

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de
agua de consumo humano, naturales y residuales
de la ciudad de Ayacucho, 2015-2016.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

Presentado por la:

Bach. SAYRITUPAC CHIHUÁN, Sheyla

Ayacucho-Perú

2016

*A mis queridos padres Andrea
y José Luis, y mi hermano
Luis con quienes compartimos
alegrías y vivencias.*

AGRADECIMIENTOS

A la Tricentenaria Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, cuna del saber.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología y a todos los docentes por sus valiosas enseñanzas y sabios conocimientos que imparten siempre, contribuyendo con el desarrollo del pueblo.

Al Dr. Blgo. Saúl Alonso Chuchón Martínez, asesor del presente trabajo de investigación por sus consejos y acertados aportes teórico-prácticos que permitieron el desarrollo de esta tesis.

A la Blga. Ruth Huamán De la Cruz por su apoyo incondicional y por sus consejos que permitieron el desarrollo de la investigación.

Al Blgo. Rilder Gastelú Quispe por su apoyo en cada proceso realizado en la investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Agua	4
2.2.1 Características del agua	4
2.2.2 Clasificación del agua	5
2.2.3 Importancia del agua	6
2.2.4 Importancia del agua como medio de infección	6
2.3 <i>Helicobacter pylori</i>	7
2.3.1 Historia	7
2.3.2 Biología de <i>Helicobacter pylori</i>	8
2.3.3 Microbiología, estructura y taxonomía de <i>Helicobacter pylori</i>	8
2.3.4 Factores patogénicos de <i>Helicobacter pylori</i>	10
2.3.5 Infección y transmisión de <i>Helicobacter pylori</i>	13
2.3.6 Enfermedades digestivas asociadas con <i>Helicobacter pylori</i>	14
2.3.7 Diagnóstico de la infección de <i>Helicobacter pylori</i>	15
2.4 Epidemiología	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Fase pre - analítica	25
3.2. Fase analítica	27
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Número de muestras obtenidas en los diferentes puntos de muestreo de mayo de 2015 a febrero de 2016. Ayacucho.	26
Tabla 2 Muestras de agua de los afluentes de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata” de las cuales se obtuvieron crecimiento de colonias con características culturales típicas para <i>Helicobacter pylori</i> . Ayacucho 2015-2016.	30
Tabla 3 Muestras de agua del afluente y efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá” de las cuales se obtuvieron crecimiento de colonias con características culturales típicas para <i>Helicobacter pylori</i> . Ayacucho 2015-2016.	31
Tabla 4 Muestras de agua de los ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina de las cuales se obtuvieron crecimiento de colonias con características culturales típicas para <i>Helicobacter pylori</i> . Ayacucho 2015-2016.	32
Tabla 5 Número de colonias con características culturales típicas para <i>Helicobacter pylori</i> aisladas de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”, Planta de tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”, río Alameda, río Chacco, río Huatatas y río Muyurina. Ayacucho 2015-2016.	33
Tabla 6 Resultados de la coloración Gram de las colonias con características culturales típicas de <i>Helicobacter pylori</i> de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”. Ayacucho 2015-2016.	34
Tabla 7 Resultados de la coloración Gram de las colonias con características culturales típicas <i>Helicobacter pylori</i> de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2015-2016.	35
Tabla 8 Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas procedentes de colonias con características culturales típicas de <i>Helicobacter pylori</i> en muestras obtenidas de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”. Ayacucho 2016.	36

Tabla 9	Resultados de las pruebas bioquímicas de las colonias típicas de <i>Helicobacter pylori</i> en muestras obtenidas de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2016.	37
Tabla 10	Porcentaje de número de muestras, número de colonias típicas, números de bacterias curvas Gram negativas y número de cepas <i>Helicobacter pylori</i> . Ayacucho 2015-2016.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Imagen de la tabla de la diferenciación de bacterias móviles, curvadas, Gram negativos y microaerófilas.	54
Anexo 2 Resultados de la coloración Gram de las colonias con características culturales típicas de <i>Helicobacter pylori</i> de los ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina. Ayacucho 2015-2016.	55
Anexo 3 Proceso de obtención de muestras de agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2016.	57
Anexo 4 Proceso de obtención de muestras de agua del río Muyurina. Ayacucho 2016.	58
Anexo 5 Proceso de obtención de muestras de agua de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”. Ayacucho 2016.	59
Anexo 6 Flujograma de obtención de sangre desfibrinada de carnero.	60
Anexo 7 Flujograma de la preparación del medio de cultivo Skirrow.	61
Anexo 8 Flujograma del aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i> .	62
Anexo 9 Taper hermético acondicionado para darle condiciones microaerófilas a <i>Helicobacter pylori</i> .	63
Anexo 10 Colonias con características culturales típicas de <i>Helicobacter pylori</i> .	64
Anexo 11 Observación microscópica de <i>Helicobacter pylori</i> de la cepa PTARA3a (c) de la muestra de agua del efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2016.	65
Anexo 12 Observación microscópica de <i>Helicobacter pylori</i> de la cepa PTARE1a (c) de la muestra de agua del efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2016.	66
Anexo 13 Flujograma de la preparación del Agar Base Urea para la prueba de la ureasa.	67
Anexo 14 Resultados de la prueba de ureasa de las cepas PTARA3a (c), PTARA4a (c) y PTARE1a (c) y controles positivo (<i>Klebsiella</i> sp.) y negativo (<i>Escherichia coli</i>). Ayacucho 2016.	68

Anexo 15	Resultado de la prueba de la oxidasa de la cepa PTARA3a (c) de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2016.	69
Anexo 16	Resultado de la prueba de la catalasa de la cepa PTARA3a (c) de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2016.	70
Anexo 17	Matriz de consistencia	71

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo detectar *Helicobacter pylori* en muestras de agua. El tipo de investigación fue no experimental - descriptivo. Para el estudio se tomaron muestras de agua correspondientes a la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”, a la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá” y a los ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina de la ciudad de Ayacucho. El muestreo se realizó de manera intencional en tres puntos de cada río y dos puntos en las Plantas de Tratamiento, 16 muestras por mes. El muestreo se llevó a cabo durante 10 meses obteniéndose un total de 160 muestras (mayo 2015 – febrero 2016). El transporte de las muestras se realizó en un Cooler a temperatura ambiente, el tiempo que se tardó en llevar las muestras de agua al laboratorio fue no más de 2 horas. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, las muestras de agua se dejaron en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente para su sedimentación, al cabo del tiempo establecido se decantaron. De cada muestra obtenida se realizó el cultivo del sedimento obtenido en la decantación, con ayuda de un asa de Kolle, se tomó una asada y se sembró por la técnica de agotamiento en superficie en las placas petri conteniendo el medio Skirrow, se incubaron a 37 °C por 5 a 10 días en una cámara bajo condiciones microaerófilas, al cabo de 5 días se hizo la observación de las placas que contenían las colonias típicas: pequeñas, blancas y brillantes, luego se hizo la coloración Gram correspondiente. Se observaron las bacterias curvas Gram negativas, para identificar *Helicobacter pylori* se hicieron las pruebas bioquímicas confirmativas (ureasa, oxidasa y catalasa) las cuales fueron positivas para 1 muestra del efluente (2 cepas) y 1 muestra del afluente (1 cepa) de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Se concluye que de las 160 muestras de agua (100%) que se analizaron solo se obtuvieron tres cepas positivas de *Helicobacter pylori*, dos cepas provenientes del afluente y 1 cepa del efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”, las cuales equivalen al 1,88 % del total de cepas que eran Gram negativas y curvas.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, agua.

I. INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados en los últimos tiempos han convertido a *Helicobacter pylori* en uno de los agentes más infecciosos de mayor prevalencia en humanos, al implicarlo en la patogenia de la gastritis crónica activa, la úlcera péptica y el adenocarcinoma gástrico.¹ La infección por *Helicobacter pylori* es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en la actualidad, pudiendo afectar a cualquier estrato social, raza, sexo o grupo etario.²

A pesar de que, al igual que ocurre con otras enfermedades de tan alta prevalencia, es difícil establecer cifras exactas, se estima que la infección por *Helicobacter pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial. Esta bacteria tiene la capacidad de producir una enzima llamada ureasa que convierte la urea química en amonio, este se encarga de proteger a *Helicobacter pylori* frente al ácido que presenta el estómago, además de que la forma espiral de la bacteria permite que penetre la capa mucosa y dirigirse hacia el espacio interior que es menos ácida y así adherirse a las células epiteliales del estómago.²

A pesar de la enorme adaptación, que *Helicobacter pylori* posee para adherirse a la mucosa gástrica, resulta difícil establecer que este sea su único hábitat. Diversos estudios se han enfocado en aclarar la existencia de otros reservorios para este microorganismo. Se ha investigado *Helicobacter pylori* en animales, agua y alimentos, con el fin de establecer si estos tienen participación en la diseminación de la infección. Sin embargo, el difícil cultivo de este microorganismo a partir de muestras con altas cargas de microbiota acompañante y su conversión a un estado viable pero no cultivable afecta el conocimiento sobre el papel del agua y los alimentos en la transmisión de la infección con este patógeno.³

Se considera que el medio ambiente juega un rol preponderante en la adquisición de la infección. En el escenario de múltiples rutas, se estima que los

seres humanos se ven inmersos en una serie de intentos de *Helicobacter pylori* del ambiente por colonizar la mucosa gástrica, reconociendo que se pueden conjugar tres factores: bajo número de la bacteria, baja actividad fisiológica y posiblemente reacción y resistencia humana a la mayoría de las cepas. De forma contraria, el éxito de la bacteria en la colonización y la infección de un individuo corresponderían a la susceptibilidad natural del hospedero con cepas que expresan factores de virulencia.³ Por mucho tiempo se consideró que muchos de los problemas que se han encontrado en la recuperación de formas viables de *Helicobacter pylori* en el agua, se debe a que estas pasan a formas cocoides. 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, sin embargo se ha demostrado que formas cocoides de *Helicobacter pylori* son capaces de colonizar la mucosa gástrica y causar gastritis.

Actualmente se cuenta con evidencia para el reconocimiento del agua de consumo humano en el rol epidemiológico de *Helicobacter pylori*, advirtiéndose directamente que el consumo del agua no tratada debería considerarse un factor de riesgo para la infección en una población dada.⁴ Sin embargo pocos trabajos en el mundo dan cuenta de su hallazgo en agua y menos en agua de consumo humano de una población, es por ello que los objetivos del presente trabajo son:

OBJETIVO GENERAL

Detectar *Helicobacter pylori* en muestras de agua de consumo humano, naturales y residuales de la ciudad de Ayacucho.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar *Helicobacter pylori* en muestras de agua del afluente de la Planta Potabilizadora de Agua de la ciudad de Ayacucho.
2. Detectar *Helicobacter pylori* en muestras de agua del río Alameda, Huatatas, Muyurina y Chacco.
3. Detectar *Helicobacter pylori* en muestras de agua del afluente y efluente de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales de la ciudad de Ayacucho.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Pocos trabajos en el mundo dan cuenta de su hallazgo en agua y menos en agua de consumo humano de una población. Las primera evidencia sobre la ruta de transmisión acuática de este microorganismo a humanos fueron aportados por estudios epidemiológicos realizados en algunos países en vías de desarrollo (Perú, Colombia, Chile y Venezuela). En Lima - Perú se demostró la prevalencia de *Helicobacter pylori* en niños (48 %) y el consumo de fuentes externas de agua (drenaje comunitario). Un estudio similar desarrollado con niños en un área rural de los Andes colombianos determinó una prevalencia de *Helicobacter pylori* del 69 %, incrementando las tasas de infección con el uso de arroyos como fuente de agua potable. Otro trabajo realizado en una población chilena, encontró que la seropositividad a este patógeno fue superior a 60 % en los grupos socioeconómicos más bajos, asociada al consumo de vegetales no procesados, los cuales pudieron haber sido irrigados con aguas residuales.⁵

La frecuencia de infección de *Helicobacter pylori* es significativamente más alta durante los meses de lluvia, sugiriendo que esto podría ser debido a un aumento en la densidad bacteriana y/o cambios de formas cocoides en estado de latencia a formas bacilares en división celular. Los resultados de estos estudios indican que el agua puede ser un intermediario en la transmisión fecal – oral, actuando como reservorio en el cual la bacteria puede permanecer por periodos prolongados antes de ser ingerida como agua potable, accidentalmente por el baño o a través de alimentos contaminados.⁶

En el año 2010 se realizó una investigación en el cual se analizó un total de 122 muestras de agua de consumo de la población de 20 cantones escogidos de zonas de alta y baja incidencia de cáncer gástrico de Costa Rica, donde ya es reconocida en el mundo su alta incidencia, según información estadística del Registro Nacional de Tumores.

Se logró el cultivo e identificación molecular de *Helicobacter pylori* en el 40% de las muestras de agua de las zonas de alta incidencia de cáncer gástrico y en el 7 % de las muestras de zona de baja incidencia. La investigación mostró una comparación estadística que correlaciona la incidencia de cáncer gástrico con factores geomorfológica y fisicoquímica de los suelos donde nace el agua de consumo de las poblaciones de ambas zonas.⁷

En el año 1990, el Grupo de Fisiología Gastrointestinal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y de la Universidad Johns Hopkins comunicó que el agua de la Atarjea era una de la fuentes de contagio del *Helicobacter pylori* en la ciudad de Lima. Se demostró la presencia de ADN de esta bacteria en 24 de 48 muestras del agua de la Atarjea, tomadas en diferentes lugares de la capital.⁴

El agua tiene así un rol significativo en la transmisión de la infección por *Helicobacter pylori* en el Perú. También se ha aislado ADN del *Helicobacter pylori* en el agua para consumo humano en el Japón. Esto explica los altos porcentajes de reinfección que se observa en el Perú.⁴

El cloro inhibe el crecimiento del *Helicobacter pylori*, bacteria que es más resistente al cloro residual que la *Escherichia coli*, indicador tradicional para la calidad microbiológica del agua para consumo humano, por lo que la ausencia de unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* no descarta la presencia de *Helicobacter pylori*.⁴

2.2 Agua

2.2.1 Características del agua

Es una sustancia líquida formada por la combinación de dos moléculas de hidrógeno y una de oxígeno. Constituye el componente más abundante en la tierra llamada hidrosfera que cubre el 70 % de la superficie terrestre (97% agua salada y 3% agua dulce), con un comportamiento característico que lo hace diferente de la mayoría de los líquidos siendo a temperatura ambiental un líquido incoloro, inodoro e insípido, por tal razón es considerado como el líquido de la vida. Las moléculas de agua están constituidas por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno. El enlace entre estos átomos es covalente, cada átomo de hidrógeno tiene necesidad de compartir un electrón y el de oxígeno dos electrones. El ángulo formado entre los dos átomos de hidrógeno (H-O-H) es de 104.5°; mientras que la distancia de enlace entre el oxígeno e hidrógeno (O-H) es de 0.096 nanómetros.⁸

El agua como compuesto químico presenta propiedades que hace diferente de los demás, como:

- Es la única sustancia en estado natural que se presenta sobre la tierra bajo los tres estados al mismo tiempo.
- El agua tiene la tensión superficial más alta de todos los líquidos comunes
- Tiene una gran capacidad de cohesión y se adhiere a la mayoría de las sustancias sólidas con que entra en contacto.
- Tiene la capacidad de diluir muchas sustancias debido a su naturaleza dipolar y alta constante dieléctrica

Es la sustancia que más se aproxima a ser el solvente químico universal. Aparte de elevado calor de vaporización, densidad, etc.⁸

2.2.2 Clasificación del agua

a. Aguas superficiales

- Río:

Es una corriente natural de agua que fluye con continuidad. Posee un caudal determinado, rara vez es constante a lo largo del año, y desemboca en el mar, en un lago o en otro río, en cuyo caso se denomina afluente. La parte final de un río es su desembocadura. Algunas veces terminan en zonas desérticas donde sus aguas se pierden por infiltración y evaporación por las intensas temperaturas.

