

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

### El agua como ruta de transmisión de *Helicobacter Pylori*.

Ceballos Toro Valeria, Quintero María del Mar<sup>1</sup>, Álvarez Aldana Adalucy<sup>2</sup>  
Siller López Fernando<sup>3</sup>

#### Resumen

*Helicobacter pylori* es un bacilo móvil Gram negativo cuya morfología es espiral. Se considera catalasa, oxidasa y ureasa positiva. Es una bacteria de distribución mundial cuya prevalencia varía de acuerdo a las características epidemiológicas de la población. Las rutas de transmisión descritas son: oral-oral, gastro-oral y fecal-oral; aunque también se ha descrito su transmisión a través de alimentos, animales y agua. Para la realización del siguiente artículo de revisión se ejecutó una búsqueda en las bases de datos PubMed y Science Direct utilizando los términos *Helicobacter pylori*, water, detection methods, VBNC y cocoid form. Obteniendo como resultado que existe una alta prevalencia de esta bacteria en países en vía de desarrollo que cuentan con condiciones deficientes de saneamiento, por lo que el agua se convierte en uno de los canales por el cual viaja la bacteria, se mantiene con vida, llega al estómago del ser humano y lo coloniza. *H. pylori* sobrevive en agua gracias a varios mecanismos como es su cambio a forma cocoide (VBNC), su capacidad para formar biofilms y de asociarse con amebas de vida libre. Debido a su presencia en forma viable pero no cultivable es difícil de detectar en las muestras de agua, por lo que es necesaria la utilización de métodos moleculares como PCR, FISH y LAMP, sin

embargo, estas técnicas deben mejorarse para poder detectar la viabilidad de las células para que sean métodos 100% efectivos, lo cual beneficiará la salud pública.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, agua, detección, riesgo sanitario.

#### Abstract

*Helicobacter pylori* is a Gram negative mobile bacillus. Its morphology is spiral and is considered catalase, oxidase and urease positive. It is a bacterium of worldwide distribution whose prevalence varies according to geographical distribution, ethnicity, race, socioeconomic factors, hygiene and sanitation. There are several distribution routes but the best known are oral-oral, gastro-oral and fecal-oral; it has also been described that the bacteria can be transmitted through food, animals and water. For the realization of the following review article, a search was made in the databases PubMed, PubMed Central and Science Direct using the terms *Helicobacter pylori*, water, detection methods, VBNC y cocoid form. Obtaining as a result that there is a high prevalence of this bacterium in developing countries that have poor sanitation conditions, so that water becomes one of the channels through which the bacteria travels, stays alive, arrives to the stomach of the human being and colonizes it. *H.*

- 1 Programa de Microbiología. Universidad Libre Pereira. Semillero Microorganismos de importancia en salud humana y animal "OBVIO MICROBIO"
- 2 Profesora investigadora. Programa de Microbiología. Grupo de investigación MICROBIOTEC. Universidad Libre Seccional Pereira. Líder Semillero "OBVIO MICROBIO"
- 3 Programa de Microbiología. Universidad Libre Pereira. Líder Semillero Microbiología Molecular "MICROMOL" fernando.siller@unilibre.edu.co

*pylori* survives in water thanks to several mechanisms such as its change to coccoid form (VBNC), its ability to form biofilms and to associate with free-living amoebas. Due to its presence in a viable but not cultivable way, it is difficult to detect in water samples, so it is necessary to use molecular methods such as PCR, FISH and LAMP, however, these techniques must be improved in order to detect the viability of the cells to be 100% effective methods, which will benefit public health.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, water, detection, health risk

### Introducción

*Helicobacter pylori* es un bacilo móvil Gram negativo, microaerófilo, su morfología típica es en espiral de aproximadamente 3.5 x 0.5 µm. Bioquímicamente es ureasa(1), oxidasa y catalasa positivo; se encuentra colonizando el estómago de aproximadamente la mitad de la población mundial y es la causa de gastritis, úlceras pépticas, cáncer gástrico y linfoma de células B2. *H. pylori* fue la primera especie bacteriana probada para causar cáncer y está clasificado como un carcinógeno del grupo I por el Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC)(3). Es una bacteria de distribución mundial cuya prevalencia varía de acuerdo a la distribución geográfica, etnia, raza, factores socioeconómicos, de higiene y saneamiento. La infección puede presentarse a cualquier edad pero se presenta con mayor frecuencia en edades tempranas, donde puede permanecer asintomática o hacerse sintomática en la adultez; no produce inmunidad de memoria y suele darse la reinfección(4, 5).

Las rutas de transmisión de *H. pylori* aún son poco conocidas pero las más aceptadas son las vías oral-oral, gastro-oral y fecal-oral; aunque también se

ha descrito que la bacteria puede ser transmitida a través de alimentos, animales y agua (6). Hace algunos años pocas investigaciones implicaban el agua como vehículo de transmisión de *H. pylori*, pero hoy en día hay suficiente evidencia de la presencia de esta bacteria en el agua a nivel mundial, por lo que se puede implicar al agua tratada y no tratada como posible vehículo de transmisión(7). La hipótesis de que el agua es una vía de transmisión de *H. pylori* está respaldada por dos tipos de estudios; los epidemiológicos que han demostrado una mayor prevalencia de la infección en países en vía de desarrollo que padecen problemas relacionados con la distribución sanitaria del agua a la población y los estudios que han detectado o aislado *H. pylori* de diversas fuentes de agua (8, 9). Por este motivo, son varios los estudios que se han centrado en determinar el potencial del agua como fuente de transmisión de *H. pylori* y su capacidad de producir la infección clínica (10).

