1,77 %) estaban contaminados con *Helicobacter pylori*. Las muestras se filtraron a través de membranas filtrantes de 0.45 μm . Cada

membrana se sumergió en 2 mL de caldo Tripticasa Soya (TSB) durante 1 h. Posteriormente, se tomaron 2 mL de TSB para inocular placas con agar Brucella que contenía suplemento selectivo *Campylobacter*. La presencia de los genotipos *iceA1*, *iceA2*, *oipA*, *cagA*, *cagE*, *babA2* y además varios genotipos de los alelos *vacA* (*s1a*, *s1b*, *s1c*, *m1a*, *m1b* and *m2*) fueron determinados utilizando la técnica de PCR. ⁽³¹⁾

Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua y biopelícula de los grifos de las instituciones educativas oficiales en la ciudad de Medellín.

Las muestras de agua recolectadas se centrifugaron a 4°C, a 2500 rpm durante cinco minutos; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 5 mL de BHI-DENT, luego se incubó por 48 horas a 35°C en ambiente de microaerofilia. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 2500 rpm a 4°C, por cinco minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 300 µl de BHI-DENT. Así se sembró luego por duplicado 100 µl en el agar para *Helicobacter pylori* con peptona especial (HPSPA), y los otros 100 µl restantes se utilizaron para la extracción de ADN. La presencia de *Helicobacter pylori* determinada por cultivo en agar HPSPA fue 11.3% en agua y en biopelículas de 11.3% también. La presencia de ADN de *Helicobacter pylori* en aguas determinada por la prueba de PCR con la secuencia de oligonucleótidos del gen *ureA* fue 2.1% en agua y en biopelícula de 2.1%. Sólo una muestra de biopelícula fue positiva por cultivo y por PCR a la vez. ⁽¹²⁾

Un estudio con perfil epidemiológico es el que se realizó en una zona rural de la Villa de Keneba en la República de Gambia, donde se estudiaron más de 60 niños que nacieron en condiciones de escasas de agua potable, por lo cual sus familias se vieron obligados a utilizar aguas superficiales para beber y en su primer año de vida fueron detectados con *Helicobacter pylori* mediante el test de ureasa determinando así al agua como vía de transmisión.

En cuanto al aislamiento de *Helicobacter pylori* a partir de muestras de agua y confirmado mediante PCR, Paula Santiago Cuellar lo menciona en el siguiente estudio:

El único precedente de aislamiento mediante cultivo de *H. pylori* es a partir de agua no tratada, en el que se analizaron muestras procedentes de la Ciudad de Juárez, México, empleando la técnica de PCR y cultivo para la detección de *Helicobacter pylori*. Obtuvieron aislados de *Helicobacter pylori* en un 17% de las muestras analizadas, confirmándolos mediante PCR del 16S ADNr. ⁽³⁴⁾

Fujimura et al., (2004) analizaron 24 muestras de agua procedentes de distintos puntos de cuatro ríos de Japón, con la ayuda de la técnica molecular PCR se confirmó la presencia de ADN de *Helicobacter pylori* reforzando la teoría de que *Helicobacter pylori* puede sobrevivir en ambientes naturales como ríos y lagos, durante periodos de tiempo prolongados. ⁽¹⁵⁾

Los niveles de cloro en sistemas de distribución de agua potable oscilan entre 0.1 y 0.3 mg/L. Cuando estos niveles son inadecuados por algún motivo, el cloro pierde su objetivo de inhibir las bacterias como el caso de *Helicobacter pylori*, confiriéndole la capacidad de entrar y persistir en el sistema de distribución de aguas suponiendo un riesgo de infección para los individuos que consuman estas aguas tratadas de forma deficiente. ⁽³³⁾

Helicobacter pylori es capaz de sobrevivir en biopelículas cuando crece bajo altas condiciones de C:N. La formación de biopelículas es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en este ambiente les ofrece ventajas importantes: les protege frente la acción de los agentes adversos, ven incrementada la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento y además posibilita la transferencia de material genético. Todas estas circunstancias pueden incrementar su capacidad de supervivencia. Como consecuencia, los

métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias de la biopelícula.

Se ha observado que *Helicobacter pylori* forma biopelículas tras 24 horas de encontrarse en un ambiente desfavorable. No se ha conseguido cultivar células de *Helicobacter pylori* desde las biopelículas, pero si lo detectaron mediante FISH, aunque no se pudiera determinar la viabilidad del mismo. La asociación de *Helicobacter pylori* con comunidades de biopelículas dentro de un sistema de distribución de aguas podría ofrecer a la bacteria protección frente a la desinfección y a la predación por protozoos. ⁽³³⁾

3.4 DETECCION MOLECULAR DE *Helicobacter pylori*

Desde que Kary B. Mullis inventara la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), a principios de la década de 1980, en el horizonte de este campo ha ido apareciendo una gran cantidad de aplicaciones al diagnóstico clínico. Esta técnica ha tenido tanta influencia en el desarrollo de la biología y, por consiguiente, en la medicina, como el descubrimiento de la estructura de doble hélice del material genético (ADN). El hecho de poder amplificar mínimas cantidades de ADN de manera específica ha propiciado su aplicación en la detección de microorganismos difíciles de cultivar, infecciones virales recientes, polimorfismos que causan enfermedades y marcadores de cáncer, entre otras muchas aplicaciones. Hoy por hoy, la medicina no puede caminar sin ella. ⁽²¹⁾

Explotando la función original de las polimerasas -enzimas cuya actividad es copiar secuencias de ADN, esta técnica nos permite realizar un fotocopiado molecular de una parte del material genético. Por ello, la presencia de ínfimas cantidades de una secuencia específica, como por ejemplo la secuencia que caracteriza a un virus, se puede amplificar hasta hacerla visible y, por lo tanto, detectable.

Es evidente que esta herramienta, que en principio se entendió como otra más de la biología molecular, tiene un amplio espectro de aplicación en el diagnóstico. En el campo de la microbiología, la PCR está llamada a sustituir completamente a gran cantidad de los métodos actuales de detección de agentes patógenos. No sólo gana, por amplia diferencia, en cuanto a la posibilidad de detectar la presencia de microorganismos difíciles de cultivar; también facilita tener resultados fiables en un intervalo de tiempo corto -horas-, mientras que los cultivos necesitan días. ⁽²¹⁾

En la actualidad se han desarrollado ensayos de PCR para la detección de *Listeria*, *Legionella*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Chlamydia*, *Neisseria* y *Treponema*, entre otros.

Información publicada por la Universidad Nacional Autónoma de México menciona que la reacción en cadena de la polimerasa (polymerasa chain reaction PCR) representa una biotecnología que logra amplificar o reproducir *in vitro* un número de copias de una región específica del ADN, con la finalidad de reproducir cantidad suficiente de un fragmento para su evaluación, y a su alta especificidad y sensibilidad, se debe su utilización en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo, como es el caso de *Helicobacter pylori*, ofreciendo un diagnóstico confiable, rápido y menos laborioso que los cultivos normales, con la ventaja adicional, de que la cantidad de material necesario para el inicio de la reacción es muy pequeña, ya que sólo es necesario la cantidad de ADN contenida en una sola célula. ⁽¹⁸⁾

Estudios previos que involucran la utilización de PCR para confirmar la presencia de *Helicobacter pylori* en aguas han sido realizados en Pakistán, donde se detectó en sus sistemas de distribución de agua alrededor de la ciudad Karachi, y en Inglaterra, detectaron la presencia de ADN de *Helicobacter pylori* en grifos de escuelas, en bocas de riego y embalses. ⁽²⁹⁾

Los estudios detectaron un mayor número de muestras positivas de ADN de *Helicobacter pylori* en muestras procedentes de biopelículas. Sus hallazgos refuerzan la evidencia de que *Helicobacter pylori* puede ser transmitido a través del agua potable. Sin embargo, la existencia de células viables sobrevivientes a tratamientos de desinfección es muy poco probable.

Cada ciclo de PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. A continuación, los acontecimientos que suceden en cada una.

3.4.1 Desnaturalización

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C (Citosina - Guanina) es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T (Adenina - Timina). Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso. ⁽³⁸⁾

3.4.2 Hibridación

En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente. ⁽³⁸⁾

3.4.3 Extensión

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador. ⁽³⁸⁾

3.5 DETECCION DE GENES *vacA* y *cagA*

Como menciona Martínez, A., (2001) en su artículo, existen varios factores patogénicos de *Helicobacter pylori*, algunos de los cuales son característicos de la especie y otros de presencia variable:

Dos importantes factores de virulencia de presencia variable son el antígeno A asociado a la citotoxina o *cagA* y la citotoxina vacuolizante o *vacA*, codificados por los genes *cagA* y *vacA*, respectivamente. El gen *cagA*, marcador del islote de patogenicidad *cag* (o PAI), es de presencia variable, pero siempre expresado. Las cepas con este gen, cepas *cagA+*, se asocian con ulceración péptica, atrofia, metaplasia y cáncer gástrico. ⁽³⁷⁾

El gen *vacA* está presente en todas las cepas, pero su expresión es variable. Presenta dos regiones variables: una en la secuencia señal (s) y otra en la región media (m) del gen, en base a las cuales se describen tipos de secuencia señal (s1 y s2) y de región media (m1 y m2), que permiten caracterizar el genotipo del gen *vacA*. La secuencia señal s1 y la región media m1 se asocian a una acción más deletérea de la cepa infectante sobre la mucosa gástrica. Así, la presencia de *cagA*, el tipo de secuencia señal y de región media de *vacA* constituyen marcadores de virulencia de las cepas de *Helicobacter pylori* infectantes. ⁽³⁷⁾

3.6 PRIMERS

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN. La selección de oligonucleótidos iniciadores debe ser específicos en la reacción en cadena de la polimerasa, de esta selección depende el éxito o fracaso de la prueba. En la Tabla N° 2 se muestran los partidores a utilizar para la detección de genes *vacA* y *cagA*.⁽³⁷⁾

Tabla N° 2. Partidores utilizados en la genotipificación del gen *vacA* y la detección del gen *cagA* de *Helicobacter pylori*.⁽²⁴⁾

Gen	Fragmento amplificado	Nombre partidor	Secuencia partidores	Tamaño fragmento
<i>vacA</i>	s1a*	SS1-F	5'- GTCAGCATCACACCGCAAC -3'	190 pb
		VA1-R	5'- CTGCTTGAATGCGCCAAAC -3'	
	s1b*	SS3-F	5'- AGCGCCATACCGCAAGAG -3'	187 pb
		VA1-R	5'- CTGCTTGAATGCGCCAAAC -3'	
	s2*	SS2-F	5'- GCTAACACGCCAAATGATCC -3'	199 pb
		VA1-R	5'- CTGCTTGAATGCGCCAAAC -3'	
	m1*	VA3-F	5'- GGTCAAAATGCGGTCATGG -3'	290 pb
		VA3-R	5'- CCATTGGTACCTGTAGAAAC -3'	
	m2*	VA4-F	5'- GGAGCCCCAGGAAACATTG -3'	352 pb
		VA4-R	5'- CATAACTAGCGCCTTGCAC -3'	
	s1°	S1f	5'- AGTTTAAAGTCGCACCCCTTTG -3'	155 bp
		S1r	5'- ATGACTTTGTTGCGGTGTGA -3'	
	s2°	S2f	5'- AGTCTAAAGTCGCACCCCTTTG -3'	136 bp
		S2r	5'- AGTTCGGTGCCCATTAACAC -3'	
m1°	M1f	5'- TGGTAATGTTTCTACAGGTACCAATG -3'	116 bp	
	M12r	5'- TTCGCACCACACAAGTATCC -3'		
m2°	M2f	5'- GGAGTGCAAGGCGCTAGTTA -3'	122 bp	
	M12r	5'- TTCGCACCACACAAGTATCC -3'		
<i>cagA</i>	1228-1577*	F1	5'- GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG -3'	349 pb
		B1	5'- CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA -3'	
	3433-3580°	CG3433	5'- AGCAAAAAGCGACCAAGAAA -3'	149 pb
	CG3580	5'- TTTGAGATCGGCTAACGCTT -3'		

*Partidores utilizados por Atherton y col (1995); °partidores gentilmente proporcionados por el Dr. A Corvalán (Instituto Chileno-Japonés de Enfermedades Digestivas).

Para lograr que la técnica de PCR amplifique adecuadamente el fragmento diana de ADN, debe de mezclarse el material genético con todos los ingredientes necesarios para poder realizarlo, dentro de los cuales se encuentran: la *taq*

polimerasa, el ADN en estudio, oligonucleótidos (“primers”), dinucleótidos (dNTP´S), y estabilizadores como cloruro de magnesio y cloruro de potasio entre otros los cuales dependerán de la *taq* polimerasa. Por lo tanto, para este trabajo, la preparación se hará con base en las concentraciones universales, siendo éstas sujetas a estandarización la realización de las pruebas.

3.7 PERFIL DE RESISTENCIA DE *Helicobacter pylori*

El principal objetivo de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos (PSA) in vitro es el proporcionar una guía para el manejo terapéutico de las enfermedades infecciosas a través de la sensibilidad o resistencia de bacterias patógenas aerobias y anaerobias facultativas a diferentes compuestos antimicrobianos. ⁽¹¹⁾

Debido a que es imposible predecir la susceptibilidad de una bacteria responsable de una determinada infección a los antimicrobianos, las PSA efectuadas en el laboratorio microbiológico se convierten en un instrumento esencial para el manejo terapéutico de los pacientes.

Existen diferentes técnicas de laboratorio que pueden ser utilizadas para evaluar in vitro la resistencia de las bacterias a diferentes agentes antimicrobianos. Entre estas técnicas, la prueba de susceptibilidad de difusión en disco (técnica de Kirby Bauer) es la más común, así como las pruebas de macrodilución en caldo y agar.