- Lago:

Es un cuerpo de agua, generalmente dulce, de una extensión considerable, que se encuentra separado del mar. El aporte de agua a todos los lagos viene de los ríos, de aguas freáticas y precipitación sobre el espejo del agua.

- Arroyo:

Es una corriente natural de agua que normalmente fluye con continuidad, pero que a diferencia de un río, tiene escaso caudal, que puede incluso desaparecer en la estación seca, verano o invierno, dependiendo de la temporada de lluvia para su existencia. En el caso de tener un caudal muy escaso y esporádico, es preferible usar el nombre de torrente o rambla.⁹

b. Aguas subterráneas

Representa una fracción importante de la masa de agua presente en los continentes, y se aloja en los acuíferos bajo la superficie de la Tierra. El volumen del agua subterránea es mucho más importante que la masa de agua retenida en lagos o circulante, y aunque menor al de los mayores glaciares, las masas más extensas pueden alcanzar millones de kilómetros cuadrados. El agua del subsuelo es un recurso importante y de este se abastece a una tercera parte de la población mundial, pero de difícil gestión, por su sensibilidad a

la contaminación y a la sobreexplotación. El agua subterránea es parte de la precipitación que se filtra a través del suelo hasta llegar al material rocoso que está saturado de agua. El agua subterránea se mueve lentamente hacia los niveles bajos, generalmente en ángulos inclinados (debido a la gravedad) y eventualmente llegan a los arroyos, los lagos y los océanos.⁹

2.2.3 Importancia del agua

Es el factor abiótico más importante de la tierra y uno de los principales constituyentes del medio en que vivimos y de la materia viva. Aproximadamente un 71 % de la superficie terrestre está cubierta por agua en estado líquido, que se distribuye por cuencas saladas y dulces, formando los océanos, mares, lagos y lagunas. El 97 % de agua está en los océanos. Se encuentra también como gas constituyendo la humedad atmosférica, las nubes y también en forma sólida como la nieve o hielo.⁹

El agua constituye lo que llamamos la hidrósfera, sin límites precisos con la atmósfera y litósfera porque se compenetra con ellos. La vida depende del agua tanto para los organismos que viven en ambientes acuáticos como para aquellos que viven en ecosistemas aeroterrestres.

El agua es el líquido más abundante de la corteza y uno de los pocos líquidos naturales. No es de extrañar entonces que el agua sea una sustancia esencial en los seres vivos. El agua es el componente más abundante en los medios orgánicos, los seres vivos contienen por término medio un 70% de agua. No todos tienen la misma cantidad, los vegetales tienen más agua que los animales y ciertos tejidos (por ejemplo: el tejido graso) contienen menos agua - tiene entre un 10% a un 20% de agua- que otros como, por ejemplo: el nervioso, con un 90% de agua.⁹

2.2.4. Importancia del agua como medio de infección

La mayor parte de las enfermedades transmitidas a través del agua son de origen intestinal. La materia fecal de huéspedes o portadores infectados puede introducirse de diversas maneras en un sistema de abastecimiento de agua o en un área de natación. La más común es por descarga directa de aguas negras, sin tratamiento, en el agua receptora. Los retretes de fosa ubicados cerca de un pozo o arroyo también pueden ser fuente de contaminación. Se ha rastreado el origen de brotes específicos de enfermedades a interconexiones entre tuberías de agua y alcantarillado, a rupturas en cañerías de acueducto, y a contaminación de sistemas de abastecimiento de agua durante inundaciones

o fallas temporales de una planta de tratamiento de aguas negras. Los organismos patógenos son incapaces de crecer en el agua, pero pueden sobrevivir en ella por varios días. Los patógenos capaces de formar esporas o quistes tienen la capacidad de existir fuera de un huésped durante un tiempo mucho más largo. Por ejemplo, las esporas de *Clostridium tetani*, el patógeno que causa la infección de tétanos, sobrevive durante años en la naturaleza.⁹

Con la progresiva demanda de recursos hidrológicos es de esperar que aumente las posibilidades de contaminación por microorganismos entéricos. Entre las bacterias que se transmite por las aguas limpias y residuales se encuentran: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* enteropático *Vibrio cholerae*, *Leptospira* y *Yersinia*. De descubrimiento reciente la familia Legionellaceae, aunque no entérica se encuentra ampliamente distribuida en el medio hídrico, y se han comunicado brotes epidémicos de neumonía asociados con el agua corriente y de transmisión por aerosoles.⁸

El análisis de aguas limpias y residuales para detectar patógenos es limitado y la prueba de coliformes no siempre es un indicador adecuado de la inocuidad microbiológica del agua. Sin embargo, el análisis de coliformes ha sido y continúa siendo una herramienta útil para valorar la calidad del agua. Otros tipos comunes de enfermedades de transmisión por agua son la hepatitis infecciosa, la amibiasis, la giardiasis y la esquistosomiasis. En muchas partes del mundo periódicamente se producen epidemias de todas estas enfermedades, pero son poco frecuentes en Estados Unidos porque la mayor parte de la población cuenta con sistemas adecuados de abastecimiento de agua y eliminación de aguas residuales.¹⁰

2.3 *Helicobacter pylori*

2.3.1 Historia

Las primeras observaciones de bacterias espirales en el estómago no son recientes. Ya que en el año 1881, Rappin pudo observar a estas bacterias en el estómago de los perros y a comienzos del siglo XX, Krienitz las describió en el estómago de pacientes con cáncer gástrico. A pesar de que algunos autores sugirieron su implicación en la inflamación gástrica como hizo Steer en 1975, el hecho de que no lograran cultivarla implicaba que no podía pasar más que de una hipótesis no demostrable.³

Ahí es donde radica la importancia del descubrimiento de Warren y Marshall. No solo es describirlas en biopsias gástricas de pacientes con gastritis y úlcera

péptica relacionándola con estas patologías sino que, y siguiendo la metodología que Skirrow utilizó para el aislamiento de *Campylobacter*, lograron cultivar la bacteria a partir de biopsias de antro gástrico, y ante la incredulidad con la que la comunidad científica acogió la noticia, decidieron demostrar los postulados de Koch, para lo cual Barry Marshall ingirió una solución con el microorganismo y padeció una gastritis aguda demostrada con datos histológicos. Por el aspecto curvo de la bacteria, sus requerimientos en el cultivo y su localización anatómica fue llamado en un principio *Campylobacter pyloridis*, nombre después corregido para adoptarlo a la forma científica correcta *Campylobacter pylori*.⁴

Pero en el año 1989 datos provenientes del estudio de la secuencia 16S ARN ribosomal llevaron a la conclusión de que se trataba de un nuevo género. Quedó entonces clasificado *Helicobacter pylori*. La bacteria fue llamada inicialmente *Campylobacter pyloridis*, después *Campylobacter pylori* (al corregirse la gramática latina) y en 1989, después de secuenciar su ADN se vio que no pertenecía al género *Campylobacter* y fue emplazada dentro del género *Helicobacter*. El nombre *pylori* viene del latín *pylorus*, que significa “guardabarrera”, y hace referencia al píloro (la apertura circular del estómago que conduce al duodeno).¹

2.3.2 Biología de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria que infecta el epitelio gástrico humano. Muchas úlceras y algunos tipos de gastritis se deben a infecciones por *Helicobacter pylori* en muchos casos los sujetos infectados nunca llegan a desarrollar ningún tipo de síntoma. Esta bacteria vive exclusivamente en el estómago humano. Es una bacteria espiral (de esta característica morfológica deriva el nombre de *Helicobacter*) y puede enrollarse literalmente por sí misma para colonizar el epitelio estomacal.¹⁰

Helicobacter pylori es considerado generalmente como un microorganismo extracelular pero en varios estudios se ha encontrado en el interior de las células epiteliales una invasión similar a la *Yersinia enterocolitica* lo que sugiere que un mecanismo invasivo puede ser el responsable del daño a las células y la ulceración péptica.¹¹

2.3.3 Microbiología, estructura y taxonomía de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa de forma espiral, de alrededor de 3 micrómetros de largo y con un diámetro aproximado de 0,5 micrómetros. Tiene de 4-6 flagelos. Es microaerófila, es decir, requiere oxígeno pero a bajas

concentraciones de las encontradas en la atmósfera. Es oxidasa y catalasa positiva. Con su flagelo y su forma espiral la bacteria perfora literalmente la capa de *mucus* del estómago, y después puede quedarse suspendida en la mucosa gástrica o adherirse a las células epiteliales.

Helicobacter pylori produce adhesinas, las cuales se unen a lípidos asociados a membranas y a carbohidratos, se caracteriza por ser una bacteria de crecimiento lento.

Este microorganismo segrega proteínas con conocidos efectos quimiotácticos, atraen a los neutrófilos lo que produce inflamación en la zona afectada. Su característica bioquímica más sobresaliente es la abundante producción de la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y CO₂; lo cual permite la formación de una nube de amonio que es un mecanismo importante para la sobrevivencia de la bacteria en un pH tan ácido como lo es el jugo gástrico.¹²

Es la especie tipo de este género y el más importante en cuanto se refiere a la patología humana. Las bacterias cultivadas *in vitro* son menos espirales y aparecen como bacilos curvados, en los cultivos expuestos al aire, las bacterias se hacen rápidamente cocoides y eventualmente degeneran esta capacidad para transformarse en forma cocoide.¹³

La taxonomía del *Helicobacter pylori*

Reino : Bacteria

Filo : Proteobacteria

Clase : Epsilon Proteobacteria

Orden : Campylobacterales

Familia: Helicobacteraceae

Género: *Helicobacter*

Especie: *Helicobacter pylori*¹²

Especies de *Helicobacter*

Desde la descripción del género el número de especies incluidas en él ha aumentado espectacularmente. En la actualidad al menos 24 especies de *Helicobacter* han sido descritas de una forma válida y 35 o más *Helicobacter* nuevos esperan ser formalmente nombrados.⁷

Las especies de *Helicobacter* se clasifican según el análisis de la secuencia del ARNr de 16S de sus genes, según sus ácidos grasos celulares y la presencia de flagelos polares.⁵

Una manera útil y práctica de agrupar las especies de *Helicobacter* es teniendo en cuenta el hábitat que ocupa. Así tradicionalmente se han distinguido especies de *Helicobacter* gástricas o enterohepáticas.⁵

2.3.4 Factores patogénicos

Existen diversos factores que influyen en la virulencia y patogenicidad del *Helicobacter pylori*, algunos factores están relacionados con el microorganismo y otros con el hospedero que, juntos, modulan el riesgo de desarrollar la enfermedad.¹¹

Aún se desconoce el mecanismo patogénico, pero se ha descrito la producción de citotoxinas. La gran cantidad de ureasa producida por el microorganismo puede contribuir en la supervivencia en el ambiente ácido de la mucosa gástrica.¹¹

Helicobacter pylori es capaz de colonizar y persistir en su hábitat: la mucosa gástrica. Los factores de patogenicidad de *Helicobacter pylori* pueden dividirse en dos grupos.⁴

a. Factores de virulencia, que contribuye a los efectos patogénicos de la bacteria. Responsables de los tres grandes efectos patogénicos imputados a *Helicobacter pylori*: inducción de la inflamación gástrica, alteración de la barrera mucosa gástrica y alteración de la fisiología gástrica.

a.1. Inducción de la inflamación gástrica.

La presencia de un infiltrado inflamatorio en la mucosa se ha relacionado con la necesidad de éste, para permitir la supervivencia de *Helicobacter pylori in vivo*.¹⁰

- Interleucina-8: es un péptido que actúa como un potente mediador de la inflamación reclutando y activando neutrófilos. Cepas de *Helicobacter pylori* VacA + / CagA + inducen una mayor producción de IL-8 que cepas VacA (-) / CagA (-).
- Adherencia de los neutrófilos: Existe una proteína, denominada HP-NAP, de 150 kDa que incrementa la expresión en los neutrófilos de la integrina CD11b/CD18 y aumenta su adherencia a las células del endotelio.¹¹
- Factor activador plaquetario (PAF): se trata de un reconocido agente ulcerogénico, ya que estimula la secreción ácida gástrica, vía receptores específicos de las células parietales. *Helicobacter pylori* puede metabolizar su precursor inactivo Lyso-PAF en PAF, induciendo lesión gástrica.¹²
- Lipopolisacárido: el lipopolisacárido de *Helicobacter pylori* rompe la barrera mucosa gástrica interfiriendo la interacción entre la mucina y su receptor a nivel de la mucosa. La ebrotidina, contrarresta este efecto.¹²

- Ureasa: es un potente estímulo de la activación de la fagocitosis mononuclear y la producción de citocinas inflamatorias. Producida en grandes cantidades por todos los aislamientos de *Helicobacter pylori*, parece implicada en la protección de la bacteria frente a la acidez del estómago.¹⁴

Estudios en modelos experimentales demuestran que mutantes ureasa-negativas son incapaces de colonizar la mucosa del modelo animal en cerdos.¹³

La ureasa es la enzima más abundante producida por *Helicobacter pylori* y su actividad depende del pH alrededor de la bacteria. El hábitat natural de *Helicobacter pylori* se encuentra por debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad. El mecanismo que utiliza para protegerse de ese pH ácido durante la colonización o de las bajadas de pH que pueden ocurrir por daños mecánicos en la mucosa, se basa en acumular una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono. El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 ó 7 en su entorno.

De este modo puede alcanzar la superficie de las células de la mucosa, donde el pH es prácticamente neutro.

La ureasa se regula puesto que un aumento excesivo de la alcalinidad debida al NH_4 producido mataría a la bacteria. La regulación se produce mediante un transportador dependiente de pH. El transportador *UreI* permite la entrada de urea pero una vez que el pH alcanza el valor de 6-7, se inactiva.

El NH_4 liberado va a producir una serie de daños que afectan a la microcirculación y a las células epiteliales superficiales. Origina una necrotización del tejido profundo; colabora en el desarrollo de gastritis atrófica crónica humana y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis.¹⁵

a.2. Alteración de la barrera mucosa gástrica.

Helicobacter pylori puede inhibir la respuesta de las células productoras de moco, lo que supone un efecto nocivo sobre el primer mecanismo de defensa de la mucosa gástrica.

- Fosfolipasa. a través de las fosfolipasas A y C expresadas por *Helicobacter pylori*, este microorganismo altera la capa de moco del epitelio gástrico. Su efecto puede ser inhibido por el uso de sales de bismuto.
- Mucinas. su expresión *in vivo*, contribuye probablemente a la alteración de la barrera mucosa gástrica.