La presente revisión tiene como objetivo compilar la información actual con relación a la presencia de *Helicobacter pylori* en aguas; las metodologías de detección y su cambio morfológico de forma espiral a forma cocoide en el agua así como su patogenicidad al encontrarse en este estado.

### Metodología

Se realizó una búsqueda amplia y sistemática de la literatura en las bases de datos PubMed y Science Direct utilizando los términos *Helicobacter pylori*, water, detection methods, VBNC y coccoid form, para lo cual se empleó el conector booleano AND. La búsqueda arrojó como resultado 797 y 12.614 artículos respectivamente, de los cuales 136 y 3.360 correspondían a trabajos no mayores a 5 años de publicación, el

cual fue un criterio de aceptación, ya que se restringió la bibliografía a artículos originales publicados en los últimos 5 años y algunos artículos de revisión. Se seleccionaron artículos sobre los métodos de detección de *H. pylori* en agua, sobre el cambio de forma espiral a forma cocoide (viable no cultivable) que sufre la bacteria en el agua y en general sobre evidencias del agua como mecanismo de transmisión de la bacteria *H. pylori*.

### **Resultados y Discusión**

La primera asociación entre el agua y la infección por *H. pylori* fue sugerida en Perú en 1991 cuando se observó que los niños peruanos que consumían agua no tratada tenían mayor prevalencia de *H. pylori* (9, 11) y aun hoy en día Perú tiene una prevalencia estimada del 45,5%; encontrándose en agua potable la mayor cantidad de la bacteria, equivalente a  $1.6 \times 10^6$  copias del genoma/L. Un estudio publicado en este año arrojó que el agua potable en Lima está contaminada con *H. pylori* el 20.3% del tiempo, resultando positivas 49 de 241 muestras (13).

Diferentes estudios han mostrado la prevalencia de esta bacteria en países en vía de desarrollo, esto relacionado con las circunstancias socioeconómicas y la calidad de vida llevan a la falta de acceso a agua potable de calidad, a un saneamiento adecuado, a medidas higiénicas estrictas y a una buena atención en salud, permitiendo estas situaciones que el agua contaminada sea uno de los canales por el cual viaja la bacteria, se mantiene con vida, llega al estómago del ser humano y lo coloniza (6, 13, 14).

En las poblaciones del Norte de Europa y América del Norte, alrededor de un tercio de los adultos se encuentran infectados por la bacteria, mientras que en Europa del Sur y Este, América del Sur y Asia,

la prevalencia de *H. pylori* a menudo es superior al 50%, siendo estos últimos países en desarrollo que aun cuentan con servicios de saneamiento deficientes (15).

En este punto aparece otro posible factor detrás de las diferencias geográficas y económicas en la incidencia de la infección y son las fuentes mejoradas que permiten el acceso al agua de estas poblaciones, las cuales consisten en métodos artesanales que aplican las personas que no tienen suministro continuo de agua, como lo son el agua entubada en el hogar, pozos de sondeo, manantiales de arenas de cavado bien protegidos, agua de lluvia y fuentes de agua públicas o externas, las cuales pueden llegar a ser fuentes directas de *H. pylori* como arroyos y aguas superficiales contaminadas por contaminación fecal, industrial y doméstica (16, 17, 18).

*H. pylori* ha sido detectada en varias fuentes de agua, incluyendo lagos, ríos, agua del grifo, agua de pozo, aguas de riego, agua de mar, agua mineral, agua de unidades dentales, agua potable y sus sistemas de distribución como lo han demostrado diferentes estudios realizados en Colombia, Perú, Estados Unidos, España, Costa Rica, Irán, Pakistán, entre otros (19).

Aunque algunos estudios han encontrado que el agua clorada carece de la bacteria, se dice que arrojaron esta conclusión debido a que se basaron en la falta de recuperación utilizando métodos de cultivo estándar, ya que muchos otros autores han demostrado que *H. pylori* es capaz de resistir y tolerar las prácticas de desinfección normalmente empleadas en el tratamiento del agua potable (20, 21). Se dice que el cambio de morfología permite a las células evadir el tratamiento con cloro del agua utilizada para el consumo humano (22).

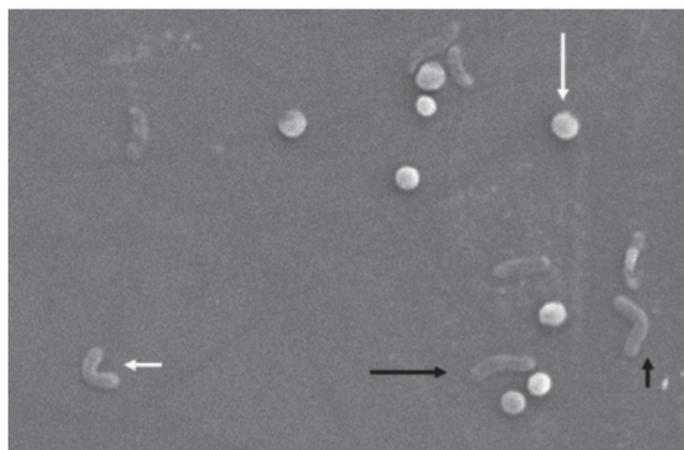
En un estudio realizado en España se expuso el patógeno a una concentración de 0.96 mg/L de cloro libre durante varios tiempos control, observando que *H. pylori* perdía su capacidad de crecimiento sobre medios de cultivo pasados 5 minutos. Sin embargo, mediante las técnicas moleculares FISH y PCR observó que un porcentaje elevado de las células pasaban a forma viable no cultivable, demostrando así que la bacteria puede sobrevivir a concentraciones elevadas de cloro libre y que los tratamientos de desinfección en aguas potables podrían ser ineficientes para la eliminación de éste patógeno de las redes de distribución (23).