⁽¹¹⁾

Para obtener unos resultados fiables y uniformes, las técnicas utilizadas, los medios y los procedimientos empleados deben estar normalizados. Hoy en día, el Clinical Laboratory Standards Institute de los Estados Unidos de América (CLSI) es responsable de la actualización y modificación del procedimiento original de Kirby y Bauer a través de un proceso de consenso global. Esto asegura la uniformidad de la técnica y la reproducibilidad de los resultados.

Este método normalizado implica la colocación de un disco de papel cargado de una concentración conocida de un antibiótico sobre la superficie del agar en el que los microorganismos han sido sembrados. De esta forma, se produce un gradiente de concentración y la sensibilidad de los microorganismos se indica según el tamaño del halo de inhibición. El uso de medios de cultivo estandarizados y el control de las condiciones durante la prueba son requisitos fundamentales en el ensayo microbiológico de antibióticos a la hora de lograr resultados satisfactorios. ⁽¹¹⁾

En la actualidad, instituciones como el National Institute of Health de los Estados Unidos, el Maastricht Consensus en Europa y el Consenso Canadiense, recomiendan terapia antibiótica en algunas de las patologías gastro duodenales asociadas a la infección por *H. pylori*. Los regímenes de erradicación más utilizados hoy en día consideran una combinación de tres drogas, las que incluyen un inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos. Con este esquema terapéutico se consigue una erradicación de 70 al 90%. Entre los antibióticos más usados se encuentran amoxicilina, tetraciclina, metronidazol y claritromicina.

3.7.1 Agentes antimicrobianos

Las bacterias generalmente adquieren la resistencia a los antibióticos a través de dos mecanismos: la más conocida es la mutación de genes cromosomales y la segunda por la adquisición horizontal de genes de resistencia. Existen mutaciones repentinas asociadas a la resistencia a un gran número de familias de antimicrobianos *in vitro* y según la especie bacteriana y el agente utilizado, así será el tipo de mutación a sufrir. A la fecha, dentro de la comunidad científica consideran que las mutaciones (cualquier cambio en la secuencia de ADN) son el único mecanismo que puede producir nuevas actividades y funciones genéticas en el mundo biológico, adquiriendo así una vía para la evolución que explique el origen de la resistencia a los antibióticos. ⁽²⁸⁾

La resistencia intrínseca a los antimicrobianos, aplica a todos los miembros de un género o una especie de bacterias debido a la incapacidad del antibiótico de completar su mecanismo de acción mediante los distintos métodos de resistencia ya conocidos como lo son: la imposibilidad de alcanzar su sitio de acción, a la falta de afinidad por el sitio de acción, por la presencia de bombas de eflujo o de otros mecanismos de resistencia cromosómica. La conjugación, transformación o transducción son los principales medios para la adquisición de resistencia en los genes y pueden incorporarse a plásmidos, transposones o integrones, o estar presente en casetes genéticos liberados de otras células bacterianas muertas. ⁽²⁶⁾

A la fecha, la resistencia a los antimicrobianos es una o la principal causa de fracaso del tratamiento contra *Helicobacter pylori* lo cual se traduce en una menor tasa de erradicación. Para ciertos antibióticos la resistencia es intrínseca, es decir, que todos los organismos de *Helicobacter pylori* son resistentes y en consecuencia estos antibióticos no pueden usarse para el tratamiento. ⁽⁴¹⁾

Las bacterias Gram-negativas en muchos casos se hacen resistentes a los β -lactámicos debido a la adquisición del gen de la β -lactamasa, ya sea en su ADN cromosomal o través de plásmidos. Una de las “ventajas” en nuestra actualidad es que no hay registro de ninguna cepa de *Helicobacter pylori* que produzca β -lactamasa; ya que los β -lactámicos son una de las mejores soluciones que se tiene para el tratamiento de la mayoría de enfermedades infecciosas. *Helicobacter pylori* lleva a cabo su mecanismo de resistencia a través de las proteínas fijadoras (PBP) en la membrana citoplasmática. Estas PBPs son enzimas que llevan a cabo carboxipeptidación y transpeptidación, que son los pasos finales de la biosíntesis del peptidoglicano, además producen cambios en la permeabilidad a la droga y alteraciones en las bombas de eflujo multidrogas como también en las porinas. En *Helicobacter pylori* se han descrito tres PBPs

(PBP1, PBP2 y PBP3) que corresponden a los marcos de lectura abierto (ORF) HP0597 (homóloga a la PBP1a de *Escherichia coli*), HP1556 (homóloga a la proteína FtsI) y HP1565 (homóloga a PBP2 de *Helicobacter pylori*) respectivamente, de acuerdo a la notación de la secuencia del genoma de *Helicobacter pylori* 26695. ⁽⁴¹⁾

Los agentes bacteriostáticos tales como tetraciclina inhiben el crecimiento y multiplicación de las bacterias. A partir de la exposición a un agente bacteriostático, las células en una población susceptible cesan su división. Sin embargo, si el agente es retirado, las células vuelven a multiplicarse.

Los agentes bactericidas, como las fluoroquinolonas, no solo inhiben el crecimiento de las células sino también desencadenan mecanismos dentro de la célula que conducen a la muerte celular. Las acciones de los agentes bactericidas son irreversibles por tanto una vez que las células susceptibles son expuestas al agente bactericida, estas mueren. ⁽¹¹⁾

3.7.2 Modo de acción

Los agentes antimicrobianos se clasifican de acuerdo a sus modos específicos de acción contra las células bacterianas. Estos agentes pueden interferir con la síntesis de la pared celular, inhibir la síntesis de proteínas, interferir con la síntesis de ácido nucleico, o inhibir una ruta metabólica. Los modos de acción de los agentes antimicrobianos contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son muy similares. ⁽¹¹⁾

- Interferencia con la síntesis de la pared celular.
- Actividad de los betalactámicos en bacterias Gram-negativas.
- Actividad de los betalactámicos en bacterias Gram-positivas.
- Interferencia con la membrana citoplásmica.
- Interferencia con la síntesis de proteínas mediante el enlace a la subunidad ribosómica 30S.

- Inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosómica 50S.
- Inhibición de la síntesis de proteínas mediante mecanismos en investigación.
- La interferencia con la síntesis de ácido nucleico es causada por dos tipos de agentes antimicrobianos.
- Inhibición de la ruta metabólica de la síntesis de ácido fólico causada por sulfonamidas y trimetoprima.

3.7.3 Resistencia antimicrobiana

Hay una serie de formas en que los microorganismos son resistentes a los agentes antimicrobianos. Estos incluyen:

- Producción de enzimas que destruyen el agente antimicrobiano antes que este alcance su blanco o modifica el agente antimicrobiano de tal forma que ya no puede ser reconocido por su blanco.
- Impermeabilidad de la pared celular al agente antimicrobiano.
- Alteración del sitio de ataque por mutación de tal manera que ya no permite la unión del agente antimicrobiano.
- Utilización de bombas de eflujo que expelen al agente antimicrobiano de la célula antes que este alcance su blanco.
- Alteración genética de rutas metabólicas específicas dentro de la bacteria para que el agente antimicrobiano no pueda provocar un efecto. ⁽¹¹⁾

En materia de resistencia antimicrobiana, se han realizado estudios in vitro de *Helicobacter pylori* donde se evidenció susceptibilidad a una amplia gama de antibióticos, mismos que al realizar estudios in vivo pierden su actividad por las condiciones de pH bajo existentes en el estómago, con lo cual es obligatorio el uso de inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol) en la terapia, los cuales facilitan la acción de los antibióticos. Los antibióticos más frecuentemente usados en el tratamiento de la infección con *Helicobacter pylori*

son el metronidazol, la amoxicilina, la tetraciclina y la claritromicina. No obstante, se han utilizado otros en menor medida, tal es el caso de la ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, azitromicina, eritromicina, furazolidona y nitrofurantoína.

Una técnica molecular que resulta útil para la detección de las mutaciones es la secuenciación posterior a la amplificación por PCR de un fragmento del gen donde están las mutaciones que contribuyen a la resistencia. Esta metodología resulta eficiente para cualquiera de los 4 antibióticos. ⁽¹¹⁾

3.8 Ubicación del área de estudio

El Distrito de Riego del Valle de Zapotitán se localiza entre los 13°42' y los 13°52' de Latitud Norte; y entre los 89°21' y 89°32' de Longitud Oeste, con elevación promedio de 460 msnm; extendiéndose en buena parte del espacio ocupado anteriormente por una laguna original en su parte céntrica y más baja, la cual fue drenada en 1966, estableciéndose formalmente el Distrito de Riego como tal, en 1971. La región dista 30 Km al oeste de San Salvador y su Ubicación general, puede ilustrarse por la siguiente fotografía satelital de la región (Ver Figura N° 2) y por las ilustraciones de mapas que indican su posición interdepartamental y su naturaleza de planicie de mediana elevación (460 m.s.n.m aproximadamente), al

Norte de las tierras altas de la cadena costera, al Sur -Este del borde del Lago de Coatepeque y al Este del Volcán de San Salvador. (37)

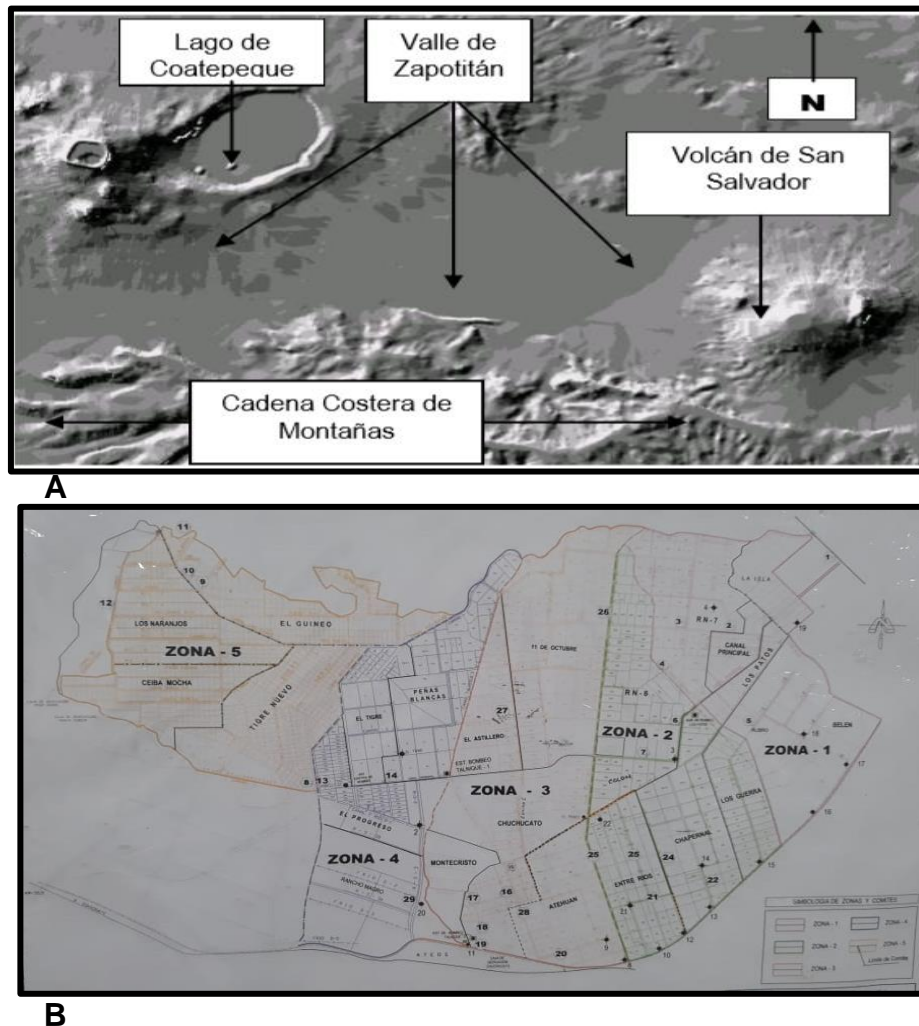


Figura N° 2. **A:** Vista satelital de la región de Zapotitán. **B:** Plano del Distrito de Riego de Zapotitán.

El Valle de Zapotitán abarca nueve municipios que tienen dentro de él, más del 50% de su territorio: San Juan Opico, Ciudad Arce, Sacacoyo, Talnique, Jayaque, Tepecoyo, Armenia y El Congo; sin embargo, otros cuatro municipios más, tienen dentro de la cuenca alta del Río Sucio (principal drenaje del Valle de Zapotitán), una extensión menor al 50% de sus propios territorios, siendo éstos: Coatepeque, Izalco, Nueva San Salvador (Santa Tecla) y Santa Ana. (37)

3.8.1 Funcionamiento del distrito de riego del valle de Zapotitán

El Valle de Zapotitán fue inaugurado como tal en 1971 y debajo de su superficie se encuentra uno de los acuíferos más importantes del país, del cual se extraen significativas cantidades de agua para riego agrícola y otras formas de consumo. Su funcionamiento administrativo considera cinco zonas, conocidas bajo el criterio de administración del agua, así:

- Zona 1 (Z 1): Belén
- Zona 2 (Z 2): Centro de Acopio
- Zona 3 (Z 3): Canal Talnique
- Zona 4 (Z 4): El Tigre
- Zona 5 (Z 5): Ceiba Mocha

Delimitadas en parte por ríos y derivaciones de canales, en los ríos Belén, Agua Caliente, Los Patos, Colón, Chuchucato y Ateos (formando estos dos últimos, al río Talnique) y el Río Copapayo (Ver Figura N° 2) considerándose que aunque la zona de la cooperativa agrícola de Copapayo no pertenece administrativamente al Distrito como tal, si corresponde geográficamente al Valle de Zapotitán, donde convergen en un reservorio el cual alimenta a un canal principal derivándose en 22 canales de riego manejados por la Asociación de Regantes del distrito de Riego del Valle de Zapotitán (AREZA) y la organización de una Asociación de Desarrollo Comunal (ADESCO). ⁽³⁷⁾

3.8.2 Cultivos

Durante el período de invierno el cultivo de arroz se vuelve primordial alcanzando un promedio de 1,800 manzanas de cultivo, obteniéndose una producción aproximada de 250,000 qq. En época de verano el frijol es otro cultivo que alcanza las 1,200 manzanas de cultivo con una producción aproximada de

42,000 qq. El maíz para elote es el tercer cultivo de la zona que promedia entre 1,500 a 1,800 manzanas con una producción de 105,000 redes.