- Radicales libres de oxígeno. Inducidos por *Helicobacter pylori*, se ha relacionado su formación en la mucosa gástrica *in vivo* con la extensión de la lesión gástrica, de modo que no existe evidencia de participación de los radicales libres de oxígeno en el daño gástrico en casos no relacionados con la infección por *Helicobacter pylori*.
- Inducción del óxido nítrico sintetasa. Elevados niveles de óxido nítrico se han asociado a activación inmunitaria y lesión tisular. *Helicobacter pylori* induce su producción *in vitro*, a cargo de los macrófagos.
- Apoptosis *Helicobacter pylori* aparece como un inductor de la muerte celular programada de las células de epitelio gástrico. Del mismo modo inhibe la migración y proliferación de las células epiteliales.¹⁶

a.3. Alteración de la fisiología gástrica.

La infección por *Helicobacter pylori* induce la secreción de gastrina, que actúa como un estímulo para la secreción ácida e inhibe la secreción de somatostatina, péptido inhibidor de la secreción ácida. Este efecto está relacionado también con el grado de inflamación gástrica presente, de forma que, cuando la secreción gástrica es inhibida con omeprazol, la presencia de *Helicobacter pylori* en el antro se encuentra comprometida y se produce la migración de la bacteria desde esta localización hacia el cuerpo del estómago.¹⁷

b. Factores de movimiento, que permite a la bacteria colonizar y permanecer dentro del hospedero.

- Movilidad: los flagelos son los que le permiten su gran movilidad para introducirse con rapidez en la capa de moco del estómago. Los genes Fla-A y Fla-B se han identificado como reguladores de los flagelos y las cepas que carecen de ellos son incapaces de colonizar.¹¹
- Catalasa y superóxido dismutasa: confieren resistencia a la bacteria frente a la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares.
- Heat shock proteins, inductoras de la respuesta inmune y moduladoras de la actividad ureasa.
- ATPasa, diana del efecto bactericida de los inhibidores de la bomba de protones en *Helicobacter pylori*.
- Adhesinas involucradas en la fijación del microorganismo a las células epiteliales del estómago, resistiendo el peristaltismo.¹⁷
- Evasión a la inmunidad. *Helicobacter pylori* para tener una cierta actividad supresiva de la respuesta inmunitaria celular del hospedero, al mostrar

resistencia a la fagocitosis, quizá debido a la gran cantidad de amonio que es capaz de producir. La expresión del antígeno de Lewis en la superficie de *Helicobacter pylori*, puede contribuir al camuflaje de la bacteria. La modificación de la morfología de las bacterias también está implicada, por medio de las formas cocoides, que representa una forma de resistencia en condiciones ambientales hostiles, que pueden ser revertidas a formas bacilares virulentas in vivo.¹

2.3.5 Infección y transmisión de *Helicobacter pylori*

La infección por *Helicobacter pylori* puede ser sintomática o asintomática, se estima que más del 70% de las infecciones son asintomáticas. En ausencia de un tratamiento basado en antibióticos, una infección por *Helicobacter pylori* persiste aparentemente durante toda la vida. El sistema inmune humano es incapaz de erradicarla.

Lo que parece más claro son los factores de riesgo para adquirir la infección: nacer en países en vías de desarrollo; estatus socioeconómico bajo; vivir en situaciones de hacinamiento e insalubres; comer alimentos y beber agua en malas condiciones sanitarias y exposición al contenido gástrico de personas infectadas. En cuanto a la posible fuente ambiental la más importante de las propuestas es el agua. Son muy numerosos los estudios de detección del ADN de *Helicobacter pylori* en el agua e incluso en uno de ellos se llegó a cultivar.¹

Las infecciones por vía ambiental o a través reservorios animales no pueden ser descartadas. De hecho, los perros y gatos sirven de reservorio de *Helicobacter heilmannii*, que se asocia a *Helicobacter pylori* en la infección y produce casos de gastritis en humanos.¹⁸

Transmisión de *Helicobacter pylori*

Aunque *Helicobacter pylori* está en el estómago de la mitad de la población mundial todavía no se conoce perfectamente cómo se transmite. Se han propuesto distintas rutas que puede seguir la infección: oral-oral, fecal-oral, oro-gástrica o a partir de una fuente ambiental. Los estudios, dependiendo en que grupo poblacional se realicen, apuntan a favor de una u otra. Podría ser que en países desarrollados la ruta de transmisión más habitual fuera de la oral-oral y en aquellos donde las condiciones higiénico-sanitarias no sean correctas fuera la fecal-oral.¹

Existen tres rutas de transmisión:

- Latrogénica: material en contacto con la mucosa gástrica de una persona es luego puesto en contacto con otra. La desinfección de material hospitalario como reducen los índices de transmisión. Endoscopistas que no usan guantes, incrementan el riesgo de estar infectados.¹⁸
- Transmisión fecal-oral: es quizás la más importante. Aunque es aislada de heces de niños infectados, los residuos fecales contaminan el agua que puede ser entonces la fuente de infección.¹⁸
- Transmisión oral-oral: fue identificada en mujeres africanas que premasticaban alimentos para sus hijos. No hay asociación relacionada con transmisión sexual. La transmisión por aspiración del vomito es otra posibilidad no documentada.¹⁸

2.3.6 Enfermedades digestivas relacionadas con *Helicobacter pylori*

La asociación de la bacteria *Helicobacter pylori* con un 90% de las úlceras duodenales y con un 70-80% de úlceras gástricas ha quedado perfectamente establecidas. En cambio resulta menos claro el papel de *Helicobacter pylori* en dispepsia funcional o no ulcerosa, que habitualmente se manifiesta con dolor recurrente o persistente en la parte superior del abdomen, sin pruebas estructurales de la enfermedad. Está asociado a gastritis, úlcera péptica, dispepsia no ulcerosa, cáncer gástrico y linfoma gástrico tipo MALT16.

Gastritis

La gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori* es una de las infecciones crónicas de mayor prevalencia en la población. El concepto de gastritis crónica incluye todo tipo de inflamación de la mucosa gástrica. Clásicamente se había utilizado la clasificación de gastritis tipo A- atrófica, predominantemente en el cuerpo del estómago y a menudo con componente inmunológico; gastritis tipo B- superficial y predominante en el antro del estómago y gastritis tipo C- de origen químico. En 1990 se propuso la clasificación del sistema Sidney que incluye sistemas endoscópicos, histológicos y etiológicos. Con esta nueva clasificación las gastritis se clasificaron en aguda, crónica y formas específicas, dividiéndose la gastritis crónica en dos grandes categorías: no atrófica y atrófica.

La gastritis que se origina después de la infección por *Helicobacter pylori* puede desarrollarse sin manifestaciones o bien originar la expresión clínica propia de gastritis aguda (dolor epigástrico, náuseas y vomito), el cuadro es autolimitado. Esta infección va permanecer indefinidamente, tanto si se ha desarrollado sintomatología como si no. La infección crónica dará lugar a una gastritis

superficial crónica difusa que podría conducir a una gastritis atrófica multifocal, a una atrofia gástrica y metaplasia gástrica.¹⁷

Úlcera péptica

La asociación de *Helicobacter pylori* con la úlcera duodenal es clara ya que el 90-95 % de los pacientes con úlcera duodenal presentan este microorganismo y la úlcera cicatriza al erradicar la bacteria. Con respecto a la úlcera gástrica también existe una clara relación aunque solo con un 70% de este tipo de úlcera está asociado con la presencia *Helicobacter pylori*, debido a que el resto de ellas están producidas por consumo de anti-inflamación no esteroides.

En cuanto a la úlcera péptica hay que destacar que más del 90% de los pacientes con úlcera duodenal y entre el 50-80% de los pacientes con úlcera gástrica están infectados por *Helicobacter pylori*. Pero solo es desarrollado por el 10% de las personas infectadas. Luego deben de existir otros factores necesarios para su producción. Quizá haya cepas más virulentas que otras.³

Dispepsia no úlcera

Consiste en molestias gástricas de clínica heterogénea. Al no conocerse su causa se postuló que la bacteria estuviera implicada en su etiología. Pero estudios recientes han demostrado que la erradicación de la bacteria no resuelve dichas molestias.^{18, 19}

Linfoma gástrico MALT (tejido linfoideo asociado a mucosa)

El 90% de los pacientes con linfoma MALT son positivos para *Helicobacter pylori*. Es un tipo de linfoma que se localiza preferentemente en el antro del estómago, dado que es la zona donde más existe tejido linfoide. Además, varios estudios apoyan la asociación de *Helicobacter pylori* con esta enfermedad puesto que tras la erradicación de la bacteria se ha observado la regresión del linfoma.¹⁸

2.3.7 Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*

La demostración de que *Helicobacter pylori* era el principal agente causal de la gastritis antral asociada a la úlcera péptica y de que su erradicación conducía a la curación definitiva de la mayoría de los casos de esta enfermedad, así como su implicación en los síntomas gástricos tipo MALT y el cáncer de estómago, produjeron una auténtica explosión de métodos de diagnóstico.

Existen diferentes métodos para diagnosticar una infección de *Helicobacter pylori*. El diagnóstico de la infección puede establecerse por métodos directos, cuando se detecta la presencia del microorganismo en muestras obtenidas por

endoscopia (cultivo, tinciones histológicas, técnicas moleculares) o indirectos, cuando se estudia alguna propiedad del mismo o la respuesta inmune específica.^{18, 19}

Métodos invasivos

La obtención de muestras para el diagnóstico puede realizarse por métodos invasivos, si es necesario la realización de una endoscopia para la obtención de muestra.

Cultivo

El cultivo de *Helicobacter pylori* en ambientes distintos al estómago humano ha sido difícil, debido a cambios morfológicos de esta bacteria y al sobrecrecimiento o competencia de otros microorganismos. Se han realizado esfuerzos por cultivar esta bacteria en muestras de agua usando medios de crecimiento alternativos bajo condiciones microaerófilas variables. Hasta el presente, se han reportado algunos casos de cultivo viable de este patógeno a partir de muestras de aguas residuales, agua marina y asociado al plancton, confirmando la presencia de *Helicobacter pylori* por análisis de secuencias del gen 16S del ARNr.

El *Helicobacter pylori* es una bacteria muy exigente y para su crecimiento en medios de cultivo necesita una atmósfera adecuada, microaerófila, con una baja concentración de oxígeno y presencia de CO₂ de 5 - 10%, así como una humedad de 70 - 90%.

Se recomienda el uso de estufas de CO₂ que permite mantener una temperatura entre 35 a 37 °C o utilizar jarras de anaerobiosis para el crecimiento del bacilo.¹⁹

Los medios de cultivo utilizados deben ser ricos en nutrientes y deben contener sangre de carnero, caballo o humana o productos derivados de la sangre; por lo que el medio más adecuado es el de Skirrow.

El periodo de incubación es prolongado (7 a 10 días) pero al cabo de 2 a 5 días ya se pueden visualizar las colonias típicas del *Helicobacter pylori*, las cuales son pequeñas, brillantes y blanquesinas.²⁰

Histología

La observación de microorganismos de forma espiral en cortes histológicos con diferentes tinciones es un método sencillo para diagnosticar la infección por *Helicobacter pylori*, así como para determinar la densidad de la colonización. Entre los métodos de tinción utilizados, unos son simples y fáciles de realizar y

otros son más complejos. En la actualidad se emplean las tinciones con hematoxilina-eosina, la de Warthin-Starry con nitrato de plata y la tinción con azul de metileno, aunque esta última ha sido sustituida por la tinción con Giemsa, probablemente una de las más populares, por ser fácil de realizar y económica y con buenos resultados en el diagnóstico. Existen técnicas complementarias a la histología como la inmunohistoquímica y la técnica de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) que han sido empleadas para la detección de *Helicobacter pylori* con esta última se ha reportado hasta 98 % de sensibilidad y 100 % de especificidad en la detección de la bacteria. A pesar de los buenos resultados que se han reportado con la técnica de FISH, la misma necesita un microscopio de fluorescencia, oligonucleótidos fluorescentes específicos y varios reactivos que encarecen la técnica sustancialmente. Los análisis histológicos son importantes no sólo para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*, sino fundamentalmente para determinar el nivel de daño histológico. Estos estudios brindan información sobre la presencia de polimorfonucleares y diagnostican la gravedad de la gastritis, metaplasia y/o de atrofia en el tejido analizado. Las principales desventajas del diagnóstico histológico en el caso de *Helicobacter pylori* son que el resultado está muy influenciado por la experiencia del patólogo y el tipo de tinción que se emplee. Por otra parte, existen algunos factores específicos que disminuyen su sensibilidad, como son: la baja densidad de microorganismos y la desigual distribución de la bacteria en el estómago, esto último afecta por igual a todos los métodos directos de detección y, por tanto, se recomienda tomar varias biopsias para aumentar la sensibilidad de la técnica en cuestión que se esté empleando. A pesar de que aún no se ha podido visualizar *Helicobacter pylori* directamente en el epitelio gástrico al realizar las endoscopias, recientemente fue empleado un endocitoscopia Olympus XEC-120 para la visualización *ex vivo* de *Helicobacter pylori*. En este experimento se tomaron alícuotas de 20 L. de cultivos semilíquidos del microorganismo, se colocaron en portaobjetos y se logró visualizar la bacteria en movimiento por al menos 5 min sin realizar ninguna tinción previa. Este es el primer reporte del uso de un endocitoscopia para visualizar microorganismos vivos y, aunque el mismo no fue diseñado con este fin, se abre la posibilidad para que en un futuro cercano pueda construirse un instrumento que permita la observación de *Helicobacter pylori* directamente en la mucosa gástrica cuando se realiza la endoscopia.