Aunque varios estudios epidemiológicos proponen el agua como un intermediario en la transmisión fecal-oral de *H. pylori* (20); se ha encontrado que la detección de esta bacteria en muestras de agua no siempre se correlaciona con la presencia de bacterias fecales indicadoras (*E. coli* o *Enterococcus*). Es más, se ha demostrado que *H. pylori* es más resistente a la cloración que *E. coli*. Lo cual puede constituir un grave problema de salud pública, ya que a menudo se intenta predecir la seguridad

de los cuerpos de agua en función de los niveles de bacterias indicadoras fecales cuando el agua tratada no está necesariamente exenta de *H. pylori* (24, 25).

Aparte de ser resistente al cloro, *H. pylori* es resistente al ozono (19) y a la radiación UV como tratamiento terciario, hecho que pudo deberse al alto caudal de agua tratado en el estudio, el cual no permitió una penetración total de la radiación ultravioleta durante un tiempo suficiente, o bien que el sistema de radiación UV no se encontraba en buenas condiciones de mantenimiento (23).

Se han descrito algunos mecanismos que le permiten sobrevivir a *Helicobacter pylori* en un ambiente adverso para ella como es el agua. Entre ellos encontramos la conversión a su forma cocoide (forma viable no cultivable) (Fig 1), su capacidad para adherirse a diferentes materiales y agregarse junto con otras bacterias para formar estructuras complejas en tuberías u otras superficies en contacto con agua (biopelículas) y también para sobrevivir dentro de amebas de vida libre (FLA).



**Figura 1.** Cambios morfológicos en *Helicobacter pylori*. Forma espiral (flecha negra larga), forma V (flecha negra corta), forma U (flecha blanca corta) y forma cocoide o viable no cultivable (flecha blanca larga) (26).

### **Forma Viable No Cultivable - Vbnc**

Muchas especies de bacterias entran en el estado viable no cultivable (VBNC) cuando están expuestas a condiciones estresantes como inanición, bajas temperaturas y en general condiciones ambientales desfavorables, siendo esta una estrategia de adaptación para la supervivencia a largo plazo. A diferencia de las células normales que son cultivables en medios adecuados y se convierten en colonias, las células VBNC son células vivas que pierden su capacidad de crecer en medios de cultivo en los que normalmente crecen. A pesar de esto, las células VBNC no se consideran células muertas debido a que tienen una membrana intacta que contiene la información genética en perfecto estado, además de ser metabólicamente activas (27).

La capacidad de ingresar al estado VBNC puede ser ventajosa para la bacteria, pero representa un riesgo para la salud humana ya que bajo los métodos convencionales de cultivo no es posible su detección, por lo que si en una muestra todas o algunas bacterias se encuentran en estado VBNC, la cantidad total de bacterias viables será subestimada o no se detectará (28) y tratándose de un patógeno humano, podrá infectar a la persona que consuma el agua en la cual no pudo ser detectado.

Se ha demostrado la viabilidad y la capacidad de cultivo de *H. pylori* en agua hasta por 75 horas a 10 °C. Así mismo se determinó que el total de células no disminuía por períodos mucho más largos de tiempo en condiciones adecuadas (2 años a 4 °C) (29).

Varios estudios han señalado que los cambios en la morfología de *H. pylori* están estrechamente asociada a los genes implicados en la síntesis de peptidoglucano. En primer lugar, ocurre

la división de los enlaces peptídicos por acción de Csd1, Csd2 y Csd3. Luego, los enlaces intrapéptidos también se escinden por acción secuencial de Csd3, de una DL-carboxipeptidasa desconocida y Csd4, que permite una relajación inicial del peptidoglucano en la zona de torsión, perdiendo la forma helicoidal. A continuación, los monómeros que han sido sometidos a la acción enzimática, son reconocidos por diferentes transglicosilasas líticas, como Slt y MltD, que se eliminan para la posterior inserción de nuevos monómeros. Finalmente, la inserción de nuevos monómeros en el peptidoglucano y la elongación, se realiza mediante PBP1, PBP2 y proteínas de membrana (MreC). Esto aumenta la longitud de las cadenas de glucanos y los enlaces cruzados (30).

La forma espiral se ha asociado con la capacidad de moverse en un medio viscoso, como el moco gástrico. Esto significa que la forma helicoidal puede ser innecesaria en ambientes acuáticos y también puede implicar un costo energético innecesario para la bacteria (30), siendo este otro posible motivo que justifique el cambio de forma.

Por mucho tiempo se consideró que muchos de los problemas que se han encontrado en la recuperación de formas viables de *H. pylori* en el agua, se debe a que estas pasan a formas cocoides o VBNC. Desde un punto de vista más amplio, ahora se acepta que lo que ocurre es que estas bacterias no se logran cultivar bajo métodos rutinarios y convencionales de laboratorio (29) sino que son necesarios métodos de detección molecular.