Las hortalizas constituyen unas 500-600 manzanas siendo estas negociadas actualmente en el sector informal, produciendo (chile dulce, tomate, pepino, repollo, berenjena, ayote, güisquil, limón, maracuyá, pipián, chipilín, mora).⁽³⁷⁾

CAPITULO IV
METODOLOGIA

4.0 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudio

Esta investigación se realizó con un enfoque experimental, de tipo descriptivo, y de corte transversal.

- **Estudio Experimental:** Porque se realizaron pruebas en laboratorio.
- **Estudio Descriptivo:** Porque solo se describió la presencia o no de *Helicobacter pylori* en aguas.
- **Corte Transversal:** Porque se realizó una sola medición en el tiempo.
- **Estudio de Campo:** Porque se realizaron visitas en el sitio donde se encontraba el objeto de estudio.

4.2 Universo y Muestra

Universo: Aguas del Distrito de Riego de Zapotitán.

Muestra: Agua de riego y agua potable seleccionadas.

Las muestras de agua para esta investigación comprendieron la totalidad de 25 muestras de agua de riego y 25 muestras de agua potable. La cantidad de muestras se calculó con el programa *Epi info* en línea, con parámetros como una heterogeneidad del 50%, un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 5%, ambos tipos de agua fueron recolectadas en el Sub-comité El Astillero del Distrito de Riego de Zapotitán, municipio de Ciudad Arce en el departamento de La Libertad.

4.3 Fase de campo

Se realizó una visita al sub comité el Astillero perteneciente al municipio de Zapotitán, departamento de La Libertad durante el mes de mayo de 2019, en la cual se llevó a cabo una inspección de la zona, incluyendo visitas a los ríos Talnique, Copapayo y Chuchucato, los cuales alimentan el reservorio mediante tuberías subterráneas, para posteriormente ser bombeada al canal principal,

donde se dividen 22 canaletas de distribución, desde la canaleta RN-1 hasta canaleta RN-22.

4.3.1 Puntos de muestreo

Se realizaron 10 viajes de campo a la zona de estudio, para recolectar 5 muestras de agua en cada visita, las primeras 8 visitas se efectuaron con intervalo mínimo de dos semanas, mientras que las últimas 2 visitas se realizaron un año después debido a la situación de pandemia por COVID-19 a la que se enfrentó el país, iniciando con las muestras de agua potable, las cuales se recolectaron a primera hora del día, tomando en cuenta que el servicio de abastecimiento a las viviendas es por horarios, específicamente por las mañanas. Posteriormente se recolectaron las muestras de agua de riego siguiendo la misma metodología, es decir 5 muestras de agua en cada visita, totalizando 50 muestras de agua (25 muestras de agua potable y 25 de agua de riego) para abarcar época lluviosa y época seca.

Los puntos de muestreo se detallan a continuación:

Agua potable

- Con base al mapa local de la zona, se seleccionaron 25 casas que poseían el servicio.

Agua de riego

- Rio Talnique: En su curso medio. (Ver Anexo N° 1)
- Represa del rio Talnique: En el perímetro de la compuerta de la tubería que alimenta a la pila de estación de bombeo.
- Pila de estación de bombeo
- Canal principal: Desembocadura de la tubería que alimenta al canal principal. (Ver Anexo N° 1)
- Canal de distribución: Específicamente del canal RN-4, ubicado en el sub-comité El Astillero. (Ver Anexo N° 1)

4.4 Diseño Experimental

4.4.1 Muestreo de agua.

4.4.1.1 Codificación de las muestras a evaluar

A cada una de las muestras se le asignó un código, los cuales se muestran en la Tabla N° 3

Tabla N° 3. Códigos asignados a las muestras de agua potable y agua de riego en estudio.

AGUA POTABLE		AGUA DE RIEGO	
Punto de muestreo	Código	Punto de muestreo	Código
Zona 1	APH-01	Rio Talnique	RTA-01
	APH-02		RTA-02
	APH-03		RTA-03
	APH-04		RTA-04
	APH-05		RTA-05
Zona 2	APH-06	Represa rio Talnique	RRT-01
	APH-07		RRT-02
	APH-08		RRT-03
	APH-09		RRT-04
	APH-10		RRT-05
Zona 3	APH-11	Pila de estación de bombeo	PEB-01
	APH-12		PEB-02
	APH-13		PEB-03
	APH-14		PEB-04
	APH-15		PEB-05
Zona 4	APH-16	Canal Principal	CPP-01
	APH-17		CPP-02
	APH-18		CPP-03
	APH-19		CPP-04
	APH-20		CPP-05
Zona 5	APH-21	Canal de distribución	CDD-01
	APH-22		CDD-02
	APH-23		CDD-03
	APH-24		CDD-04
	APH-25		CDD-05

4.4.1.2 Recolección de muestras

El sub-comité El Astillero se dividió en 5 zonas para facilitar el muestreo. (Ver Anexo N° 2). Se seleccionaron al azar 5 hogares de cada zona que contaban con servicio de agua potable, haciendo un total de 25 muestras.

Antes de realizar la toma de las muestras, se procedió a completar la Ficha de recolección de muestras de agua en el Distrito de Riego de Zapotitán con la información necesaria. (Ver Anexo N° 3)

Agua potable.

- Para realizar el muestreo de agua se utilizaron los siguientes materiales: pizeta con alcohol etílico al 70 %, bolsa estéril para muestreo debidamente rotulada, gasa estéril, guantes y mascarilla.
- Con una gasa estéril impregnada con alcohol etílico al 70%, se desinfectó el grifo, desde adentro de la toma hasta la superficie, descartando por lo menos 2 litros de agua antes de tomar la muestra, y tomando un volumen de 500 mL (Ver Figura N°3).



Figura N° 3. Muestreo de agua potable en hogares seleccionados

- Una vez recolectadas las muestras, se transportaron en una hielera a una temperatura entre 4 y 8 °C al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina en la Universidad Evangélica de El Salvador, donde se procesaron las muestras.

Agua de Riego.

- Se rotularon los frascos de vidrio estériles y se recolectaron aproximadamente 500 mL de muestra directamente de los puntos seleccionados (ríos, reservorio, canal principal, y canal RN-4). (Ver Anexo N° 3).
- Una vez recolectadas las muestras, se transportaron en una hielera a una temperatura entre 4 y 8 °C al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina en la Universidad Evangélica de El Salvador, donde se procesaron las muestras.

4.4.2 Proceso de filtración

4.4.2.1 Agua Potable.

- Se prepararon anticipadamente según indicación del fabricante, placas con caldo Brucella, conteniendo 20 mL de medio de cultivo. Se incubaron por 24 horas de 30 - 35 °C.
- Se ensambló el manifold de filtración de agua con los vasos de previamente esterilizados en autoclave con los parámetros establecidos internacionalmente (121°C x 15´ a 15 libras de presión por cm³). (Ver Figura N°4)



Figura N° 4. Aparato de filtración por membrana utilizado en el procesamiento de las muestras.

- Se colocó la membrana de 0,45 mm en el soporte del filtro, utilizando una pinza estéril y colocando el vaso de acero inoxidable estéril sobre el soporte del filtro con su respectivo seguro (abrazadera).



Figura N° 5. Membranas estériles de 0.45 mm utilizadas en el proceso de filtración.

- Se homogenizó la muestra agitándola con movimientos de arriba hacia abajo, y se vertieron 100 mL de la muestra en el vaso del equipo aplicando vacío para hacer pasar el agua a través de la membrana. Se desmontó el vaso y con cuidado se retiró la membrana con la pinza previamente sanitizada.



Figura N° 6. Procesamiento de muestras de agua potable

- A partir de este punto se utilizó la cepa de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 como control positivo.
- Se colocó la membrana en las placas con caldo Brucella preparadas previamente. (30)
- Se incubaron las placas a 37 °C en una atmosfera con 10% de CO₂ por 24 horas.



Figura N° 7. Caldo Brucella conteniendo la membrana utilizada en el proceso de filtración

- Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron 100 μ L de caldo Brucella en el medio selectivo Columbia enriquecido con suplementos DENT y 7% de sangre desfibrinada de carnero. ⁽³⁴⁾

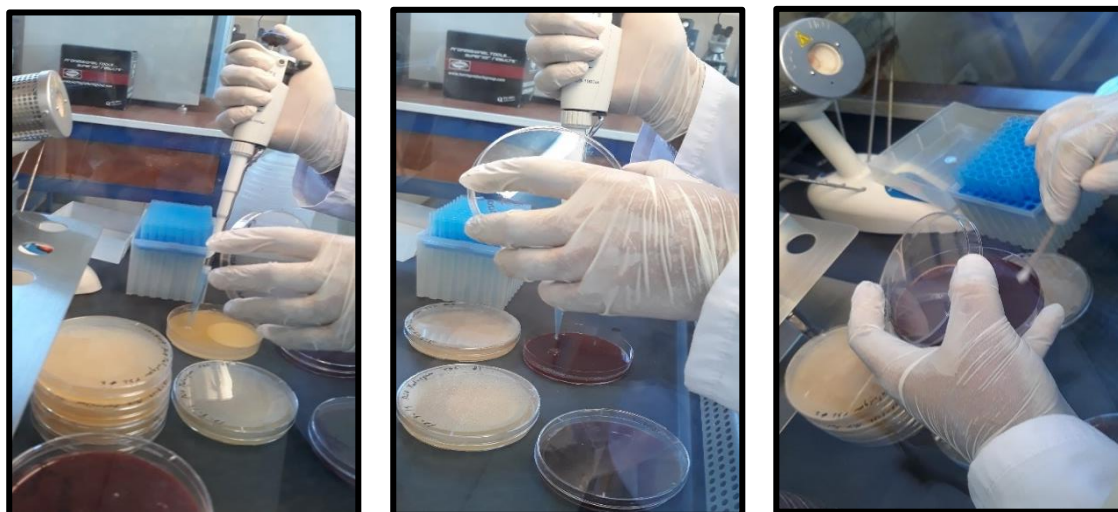


Figura N° 8. Siembra de muestras en agar Columbia enriquecido con suplementos DENT y 7% de sangre desfibrinada de carnero.

- Se estrió con hisopo estéril e incubaron las placas en una cámara con las siguientes condiciones:
 - 5% de O₂
 - 10% de CO₂
 - 80% de N₂
 - 37 °C
 - Humedad del 95%.

4.4.2.2 Agua de riego

- Se recortaron los filtros de 1 µm y se ajustó al tamaño del soporte del filtro.
- Se vertieron los 500 mL de agua, distribuyendo 100 mL en cada uno de los 5 vasos del equipo de filtración y se realizó un pre-filtrado empleando filtros de poro de 1 µm.
- Se desmontaron los vasos para retirar el filtro de 1 µm y se descartó.
- Se ensambló el equipo de filtración y se colocó la membrana de 0,45 mm en el soporte del filtro, utilizando una pinza estéril y ensamblando el vaso sobre el soporte del filtro con su respectivo seguro (abrazadera).
- Se homogenizó la muestra agitándola con movimientos de arriba hacia abajo, y se vertieron 500 mL de la muestra en un vaso del equipo aplicando vacío para hacer pasar el agua a través de la membrana. Se desmontó el vaso y con cuidado se retiró la membrana con la pinza previamente sanitizada.
- Se colocó la membrana en las placas con caldo Brucella preparadas previamente, incubando las placas a 37 °C en una atmosfera con 10% de CO₂ por 24 horas. ⁽³⁴⁾
- Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron 100 µL de caldo Brucella en el medio selectivo para *Helicobacter pylori* Columbia

enriquecido con suplementos DENT y 7% de sangre desfibrinada de carnero. ⁽³⁴⁾

- Se cultivó con hisopo estéril y se incubaron las placas en una cámara con las siguientes características:

5% de O₂

10% de CO₂

80% de N₂

37 °C

Humedad del 95%.

Antes de considerar negativo el cultivo por la ausencia de colonias se esperó 5 días para verificar resultados.

Dichas colonias deben tener las siguientes características: pequeñas, brillantes y transparentes de aproximadamente 1mm. En ocasiones un poco grisáceas. Para las colonias sugestivas de *Helicobacter pylori*, primero se realizó una coloración de Gram en busca de bacilos ligeramente curvos Gram negativos. ⁽⁵⁾

4.4.3 Pruebas bioquímicas

A las colonias que poseían las características antes mencionadas se les realizó las siguientes pruebas bioquímicas:

4.4.3.1 Prueba de Catalasa.

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas.

Se depositó una colonia en un portaobjeto y se añadió una gota del reactivo (peróxido de hidrógeno al 3%). Interpretar como reacción positiva el desprendimiento de oxígeno que se evidencia con la formación de burbujas (Ver Figura N° 9). ⁽³⁴⁾

4.4.3.2 Prueba de Oxidasa.

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerófila, pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción de oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

Se depositó una colonia en la zona reactiva de la tira de oxidasa y se frotó con el asa. Interpretar el resultado al cabo de 10-30 segundos. Se interpretará como reacción positiva el viraje de color blanco a púrpura (Ver Figura N° 9).⁽³⁴⁾

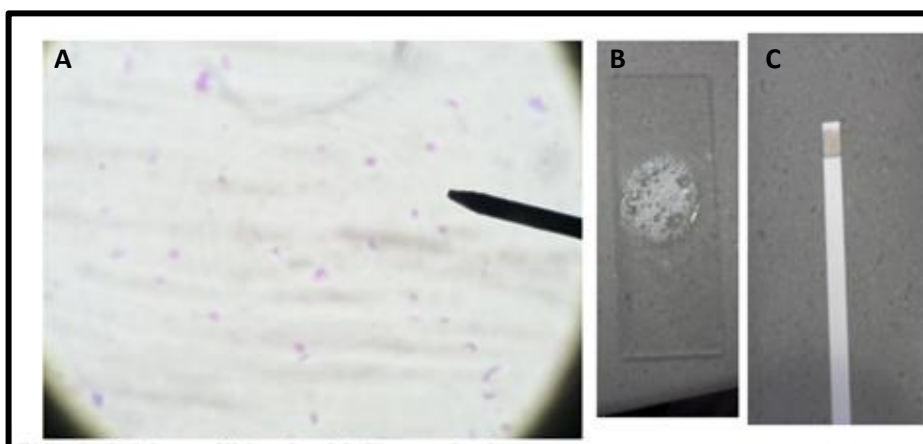


Figura N° 9. **A:** Cultivo sólido de 24 horas de la cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (forma cocoide). Tinción de Gram. **B:** Catalasa positiva. **C:** Oxidasa positiva.