La histología ha sido una de las técnicas más empleadas en la red hospitalaria cubana para la detección de *Helicobacter pylori*, así como en los estudios realizados en nuestro país sobre la infección con este microorganismo.²¹

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante la técnica de PCR es posible detectar el ácido desoxiribonucleico (ADN) de *Helicobacter pylori* en concentraciones mínimas, a partir de biopsias gástricas, para lo cual se utilizan diferentes iniciadores de secuencias (cebadores) para amplificar varios genes como: el gen *ureA* que codifica para la subunidad A de la enzima ureasa, el gen *glmM* que codifica para una fosfoglucosamina mutasa y secuencias altamente conservadas del gen que codifica para el ácido ribonucleico de la subunidad 16S del ribosoma (ARNr 16S). De todos los genes, el gen *glmM* ha sido el más empleado para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*, y se reportan muy buenos valores de sensibilidad y especificidad con su uso.²²

La mayoría de los métodos basados en esta técnica tienen 100 % de sensibilidad, también varios estudios sugieren que la PCR es tan válida como el cultivo para confirmar la erradicación del microorganismo y para detectar los fallos de las múltiples terapias empleadas en la erradicación de este patógeno. La PCR también permite detectar los genes de factores de patogenia específicos de *Helicobacter pylori* como CagA y VacA. Es, además, un método rápido y aplicable a diferentes tipos de muestras. Su principal inconveniente lo constituye la presencia en la muestra de restos de tejido gástrico, lípidos u otros componentes que inhiben la reacción de la PCR y que por tanto favorecen la obtención de falsos negativos. Al igual que para el cultivo y la histología, la sensibilidad de la PCR se ve afectada por la desigual colonización de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori*.¹⁹

Recientemente, se empleó un nuevo sistema para la identificación de *Helicobacter pylori* que consiste en la combinación de la técnica de endoscopia de barrido y el método LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*). En este sistema se emplearon cebadores para el gen *glmM* y se logró 100 % de sensibilidad y especificidad. Este procedimiento tiene la ventaja de no necesitar una muestra de biopsia gástrica, además, tiene menos requerimientos que la PCR estándar, pero se necesitarán más estudios para corroborar su eficiencia en el diagnóstico de *Helicobacter pylori*.¹⁷

La PCR no ha sido empleada hasta ahora en nuestra red asistencial de salud para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* y solo en 2 estudios se ha usado como método de detección de la infección por *Helicobacter pylori*.²¹

Métodos no invasivos

Prueba serológica

La técnica más empleada, por más de 20 años, es el ELISA estándar y sus variantes. Son muchos los juegos comerciales basados en esta técnica, gran parte de los cuales contienen mezclas de antígenos específicos de *Helicobacter pylori*, con lo cual se ha disminuido la reactividad inespecífica, y por tanto se ha aumentado la especificidad de los ensayos hasta un 98 %.²³

Los inmunoensayos sobre papel de nitrocelulosa (immunoblotting), como el Western Blot, son muy útiles para evaluar la respuesta inmune contra antígenos específicos, como VacA y CagA, lo que permite establecer relaciones entre el desarrollo de patologías más severas y la presencia de determinados antígenos de *Helicobacter pylori*.¹⁶

Uno de los juegos comerciales basado en la inmunocromatografía es el AssureTM *H. pylori* Rapid Test. Al emplear este ensayo en estudios realizados en distintas poblaciones, se ha alcanzado una sensibilidad del 96 % y una especificidad del 94 %.

Las técnicas serológicas son generalmente simples, reproducibles y económicas, pero además, son las únicas que permiten realizar estudios epidemiológicos y determinar la prevalencia y la edad de adquisición de la infección por *Helicobacter pylori* en diferentes poblaciones.

La limitación principal de la serología es su incapacidad para distinguir entre la infección activa y una infección previa con *Helicobacter pylori*, ya que los niveles de anticuerpos persisten alrededor de 6 meses en sangre y esto puede determinar la obtención de falsos positivos. Por otra parte, dada la heterogeneidad de las cepas que circulan en las diferentes zonas geográficas y las variaciones en las preparaciones antigénicas de los diferentes juegos serológicos comerciales, es necesario validar cada juego comercial en la población particular donde se pretenda hacer extensivo su empleo. Hasta estos momentos no se ha empleado en nuestro país ningún juego serológico para el diagnóstico generalizado de la infección por *Helicobacter pylori* y tampoco se cuenta con un juego propio¹⁷. No obstante, sí se han empleado varios juegos serológicos comerciales para el diagnóstico de la infección en algunos estudios realizados.²⁴

La detección de antígenos de *Helicobacter pylori* en heces fecales, mediante técnicas inmunoenzimáticas, se ha empleado para el diagnóstico inicial de la bacteria y para confirmar la erradicación de la misma después del tratamiento. El primero de los juegos comerciales desarrollados fue el Premier Platinum HpSATM (Meridian Diagnostics), que constaba de una mezcla de anticuerpos policlonales para el reconocimiento de los antígenos y aunque su sensibilidad era buena, la especificidad no era suficiente. Estos juegos han sido sustituidos por otros que contienen anticuerpos monoclonales, los cuales muestran una muy buena especificidad. Esta técnica tiene la ventaja de ser totalmente no invasiva y por tanto muy útil para el diagnóstico de la infección en pacientes de cualquier edad, sobretodo en niños.

Recientemente, un juego inmunocromatográfico que detecta a la enzima catalasa, en su estado nativo en heces fecales, fue desarrollado y empleado en el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños asintomáticos y personas de edad avanzada. Aunque con este juego se obtuvieron muy buenos resultados, es necesario realizar otros estudios para corroborar su eficacia en el diagnóstico.²³

Los juegos comerciales basados en la detección de antígenos en heces fecales se ven afectados por varios factores, entre los que se destacan: la excreción de los antígenos muy diluidos o degradados, cuando hay problemas de diarreas u obstrucciones intestinales, respectivamente; lo que compromete la sensibilidad de estos juegos. Otro aspecto que limita su uso extensivo, son sus altos precios. En nuestro país no se encuentran reportes del uso de estos juegos comerciales en la detección de *Helicobacter pylori*.²⁴

Prueba de aliento

La prueba del aliento se basa también en la actividad de la ureasa de *Helicobacter pylori*, pero en este caso con urea marcada. Como resultado de la ingestión de una suspensión de urea marcada con C^{13} o C^{14} , ocurre la hidrólisis de la urea y se forma anhídrido carbónico que se absorbe en los tejidos, se difunde a la sangre, es transportado a los pulmones y de allí es exhalado a través del aliento. La cantidad de CO_2 marcado que se exhala está en relación directa con la intensidad de la hidrólisis de la ureasa del microorganismo y, por tanto, con la presencia de *Helicobacter pylori*. La prueba del aliento es un método cualitativo que, a diferencia de la prueba de la ureasa rápida, estudia toda la superficie del estómago, son muy altas su sensibilidad y

especificidad, tanto en pacientes que no han sido tratados previamente, como en aquellos que sí han recibido un tratamiento erradicador. También es considerada la más fidedigna de las técnicas no invasivas por su robustez. En contraste con otros métodos indirectos, como la serología, cuando su resultado es positivo indica infección actual. Esta técnica es costosa y en su realización existen aspectos que pueden afectar el resultado, como son: las variaciones en cuanto al punto de corte utilizado para la positividad, la ingestión previa de algunos alimentos y el intervalo de tiempo para la toma de la muestra. Además, la presencia de atrofia gástrica puede favorecer la obtención de falsos negativos, por lo que en estos casos se ha demostrado la utilidad de realizar además, pruebas serológicas para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*.²⁵

Esta prueba, por ser tan costosa no se ha empleado en nuestro país para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en la red asistencial de salud y no hay reportes de su uso en estudios de esta infección.²⁴

2.4 EPIDEMIOLOGÍA

Los estudios realizados en la última década han convertido a *Helicobacter pylori* en uno de los agentes infecciosos de mayor prevalencia en el hombre, implicándose en la patogenia de enfermedades tan dispares como la patología gastroduodenal crónica.²⁶

La proporción de infección varía de nación a nación. En el mundo occidental (Oeste de Europa, Norteamérica y Australia), la proporción es de alrededor de un 25% de la población, siendo mucho mayor en el tercer mundo. En este último caso, es común, probablemente por las pobres condiciones sanitarias, encontrar infecciones en niños. En los Estados Unidos, la infección se da principalmente entre personas de edad avanzada (más del 50% de estas ocurren en personas de las de 60 años frente a un 20% entre personas de menos de 40) y entre pobres.²³

El último reservorio en condiciones naturales es el hombre, aunque no es infrecuente el aislamiento en primates. Todavía hoy, la ruta de transmisión de la infección, no está claramente establecida y se piensa como vía más posible, la vía oral y oro-fecal. Se ha hipotetizado sobre el mecanismo de transmisión a partir de insectos como las moscas o animales domésticos (mascotas), y más concretamente gatos, si bien implica especies diferentes como son *Helicobacter felis* y *Gastrospirillum hominis*.²⁴

A prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en el mundo es muy elevada, aproximadamente del 50% y se divide en dos grupos. El grupo I está constituido por los países en donde la mayoría de los niños se infectan durante la infancia y en los que la infección crónica producida por el microorganismo persiste durante la edad adulta; el grupo II está integrado por aquellas zonas en que solo una minoría de los niños que viven actualmente están infectados, pero donde la prevalencia de la infección aumenta con relación a la edad durante la etapa adulta. En este último grupo interviene el denominado efecto de cohorte o generacional que se encuentra en poblaciones en que han cambiado o se han modificado de modo importante las condiciones socioeconómicas en las últimas décadas.¹⁷

Estudios de prevalencia de la infección en poblaciones sanas muestran amplias variaciones entre diferentes comunidades. Entre los países del grupo I con mayores porcentajes se encuentran dentro del continente africano. Nigeria con 85%, Argelia con un 79% y Costa de Marfil con 73%, mientras que en el grupo II los mayores porcentajes corresponden a Israel con 65%. Reino Unido con 56,9%, EE.UU con 52% y Japón con 50%.

Las más altas tasas de infección están asociadas a los bajos estatus socioeconómicos y hacinamiento en la vivienda, por eso, la prevalencia de la infección de *Helicobacter pylori* es muy diferente tanto entre distintos grupos de la población como dentro de un mismo grupo.³

La prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en Lima, Perú, está disminuyendo entre las personas de nivel socioeconómico medio y alto, y se mantiene estacionaria entre la población de nivel socioeconómico bajo. La infección es ligeramente más frecuente en el sexo masculino y se adquiere en edades tempranas de la vida, probablemente la vía fecal-oral y el agua sean los mecanismos de transmisión más importantes. No existen hasta el momento pruebas en nuestro país que permitan afirmar que ciertas razas tengan predisposición para adquirir la infección. No hay diferencias en la prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* entre las poblaciones de la costa, sierra y selva del Perú; en la población de altura es más frecuente la gastritis crónica secundaria a la infección por *Helicobacter pylori* que en la población que reside a nivel del mar.²

En un estudio realizado en la ciudad de Lima, en pacientes con dispepsia la detección de *Helicobacter pylori* en saliva fue de un 35,3% de un total de 34

muestras, estos resultados obtenidos podrían demostrar que la cavidad oral puede ser un reservorio para *Helicobacter pylori* y las secreciones orales vías importante de transmisión del microorganismo.²⁷

Actualmente se estima que el 60% de la población mundial está infectada por el *Helicobacter pylori*. Aunque la infección del estómago por el *Helicobacter pylori* es una de las más comunes en el mundo, su epidemiología y otros aspectos vinculados a su relación con la patología gastroduodenal no están aun completamente aclarados.²⁵

Desde hace dos décadas, cuando el «Grupo de Fisiología Gastrointestinal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y de la Universidad de Johns Hopkins» inició las primeras investigaciones en el Perú sobre el *Helicobacter pylori*, se ha realizado importantes estudios, entre otros, sobre la epidemiología de la infección producida por esta bacteria. Al evaluar panorámicamente los reportes efectuados por nosotros desde esos años hasta la actualidad, se evidencia que las características epidemiológicas de la infección por el *Helicobacter pylori* en el Perú están cambiando considerablemente, al igual de lo que se reporta en el resto del mundo desarrollado. De acuerdo a ciertos reportes, algunos grupos raciales como los negros e hispanos en los Estados Unidos de Norteamérica, tendrían una mayor predisposición para la infección, aunque desde nuestro punto de vista en estos casos las condiciones socioeconómicas y ambientales que son más desfavorables condicionan la aparente diferencia de prevalencia. En el Perú, desde el punto de vista epidemiológico se ha encontrado iguales tasas de infección en poblaciones de nivel socioeconómico bajo de la Costa, Sierra y Selva. En personas de nivel socioeconómico alto, las mujeres tienen una tasa de infección menor que los hombres (probablemente por una menor exposición que éstos a las formas de contagio). En la raza japonesa no se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas en comparación con peruanos del mismo nivel socioeconómico.²⁸

A nivel mundial, se ha establecido que en los países desarrollados el 50% de los pacientes con síntomas del tracto gastrointestinal superior son portadores de esta bacteria y un 80% en los países en vías de desarrollo.¹⁶

La forma de transmisión de la infección por el *Helicobacter pylori* no está del todo aclarada. Al parecer son múltiples los modos de transmisión (fecal-oral, oral-oral), predominando algunos de ellos en relación a las características ambientales y de la población. La alta prevalencia de la infección en los países

en vías de desarrollo se ha asociado con las pobres condiciones sanitarias, cloración del agua, preparación de los alimentos, y hacinamiento, observación apoyada por el rol del agua en la propagación de la bacteria y la aparente transmisión fecal-oral de la infección. En el Perú, probablemente la transmisión a través del agua juegue el rol más importante. Se ha encontrado al *Helicobacter pylori* en el agua procedente de Lima, la Atarjea (central de procesamiento desde donde se distribuye el agua a toda la ciudad), y la población que la consume tiene mayor riesgo de presentar la infección que la que bebe la procedente de pozos.²⁹

En pacientes con los síntomas del tracto intestinal superior que fueron examinados mediante endoscopia en Ayacucho, se halló *Helicobacter pylori* en un porcentaje de 85% de casos superior al 60% reportados en países industrializados y similar a los reportado en otros países no desarrollados, con relación a la edad se probó que la infección de la bacteria se adquiere a edades tempranas.³⁰

De cualquier forma en los últimos años están apareciendo cepas de *Helicobacter pylori* que presenta resistencia a antibióticos. Hay cepas resistentes incluso a metronidazol en el reino unido.²⁹

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 FASE PRE ANALÍTICA

3.1.1 UBICACIÓN DE ZONA DE MUESTREO Y DE TRABAJO

3.1.1.1 Ubicación de zona de muestreo

Los puntos de muestreo están ubicados en los siguientes ríos y Plantas de Tratamiento que corresponden a los siguientes distritos:

- Río Alameda
 - Distrito de Carmen Alto (muestreo realizado en tres puntos a 2775 m.s.n.m, 2780 m.s.n.m y 2787 m.s.n.m)
- Río Chacco
 - Distrito de Ayacucho - Tambillo (muestreo realizado en dos puntos a 2731 m.s.n.m y 2744 m.s.n.m)
 - Distrito de Tambillo (muestreo realizado en un punto a 2747 m.s.n.m)
- Río de Huatatas
 - Distrito de Andrés Avelino Cáceres (muestreo realizado en tres puntos a 2748 m.s.n.m, 2750 m.s.n.m. y 2755 m.s.n.m)
- Río Muyurina
 - Distrito de Tambillo (muestreo realizado en tres puntos a 2741 m.s.n.m, 2744 m.s.n.m y 2749 m.s.n.m)
- Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”
 - Distrito de Carmen Alto (muestreo realizado en dos puntos: afluente 1 a 2796 m.s.n.m y afluente 2 a 2790 m.s.n.m)
- Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”
 - Distrito de Jesús Nazareno (muestreo realizado en dos puntos: afluente a 2622 m.s.n.m y efluente a 2617 m.s.n.m)

3.1.1.2 Ubicación de zona de trabajo

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de

Huamanga, ubicado en la ciudad universitaria a 2750 m.s.n.m latitud 13°08'50.92" S y longitud 74°13'09.84" N.