### **Formación de Biopelículas**

La formación de biopelículas en el ambiente ha sido propuesto como una estrategia de *H. pylori* para sobrevivir en

los sistemas de distribución de agua (22).

Las biopelículas son comunidades microbianas embebidas dentro de una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie viva o inerte; son sólidas y presentan canales por donde fluyen el agua y los nutrientes a las zonas más profundas. Los primeros análisis de la producción de biofilm por parte de bacterias, como *H. pylori*, se llevaron, mediante estudios de microscopía electrónica, observando formas espirales, cocoides y degenerativas. La formación de la biopelícula conlleva un proceso de cinco fases: 1) Adsorción reversible de la bacteria a la superficie; 2) Unión irreversible a la superficie; 3) Fase inicial de maduración con crecimiento y desarrollo microbiano; 4) Producción del exopolímero y, 5) Desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras (31).

Cuando *H. pylori* se adhiere a una superficie, comienza la activación del *quorum sensing* así como los mecanismos de formación de los biofilms. Se ha trabajado con biofilms en sistemas de tuberías y tanques de almacenamiento y algunos autores creen que así es como *H. pylori* puede ser viable en el agua (25) debido a que al ubicarse en la parte interna de estos tanques y tuberías, las hace bastante inaccesibles y difícil de alcanzar por los desinfectantes (32).

En Colombia se evaluó la presencia de *H. pylori* en muestras de agua y biopelículas de los grifos de instituciones educativas oficiales de la ciudad de Medellín a través de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) directa convencional, identificando la bacteria por cultivo en 11.2% y PCR en 2.1% de las muestras (7). En este caso, el cultivo tuvo mejor rendimiento que la PCR probablemente porque los componentes de las

biopelículas actuaron como inhibidores de la PCR, por los genes utilizados para la amplificación o por la técnica de procesamiento de muestras (7).

La capacidad de *H. pylori* para crecer y formar biopelículas in vitro e in vivo podría ser una ventaja para la especie para evitar lesiones causadas por factores estresantes químicos, como la terapia antimicrobiana in vivo, o el estrés inducido por la privación de nutrientes en el medio ambiente (22).

La presencia de las biopelículas de *H. pylori* en agua se ha verificado mediante PCR, sondas de ADN e hibridación fluorescente in situ (FISH). Así mismo, se ha presentado evidencia in vitro que sugiere que las interacciones con bacterias específicas (por ejemplo, *Mycobacterium chelonae*) dentro de una biopelícula de múltiples especies puede contribuir a la viabilidad de *H. pylori* (33).

Es necesario tener en cuenta que aunque una población disponga de aguas municipales potables y de grifos adecuados, la calidad del agua de la potabilización no es la misma en todas partes, además el estado del acueducto como daños previos que exponen al agua potable a contaminación con materia fecal, la antigüedad del acueducto y la presencia de biopelículas en las tuberías, deben estudiarse como factores predictores de contaminación del agua (7).

#### **Asociación con amebas de vida libre (FLA)**

Se ha demostrado previamente que las amebas de vida libre (FLA), como *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vermamoeba* o *Balamuthia*, pueden actuar como huéspedes de algunos patógenos bacterianos capaces de resistir la digestión amebiana (bacterias resistentes a amebas,

ARB). Dentro de ellas, las bacterias sobreviven y son más resistentes a las condiciones ambientales que normalmente las matarían. Por lo tanto, FLA actúa como «caballo de Troya» para ARB, permitiendo la supervivencia bacteriana y/o la transmisión a susceptibles hospedadores (34, 35).

Recientemente, un estudio in vitro ha indicado que *H. pylori* puede sobrevivir dentro de *Acanthamoeba castellanii* después de resistir un tratamiento de desinfección por cloración. FLA proporciona refugio para *H. pylori*, lo que le permite sobrevivir bajo diferentes tratamientos y hacer posible su transmisión a humanos. El análisis de qPCR de las muestras mostró la presencia de ADN de *H. pylori* intracelular en 28 (50,9%) de las muestras de aguas residuales y en 11 (91,7%) de las muestras de agua potable. Así mismo, se indicó que no se pudieron recuperar colonias por cultivo de las muestras de FLA positivas, debido a que la bacteria podría haber adquirido su estado VBNC, ya que mediante DVC-FISH se observó su viabilidad después del tratamiento con hipoclorito (34, 36).

### **Virulencia de las formas cocoides de *H. pylori***

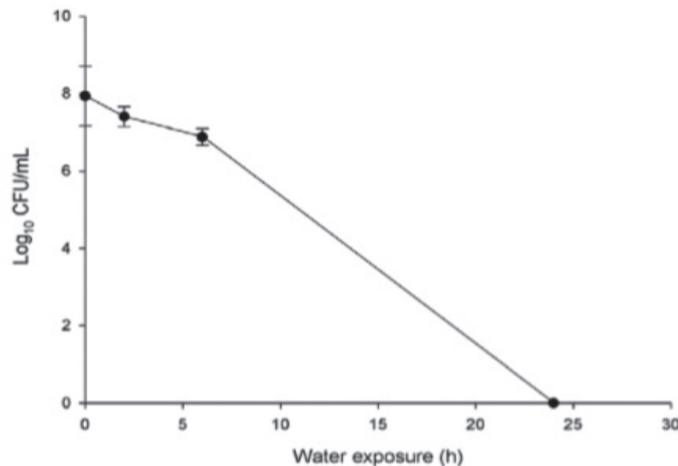
Para determinar si *H. pylori* representaba un riesgo significativo para la salud pública, era necesario realizar una evaluación cuantitativa del riesgo microbiano (QMRA), la cual fue realizada por Ryan et al., quienes sugirieron un nivel máximo del contaminante en agua potable de un organismo por litro (<1 organismo/L). Igualmente se determinó la mediana de *H. pylori* en agua potable para el rango anual de riesgo de infección en  $6.84 \times 10^{-02}/L$  para humanos (37).