4.4.4 Extracción de ADN

4.4.4.1 Preparación para PCR

Superadas las etapas de realización de las pruebas bioquímicas, se procedió a la extracción de ADN por medio de la técnica de columnas de sílica gel a las colonias que mostraron resultados bioquímicos presuntivos en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Evangélica de El Salvador. La técnica se realizó de la siguiente manera:

- Para iniciar con la extracción de DNA, se reconstituyó la enzima de PROTEINASA K con 1.35 mL de Proteinasa buffer K.
- Se mezcló y se homogenizó con vortex.
- En los tubos Eppendorf se agregó a cada uno lo siguiente: 180 μ L de B1, 5 colonias de cada muestra positiva y 25 μ L de Proteinasa K.
- Se mezcló y se homogenizó con vortex.
- Se incubó en baño de maría a una temperatura de 56 °C por una hora considerando homogenizar con vortex cada 15 minutos durante la incubación (Ver Anexo N° 5).
- Se colocó a cada tubo 200 μ L de B3 mezclando con vortex vigorosamente.
- Se incubó en baño de maría a 70 °C por 10 minutos.
- Se centrifugó por 5 minutos a 11,000 rpm.
- Se agregaron 210 μ L de Etanol molecular, luego se mezcló y se homogenizó con vortex.
- Para iniciar con la purificación del DNA, se transfirió el contenido total de los tubos Eppendorf a las columnas de sílica gel con su respectivo tubo colector, rotulando los tubos en la tapa.
- Se centrifugó por 1 minuto a 11,000 rpm.
- Se descartó el tubo colector con el líquido filtrado.
- Se colocó la columna en un nuevo tubo colector.

- Se preparó el B5 con 48 mL de etanol molecular.
- Se agregaron 500 μ L de BW (1^o lavado) a cada columna contenida en el nuevo tubo colector.
- Se centrifugó por 1 minuto a 11,000 rpm.
- Se eliminó el filtrado de cada tubo colector y se colocó nuevamente con su respectiva columna.
- Se agregaron 600 μ L de Buffer B5 a cada tubo, centrifugando a 11,000 rpm durante 5 minutos (2^o lavado).
- Se descartó el tubo colector con su contenido y se colocó otro nuevo.
- Se centrifugó nuevamente sin agregar ningún buffer.
- Se rotularon los tubos Eppendorf donde quedó guardado el ADN extraído.
- Se separó la columna del tubo colector y se colocó en los tubos Eppendorf anteriormente rotulados.
- Se agregaron 60 μ L de BE a cada tubo.
- Se centrifugó por 1 minuto a 11,000 rpm.
- Se descartaron las columnas.
- Se guardaron los tubos Eppendorf con el ADN extraído en freezer.

4.4.4.2 Preparación del master mix.

Una vez extraído el DNA bacteriano, se procedió a preparar el master mix, considerando las concentraciones estándar. Todos los componentes se calcularon para obtener un volumen final de 50 μ L por cada muestra.

En un tubo Eppendorf se agregaron las cantidades respectivas de todos los componentes multiplicado por 6 (5 muestras positivas y 1 control positivo), a excepción de los iniciadores y el ADN, ya que estos se agregaron por separado a cada tubo de PCR donde se distribuyó el master mix, quedando el contenido de cada tubo de la siguiente manera:

- 10X Buffer	5 μ L
- dNTP'S	1 μ L
- Cloruro de magnesio	1.5 μ L
- Oligo Forward	0.25 μ L
- Oligo Reverse	0.25 μ L
- Taq polimerasa	0.4 μ L
- Agua libre de nucleasas	36.6 μ L
- ADN	<u>5 μL</u>
	50 μ L

Una vez completos y bajo las condiciones de PCR previamente establecidas, se procedió a la amplificación en un termociclador de punto final (Prime Thermal Cycler) bajo las condiciones previamente establecidas.

Con estas concentraciones lo que se busca es que el mix quede lo más homogéneo posible. Se recomienda no congelar y descongelar en repetidas ocasiones ya que esto puede cambiar las concentraciones de los reactivos formando gradientes dentro del tubo causando errores en la reproducibilidad.

Posteriormente se procedió a preparar la cámara de electroforesis y el molde del gel. Los extremos abiertos de la cámara se cubrieron con cinta, cuidando que un trozo a lo largo de la cinta sobresaliera de la base del molde (0,5 cm). Se colocó el peine en la parte superior del molde.

4.4.4.3 Preparación de la agarosa

- En una probeta de 1 litro de capacidad, se diluyeron 100 mL de TBE 10 X con 900 mL de agua destilada, obteniendo un volumen total de 1 L de buffer TBE al 1X.
- Se pesaron 1.25 g de agarosa para un volumen de 50 mL de buffer TBE al 1X para obtener un gel a una concentración de 2.5 %.

- En un erlenmeyer de 250 mL, se colocó la agarosa con el buffer TBE al 1X. Luego se fundió la agarosa.
- Se enfrió hasta que fuese tolerable con mano desnuda, aproximadamente 50 °C.
- Se agregaron 3.5 µL de tinte fluorescente para ácidos nucleicos al erlenmeyer con la agarosa fundida.
- Se vertió dentro del molde con el peine y se dejó solidificar.
- Al solidificar la agarosa, se retiró con cuidado el peine y las cintas de los bordes. (Ver Anexo N° 6)

4.4.4.4 Preparación de la muestra para la electroforesis.

- Se llenó la cámara de electroforesis con el buffer TBE al 1X, hasta el límite permitido.
- Se sumergió el gel dentro de la cámara de electroforesis (Ver Figura N°12)
- ⁽³⁷⁾
 - En los pozos del gel de agarosa sumergido en la cámara de electroforesis con el buffer TBE 1X, se sembraron las muestras de la siguiente manera:
 - En una tira de papel encerado, se pipetearon 2 µL de buffer de carga 7 veces, los cuales se agregaron al volumen total del cada pozo a sembrar.
 - En el pozo número 1 con una micropipeta se sembraron 7 µL del marcador de peso molecular previamente homogenizado con los 2 µL de buffer de carga.
 - En el pozo número 3, se sembraron 10 µL de DNA amplificado del control positivo previamente homogenizado con los 2 µL de buffer de carga.
 - Del pozo número 4 en adelante, se sembraron 10 µL de DNA amplificado de las muestras previamente homogenizadas con los 2 µL de buffer de carga respectivamente.
- Se colocó la tapa a la cámara de electroforesis conectando en su parte posterior los electrodos.

- Se programó la fuente de la cámara de electroforesis a 80 mV, 500 m/amp por 45 minutos.
- Después de la corrida, se sacó el gel dejándolo secar.
- Finalmente, se introdujo el gel de agarosa seco dentro de la campana de luz ultravioleta verificando la presencia de bandas en el gel procediendo a interpretar los resultados. ⁽¹⁴⁾
- Se utilizó como control positivo la cepa de *Helicobacter pylori* NTCT 11637.

4.4.4.5 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ⁽³¹⁾

El estudio requiere de tres protocolos diferentes los cuales se detallan a continuación:

Gen 16 S ARNr *Helicobacter pylori*

Secuencia:

Forward: 5' - CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC – 3'

Reverse: 3' - ATT ACT GAC GCT GAT TGT GC – 5'

Tamaño amplicón: 110 pb

Como primer paso, se realiza una desnaturalización inicial por 2 min a 94 °C, luego completar 30 ciclos en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización a 95 °C por 30 s,
- Hibridación a 60 °C por 30 s,
- Extensión a 72 °C por 30 s
- Concluyendo con 1 ciclo para una extensión final a 72 °C por 8 min.

Gen *vacA m1A*

Secuencia:

Forward: 5' - GGTCAAAATGCGGTCATGG - 3'

Reverse: 3' – CCATTGGTACCTGTAGAAAC - 5'

Tamaño amplicón: 290 pb

La desnaturalización inicial debe ser programada por 2 min a 94 °C, luego completar 40 ciclos en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización 94 °C por 45 s,
- Hibridación a 55 °C por 45 s,
- Extensión a 72 °C por 60 s,
- Y finalmente una extensión final a 72 °C por 7 min.

Gen *cagA*

Secuencia:

Forward: 5' – GATAACAGCCAAGCTTTTGAGG - 3'

Reverse: 3' – CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA - 5'

Tamaño amplicón: 300 pb

La desnaturalización inicial debe ser programada por 2 min a 94 °C, luego completar 40 ciclos en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización 94 °C por 45 s,
- Hibridación a 55 °C por 45 s,
- Extensión a 72 °C por 60 s,
- Y finalmente una extensión final a 72 °C por 7 min.

4.4.5 Perfil de resistencia antimicrobiana

4.4.5.1 Preparación de agar Müller-Hinton

El agar Müller-Hinton se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante con agua destilada. Inmediatamente después se autoclavó y dejando enfriar hasta una temperatura aproximada de 45 - 50 °C. Se añadieron 7% de sangre de carnero desfibrinada. Se vertió el preparado fresco y tibio a una placa petri de plástico y fondo plano para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Para ello, se utilizaron 20 mL de medio por placa. Se dejó enfriar a temperatura ambiente ⁽¹¹⁾

4.4.5.2 Método de suspensión de colonias

El inóculo se preparó haciendo directamente una suspensión salina de colonias aisladas de una placa de agar. La suspensión se ajustó hasta 0.5 McFarland de turbidez y esta aproximación es el método recomendado. ⁽¹¹⁾

Se removió el exceso de la torula y se inoculó la superficie de las placas de agar Mueller -Hinton por extendido sobre toda la superficie. Este procedimiento se repitió rayando dos o más veces, rotando la placa para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasó sobre los bordes del agar. ⁽¹¹⁾

4.4.5.3 Aplicación de los discos

Los sensidiscos se colocaron sobre la superficie del agar, típicamente, se pueden aplicar hasta 12 discos en una placa de 150 mm de diámetro o hasta 5 discos en una placa de 100 mm, cada uno debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Deben ser distribuidos en forma constante y no debe quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros. Las placas se colocan en posición invertida en un incubador a 35°C en el lapso de 15 minutos después de aplicados los discos. Las placas deben de incubarse en un ambiente de CO₂ (Ver Anexo N° 7).

Los antibióticos que se utilizaron fueron: Claritromicina, Amoxicilina, Metronidazol y Levofloxacina.

4.4.5.4 Lectura e interpretación de los resultados

Después de 3 a 5 días de incubación, se examinaron las zonas de inhibición resultantes de forma circular y homogénea alrededor del disco, si la hubiera. El margen de las zonas de inhibición debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Los tamaños de las zonas de inhibición serán interpretados con base a la Tabla N° 4. ⁽¹¹⁾

Tabla N° 4. Criterios de clasificación para la respuesta de *Helicobacter pylori* ante los antibióticos de prueba.

Antibiótico de prueba	Concentración (µg)	Sensible (mm)	Sensibilidad intermedia (mm)	Resistente (mm)
Amoxicilina	10	>25	-	≤25
Claritromicina	15	>21	-	≤21
Metronidazol	5	>21	16 - 21	<16
Levofloxacina	5	≥17	14 - 16	≤25

4.5 Procesamiento y análisis de datos.

Los datos obtenidos por medio de las pruebas realizadas fueron recolectados y tabulados utilizando Microsoft Office Excel 2020.

La presencia de genes *vacA* y *cagA* se registraron a través de fotografías digitales del gel de agarosa. Posteriormente se procesaron los datos obtenidos y a partir de esta información se obtuvo los resultados definitivos de la investigación que se presentan a continuación.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION

En esta investigación se determinó la presencia o ausencia de *Helicobacter pylori* y comprobamos la presencia de los genes *vacA* y *cagA* mediante técnicas moleculares como la PCR de punto final, obteniendo lo siguiente: de agua potable, todas las muestras dieron resultados negativos para el aislamiento de *Helicobacter pylori*, en agua de riego, un total de 2 muestras correspondientes a la represa del rio Talnique y 3 muestras del rio Talnique arrojaron resultados positivos para *Helicobacter pylori*, logrando amplificar los genes 16 S ARNr, *vacA m1A* y *cagA*, para las 20 muestras de agua de riego restantes, los resultados fueron negativos.

Inicialmente se planteó la sobrevivencia del *Helicobacter pylori* en ambos tipos de agua, ya que en otras investigaciones se confirmó el agua potable como un mecanismo de transmisión, sin dejar de mencionar que la presencia de esta bacteria en agua de riego, la convierte en un riesgo potencial para contaminar los cultivos, esta última aseveración se confirma en este estudio, ya que la bacteria se encontró en el 20% de las muestras de agua de riego. (12, 31, 35)

Los cultivos aislados fueron comparados con las características macroscópicas y microscópicas de la cepa de referencia NCTC 11637 de *Helicobacter pylori* (ver Figura N° 10).