3.1.2 MUESTREO

El muestreo se realizó de manera intencional en tres puntos para cada río y dos puntos en las Plantas de tratamiento (un muestreo por cada mes), para lo cual se utilizaron muestreadores y botellas de vidrio previamente esterilizadas de 625 mL.²⁸

Se realizó la colecta manual para las muestras de ríos, tomando en cuenta los cuidados de asepsia, se removió la tapa del frasco conjuntamente con el papel protector, con una de las manos se aseguró el frasco por la base, se sumergió rápidamente con la boca hasta abajo con la profundidad de 15 a 20 cm., para evitar el ingreso de contaminantes superficiales. Se orientó el frasco de modo que la boca este en sentido contrario a la corriente de agua. Se inclinó el frasco lentamente hacia arriba, para permitir la salida del aire y permitir el ingreso del agua; luego se retiró el frasco del cuerpo de agua, se eliminó una pequeña porción de muestra, dejando un espacio vacío de $\frac{1}{4}$ para permitir una homogenización antes del inicio del análisis. En el caso de muestras de aguas residuales crudas y tratadas, se llevó a cabo con la debida precaución para lo cual se utilizó un muestreador, guantes descartables y mascarilla. Se llenó las $\frac{3}{4}$ partes del frasco y se cerró cuidadosamente.

El transporte de las muestras se realizó en un Cooler a temperatura ambiente, el tiempo que se tardó en llevar las muestras de agua al laboratorio de microbiología ambiental fue de 2 horas.²⁹

Tabla N° 1: Número de muestras obtenidas en los diferentes puntos de muestreo de mayo de 2015 a febrero de 2016. Ayacucho.

Fuente de agua	Muestra						Total
	Afluente I	Afluente II	Efluente	Punto 1	Punto 2	Punto 3	
Planta Potabilizadora de Agua	10	10	---	---	---	---	20
Planta de tratamiento de Aguas Residuales	10	---	10	---	---	---	20
Río Alameda	---	---	---	10	10	10	30
Río Chacco	---	---	---	10	10	10	30
Río Huatatas	---	---	---	10	10	10	30
Río Muyurina	---	---	---	10	10	10	30
Total	20	10	10	40	40	40	160

3.2 FASE ANALÍTICA

3.2.1 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

- Se preparó el medio de cultivo Skirrow, el cual contiene Agar Base Columbia, 5 % de sangre desfibrinada de carnero y antibióticos (250 uL. de vancomicina y 625 uL. de trimetoprima).
- Antes que el medio solidifique se transfirió a placas petri estériles.³⁰

3.2.2 AISLAMIENTO DE *Helicobacter pylori*

- Al llegar al laboratorio de microbiología ambiental se dejaron las muestras de agua en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente para su sedimentación.
- Al cabo del tiempo establecido se decantaron las muestras de agua.
- Se realizó el cultivo del sedimento obtenido en la decantación, con ayuda de un asa de Kolle, se tomó una asada de muestra para sembrar por la técnica de agotamiento en superficie en las placas petri conteniendo el medio Skirrow.
- Las placas se colocaron en una cámara bajo condiciones microaerófilas (ver anexo 8), para ello se utilizó un taper hermético de 29 cm de largo x 16 cm de ancho dentro del cual se colocaron 4 velas pequeñas que permitieron consumir todo el oxígeno del taper, además se colocó un vaso con efervescente para producir dióxido de carbono.
- Se incubaron a 37 °C de 5 a 10 días, esperando el crecimiento de colonias típicas (pequeñas, brillantes y blanquecinas).
- Al cabo del tiempo de incubación se hizo la observación de colonias características de *Helicobacter pylori*.
- Para la identificación de *Helicobacter pylori* primero se realizó la coloración Gram en donde se observaron bacterias curvas y Gram negativas.³⁰

3.2.3 IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori*

Después se procedió a realizar las pruebas bioquímicas que se detallan a continuación:

3.2.3.1 Prueba de la ureasa

- En un matraz se disolvió 1,5 g de Agar agar en 90 mL de agua destilada, luego se llevó a esterilizar a 121 °C a 15 Lbs/pulg2 x 15 min.
- Posteriormente se disolvió en condiciones asépticas el 2,9 g de Caldo base urea en 100 mL. de agua destilada previamente esterilizado a 121 °C a 15 Lbs/pulg2 x 15 min.

- Al cabo del tiempo de esterilización se procedió a mezclar el Agar agar con el Caldo base urea, luego se trasvasó el medio en tubos de ensayo estériles y se esperó su solidificación en posición vertical.
- Se inocularon las cepas en cada tubo de ensayo que mostraban tener las características culturales típicas de *Helicobacter pylori* y que fueron Gram negativas y curvas. Se llevó a incubar a 37 °C por 10 días, dándole las condiciones microaerófilas.
- Al cabo de 2 días de incubación se observó el viraje del color inicial amarillo claro a rosado o rojo claro, esto debido al indicador rojo de fenol contenido en el Caldo base urea.
- Como control positivo se utilizó la cepa de *Klebsiella sp.* y como control negativo la cepa de *Escherichia coli*, las cuales se obtuvieron del área de microbiología del servicio de laboratorio del Departamento de Patología Clínica del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel A. Mariscal Llerena”.³¹
- Los resultados fueron comparados con la tabla de diferenciación de bacterias móviles, curvadas, Gram negativos y microaerófilas del Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey's – 9 (ver anexo 1).

3.2.3.2. Prueba de la oxidasa

- Se tomó una asada de la colonia deseada y se extendió sobre las tiras del kit de la prueba de oxidasa (Microbiología Bactident Oxidasa – Merck Millipore).
- Se esperó 10 segundos.
- El cambio de color de la tira a color morado muestra el resultado positivo.³¹

3.2.3.3 Prueba de la catalasa

- Con un asa de Kolle se transfirió parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos.
- Se agregó 1 gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observó la producción de burbujas como resultado positivo.³¹

IV. RESULTADOS

Tabla 2: Muestras de agua de los afluentes de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata” de las cuales se obtuvieron crecimiento de colonias con características culturales típicas para *Helicobacter pylori*. Ayacucho 2015-2016.

Mes de muestreo	A1	A2
Mayo	----	----
Junio	----	----
Julio	----	----
Agosto	----	----
Setiembre	----	----
Octubre	----	----
Noviembre	Col PPA11a	Col PPA22a Col PPA22b
Diciembre	Col PPA11b(a)	Col PPA21a(a)
Enero	Col PPA12b(b)	Col PPA21a(b)
Febrero	Col PPA11a(c) Col PPA11b(c)	Col PPA21a(c)

A1 = Afluente 1

A2 = Afluente 2

Col = colonia

PPA = Planta Potabilizadora de Agua

Tabla 3: Muestras de agua del afluente y efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá” de las cuales se obtuvieron crecimiento de colonias con características culturales típicas para *Helicobacter pylori*. Ayacucho 2015-2016.

Mes de muestreo	A						E	
Mayo	----	----	----	----	----	----	----	----
Junio	----	----	----	----	----	----	----	----
Julio	----	----	----	----	----	----	----	----
Agosto	----	----	----	----	----	----	----	----
Setiembre	----	----	----	----	----	----	----	----
Octubre	----	----	----	----	----	----	----	----
Noviembre	Col PTARA1a Col PTARA1b	Col PTARA2a Col PTARA2b	Col PTARA3a	Col PTARA4a	Col PTARE1a	Col PTARE2b	Col PTARE3a	Col PTARE4a
Diciembre	Col PTARA1a (a)	Col PTARA2a (a)	Col PTARA3a (a) Col PTARA3b (a)	-	Col PTARE1a (a) Col PTARE1b (a)	Col PTARE2a (a) Col PTARE2b	Col PTARE3a (a)	Col PTARE4a (a) Col PTARE4b (a)
Enero	Col PTARA1a	Col PTARA2a (b) Col PTARA2b (b)	Col PTARA3a (b)	-	Col PTARE1a (b)	Col PTARE2a (b)	Col PTARE3a (b) Col PTARE3b (b)	-
Febrero	Col PTARA1a (c) Col PTARA1b (c) Col PTARA1c (c)	Col PTARA2a (c)	Col PTARA3a (c)	Col PTARA4a (c) Col PTARA4b (c)	Col PTARE1a (c)	Col PTARE2a (c) Col PTARE2b (c) Col PTARE2c (c)	Col PTARE3a (c)	Col PTARE4a (c)

A = Afluente

E = Efluente

Col = colonia

PTAR = Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

Tabla 4: Muestras de agua de los ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina de las cuales se obtuvieron crecimiento de colonias con características culturales típicas para *Helicobacter pylori*. Ayacucho 2015-2016.

Mes de muestreo	Rio Alameda			Rio Chacco			Rio Huatatas			Rio Muyurina		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Mayo	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Junio	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Julio	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Agosto	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Setiembre	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Octubre	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Noviembre	Col RA11a	-	Col RA31a	Col RC12a	-	-	-	Col RH22a	-	Col RM13a	Col RM21a	-
Diciembre	Col RA11a (a)	-	Col RA31a (a)	-	Col RC22a (a)	Col RC33a (a)	-	-	Col RH32a (a)	Col RM11a (a)	-	Col RM31a (a)
Enero	ColRA11a (b)	-	-	-	Col RC21a (b)	-	-	-	Col RH31a (b) Col RH31b (b)	-	Col RM21a (b) Col RM21b (b)	-
Febrero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Col = colonia
RA = río Alameda
RC = río Chacco
RH = río Huatatas
RM = río Muyurina

Tabla 5: Número de colonias con características culturales típicas para *Helicobacter pylori* aisladas de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”, Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”, río Alameda, río Chacco, río Huatatas y río Muyurina. Ayacucho 2015-2016.

Ubicación de muestreo	Número de colonias	%
PPA	9	12,9
PTAR	42	60
Rio Alameda	5	7.1
Rio Chacco	4	5.7
Rio Huatatas	4	5.7
Rio Muyurina	6	8.8
Total	70	100

PPA = Planta Potabilizadora de Agua

PTAR = Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

Tabla 6: Resultados de la coloración Gram de las colonias con características culturales típicas de *Helicobacter pylori* de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”. Ayacucho 2015-2016.

Mes de muestreo	A1		A2	
	Código de cepa	Gram	Código de cepa	Gram
Noviembre	PPA11a	Cocos (+)	PPA22a	Cocos (+)
	-----	-----	PPA22b	Bacilos (-)
Diciembre	PPA11b(a)	Cocos (+)	PPA21a(a)	Bacilos (-)
Enero	PPA12b(b)	Cocos (+)	PPA21a(b)	Bacilos (-)
Febrero	PPA11a(c)	Bacilos (-)	PPA21a(c)	Bacilos (-)
	PPA11b(c)	Cocos (+)	-----	-----

PPA = Planta Potabilizadora de Agua

Tabla 7: Resultados de la coloración Gram de las colonias con características culturales típicas de *Helicobacter pylori* de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2015-2016.

Mes de muestreo	A		E	
	Código de cepa	Gram	Código de cepa	Gram
Noviembre	PTARA1a	Bacilos (-)	PTARE1a	Bacilos (-)
	PTARA1b	Cocos (+)	PTARE2b	Bacilos (-)
	PTARA2a	Bacilos (-)	PTARE3a	Cocos (+)
	PTARA2b	Cocos (+)	PTARE4a	Cocos (+)
	PTARA3a	Bacilos (-)	-----	-----
	PTARA4a	Bacilos (-)	-----	-----
Diciembre	PTARA1a (a)	Bacilos (-)	PTARE1a (a)	Bacilos (-)
	PTARA2a (a)	Bacilos (-)	PTARE1b (a)	Cocos (+)
	PTARA3a (a)	Cocos (+)	PTARE2a (a)	Bacilos (-)
	PTARA3b (a)	Cocos (+)	PTARE2b (a)	Cocos (+)
	-----	-----	PTARE3a (a)	Bacilos (-)
	-----	-----	PTARE4a (a)	Cocos (+)
	-----	-----	PTARE4b (a)	Cocos (+)
Enero	PTARA1a (b)	Bacilos (-)	PTARE1a (b)	Bacilos (-)
	PTARA2a (b)	Bacilos (-)	PTARE2a (b)	Bacilos (-)
	PTARA2b (b)	Cocos (+)	PTARE3a (b)	Bacilos (-)
	PTARA3a (b)	Cocos (+)	PTARE3b (b)	Cocos (+)
Febrero	PTARA1a (c)	Bacterias curvas (-)	PTARE1a (c)	Bacterias curvas (-)
	PTARA1b (c)	Bacilos (-)	PTARE2a (c)	Cocos (+)
	PTARA1c (c)	Bacilos (-)	PTARE2b (c)	Bacterias curvas (-)
	PTARA2a (c)	Bacterias curvas (-)	PTARE2c (c)	Cocos (+)
	PTARA3a (c)	Bacterias curvas (-)	PTARE3a (c)	Bacterias curvas (-)
	PTARA4a (c)	Bacterias curvas (-)	PTARE4a (c)	Bacterias curvas (-)
	PTARA4b (c)	Bacilos (-)	-----	-----

PTAR = Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

Tabla 8: Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas procedentes de colonias con características culturales típicas de *Helicobacter pylori* en muestras obtenidas de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”. Ayacucho 2016.

Pruebas bioquímicas	A1	A2	Controles		
	PPA11a(c)	PPA21a(c)	<i>Klebsiella</i> <i>sp.</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Helicobacter</i> <i>pylori</i> (*)
Prueba de la ureasa	-	-	+	-	+
Prueba de la oxidasa	-	-	-	-	+
Prueba de la catalasa	+	+	+	+	+

PPA = Planta Potabilizadora de Agua

E = Efluente

A = Afluente

(*) =Reacción típica

Tabla 9: Resultados de las pruebas bioquímicas de las de las cepas procedentes de las colonias típicas de *Helicobacter pylori* en muestras obtenidas de la planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2016.

Pruebas bioquímicas	A				E				Controles		
	PTARA1a (c)	PTARA2a (c)	PTARA3a (c)	PTARA4a (c)	PTARE1a (c)	PTARE2b (c)	PTARE3a (c)	PTARE4a (c)	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Helicobacter pylori</i> (*)
Prueba de la ureasa	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Prueba de la oxidasa	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Prueba de la catalasa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

PTAR = Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

E = Efluente

A = Afluente

(*) =Reacción típica

Tabla 10: Porcentaje de número de muestras, número de colonias típicas, números de bacterias curvas Gram negativas y número de cepas *Helicobacter pylori*. Ayacucho 2015-2016.