Históricamente el cambio en la morfología (de bacilo espiral a cocoide) ha planteado

dudas sobre si *H. pylori* es realmente viable e infeccioso en el agua, sin embargo se han realizado pocos estudios al respecto en humanos, pero si se ha demostrado la viabilidad infecciosa de esta forma de *H. pylori* en ratones, tanto a través de agua como de sonda nasogástrica (38).

En el estudio realizado por Boehnke, se suministraron a ratones SS1 concentraciones estáticas variables de *H. pylori* en agua de:  $1.29 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  UFC/L, estableciendo como concentración mínima infecciosa de *H. pylori* en agua para esta cepa de ratones  $10^6$  UFC/L. Además, se sugirió que la dosis infecciosa en humanos puede ser menor que para los ratones porque *H. pylori* no es un habitante normal del ratón (39), coincidiendo con los resultados de la QMRA mencionada previamente y con otros estudios que establecieron la dosis infectante estimada para el ser humano en 104 - 1010 UFC/L (11, 38).

Por otra parte, Guimarães et al, realizaron un estudio que pretendía evaluar el efecto de la exposición al agua en varios mecanismos de *H. pylori* que inducen una respuesta en las células del huésped, para lo cual se utilizó la línea celular epitelial gástrica humana AGS y se obtuvieron importantes resultados, como que después de 24h de exposición al agua *H. pylori* pierde su capacidad de cultivo (Fig 2) al cambiar su morfología a forma cocoide la cual es viable pero no cultivable; así como la capacidad de inducir la producción de IL-8 por las células AGS; su adhesión a las células se ve disminuida en un 40% y se limita la influencia de la bacteria sobre la apoptosis de la célula huésped (40). Sin embargo, es importante aclarar que en otros estudios, la bacteria ha perdido su capacidad de cultivo a las 48 h e incluso a las 72 h (30).



**Figura 2.** Efecto de la exposición al agua en la capacidad de cultivo de *Helicobacter pylori*. Después de la exposición al agua, la suspensión bacteriana fue sembrada en placas con agar tripticosa soya y se incubó por 7 días a 37°C en condiciones de microaerofilia. Las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron contadas para evaluar la capacidad de cultivo (40).

Aquellas cepas que modulan su habilidad para adherirse a diversas células in vitro también manipulan su habilidad para causar infección in vivo en modelos animales, mediando diversas matrices y adhesinas bacterianas (29).

En dos estudios realizados en Irán, los genotipos más comúnmente detectados entre los aislamientos de *H. pylori* en agua potable fueron *vacAs1a* (83.3%), *vacAm1a* (66.6%), *vacAs2* (50%) y *cagA* (50%)<sup>8</sup>, y en agua mineral embotellada fueron *vacAs1a* (100%), *vacAm1a* (87.5%), *cagA* (62.5%) e *iceA1* (62.5%) (41), lo cual indica que en muestras de agua, *H. pylori* en su forma cocoide conserva una serie de factores de virulencia encargados de la colonización e invasión de la mucosa gástrica, demostrando que estas células no cultivables son formas infecciosas (42).

Además de expresar los genes anteriores, la forma cocoide mantiene detectable los

niveles de ureasa, continúa la síntesis de proteínas (menos del 1% de la cantidad de proteínas sintetizadas por la forma bacilar), aunque en pequeñas cantidades y produce pequeñas cantidades de DNA (26, 32).

Igualmente se ha indicado que la forma espiral coexiste con células mucosas inalteradas o con daños diversos, mientras que la cocoide está estrechamente asociada con las células mucosas gástricas gravemente dañadas. La forma espiral está asociada con la gastritis activa crónica y la forma cocoide se asocia con mayor frecuencia a la gastritis crónica inactiva en pacientes adultos sintomáticos. La forma espiral induce una mayor expresión de proteínas proapoptóticas (*Fos*, *Gadd45a* y *Myc*), mientras que la cocoide induce una mayor proteína antiapoptótica (*survivina*), la cual se relaciona frecuentemente con el desarrollo de cáncer, lo que sugiere que la forma cocoide puede desempeñar

un papel en la carcinogénesis gástrica, además se encontró que la abundancia de la proteína inductora del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) aumenta en la forma cocoide (43), sugiriendo que lo que sugiere que la forma viable no cultivable de *H. pylori* encontrada en agua puede ser más virulento que la espiral y contribuir a la patogénesis grave como es el cáncer gástrico.

En el tejido gástrico, las formas cocoides (VBNC) pueden permanecer latentes durante mucho tiempo y retener los factores de virulencia, por lo que también pueden ayudar a los fracasos del tratamiento y la recurrencia de la infección y de las enfermedades gastroduodenales (26). La recurrencia de la infección es posible debido a la ocurrencia de recombinación genética con otras cepas de *H. pylori* que podrían estar presentes en el mismo huésped, lo que da como resultado una mayor diversificación genética la cual puede ayudar a la bacteria a adaptarse a un nuevo huésped después de la transmisión (40).