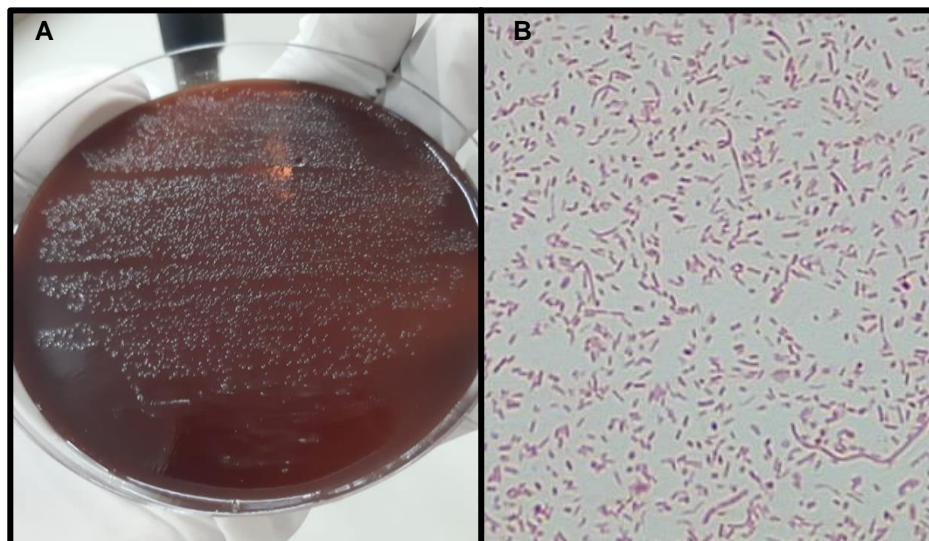


Figura N° 10. A. Colonias de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 en agar sangre Columbia.
 .B. Bacilos curvos Gram negativos de *Helicobacter pylori* NCTC 11637.

5.1 Aislamiento de *Helicobacter pylori*

Con respecto al agua potable, de las veinticinco muestras procesadas, ocho mostraron una leve turbidez en caldo Brucella, estas representan el 32% del total de muestras, mientras que diecisiete tienen ausencia de crecimiento bacteriano que representa un 68% de muestras negativas. (Ver Figura N° 11).

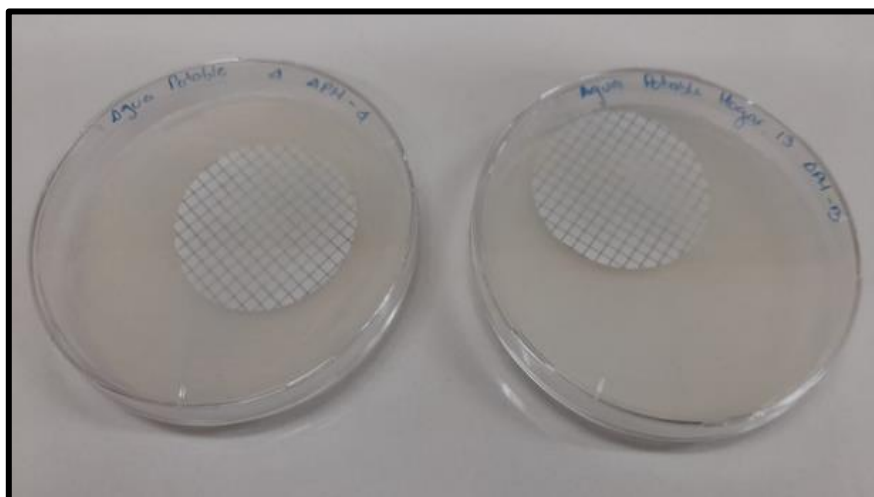


Figura N° 11. Resultados de muestras de agua potable que presentaron turbidez en etapa de enriquecimiento.

Los resultados obtenidos en la etapa de enriquecimiento, evidenciaron crecimiento microbiano mediante la turbidez observada, en este punto no se pudo afirmar la presencia de *Helicobacter pylori*, ya que este medio de cultivo permite el desarrollo de otros microorganismos poco exigentes, por lo tanto, se procedió a continuar con la siguiente etapa de aislamiento de *Helicobacter pylori*, donde se confirmó la ausencia del microorganismo, ya que no hubo crecimiento de colonias características de *Helicobacter pylori*.

La figura N° 12 expresa la ausencia de crecimiento bacteriano, apreciando que, del total de veinticinco muestras, veinticinco no presentaron crecimiento de colonias características, esto representa un 100% de muestras negativas del total de muestras analizadas.

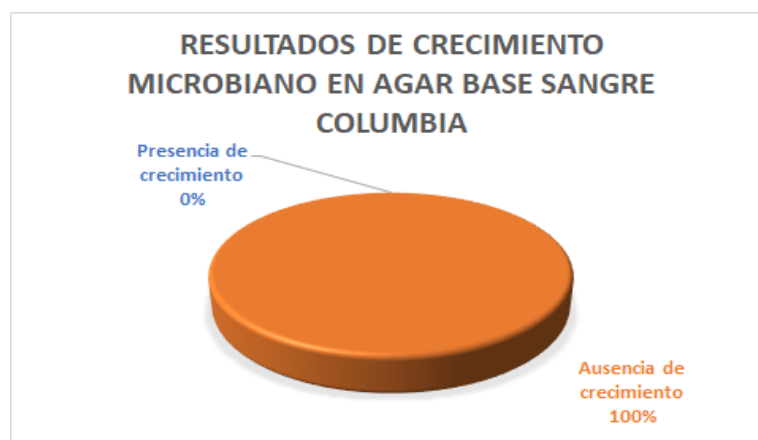


Figura N° 12. Resultados de muestras de agua potable sin crecimiento microbiano en agarsangre Columbia.

Aunque ocho muestras presentaron crecimiento microbiano en la etapa de enriquecimiento, se puede confirmar que *Helicobacter pylori* no se encuentra presente en las veinticinco muestras de agua potable de los hogares seleccionados. Sin embargo, los resultados del estudio con caldo Brucella, indican la posibilidad de la presencia de otros microorganismos potencialmente patógenos.

La dificultad que presenta cultivar *Helicobacter pylori* a partir de muestras de agua es el principal obstáculo para confirmar completamente la hipótesis de que el agua puede ser una ruta importante para la transmisión de *Helicobacter pylori*. Adicionalmente, este microorganismo por lo general está en estado viable no cultivable adoptando una morfología cocoide en muestras de agua potable, debido a dos factores, el primero es que esta bacteria pierde su capacidad de cultivo en contacto con cloro durante periodos de tiempo cortos (1-5 min), y el segundo es que al adoptar esta forma cocoide tiende a crear biopelículas con células sin capacidad de reproducción limitando la cantidad de células viables cultivables, lo que hace que su aislamiento sea aún más difícil, por lo tanto es fundamental conseguir la máxima eficiencia en la recuperación de la bacteria en el proceso de concentración de la muestra original.

El no haber tenido éxito en el aislamiento de *Helicobacter pylori* en muestras de agua potable, no confirma su ausencia. Otros investigadores (Espinoza M. 2012) en su investigación sobre detección molecular de *Helicobacter pylori* en agua y alimentos, utilizó otras técnicas como la filtración de la muestra de agua con membrana cuyo poro es más pequeño (0.22 μm), la extracción de ADN se realizó directamente de la membrana utilizada para el proceso de filtración sin paso de aislamiento previo en medio de cultivo, y reporta la utilización de métodos más complejos y sensibles para la detección de su forma cocoide como lo es la inmunoseparación con perlas magnéticas.

Con respecto al agua de riego, de las veinticinco muestras procesadas, veinticinco mostraron excesiva turbidez en caldo Brucella, apreciando que, del total de muestras analizadas, el 100% de muestras arrojaron resultados positivos. (Ver Figura N° 13).

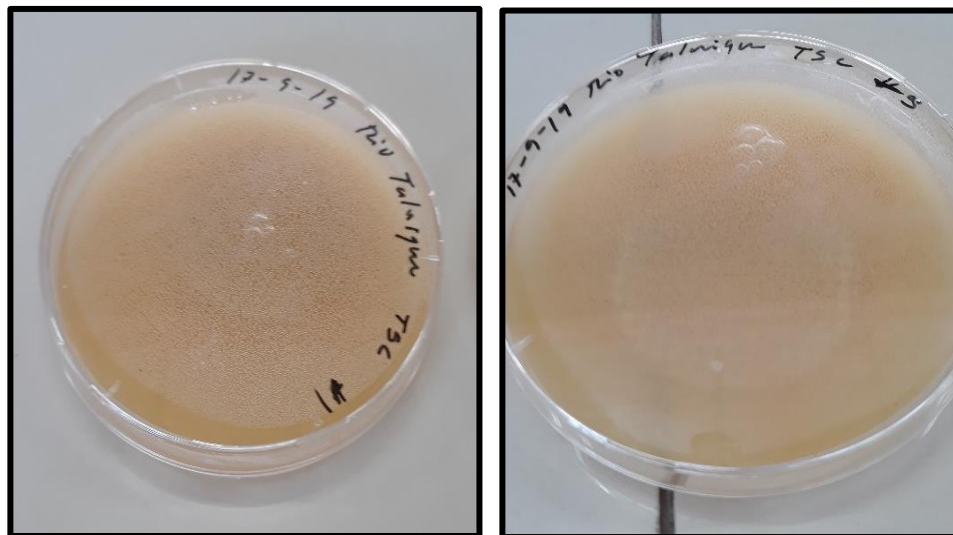


Figura N° 13. Resultados de muestras de agua de riego con crecimiento microbiano en caldo Brucella.

Con base a los resultados obtenidos de las muestras positivas (turbidez) se procedió a la siguiente etapa de aislamiento de *Helicobacter pylori*. De las placas procesadas, cinco de ellas evidenciaban crecimiento de colonias grisáceas, puntiformes y brillantes, considerándose sugestivas para *Helicobacter pylori*. (Ver Figura N° 14). Aunque en la mayoría de las placas se observó crecimiento de microbiota acompañante de diversas colonias con características macroscópicas diferentes como, por ejemplo: grandes brillantes con bordes irregulares, medianas pulvinadas y mucoides, únicamente se tomaron en cuenta las colonias con características macroscópicas correspondientes a *Helicobacter pylori*.

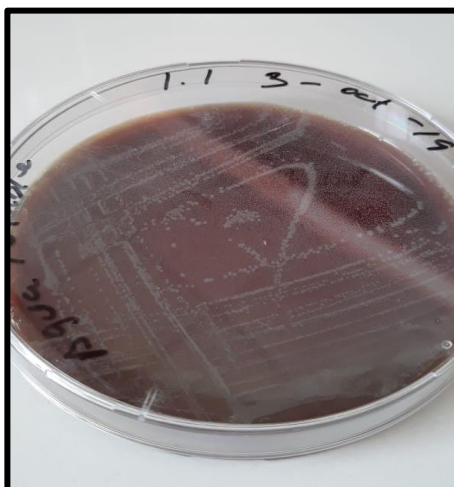


Figura N° 14. Crecimiento de colonias sugestivas de *Helicobacter pylori* aisladas en agua de riego.

La figura N° 15 expresa la presencia de crecimiento bacteriano, apreciando que, del total de veinticinco muestras, veinte tienen ausencia de crecimiento bacteriano que representa un 80% de muestras negativas, mientras que hay presencia de crecimiento en cinco muestras, lo que representa el 20% del total de muestras analizadas.

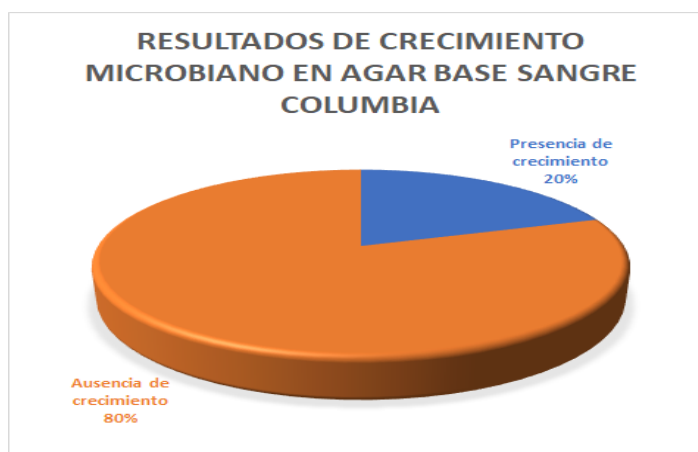


Figura N° 15. Resultados de muestras de agua de riego con crecimiento microbiano en agar sangre Columbia.

Del total de muestras de agua de riego analizadas, dos muestras correspondientes al río Talnique y tres muestras de la represa del río Talnique

evidenciaron posible presencia de *Helicobacter pylori* mediante el crecimiento de colonias características.

Cuadro N° 1. Resumen de muestras de agua de riego positivas.

Código de muestra	Resultado
RTA-04	Positivo
RTA-05	Positivo
RRT-03	Positivo
RRT-04	Positivo
RRT-05	Positivo

Es importante valorar las características físico-químicas, la alta carga de materia orgánica y los altos niveles de contaminación de origen fecal e industrial que caracteriza el agua de riego estudiada, adicionalmente los puntos donde obtuvieron muestras positivas poseen la característica de embalsar el cauce del agua lo que se traduce en un estancamiento del flujo del río, por lo mismo, se esperaba un alto porcentaje de detección de *Helicobacter pylori* en las muestras, pero en este estudio se encontró la bacteria solamente en un 20% del universo, lo cual podría deberse a la presencia de sustancias inhibidoras que no permitieron la forma bacilar, la cual es por excelencia su estado cultivable. Estos resultados se corroboran con el trabajo publicado por Abdolkazem *et al.* (2015) y Queralt y Ararujó (2007), quienes concluyeron que las muestras de aguas ambientales presentan inhibidores como sustancias ácidas y alcalinas, detergentes que forman espumas, metales pesados (As, Cd, Pb, Hg), fenoles, cianuros entre otros, que afectan a la eficacia del método de PCR para la identificación de *Helicobacter pylori*. El segundo factor a considerar es que las muestras positivas de los puntos muestreados corresponden a los meses de septiembre y octubre, últimos meses de la época lluviosa en el país,

particularmente en estos últimos meses del año 2019 se observó un déficit de lluvias ocasionado por diferentes fenómenos lo cual permite una acumulación de aguas y consecuentemente de la contaminación ya que no aumenta el nivel de los afluentes de los ríos, por lo cual se cuenta con una programación de limpiezas periódicas que oscilan entre seis y nueve meses para el canal principal, los canales de distribución y la estación de bombeo.