Ubicación de muestreo	Nº de muestras	Nº de colonias típicas	Nº de bacterias curvas Gram negativas	Nº de cepas de <i>Helicobacter pylori</i>
PPA	20	9	5	0
PTAR	20	42	24	3
Rio Alameda	30	5	1	0
Rio Chacco	30	4	1	0
Rio Huatatas	30	4	2	0
Rio Muyurina	30	6	0	0
Total	160	70	33	3
%	100	43,75	20,62	1,88

PPA = Planta potabilizadora de agua

PTAR = Planta de tratamiento de aguas residuales

V. DISCUSIÓN

Tabla 2, 3 y 4. Se observan los resultados del crecimiento de colonias con características culturales típicas para *Helicobacter pylori* aisladas de muestras correspondientes a la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”, Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá” y ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina. Durante los meses de mayo a octubre de 2015 no se obtuvo crecimiento de colonias típicas de *Helicobacter pylori*. Según Moreno, L.; Navarrete, P. y Virgos, L. en su libro Conceptos básicos de microbiología en aguas, describen diferentes factores físicos, químicos y biológicos que afectan el crecimiento de microorganismos acuáticos. Estos factores influyen no sólo en el tamaño y composición de las poblaciones microbianas, sino en la morfología y fisiología de sus componentes individuales, pudiendo producir cambios considerables en el metabolismo, morfología celular y reproducción, por todo ello, la supervivencia de los microorganismos en las aguas es muy variable, incluso para especies relacionadas. La temperatura afecta a los procesos vitales de todos los microorganismos, concretamente a la velocidad de crecimiento, necesidades de nutrientes y composición química y actividad enzimática de las células. Existe una diversidad de bacterias capaces de vivir en un amplio rango de temperaturas, así como bacterias que no. A baja temperatura se ralentiza todos los procesos vitales, de modo que el desarrollo microbiano es más lento, pero también los nutrientes durarán más y será mayor la supervivencia de microorganismos patógenos; la presión hidrostática también afecta a los microorganismos, y determina que puedan vivir en zonas más superficiales o más profundas. La materia en suspensión juega un papel importante como sustrato para muchos microorganismos que colonizan la superficie. Los microorganismos colonizan no sólo las partículas de materia orgánica, que pueden ser utilizadas directamente como alimento, sino también las partículas

inorgánicas. Las partículas en suspensión, de origen orgánico o mineral, absorben a su superficie los nutrientes y como consecuencia los microorganismos encuentran un ambiente nutricional más favorable en esta materia suspendida que libres en el agua. En aguas superficiales las partículas en suspensión suponen también una protección frente a los efectos dañinos de la luz. El potencial redox afecta al metabolismo aerobio o anaerobio y por tanto al tipo de microorganismos presentes. Algunos incluso necesitan un rango concreto de pH para sobrevivir o reproducirse. La materia orgánica es la fuente de nutrientes para las bacterias heterótrofas presentes en el agua, por tanto resulta evidente que existe una alta correlación entre el contenido de materia orgánica y actividad biológica. La concentración de materia orgánica no sólo determina el número de individuos sino también su tipo. Existen microorganismos capaces de crecer con concentraciones muy bajas en nutrientes, mientras que otros se adaptan a altos contenidos. La presencia de enzimas o sustancias bactericidas, generalmente producto del metabolismo de animales y plantas, también puede condicionar las poblaciones microbianas.

Durante el desarrollo de la tesis se presentaron una serie de inconvenientes para el aislamiento de *Helicobacter pylori*. La falta de experiencia en la preparación del medio de cultivo Skirrow, el cual requiere tres tipos de antibióticos y sangre desfibrinada de carnero, además de que se tuvo que adecuar un taper hermético para darle condiciones microaerófilas para el crecimiento y desarrollo de *Helicobacter pylori*, para ello se utilizaron velas pequeñas y sal efervescente, el cual permitió la producción de CO₂. Al cabo del tiempo de incubación de las muestras se observó el crecimiento de colonias con diferentes características culturales las cuales no eran representativas a la bacteria. Para la coloración Gram solo se tomaron en cuenta las colonias pequeñas, brillantes y blanquecinas, pero en la observación microscópica no se vieron bacterias curvas Gram negativas, si no se observaron cocos Gram positivos o bacilos Gram negativos, lo cual no permitía seguir con los siguientes procesos y por eso se repetía el cultivo cada mes para tratar de obtener resultados. El no tener mucha información sobre *Helicobacter pylori* en agua y su aislamiento en medio de cultivo fue un gran inconveniente que se fue manejando para poder lograr los objetivos trazados.

Montero *et al.* 2010 en la investigación "Hallazgo de la bacteria *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y su relación con la incidencia de cáncer

gástrico en Costa Rica” mencionan que *Helicobacter pylori* muestra dos formas, la primera es la espiral y la segunda es la cocoide. Sin embargo, el difícil cultivo de este microorganismo a partir de muestras con altas cargas de microbiota acompañante y su conversión a un estado viable pero no cultivable afecta el conocimiento sobre el rol del agua y los alimentos en la transmisión de la infección con este patógeno. En respuesta a condiciones de estrés ambiental, algunas bacterias adoptan un estado que se ha definido como viable no cultivable (VNC); viable porque mantiene la capacidad de realizar funciones metabólicas, y no cultivable porque no puede aislarse mediante métodos de cultivo en el laboratorio. Al entrar en contacto con el agua, *Helicobacter pylori* es capaz de adoptar el estado VNC, transformándose de la forma típica espiral a una forma cocoide que probablemente dificulta su cultivo. Díaz et al. 2008 mencionan en la investigación “Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*” que la transformación a la forma cocoide de *Helicobacter pylori* puede ser la manifestación de la muerte celular mientras que otros autores consideran que este estado es una forma durmiente y viable. Por otra parte, se demostró que la forma cocoide de *Helicobacter pylori* en las células gástricas e intestinales estimula el sistema inmune del hospedador, indicando que la morfología cocoide es una forma viable y activa de la bacteria.

A partir del mes de octubre del 2015 hasta enero de 2016 se pudo observar que en el afluente 1 y 2 de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata” y en el afluente y efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La totora” hubo crecimiento de colonias con características culturales típicas (pequeñas, brillantes y blanquecinas) al cabo de 7 días de incubación, lo cual permitió que se hiciera la coloración Gram para observar bacterias curvas características y Gram negativas; en el caso de las muestras de los ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina los resultados mostraron colonias con características culturales típicas solo en algunos puntos de muestreo. Como se mencionó *Helicobacter pylori* es una bacteria que requiere condiciones especiales para su crecimiento.

Tabla 5. Se observan resultados del número de colonias con características culturales típicas para *Helicobacter pylori* aisladas de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”, Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totora” y los ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina; se analizaron en total 160 muestras de agua obtenidas en cada punto de muestreo de las cuales se obtuvieron 70

colonias con características culturales típicas (100 %), como se puede ver en la tabla el punto de muestreo que presenta más colonias con características culturales típicas es la Planta de Aguas Residuales, cabe resaltar que el efluente de dicha planta se mezcla con el agua del río Alameda el cual presenta mayor carga microbiana; el agua proveniente del efluente de dicha planta permite la irrigación de gran cantidad de cultivos cercanos a la planta de tratamiento cuyos productos vegetales no procesados son consumidos por la población ayacuchana, estando expuestos a la contaminación por diferentes microorganismos como *Helicobacter pylori*. De las muestras procedentes de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata” solo se lograron aislar 9 colonias con características culturales típicas (12,9 %), esto no indicaba que *Helicobacter pylori* no esté presente en dichos afluentes, si no que las exigentes condiciones para su crecimiento y desarrollo es una limitante para su aislamiento. En cuanto a las muestras de los ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina se obtuvo en total 19 colonias con características culturales típicas (27,3 %), aunque el río Alameda presenta una elevada carga microbiana no se pudo aislar *Helicobacter pylori*. Según Ludisleydis *et al.* 2008 describe las características culturales típicas de las colonias de *Helicobacter pylori* las cuales son pequeñas, blanquecinas y brillantes de aproximadamente 1 mm de diámetro las cuales crecen de 5 a 10 días.

Tabla 6 y 7. Se observa el resultado de la coloración Gram de las colonias con características culturales típicas de *Helicobacter pylori* de la planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”, Planta de Aguas Residuales “La Totorá” y ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina. Ayacucho 2015-2016, donde podemos ver que hay mayor cantidad de bacterias curvas Gram negativas de cepas aisladas de muestras de agua procedentes de la Planta de tratamiento de aguas residuales esto indica lo ya mencionado en el cuadro 5, estas características mencionadas son las que presenta *Helicobacter pylori*, como menciona Hernández, T. 2005. en su trabajo de investigación “La bacteria que más infecta al ser humano”, *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa de forma espiral, de alrededor de 3 micrómetros de largo y con un diámetro aproximado de 0,5 micrómetros.

Tabla 9. Se registra los resultados de las pruebas bioquímicas que se realizaron, se tomaron dos cepas bacterianas como controles, *Klebsiella sp.* como control positivo para ureasa y catalasa pero negativo para oxidasa y *Escherichia coli*

como control negativo para la prueba de la ureasa y oxidasa pero positiva para catalasa procedentes del área de microbiología del servicio de laboratorio del Departamento de Patología Clínica del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel A. Mariscal Llerena”. Diaz, L.; Torres, L. y Rodriguez, B. 2008. en su trabajo de investigación “Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*” menciona que la prueba de la ureasa permite diferenciar a *Helicobacter pylori* de diferentes especies de *Campylobacter*, las cuales también se desarrollan en el mismo hábitat ya sea ambiental o en el tracto gastrointestinal que *Helicobacter pylori*, además de que necesitan los mismos requerimientos para su cultivo (sangre desfibrinada, antibióticos para inhibir el crecimiento de otros microorganismos acompañantes y una atmósfera microaerófila), muestran las mismas características en cuanto a colonias (pequeñas, brillantes y blanquecinas) y en su morfología microscópica muestran bacterias curvas Gram negativas. Por eso para diferenciar una bacteria de otro se realizó la prueba de la ureasa, *Campylobacter* es negativa para la prueba de la ureasa en cambio *Helicobacter pylori* es positiva, debido a que la ureasa es la enzima más abundante producida por *Helicobacter pylori* y su actividad depende del pH alrededor de la bacteria. Para la realización de las pruebas bioquímicas se utilizaron las cepas Gram negativas a las cuales se le realizaron la prueba de la ureasa, oxidasa y catalasa, para determinar si efectivamente era *Helicobacter pylori* estas tres pruebas deben salir positivas lo cual se observó en tres cepas, dos en el afluente (PTARA3a(c) y PTARA4a (c)) y uno en el efluente (PTARE1a(a)). Estas cepas positivas indican la diferencia con *Campylobacter* sp. El hallazgo de *Helicobacter pylori* en muestras de agua indica que la población de Ayacucho es propensa a la infección por esta bacteria y probablemente a desarrollar enfermedades como gastritis y ulcera. Thomas, JE. 1995. en su investigación “Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*” menciona que las más altas tasas de infección están asociadas a los bajos estatus socioeconómicos y hacinamiento en la vivienda, por eso, la prevalencia de la infección de *Helicobacter pylori* es muy diferente tanto entre distintos grupos de la población como dentro de un mismo grupo. El “Grupo de Fisiología Gastrointestinal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y de la Universidad de Johns Hopkins” inicio las primeras investigaciones en el Perú sobre *Helicobacter pylori*, entre otros, sobre la epidemiología y otros aspectos vinculados a su relación con la patología de esta bacteria. En el Perú desde el

punto de vista epidemiológico se ha encontrado iguales tasas de infección en poblaciones de nivel socioeconómico bajo de la costa, sierra y selva.

El aislamiento de *Helicobacter pylori* sigue siendo complicado pero, dándoles las condiciones adecuadas se puede obtener resultados favorables. Actualmente se cuenta con evidencia para el reconocimiento del agua de consumo humano en el rol epidemiológico, advirtiéndose directamente que el consumo del agua no tratada debería considerarse un factor de riesgo para la infección en una población dada, es por ello que al encontrar *Helicobacter pylori* en muestras de agua del afluente y efluente de la planta de Tratamiento de Aguas Residuales muestra que es un factor de riesgo para la población de la ciudad de Ayacucho debido a que los cultivos cercanos son regados directamente con el agua del afluente de esta planta de tratamiento de aguas residuales “La Totorá”, resultando aun mayor el factor de riesgo y la transmisión de esta bacteria⁷. García-Campos, J.; Alarcón, T. y López-Brea, M. 2003 mencionan en su investigación “La infección por *Helicobacter pylori*” que a pesar de la enorme adaptación, que *Helicobacter pylori* posee para adherirse a la mucosa gástrica, resulta difícil establecer que este sea su único hábitat. Diversos estudios se han enfocado en aclarar la existencia de otros reservorios para este microorganismo. Se ha investigado *Helicobacter pylori* en animales, agua y alimentos, con el fin de establecer si estos tienen participación en la diseminación de la infección. Sin embargo, el difícil cultivo de este microorganismo a partir de muestras con altas cargas de microbiota acompañante y su conversión a un estado viable pero no cultivable afecta el conocimiento sobre el papel del agua y los alimentos en la transmisión de la infección con este patógeno. Lo que parece más claro son los factores de riesgo para adquirir la infección: nacer en países en vías de desarrollo; estatus socioeconómico bajo; vivir en situaciones de hacinamiento e insalubres; comer alimentos y beber agua en malas condiciones sanitarias y exposición al contenido gástrico de personas infectadas. En cuanto a la posible fuente ambiental la más importante de las propuestas es el agua. Son muy numerosos los estudios de detección del ADN de *Helicobacter pylori* en el agua e incluso en uno de ellos se llegó a cultivar.

La infección por *Helicobacter pylori* ocurre mayormente en países en vías de desarrollo y estrechamente relacionado con factores socioeconómicos. Con respecto al origen de *Helicobacter pylori* generalmente se han realizado a partir de muestras directas o indirectas de pacientes humanos. Sin embargo, pocos

trabajos en el mundo dan cuenta de su hallazgo en agua y menos en agua de consumo de una población. Montero, V.; Hernández. A.; Masís, F. y Camacho, J. en la investigación “Hallazgo de la bacteria *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y su relación con la incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica” analizaron un total de 122 muestras de agua de consumo de la población de 20 cantones escogidos de zonas de alta y baja incidencia de cáncer gástrico de Costa Rica, donde ya es reconocida en el mundo su alta incidencia, según información estadística del Registro Nacional de Tumores. Se logró el cultivo e identificación molecular de *Helicobacter pylori* en el 40% de las muestras de agua de las zonas de alta incidencia de cáncer gástrico y en el 7% de las muestras de las zonas de baja incidencia. La investigación mostró una comparación estadística que correlaciona la incidencia de cáncer gástrico con factores geomorfológicos y físico químicos de los suelos donde nace el agua de consumo de las poblaciones de ambas zonas. A comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo se observa solo 1,88 % debido a su difícil cultivo.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a las evaluaciones realizadas en el trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