Así como existen múltiples estudios que demuestran la presencia y la capacidad infectiva de *H. pylori* en agua; en otro estudio realizado por Boehnke et al con la cepa de ratones SS1 y *H. pylori*, ninguno de ellos mostró signos de infección, lo cual puede ser explicado debido a que la variabilidad genética de las cepas de *H. pylori* es amplia, por lo que es posible que algunas cepas carezcan de la capacidad de persistir en el agua y por el contrario se transmitan únicamente a través de otras rutas, como las vías de persona a persona o vía fecal-oral (44).

### **Métodos de detección**

Uno de los principales problemas para aceptar el agua como posible reservorio de *H. pylori* es la incapacidad de aislar

rutinariamente la especie de las muestras de agua mediante técnicas convencionales de cultivo microbiológico. Por lo tanto, la aplicación de métodos moleculares para la detección rápida, sensible y específica de *H. pylori* en entornos acuáticos es de suma importancia.

Usualmente cuando se logra cultivar *H. pylori* a partir de muestras ambientales como el agua, no es posible aislarse completamente debido al crecimiento de la microbiota competitiva en un agar selectivo, demostrando que los medios de cultivo actualmente disponible no son lo necesariamente útiles para el aislamiento de las bacterias del medio ambiente en especial *H. pylori*. Cuando muestras de la presunta colonias se analizan, células Gram-negativas exhiben una morfología típica de la bacteria pero se mezclan con otros bacilares que no son *H. pylori* (45). Para favorecer la eliminación de esta microbiota competitiva se han desarrollado técnicas alternativas como son la separación inmunomagnética (IMS) y el tratamiento ácido (23).

El principal desafío cuando se realiza un muestreo ambiental es la incapacidad de demostrar la existencia de *H. pylori* viable en el agua, que potencialmente puede colonizar el estómago o el duodeno porque los métodos moleculares utilizados para detectar las bacterias en el medio ambiente son incapaces de distinguir entre bacterias muertas; sin embargo, han surgido técnicas como la DVC-FISH (Hibridación fluorescente in situ en combinación con la incubación de conteo viable directo) que permite la detección específica de células viables y tiene la ventaja de no ser inactivado por inhibidores de muestras, así como la implementación del agente intercalante PMA a la técnica qPCR (10). Esta última sigue siendo un desafío, ya que solo

demuestra la integridad de la membrana y puede conducir a una sobreestimación de la población de bacterias viables en algunas condiciones de inactivación (42).

La prueba de qPCR para *H. pylori* presenta por sí sola varias ventajas: no se basa en el cultivo; muchas muestras pueden analizarse rápidamente (hasta 384 muestras en 2 h); se eliminan muchas de las fuentes de error humano del proceso de análisis y disminuye el potencial de contaminación(46). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la mayoría de los resultados positivos de qPCR podrían deberse al ADN de células no viables, por lo que este método no es adecuado para determinar el potencial infeccioso de una muestra (10).

Por su parte, la PCR convencional es el método más utilizado hasta el momento, siendo más sensible y específico, pero tiene algunas limitaciones, como numerosos ciclos térmicos, costoso termociclador y un método de identificación y manifestación del producto lento y difícil (2).

Cuando se utiliza la PCR como método de detección, es necesario realizar un tratamiento previo o enriquecimiento que aumente la sensibilidad de la prueba mejorando así las tasas de detección debido a que existen inhibidores de la enzima Taq polimerasa presentes en el agua (por ejemplo, en las aguas residuales los ácidos húmicos) que pueden producir resultados falsos negativos (45).

La viabilidad de *H. pylori* en muestras de agua puede evaluarse mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR), y ensayos de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA). La prueba IFA utiliza anticuerpos específicos que permiten la enumeración de células tanto cultivables como no cultivables y las formas espiral y cocoide,

pero no puede detectar genes marcadores de virulencia como *cagA* lo cual no lo hace muy útil al momento de querer confirmar la presencia de *H. pylori* a través de estos genes de virulencia (47).

Además de las anteriores técnicas, existen otras como la amplificación isotérmica medida por bucle (LAMP por sus siglas en inglés) que es un mecanismo más rápido y fácil. Esta técnica es una reacción de amplificación de una etapa, que puede producir una gran cantidad de copias en menos de una hora en condiciones isotermas. La ventaja más importante de este método es que no necesita desnaturalización del ADN (2). Además, se puede realizar sin un termociclador y los resultados pueden observarse a simple vista (46). También se utiliza la citometría de flujo, la cual es una técnica analítica que tiene el potencial de hacer una distinción entre los cuatro estados fisiológicos de las bacterias: reproductivamente viable, metabólicamente activa, intacta y permeabilizada. Puede determinar las proporciones de los estados VBNC y VC y las células muertas, en función de la integridad de la membrana de la bacteria (46).

Es importante resaltar que la transmisión por agua también ha sido sugerida para otras especies de *Helicobacter* como *H. mustelae*, *H. muridarum*, *H. felis*, *H. canadensis*, *H. pullorum*, *H. canis* y *H. ceterorum*. Utilizando para su detección la técnica PCR rRNA 16S y 23S, descubriendo que el uso de 16S era más específico para los resultados esperados (48).