Es importante mencionar que los puntos muestreados corresponden a río abajo considerando a la estación de bombeo como punto de referencia, lo cual nos indica que el riesgo de contaminación en relación a los puntos de riego de los cultivos de la zona es bajo.

5.2 Pruebas bioquímicas

A las colonias sugestivas se les realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas, los resultados fueron los siguientes:

Cuadro N° 2. Resultados de tinción al Gram y pruebas bioquímicas

MUESTRA	TINCION AL GRAM	PRUEBA DE CATALASA	PRUEBA DE OXIDASA	PRUEBA DE UREASA
RTA-03	Bacilos Gram negativos	+	+	+
RTA-04	Bacilos Gram negativos	+	+	+
RRT-03	Bacilos Gram negativos	+	+	+
RRT-04	Bacilos Gram negativos	+	+	+
RRT-05	Bacilos Gram negativos	+	+	+

En todas las muestras se observó a través del microscopio óptico bacilos curvos Gram negativos en forma de coma, en la prueba de catalasa se observó efervescencia con desprendimiento de burbujas, esto indica que la bacteria en

estudio posee la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen el cito-cromo oxidasa. En la prueba de oxidasa, se observó una coloración violeta que luego paso a purpura-negro intenso indicativo que la bacteria posee un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua.

En la prueba de ureasa todas las muestras evidenciaron un cambio de color amarillo a rosa fuerte, lo cual indica que el microorganismo en estudio posee la capacidad de hidrolizar la urea, formando amoníaco y dióxido de carbono por la acción de la enzima ureasa. Los resultados antes descritos, se muestran en la Figura N° 16.

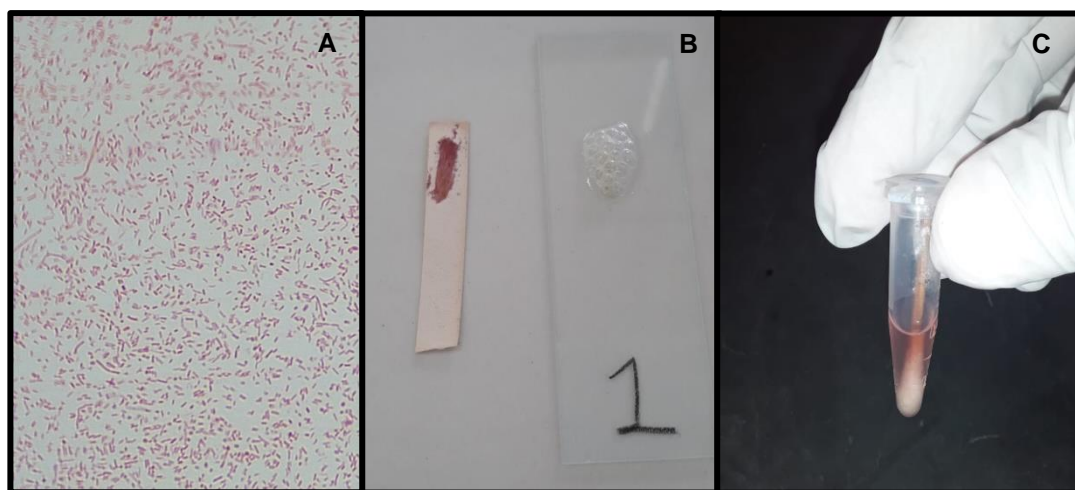


Figura N° 16. A. Tinción de Gram B. Prueba de oxidasa y catalasa positiva C. Prueba de ureasa positiva.

5.3 Reacción en cadena de la polimerasa

El primer gen que se amplificó fue el RNA 16s esperando una amplificación de 110 pb, utilizando un gel de agarosa con catorce pozos. La figura N° 17 muestra los productos de amplificación de PCR de la región del RNA 16s de las cepas aisladas de agua de riego. Se observó una banda a 110 pb en cada muestra, lo que confirma la presencia de *Helicobacter pylori*. La secuencia de este gen es específica para cada especie, por lo que nos permitió utilizarlo como herramienta estandarizada de identificación filogenética bacteriana.

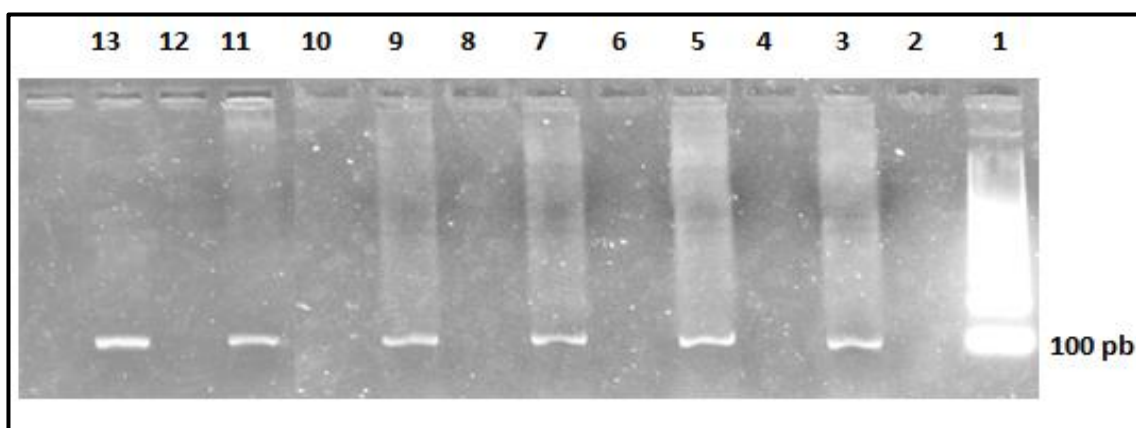


Figura N° 17. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RTA-04; carril 7: RTA-05; carril 9: RRT-03; carril11: RRT-04; carril 13: RRT-05. Banda correspondiente al gen RNA 16S de 110 pb.

El segundo gen amplificado fue el *vacA m1A*, donde se esperaba una amplificación de 290 pb. La figura N° 18 muestra los productos de amplificación de PCR del gen de las cepas aisladas de agua de riego, mediante la aparición de una banda a 290 pb en cada muestra. Aunque este gen está presente en todas las cepas de *Helicobacter pylori*, se logró identificar en las cepas aisladas que son portadoras del alelo m1, el cual se asocia con un mayor daño al tejido gástrico.

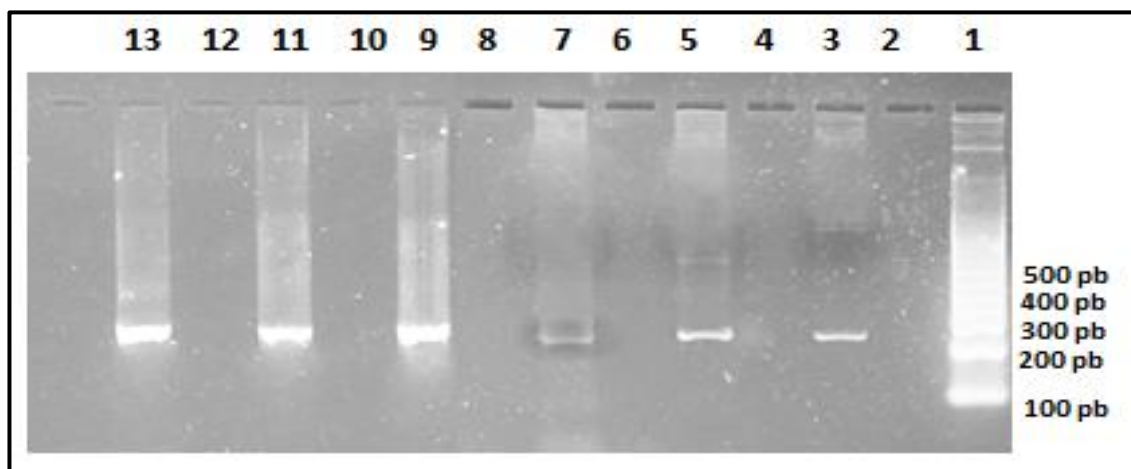


Figura N° 18. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RTA-04; carril 7: RTA-05; carril 9: RRT-03; carril 11: RRT-04; carril 13: RRT-05. Banda correspondiente al gen *vacA* de 290 pb.

El tercer gen amplificado fue el *cagA*, donde se buscaba una amplificación de 300 pb. En este estudio, el 100% (5 de 5) de las muestras positivas para *Helicobacter pylori* presentaron los 3 genes en cada una de las cepas aisladas. El gen *cagA* codifica la proteína con el mismo nombre, que confiere características patógenas a las cepas que lo contienen. Fidson J. (2018), en su investigación realizada en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización en la ciudad de Bogotá menciona que las cepas *cagA+* se asocian con mayor inducción de interleukina 8 (IL-8) en el epitelio y mayor riesgo de producir úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer. La presencia de cepas *cagA+* en muestras clínicas se asocia con síntomas relacionados con gastritis severa, reflujo gatroesofágico, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico.

La figura N° 19 y 20 muestra los productos de amplificación de PCR del gen de las cepas aisladas de agua de riego, mediante la aparición de una banda a 300 pb en cada muestra. Confirmando que las cepas aisladas son portadoras de un gen que confiere una mayor patogenicidad en una eventual infección en el ser humano.

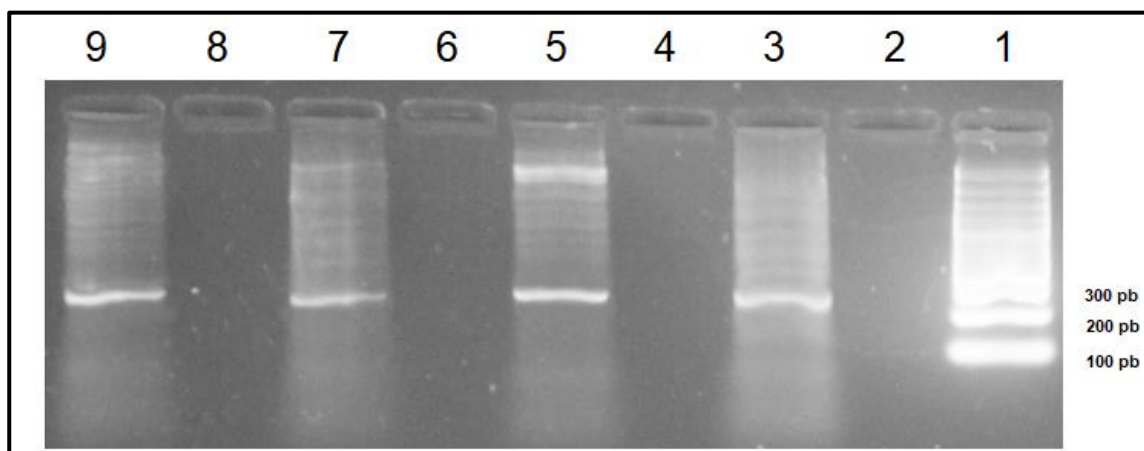


Figura N° 19. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RRT-03; carril 7: RRT-04; carril 9: RRT-05. Banda correspondiente al gen *cagA* de 300 pb.

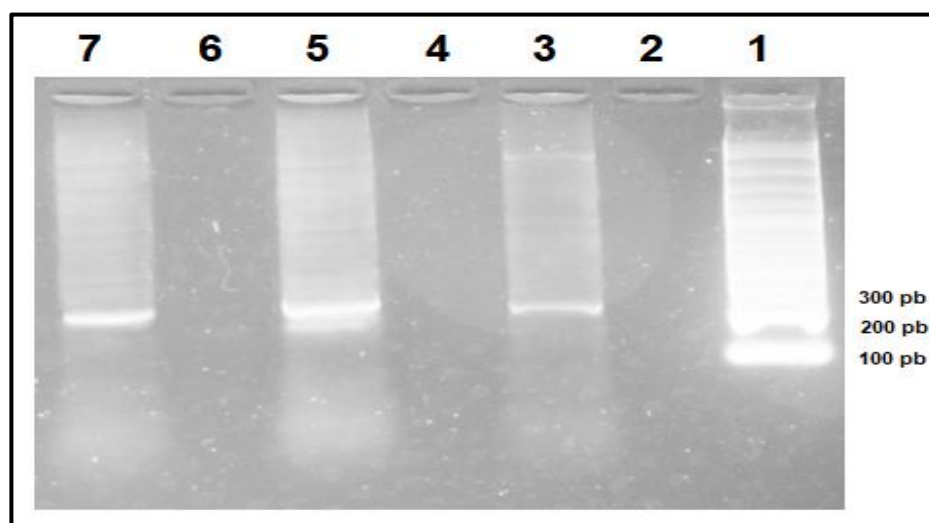


Figura N° 20. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RTA-04; carril 7: RTA-05. Banda correspondiente al gen *cagA* de 300 pb.

Las bandas a 500 pb y 900 pb de los geles donde se corrió el DNA amplificado de los genes *vacA* y *cagA* respectivamente, no se tomaron en cuenta para los resultados. Se pueden considerar variar concentraciones de componentes del que favorecen la hibridación del gen deseado en el master mix como el Buffer $MgCl_2$ y tener condiciones mas estrictas para obtener un gel sin bandas inespecíficas.