1. De las 160 muestras de agua (100%) que se analizaron solo se obtuvieron tres cepas positivas de *Helicobacter pylori*, las cuales equivalen al 1,88 % del total de cepas que eran Gram negativas y curvas.
2. De 20 muestras de agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”, 2 muestras contenían las cepas de *Helicobacter pylori* a las cuales equivalen al 10 %.
3. De 140 muestras de agua provenientes de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata” y ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina, no se logró aislar ninguna cepa de *Helicobacter pylori*.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se debe continuar con la investigación de *Helicobacter pylori* en agua, utilizando otras pruebas como PCR o Inmunofluorescencia las cuales también permiten el hallazgo de esta bacteria.
2. Se debe tomar en cuenta los parámetros establecidos para el aislamiento y la incubación ya que es una bacteria microaerófila.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pueyo, A, Huarte, M y Jiménez, C. 1998. "Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*". Disponible en:
<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol21/suple2/suple2a.html>
2. Haeckel, R. 1996. "*Helicobacter pylori* infection. Part 1: Epidemiology, pathobiochemistry, diagnosis and therapy". Lab Med; 20: 78-84.
3. García-Campos, J.; Alarcón, T. y López-Brea, M. 2003. "La infección por *Helicobacter pylori*". Servicio de Microbiología. Hospital Universitario con la Princesa, Madrid.
4. Ramírez, A. 2006. "Epidemiología del *Helicobacter pylori* en el Perú". Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima-Perú. 2006. Disponible en:
URL: <http://www.siicsalud.com/dato/dat050/06n07000.htm>
5. Ramírez, A. 2007. "*Helicobacter pylori*". Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima - Perú. 2007. disponible en:
http://www.cmp.org.pe/documentos/librosLibres/tsmi/Cap12_Helicobacter_pylori.pdf
6. Agudo, S. 2010. "Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por *Helicobacter pylori*". [tesis doctoral]. Madrid-España. Universidad Complutense de Madrid. 2010. Disponice en:
<http://eprints.ucm.es/11520/>
7. Montero, V.; Hernández, A.; Masís, F. y Camacho, J. 2011. "Hallazgo de la bacteria *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y su relación con la incidencia de cáncer gástrico en costa Rica". Tecnología en marcha; 24: 3. Disponible en:
<http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835872.pdf>
8. Marín, R. 2010. "Características físicas, química y biológicas del agua". Disponible en:
http://api.eoi.es/api_v1_dev.php/fedora/asset/eoi:48101/componente48099.pdf
9. Catedra, S. 2010. "Agua el elixir de la vida". Universidad de Buenos Aires. Facultad de Biología. Argentina – Buenos Aires. Disponible en:
<http://www.elementalwatson.com.ar/Revista%201%20N%201b.pdf>
10. Thomas, JE. 1995. "Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*". En: López-Brea (ed.). *Helicobacter pylori*: microbiología, clínica y tratamiento. M. López-Brea (ed.). 1995. Mosby/Doyma.
11. Duna, BE; Cohen, H. y Blazer, M. 1997. "*Helicobacter pylori*". Clinical Microbiology Reviews. 4: 720-741.
12. Hernández, T. 2005. *Helicobacter pylori* "La bacteria que más infecta al ser humano", [citado 31 de mayo de 2005] 1(15). Disponible en:
http://www.bus.sld.cu/revistas/ali/vol15_1_01/ali07101.hnti.
13. López-Brea, M. 1999. "*Helicobacter pylori*, microbiología, clínica y tratamiento". Edit. Mosby/Doyna libros S.A. 1ª ed. Madrid. España.
14. Solnick, JV. Y Shauer, DB. 2001. "Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases". Clin Microbio Rev. 14: 386-393.
15. Murray, P.; Rosental, K.; Kobayashi, G. y Pfaller, M. 2002. "Microbiología médica". Edit. Elsevier Science. 4ª ed. Madrid. España.
16. Ramírez, MJ.; Rivas, S.; Cervantes, R. Mata, N. y Zárate, F. 1999. "Enfermedad acido péptica y *Helicobacter pylori* en pediatría". Acta Ped Mex. 12: 386-393.
17. Blazer, MJ. 1992. "*Helicobacter pylori*: its role in disease, Clin Infec Dis". 15: 386-393.

18. Kosumen, TU. Y Megraud, F. 1995 "Diagnosis of *Helicobacter pylori*". Curr Open Gastroenterol 1995; 11 (suppl 1): 5-10.
19. Diaz, L.; Torres, L. y Rodriguez, B. 2008. "Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*". Centro Nacional de Investigaciones científicas, La Habana-Cuba. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/med/vol48_1_09/med07109.htm
20. El-Omar, E.; Penman, I.; Cruikshank, G.; Dover, S.; Banerjee, S.; Williams, C. et al. 1994 "Low prevalence of *Helicobacter pylori* in inflammatory bowel disease; association with sulphasalazine". Gut, 35:1385-1388.
21. Harris, PR; Mobley, HL.; Perez-Perez, Gl.; Blazer, MJ. y Smith, PD. 1996 "*Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production", Gastroenterology; 111:419-425.
22. Eaton, KA.; Brooks, CL.; Morgan, DR. y Krakowka, S. 1991 "Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets". Infecí Immun; 59:2470-2475.
23. Wilson, KT.; Ramanujam, KS.; Mobley, HLT.; Musselman, RF.; James, SP. Y Meltzer, SJ. 1996. "*Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line". Gastroenterology; 111: 1524-1533.
24. Logan, RP.; Walter, MM.; Misiewicz, JJ.; Gummert, PA.; Karim, QN. Y Baron, JH. 1996. "Changes in the intragastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole". Gut; 36: 12-16.
25. Cave, DR. 1997. "Epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* infection". Gastroenterology. 113; S9-S14.
26. Banatvala, N.; Mayo, K.; Megraud, F.; Jennings, R.; Deeks. JJ. y Feldman, RA. 1993. "The cohort effect and *Helicobacter pylori*. Journal Infections Diseases".
27. Conislla, A. 2003. "Detección de *Helicobacter pylori* en saliva en pacientes con dispepsia, Lima". Tesis Facultad de Ciencias Biológicas, Ayacucho – Perú.
28. Aliaga, J. "Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con sintomatología alta de la población de Ayacucho 1998", Tesis Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho - Perú.
29. Ango, H. y Carrasco, A. 2005. "Inmunología". Impresión Mercantil Ayacucho. UNSCH. Ayacucho - Perú.
30. Aurazo, M. 1993. Metodología para el análisis Microbiológico de Aguas Residuales y Productos Agrícolas. Evaluación de riesgos para la salud por el uso de Aguas Residuales en Agricultura. CEPIS. OPS. OMS. Lima – Perú.
31. Valenzuela, W. Manual de Análisis Microbiológico de Aguas. Ministerio de Salud. Dirección general de Salud Ambiental. Lima – Perú.
32. Farace, M. y VIÑAS. M. 2007. "Manual de Procedimientos Para el Aislamiento y Caracterización de *Campylobacter spp*". Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del sur.
33. Agurto, T. 2009. Microbiología. Bioquímica Bacteriana. Universidad Ricardo Palma. 1ra Ed.
34. Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J. y Stanley, W. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9na ed. 1994.

ANEXOS

Anexo 1: Imagen de la tabla de la diferenciación de bacterias móviles, curvadas, Gram negativos y microaerófilas.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9					
Table 2.1 (continued)					
Characteristic	<i>Cellvibrio</i>	<i>Halovibrio</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Marinomonas communis</i> ^b
Predominant shape:					
Helical	—	—	—	—	—
Curved in one plane	+	—	—	—	+
Vibrioid	—	+	+	+ ^g	—
Cell diameter (μm)	0.2–0.5	0.5–0.8	0.5–1.0	0.6–0.7	0.7–1.5
Cultivable on inanimate laboratory media	+	+	+	+	+
Require host or host cells for cultivation	—	—	—	—	—
Predacious on other Gram-negative bacteria	—	—	—	—	—
Grows in periplasmic space of host cell					
Exoparasitic growth					
Predacious on eucaryotic algae	—	—	—	—	—
Structures morphologically resembling endospores are present	—	—	—	—	—
Usual arrangement of polar flagella	Mono-trichous	Mono-trichous	Multiple at one or both poles	1–3 at one or both poles	Monotrichous
Sheathed flagella present			+		—
Lateral flagella occur in addition to polar flagella	+ ^m	—	D ⁿ	—	—
Optimum growth temperature 5–9°C; maximum temperature 20°C	—	—	—	—	—
Pathogenic for humans or animals	—	—	+	—	—
Inhibited by 3.5% NaCl	—	—	+	+	—
Sea water or Na ⁺ required for growth	—	+	—	—	+
Requires at least 7% NaCl for growth; can grow with 28% NaCl	—	+	—	—	—
Nitrogenase activity under microaerobic conditions	—	—	—	+	—
Relation to oxygen under non-N ₂ -fixing conditions:					
Aerobic	+	+	—	+	+
Microaerophilic	—	—	+	—	—
Grows anaerobically by using H ₂ or formate as electron donor and fumarate as electron acceptor	—	—	—	—	—
Some carbohydrates catabolized	+	—	—	+	+
Glucose catabolized	+	—	—	+	+
Cellulose hydrolyzed	+	—	—	—	—
Urease	—	+	+	—	—
Habitat:					
Freshwater	—	—	—	—	—
Marine	—	—	—	—	+
Soil	+	—	—	+	—
Within plant roots	—	—	—	+	—
Humans and/or warm-blooded animals	—	—	+	—	—
Intestinal contents of tadpoles	—	—	—	—	—
Footnotes are at end of table					

Anexo 2: Resultados de la coloración Gram de las colonias con características culturales típicas de *Helicobacter pylori* de los ríos Alameda, Chacco, Huatatas y Muyurina. Ayacucho 2015-2016.

Mes de muestreo	Rio Alameda		Rio Chacco		Rio Huatatas		Rio Muyurina	
	Código de Cepa	Gram	Código de Cepa	Gram	Código de Cepa	Gram	Código de Cepa	Gram
Noviembre	RA11a	Cocos (+)	RC12a	Bacilos (-)	RH22a	Bacilos (-)	RM13a	Cocos (+)
	RA31a	Cocos (+)	-----	-----	-----	-----	RM21a	Cocos (+)
Diciembre	RA11a (a)	Cocos (+)	RC22a (a)	Cocos (+)	RH32a (a)	Cocos (+)	RM11a (a)	Cocos (+)
	RA31a (a)	Bacilos (-)	RC33a (a)	Cocos (+)	-----	-----	RM31a (a)	Cocos (+)
Enero	RA11a (b)	Cocos (+)	RC21a (b)	Cocos (+)	RH31a (b)	Bacilos (-)	RM21a (b)	Cocos (+)
	-----	-----	-----	-----	RH31b (b)	Cocos (+)	RM21b (b)	Cocos (+)

Col = colonia
RA = río Alameda
RC = río Chacco
RH = río Huatatas
RM = río Muyurina

Anexo 3: Proceso de obtención de muestras de agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totora”. Ayacucho 2016.



Anexo 4: Proceso de obtención de muestras de agua del rio Muyurina. Ayacucho 2016.



Anexo 5: Imagen del proceso de obtención de muestras de agua de la Planta Potabilizadora de Agua “Quicapata”. Ayacucho 2016.



Anexo 6: Flujograma de obtención de sangre desfibrinada de carnero.



1. Matraz de 500 mL
con perlas de
vidrio



2. Obtención de
sangre
directamente del
cuello del carnero

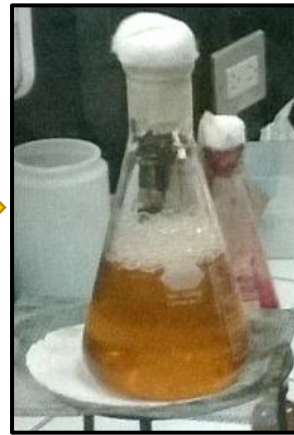


3. Sangre de carnero
en agitación

Anexo 7: Flujograma de la preparación del medio de cultivo Skirrow.



1. Pesar el Agar Base Columbia.



2. Disolver el Agar Base Columbia



4. Agregar la sangre desfibrinada al 5 %



3. Agregar 250 uL. de vancomicina y 625 uL. de trimetoprima



5. Placas con medio de cultivo Skirrow.

Anexo 8: Flujograma del aislamiento de *Helicobacter pylori*.



1. Toma de una asada de muestra de agua sedimentada.

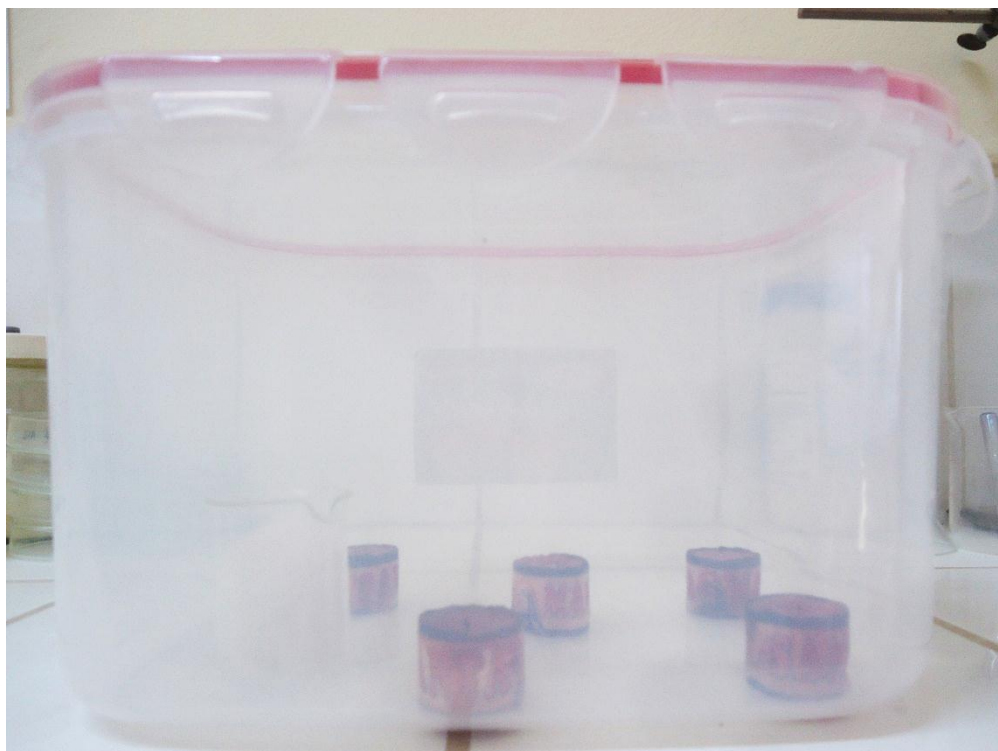


2. Siembra por agotamiento en superficie en placas con medio Skirrow.

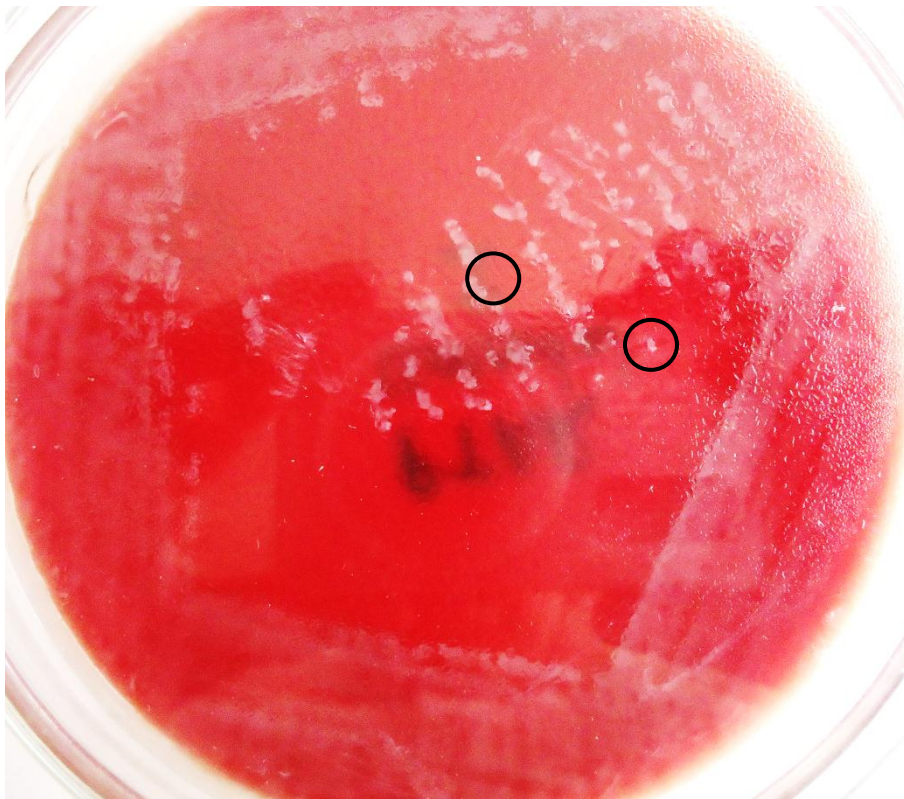


3. Incubar las placas petri a 37 °C por 7 a 10 días, con las condiciones necesarias para el crecimiento de *Helicobacter pylori*.