Para la detección molecular se han utilizado diversos genes como *ureC* (32) que se ha demostrado que es único y esencial para el crecimiento de *H. pylori* 21 rRNA 16S (cebadores Hp1, Hp2 y Hp3)49,

glmM (25), ureA, cagA, vacA (19), iceA, oipA, cagE and baba2 (41).

A medida que los instrumentos para la secuenciación de ADN se vuelven más extendidos y convenientemente portátiles, y mientras que el costo de la secuenciación continúe disminuyendo, la metagenómica probablemente se convertirá en la tecnología principal utilizada en microbiología ambiental y ecología microbiana para la detección de *H. pylori* y otras bacterias en muestras ambientales(46). No obstante, por el momento sigue siendo necesario adaptar algunos los métodos moleculares para detectar la viabilidad de *H. pylori* en los suministros de agua (50).

### Referencias bibliográficas

1. Matsumoto H, Shiotani A, Nishibayashi H, Kamada T, Kimura T, Fujimura Y, et al. Molecular Detection of *H. pylori* Using Adherent Gastric Mucous to Biopsy Forceps. *Helicobacter* 2016 21(6): 548-553.
2. Chamanrokh P, Shahhosseiny MH, Assadi MM, Nejadshattari T, Esmaili D. Three Tests Used to Identify Non-Culturable Form of *Helicobacter pylori* in Water Sample. *Jundishapur J Microbiol.* 2015 April [cited 2018 May 23]; 8(4): e16811. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4449853/>
3. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(36): 12781–12808.
4. De Pardo Ghatti EM. *Helicobacter Pylori*: un problema actual. *Gac Med Bol.* 2013; 36(2): 108-111.
5. Suárez Rivera JJ, Almaguer Betancourt YM, Martínez Garrido R. Comportamiento higiénico-sanitario de pacientes con diagnóstico de úlcera gastroduodenal por *Helicobacter pylori*. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 2013; 29(3): 328-335.
6. Breckan RK, Paulssen EJ, Asfeldt AM, Kvamme JM, Straume B, Florholmen J. The All-Age Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection and Potential Transmission Routes. A Population-Based Study. *Helicobacter.* 2016; 21(6): 586-595.
7. Cuervo CM, Gaviria AM. Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua y biopelícula de los grifos de las instituciones educativas oficiales en la ciudad de Medellín. *Acta Med Colomb.* 2017; 42(2): 121-128.
8. Ranjbar R, Khamesipour F, Jonaidi-Jafari N, Rahimi E. *Helicobacter pylori* isolated from Iranian drinking water: vacA, cagA, iceA, oipA and babA2 genotype status and antimicrobial resistance properties. *FEBS Open Bio.* 2016; 6(5): 433-41.
9. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J Adv Res.* 2015; 6(4), 539–547.
10. Santiago P, Moreno Y, Ferrús MA. Identification of Viable *Helicobacter pylori* in Drinking Water Supplies by Cultural and Molecular Techniques. *Helicobacter.* 2015; 20(4): 252-9.
11. Otero R W. *Helicobacter pylori* en agua potable ¿Es la ruta de la infección? *Acta Med Colomb.* 2017; 42(2): 87-89.
12. Boehnke KF, Brewster RK, Sánchez BN, Valdivieso M, Bussalleu A, Guevara M. et al. An assessment of drinking water contamination with *Helicobacter pylori* in Lima, Peru. *Helicobacter.* 2018; 23(2): e12462.
13. Duarte Pastor LD. Análisis de la problemática de salud ambiental

- provocada por *Helicobacter pylori* presente en fuentes hídricas contaminadas. [Tesis de Especialización]. Bogotá: Universidad Militar Nueva Granada; 2017.
14. Mentis A, Lehours P, Mégraud F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2015; 20(1): 1-7.
  15. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*. 2014; 19(1): 1-5.
  16. Eichelberger L, Murphy G, Etemadi A, Abnet CC, Islami F, Shakeri R, et al. Risk of Gastric Cancer by Water Source: Evidence from the Golestan Case-Control Study. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0128491.
  17. Porras C, Nodora J, Sexton R, Ferreccio C, Jimenez S, Dominguez RL, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). *Cancer Causes Control*. 2013; 24(2): 209–15.
  18. Baingana RK, Kiboko Enyaru J, Davidsson L. *Helicobacter pylori* infection in pregnant women in four districts of Uganda: role of geographic location, education and water sources. *BMC Public Health*. 2014; 14: 915.
  19. Castillo Canón AP. Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de *Helicobacter pylori* en aguas de consumo. [Tesis de Maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
  20. Bayona Rojas MA, Gutiérrez Escobar AJ. *Helicobacter Pylori*: Vías de transmisión. *Medicina*. 2017; 39(3), 210-220.
  21. El-Sharouny E, El-Shazli H, Olama Z. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Some Egyptian Water Systems and Its Incidence of Transmission to Individuals. *Iran J Public Health*. 2015; 44(2): 203–210.
  22. García A, Salas Jara MJ, Herrera C, González C. Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(19): 5632-5638.
  23. Cuellar P. Transmisión de *Helicobacter pylori* a través del agua: estudio de la presencia del patógeno e identificación de formas viables mediante técnicas moleculares. [Tesis Doctoral]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2016.
  24. Holman CB, Bachoon DS, Otero E, Ramsuhag A. Detection of *Helicobacter pylori* in the coastal waters of Georgia, Puerto Rico and Trinidad. *Mar Pollut Bull* 2014; 79(1-2): 354-8.
  25. Montero Campos V, Hernández Soto A, Camacho Sandoval J. Culture and Molecular Identification of *Helicobacter pylori* in Drinking Water from Areas of High and Low Incidence of Gastric Cancer in Costa Rica. *Open Journal of Medical Microbiology*. 2014; 4(4): 261-269.
  26. Sarema M, Corti R. Role of *Helicobacter pylori* coccoid forms in infection and recrudescence. *Gastroenterol Hepatol*. 2016; 39(1): 28-35.
  27. Laam L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2014; 5: 258.
  28. Mali S, Vrushi L, Hili N. The impact of drinking water on the prevalence of *H. pylori* in humans in Elbasan, Albania. *Eur Water*. 2017; 58: 263-266.
  29. Monsalve LA. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en el agua de consumo humano de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico *Helicobacter pylori* positivo en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas 2015 – 2016. [Tesis de Pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.