Los resultados obtenidos nos permiten confirmar la presencia de *Helicobacter pylori* mediante la amplificación del gen RNA 16S, el cual se utilizó como marcador de identificación genotípica. Sin embargo, la amplificación de los genes *vacA* y *cagA* nos permite reportar la presencia de unas cepas con potencial efecto cancerígeno. Si bien es cierto, el agua de riego no es de consumo humano, existe el riesgo que se convierta en una vía de transmisión indirecta al ser humano, ya que puede contaminar los productos cosechados en la zona (chile dulce, tomate, pepino, repollo, berenjena, ayote, güisquil, limón, maracuyá, pipián, chipilín, mora) y que son altamente comercializados y consumidos.

La secuencia de los primers utilizados para cada gen en estudio resultaron tener una especificidad del 100%, ya que se obtuvieron amplificaciones de cada uno en todas las cepas aisladas.

5.4 Perfil de resistencia antimicrobiana

Los subcultivos obtenidos se utilizaron para realizar un antibiograma utilizando los siguientes antibióticos: Claritromicina, Amoxicilina, Metronidazol y Levofloxacina. La figura N° 21 muestra los halos obtenidos en una placa con agar Muller Hinton con 7% de sangre de carnero desfibrinada.



Figura N° 21. Halos de inhibición obtenidos con los antibióticos de prueba.

Los resultados indican que el 100% de las muestras de los aislados de *Helicobacter pylori* son sensibles a Claritromicina, ya que se obtuvieron halos entre 34 – 37 mm, muy por encima del rango de referencia del CLSI y Levofloxacin con halos de 32 – 33 mm. Por otra parte, el 80% de los aislados presento resistencia a Amoxicilina y el 20% sensibilidad a dicho antibiótico, ya que solamente el halo de un aislado supero los 25 mm de diámetro. No obstante, con metronidazol no se observaron halos de inhibición en el ensayo, lo que indica que no presenta actividad antibacteriana sobre la cepa de *Helicobacter pylori* aisladas de las diferentes muestras de agua de riego. (Ver cuadro N° 3).

Al analizar los resultados, se observa en el 80% de las muestras una disminución de tamaño de los halos de amoxicilina a medida aumenta el tamaño de los halos de claritromicina, esto puede traducirse como un efecto antagonista, sin embargo, no se observó traslape o imbricación de halos en ninguna placa, por lo que descartamos esta teoría, por lo que, se sugiere en próximas investigaciones trabajar dos o tres discos por placa.

Álvarez A. *et al* (2009), evaluaron la resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia y concluyeron que de las 88 cepas estudiadas ninguna fue resistente a tetraciclina y amoxicilina, 2.2% (2/88) fueron resistentes a claritromicina y 88% (68/88) fueron resistentes a metronidazol.

Pereyra L. *et al* (2017) evaluaron la sensibilidad a los antimicrobianos de 30 aislamientos de *Helicobacter pylori* aislados de biopsias gástricas mediante los métodos de difusión por discos y tiras de E-test. Los antimicrobianos evaluados fueron amoxicilina, claritromicina, metronidazol y ciprofloxacina. No se encontraron cepas resistentes a amoxicilina, el 17% (5/30) fueron resistentes a claritromicina, el 20% (6/30) a ciprofloxacina por ambos métodos, y el 37% (11/30) a metronidazol por E-test. No pudo determinarse una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de lesión histológica y el patrón de resistencia encontrado.

Otero W. *et al* (2018), en su investigación sobre los aspectos básicos del tratamiento de *Helicobacter pylori*, menciona que ocasionalmente este microorganismo es resistente a amoxicilina, tetraciclina, furazolidona y rifabutina (3,6,20-22). La resistencia a esos antibióticos es de 0-2%, menor a 1%, <3% y 0,6 a 1,3% respectivamente. En este trabajo el 80% (4 de 5) de los aislados evaluados fueron resistentes a amoxicilina, esto puede asociarse al uso desmedido que hoy en día se hace de este antibiótico ya sea por automedicación, por ser primera elección de tratamiento en diversas enfermedades y por ser de venta libre (sin receta médica) en nuestro país.

Según la United European Gastroenterology, la resistencia a la Claritromicina, uno de los antimicrobianos más establecidos utilizados para erradicar *Helicobacter pylori*, había aumentado del 9,9% en 1998 al 21,6% en 2018, y también se observaron aumentos en la resistencia a la Levofloxacina y el Metronidazol.

Cuadro N° 3. Halos de inhibición con los antibióticos de prueba sobre *Helicobacter pylori*.

Antibiótico de prueba	Halo de inhibición promedio (mm)				
	RTA-04	RTA-05	RRT-03	RRT-04	RRT-05
Amoxicilina	26.59	20.79	21.03	21.93	18.54
Claritromicina	34.83	36.14	37.17	35.81	35.05
Metronidazol	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Sin halo	Sin halo
Levofloxacina	33.66	33.36	33.74	32.78	32.37

Los hallazgos experimentales presentados en este estudio indican la posibilidad de detectar *Helicobacter pylori* en su morfología viable y cultivable en agua de riego proveniente de ríos contaminados, esto sugiere que este reservorio podría ser una vía secundaria de transmisión en nuestro país, además que esta evidencia proporciona información para prevenir más infecciones y tratar adecuadamente este vehículo (agua) para reducir el número de casos nuevos especialmente en las edades tempranas del ser humano que es donde se reporta mayor probabilidad de adquirir esta bacteria patógena.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La información que se presenta en este estudio sienta un precedente sobre la presencia de *Helicobacter pylori*, ya que se encontró en el 20% de las muestras de agua de riego estudiadas del distrito de riego del sub-comité El Astillero.
2. Se confirmó la ausencia de *Helicobacter pylori* en agua potable de la zona, sin embargo, esto no garantiza que el agua no contenga otros microorganismos patógenos que se utilizan como indicadores de contaminación fecal.
3. Al analizar el total de las muestras de agua de riego, se logró aislar *Helicobacter pylori* en los 2 puntos muestreados del río Talnique probablemente porque funcionan como abrevaderos para el ganado y destino final de desechos de grandes empresas y de los habitantes de la zona.
4. El uso de técnicas moleculares como la PCR de punto final permitieron la identificación de *Helicobacter pylori* portador de genes *vacA* y *cagA* los cuales pueden potencialmente estimular el crecimiento de tumores malignos a nivel estomacal con el tiempo de la infección de este patógeno.
5. Basados en los criterios del CSLI el perfil de resistencia a antimicrobianos obtenidos de las muestras de agua de riego positiva y confirmada por PCR, mostraron sensibilidad a Claritromicina, sensibilidad intermedia a Levofloxacina y resistencia a Amoxicilina y Metronidazol.
6. Un factor que pudo interferir con tener un mayor número de muestras positivas en agua de riego es que *Helicobacter pylori* adopta una forma cocoide cuando no se encuentra en su hábitat natural, lo cual al tener esta morfología traduce que se encuentra en un estado viable pero no cultivable.

7. La presencia de *Helicobacter pylori* portador de genes *vacA* y *cagA* en agua de riego supone un alto riesgo para los cultivos cosechados en la zona, pudiendo convertir los alimentos en vía de transmisión directa al ser humano.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Concientizar mediante campañas informativas a los habitantes de las comunidades aledañas sobre el daño potencial que se puede ocasionar al seguir contaminando los ríos utilizados para el riego de sembradíos.
2. Implementar a través de la directiva de AREZA un sistema de tratamiento de aguas de riego previo a su utilización para evitar la contaminación de los cultivos con patógenos como *Helicobacter pylori*.
3. Presentar a las autoridades gubernamentales competentes (Ministerio de Agricultura y Ganadería en conjunto al MINSAL) los resultados de esta investigación con la finalidad que destinen fondos para continuar con la investigación sobre la detección de *Helicobacter pylori* en los cultivos cosechados en el distrito de riego del sub-comité El Astillero.
4. Disminuir el periodo de limpieza de seis a tres meses de los canales que distribuyen el agua de riego para contrarrestar el riesgo de contaminación de los cultivos, no solo por *Helicobacter pylori*, sino por cualquier otro microorganismo potencialmente patógeno.
5. Solicitar al Ministerio de Salud y a ANDA un estudio complementario de agua potable, ya que no se investigaron microorganismos indicadores de contaminación del agua de consumo humano.
6. Utilizar en futuras investigaciones que den continuidad a esta línea técnicas de procesamiento de muestras alternativas, como moleculares de mayor sensibilidad (RT-PCR) que permiten una mayor recuperación y detección del microorganismo en estudio.

CAPITULO VIII
FUENTES CONSULTADAS

FUENTES CONSULTADAS

1. Acosta, R. C., (2011). Detección de *Helicobacter pylori* a través del método de ELISA, ureasa rápida e histología en pacientes con síntomas de gastritis que consultan el servicio de gastroenterología del Hospital Nacional San Juan de Dios de San Miguel durante el mes de julio a agosto de 2010. San Miguel: Universidad de El Salvador.
2. Álvarez, A., (2009). Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. Revista Médica de Chile.
3. Atherton, J., Cao, P., Peek, R., Tummuru, M., Blaser, M. y Cover, T., (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. J Biol Chem. Tennessee: USA.
4. Azevedo, N. F., Guimarães, N., Figueiredo, C., Keevil, C. W. y Vieira, M. J., (2007). A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: Role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. Crit Rev Microbiol. Braga: Portugal.
5. Bernal, S. y Cadavid, T., (2013). Estrategias de cultivo de *Helicobacter pylori* en aguas residuales. Colombia.
6. Bertoli, M. T., (2012). El genoma de la cepa salvadoreña de *Helicobacter pylori* ELS37. El Salvador: Ciencia en El Salvador.
<http://cienciaenelsalvador.blogspot.com/2012/07/el-genoma-de-la-cepasalvadorena-de.html>.

7. Brook, G. F., Butel, D. S. y Morse, S. A., (2005). Microbiología de Jawetz, Melnick y Adelbe. Distrito Federal: McGrawHill.
8. Bunn, J. E., MacKay, W. G., Thomas, J. E., Reid, D. C. y Weaver, L.T., (2002). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. Cambridge.
9. Centeno, F. A., Jiménez, Y. Z. y Ventura C. V., (2014). Determinación cualitativa de antígenos de *Helicobacter pylori* en heces de pacientes con sintomatología sugestiva a gastritis que asisten a la consulta externa de la unidad comunitaria de salud familiar San Francisco Gotera, departamento de Morazán, en el período de abril a junio de 2014. San Miguel.
10. Cromeyer, M., (2017). *Helicobacter pylori*, un huésped problemático. San Salvador: Centro de Gastroenterología.
<http://clnicasaluddigestiva.com/pacientes/Helicobacter-pylori-un-huesped-problematico.html>
11. Coyle, M. B., (2007). Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Washington: Universidad de Washington.
12. Cuervo, C.M., Gaviria, A. M., (2017). Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua y biopelícula de los grifos de las instituciones educativas oficiales en la ciudad de Medellín. Colombia: Acta Médica Colombiana.
13. Espinoza, M., (2012). Detección molecular de *Helicobacter pylori* en agua y alimentos. Nuevo Leon. Universidad Autónoma de Nuevo Leon. México.
14. Fochesatto, N., Guayan, V. y Moran, E., (2004). *Helicobacter pylori* y Enfermedades Gastroduodenales, Bases para el Diagnóstico y

tratamiento. Revista de postgrado de la VI Cátedra de medicina 2004; 1 (138): 11-17.

15. Fujimura, S., Kato, S., Kawamura, T., (2004). *Helicobacter pylori* in Japanese river water and its prevalence in Japanese children. Japan: Letters in applied microbiology. 38. 517-21.
16. Garza, R. U., Silva, S. J. y Martínez, R E., (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. Mexico: Salud pública Méx. 51(3): p. s439-s446.
17. Granados, G. C., (2012). Determinación de antígenos en muestras fecales y de anticuerpos en sangre contra *Helicobacter pylori* en pacientes con sintomatología sugestiva a gastritis que asisten a la consulta general de la 90 Clínica Integral de Atención Familiar AmeriCares, en la ciudad de Santiago de María, Usulután, periodo de agosto a octubre de 2012. San Miguel.
18. Guillen, M. E., Jiménez, P. E., y Miranda K. L., (2014). Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en personal asistencial del Hogar Padre Vito Guarato y su relación con la aplicación de medidas de bioseguridad. La Libertad.
19. Jurado, M. E., (2007). Determinación de anticuerpos contra *Helicobacter pylori* en la población docente y estudiantil que presenten sintomatología sugestiva a gastritis en el Departamento de Medicina, Facultad Multidisciplinaria Oriental de la Universidad de El Salvador, durante el periodo de julio a septiembre de 2006. San Miguel: Universidad de El Salvador; 101 p.

20. Kivi, M. y Tindberg, Y., (2006). *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair? Department of Clinical Microbiology, Microbiology and Tumor Biology Center (MTC), Karolinska Institutet. Estocolmo: Scandinavian Journal of Infectious Diseases.
21. Lera, O. I., (2009). Métodos diagnósticos de la infección por *Helicobacter pylori* en Huesca. Universidad de Zaragoza: Huesca.
22. López, C. E., (2016) ¿Qué es la PCR? Madrid: Diario Médico. Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz.
23. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K., Buckley, D. y Stahl, D., (2004). Brock. Biología de los microorganismos. Madrid: Pearson, Prentice-Hall.
24. Martínez, A., González, C., Kawaguchi, F., Montoya, R., Corvalán, A., Madariaga, J., Roa, J., García, A., Salgado, F., Solar, H., y Palma, M. (2001). *Helicobacter pylori*: análisis de *cagA* y genotipificación de *vacA* en Chile. Detección de una cepa s2/m1. Revista médica de Chile, 129 (10), 1147-1153.
25. Mégraud, F., y Broutet, N., (2000). Have we found the source of *Helicobacter pylori*? Francia: Laboratoire de Bactériologie, Université Victor Segalen.
26. Organización Mundial de Gastroenterología, (2010). *Helicobacter pylori* en los países de desarrollo.
27. Otero, W., et al (2018). *Helicobacter pylori*: ¿cómo se trata en el 2018? Revista de Gastroenterología del Perú.