30. Fernandes RM, Silva H, Oliveira R, Almeida C, Azevedo NF, Vieira MJ. Morphological transition of *Helicobacter pylori* adapted to water. *Future Microbiol.* 2017; 12:1167-1179.
31. Bayona Rojas MA, Gutiérrez Escobar AJ. Biopelícula: un mecanismo de supervivencia de *Helicobacter pylori*. *Rev U.D.C.A Act & Div Cient.* 2013; 16(2): 335-342.
32. Bahrami A, Rahimi E. Detection of *Helicobacter pylori* in City Water, Dental Units Water, and Bottled Mineral Water in Isfahan, Iran. *Scientific World Journal.* 2013; 280510.
33. Hathroubi S, Servetas SL, Windham I, Merrell DS, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2018; 82(2) pii: e00001-18.
34. Moreno-Mesonero L, Moreno Y, Alonso JL, Ferrús MA. Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain. *Environ Microbiol.* 2017; 19(10): 4103-4112.
35. Amirhooshang A, Ramin A, Ehsan A, Mansour R, Shahram B. High frequency of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Kermanshah, Iran, during June–November 2012. *J Water Health.* 2014; 12(3): 504-512.
36. Bai X, Xi C, Wu J. Survival of *Helicobacter pylori* in the wastewater treatment process and the receiving river in Michigan, USA. *J Water Health.* 2016; 14(4): 692-8.
37. Ryan M, Hamilton K, Hamilton M, Haas CN. Evaluating the Potential for a *Helicobacter pylori* Drinking Water Guideline. *Risk Anal.* 2014; 34(9): 1651-62.
38. Valdivieso M, Bussalleu A, Sexton R, Boehnke K, Osorio S, Novoa I, et al. Clinical, Epidemiologic, and Genomic Studies (SWOG S1119) of *Helicobacter Pylori* in Lima, Peru: Role of Contaminated Water. *J Cancerol.* 2016; 3: 52-63.
39. Boehnke KF, Eaton KA, Valdivieso M, Baker LH, Xi C. Animal Model Reveals Potential Waterborne Transmission of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter.* 2015; 20(5): 326-33.
40. Guimarães Nuno M, Azevedo Nuno F, Vieira Maria J, Figueiredo Ceu. Water-induced modulation of *Helicobacter pylori* virulence properties. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014; 109(4): 414-419.
41. Ranjbar R, Khamesipour F, Jonaidi-Jafari N, Rahimi E. *Helicobacter pylori* in bottled mineral water: genotyping and antimicrobial resistance properties. *BMC Microbiol.* 2016; 16: 40.
42. Vesga FJ, Moreno Y, Ferrús MA, Campos C, Trespalacios AA. Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants in Bogotá, Colombia, using cultural and molecular techniques. *Int J Hyg Environ Health.* 2018; 221(4): 595-601.
43. Loke MF, Ng CG, Vilashni Y, Lim J, Ho B. Understanding the dimorphic lifestyles of human gastric pathogen *Helicobacter pylori* using the SWATH-based proteomics approach. *Sci Rep.* 2016; 6: 26784.
44. Boehnke KF, Eaton KA, Fontaine C, Brewster R, Wu J, Eisenberg JNS, et al. Reduced infectivity of waterborne viable but nonculturable *Helicobacter pylori* strain SS1 in mice. *Helicobacter.* 2017; 22(4): e12391.
45. Moreno Y, Ferrús MA. Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter.* 2012; 17(5): 327-32.
46. Assadi MM, Chamanrokh P, Whitehouse CA, Huq A. Methods for Detecting the Environmental Coccid

- Form of *Helicobacter pylori*. Front Public Health . 2015; 3: 147.
47. Chomvarin C, Wongboot W, Tirapattanun A, Kanthawong S, Wongwajana S, Tongpim S, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in Aquatic Environments and Drinking Waters in Northeastern Thailand. Chiang Mai J Sci. 2017; 44(3): 731-741.
48. Cunachi AM, Fernández M, Delgado P, Suárez M. Detection of *Helicobacter* DNA in different water source and penguin feces from Greenwich, Deed and Barrientos Islands Antarctica. Polar Bio. 2016; 39(9): 1539-1546.
49. Flores-Encarnación M, Meza-de la Rosa JL, Aguilar-Gutiérrez GR, et al. Presence of *Helicobacter pylori* into municipal water in common use. Bas Res J Med Clin Sci. 2015; 4(6): 180-185.
50. Khan A, Farooqui A, Kazmi SU. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water of Karachi, Pakistan. J Infect Dev Ctries. 2011; 6(3): 251-5.