28. Palomino, C. C., y Tomé, B. E., (2012). *Helicobacter pylori*: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. Caracas: Anales Venezolanos de Nutrición. Volumen 25. Número 2.
29. Pajares, G. J., (2006). Descubrimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* y su impacto en las enfermedades gastroduodenales: Premio Nobel 2005, merecido, aunque retrasado. Madrid: Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. ISSN-e 1697-4271, Nº. 41.
30. Pereyra, L., *et al* (2017). Sensibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Helicobacter pylori* aislados de lesiones gástricas. Revista Argentina de Microbiología. Volumen 49.
31. Ramy, K. A., Mohammed, M. K. y Radwa, R. S., (2015). Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection. Cairo: Journal of Advanced Research.
32. Reza, R., Faham, K., Nematollah, J., (2016). *Helicobacter pylori* in bottled mineral water: genotyping and antimicrobial resistance properties. Iran: BMC Microbiology.
33. Rivas, T. F., Hernández, y F., (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. México: Revista Biomédica. Publicación del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi". Universidad Autónoma de Yucatán. Volumen 11.
34. Roque, S. F., (2015) "*Helicobacter pylori*, hoy". Una historia de 30 años. Santiago: Universidad del Desarrollo/Clinica Alemana Facultad de Medicina. Chile. Vol. 26. Número 5.

35. Santiago, C. P., (2016). Transmisión de *Helicobacter pylori* a través del agua: estudio de la presencia del patógeno e identificación de formas viables mediante técnicas moleculares. España: Universidad Politécnica de Valencia.
36. Schryver, A., Winckel, M. V., Cornelis, K., Moens, G., Devlies, G., y Backer G., (2006). *Helicobacter pylori* infection: further evidence for the role of feco-oral transmission. *Helicobacter*, 11(6), 523–528.
37. Serrano, C. L., (2010). Cultivos Hospederos de Biotipos de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae), en el Distrito de Riego del Valle de Zapotitán, El Salvador, C. A. San Salvador: Universidad de El Salvador.
38. Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. México. Vol. 2, Núm. 2 Mayo - Agosto 2013 pp 70-78.
39. Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleishmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbuch, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalk, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, M., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, I. D., Fujii, C., Bwoman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M., Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. U.S.A. *Nature*; 388:539–547.
40. Torres, V. F., García, M. A. y Zárata, O. A., (2012). *Helicobacter pylori*. México: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2008/ene_01_ponencia.html

41. Vallejos M, C., Cerda A, O., Valenzuela V, M. y Toledo A, H. (2003). *Resistencia antimicrobiana en Helicobacter pylori: aspectos clínicos y moleculares*. Revista médica de Chile, 131(11), 1313-1320
42. Vaira, D., Holton, J., Ricci, C, Menegatti, M., Gatta, L., Berardi, S., Tampieri, A., Miglioli, M. (2001) Review article: the transmission of *Helicobacter pylori* from stomach to stomach. Inglaterra.
43. Van Duynhoven, Y. T., & de Jonge, R., (2001). Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food? Bulletin of the World Health Organization, 79(5), 455–460.
44. Xiaohui B., Chuanwu X., & Jianfeng W. (2016) Survival of *Helicobacter pylori* in the wastewater treatment process and the receiving river in Michigan, USA. Journal of water and health.

CAPITULO IX
ANEXOS

ANEXO N° 1



A



B



C

Figura N° 1. A: Río Talnique, perteneciente a la Zona 3 de Zapotitán. B: Desembocadura de la tubería que alimenta al canal principal. C: Canal de distribución RN-4, ubicado en el sub-comité El Astillero.

ANEXO N° 2

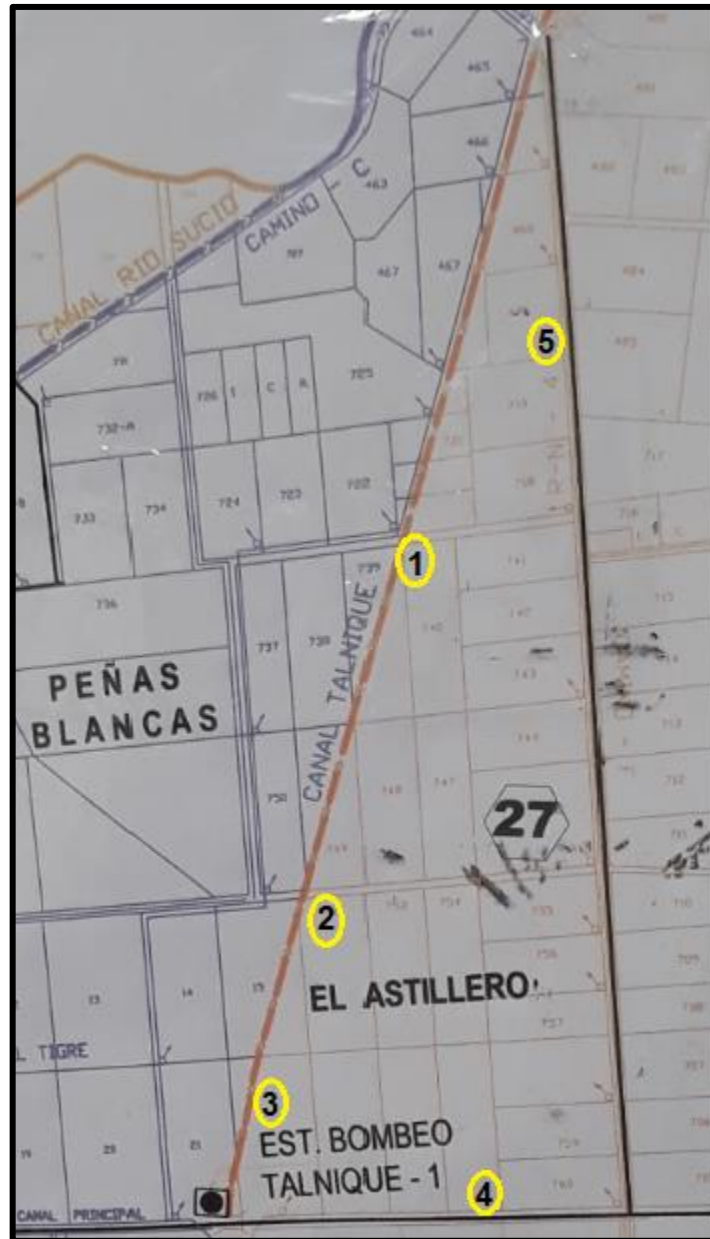


Figura N° 2. Mapa de puntos de muestreo en el sub-comité El Astillero. 1. Río Talnique. 2. Represa del río Talnique. 3. Pila de estación de bombeo. 4. Canal Principal. 5. Canal de distribución RN-4.

ANEXO N° 3

FICHA DE RECOLECCION DE MUESTRAS DE AGUA EN EL DISTRITO DE RIEGO DE ZAPOTITAN			
AGUA POTABLE	<input type="checkbox"/>	AGUA DE RIEGO	<input type="checkbox"/>
CORRELATIVO			
FECHA		HORA	
LUGAR DE MUESTREO			
DESCRIPCION DE LA MUESTRA			
OBSERVACIONES			
RESPONSABLE			

Figura N° 3. Ficha de recolección de muestras de agua en el Distrito de Riego de Zapotitán

ANEXO N° 4

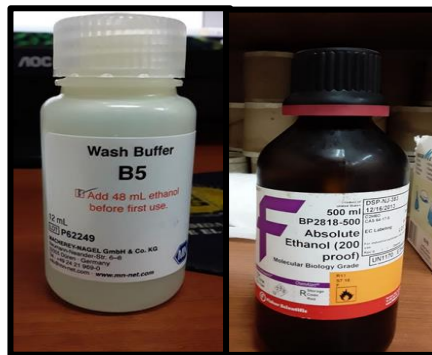


Figura N° 4. Muestreo de agua de riego de los puntos seleccionados

ANEXO N° 5



A



B

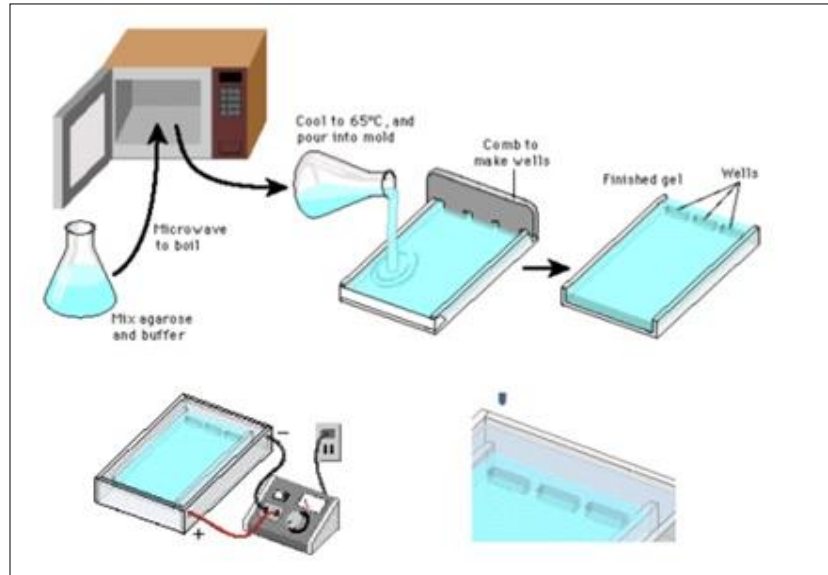


C

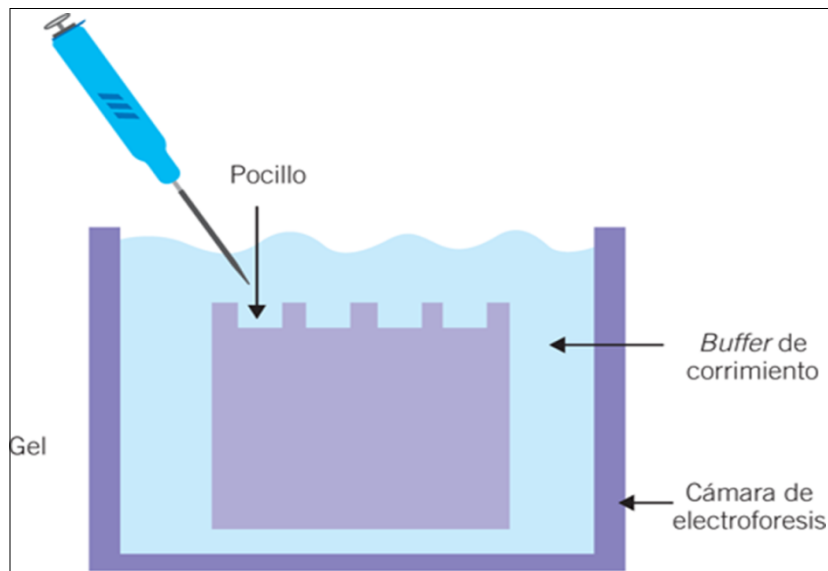
D

Figura N° 5. A. Reconstitución de Proteinasas K con buffer para Proteinasas K. B. Mezcla de B5 con etanol grado molecular. C. Mezcla de colonias bacterianas con Proteinasas K y B5 D. Incubación en baño maría a 56 °C.

ANEXO N° 6



A



B

Figura N° 6. **A:** Preparación del gel de agarosa para electroforesis con sus respectivos pozos. **B:** Depósito del mix en los pozos del gel de agarosa.

ANEXO N° 7

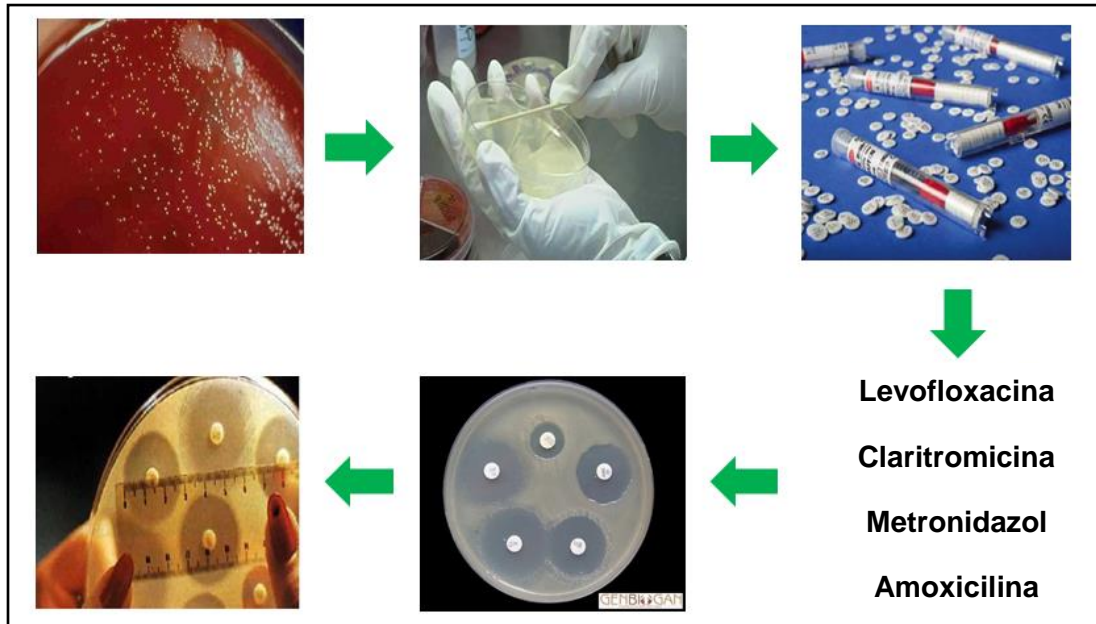


Figura N° 7. Pasos para la evaluación de la resistencia a antimicrobianos mediante la técnica de Kirby Bauer (Antibiograma).