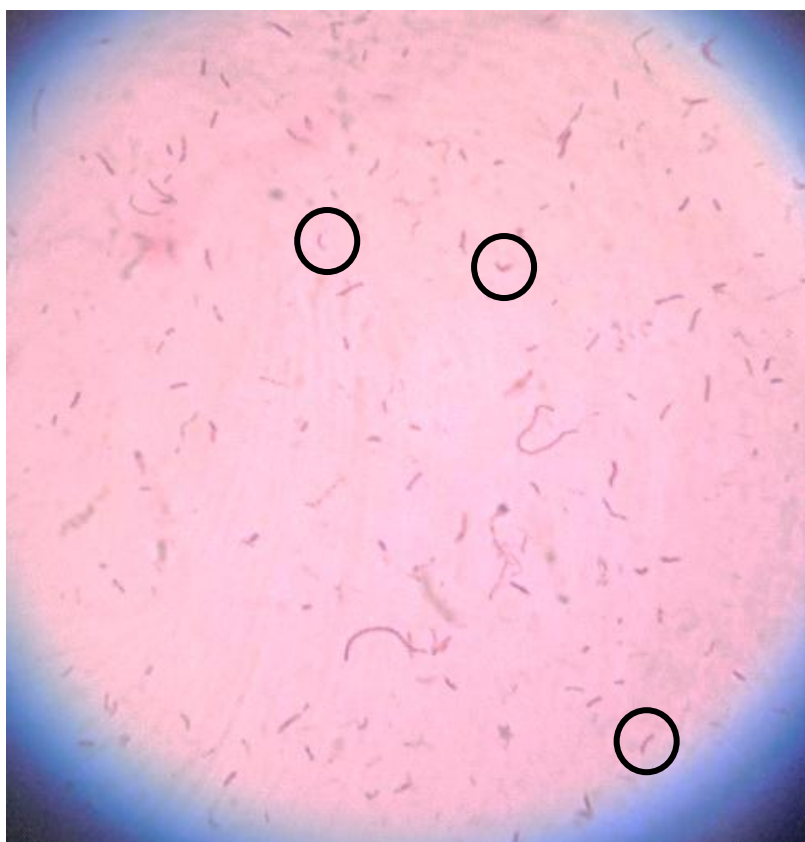
Anexo 9: Taper hermético acondicionado para darle condiciones microaerófilas a *Helicobacter pylori*.



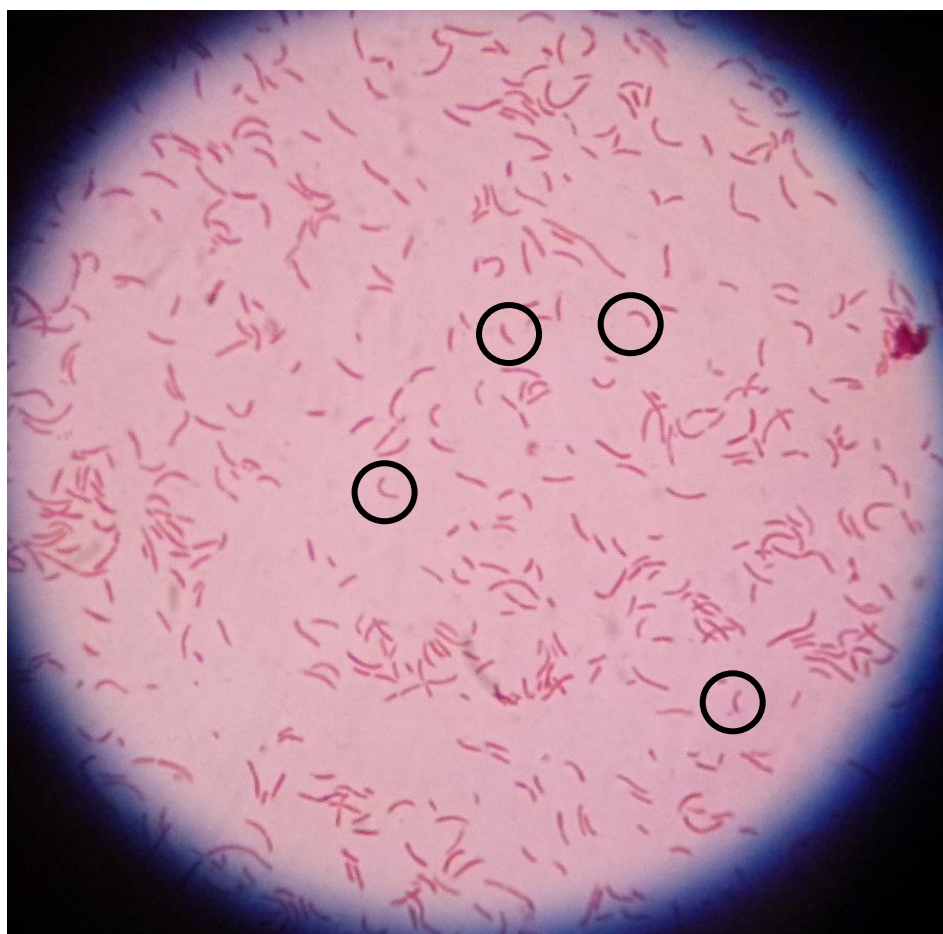
Anexo 10: Colonias con características culturales típicas de *Helicobacter pylori*.



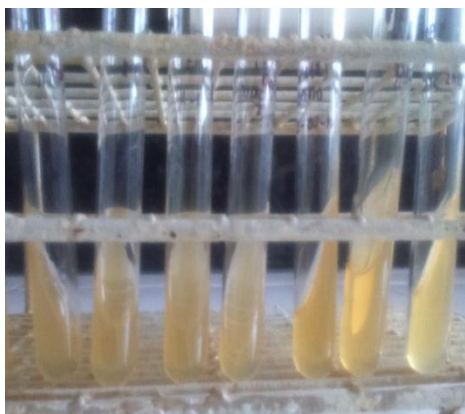
Anexo 11: Observación microscópica de *Helicobacter pylori* de la cepa PTARA3a (c) de la muestra de agua del efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2016.



Anexo 12: Observación microscópica de *Helicobacter pylori* de la cepa PTARE1a (c) de la muestra de agua del efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “La Totorá”. Ayacucho 2016.



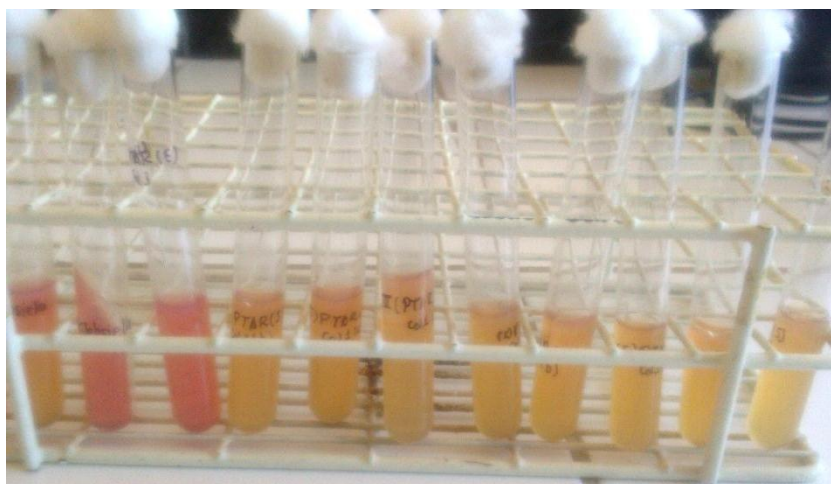
Anexo 13: Flujograma de la preparación del Agar Base Urea para la prueba de la ureasa



1. Tubos con Agar base urea

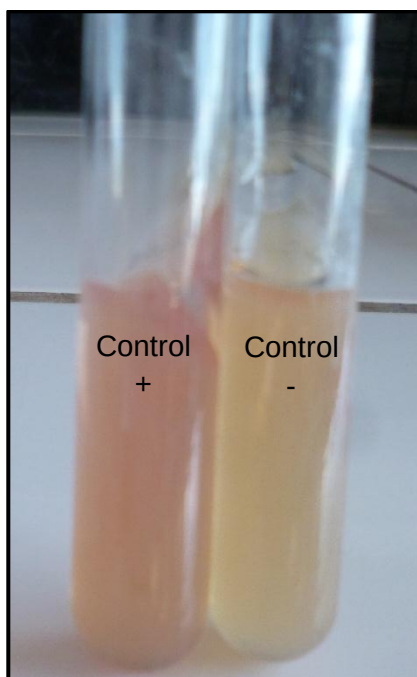
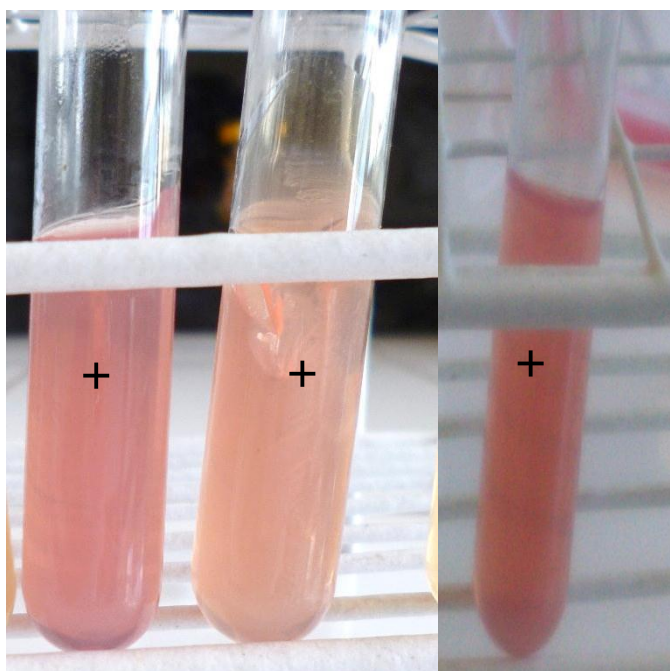


2. Inoculación de las colonias típicas en cada tubo.

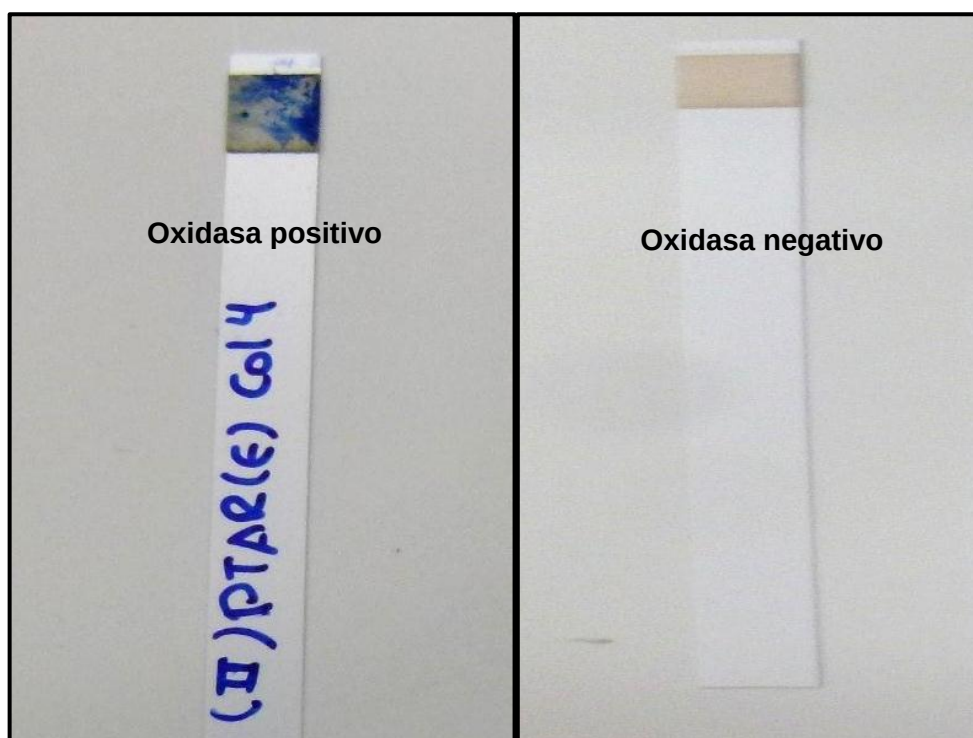


3. resultados de la prueba de la ureasa.

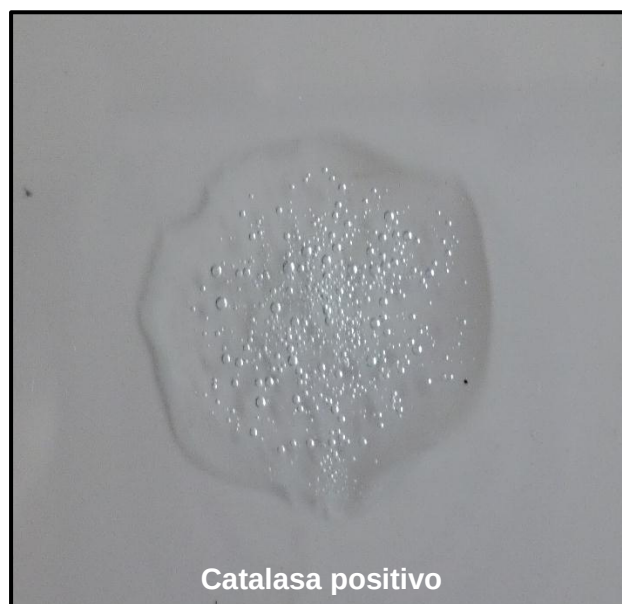
Anexo 14: Resultados de la prueba de ureasa de las cepas PTARA3a (c), PTARA4a (c) y PTARE1a (c) y controles positivo (*Klebsiella sp.*) y negativo (*Escherichia coli*). Ayacucho 2016.



Anexo 15: Resultado de la prueba de la oxidasa de la cepa PTARA3a (c) de la Planta de tratamiento de aguas residuales “La totora”. Ayacucho 2016.



Anexo 16: Resultado de la prueba de la catalasa de la cepa PTARA3a (c) de la Planta de tratamiento de aguas residuales “La totora”. Ayacucho 2016.



Anexo 16: Matriz de consistencia

Matriz de consistencia

Título: “Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua de consumo humano, naturales y residuales de la ciudad de Ayacucho, 2015-2016”.

Responsable: Bach. Sheyla Sayritupac Chihuán

Asesor: Dr. Blgo. Saúl Alonso Chuchón Martínez

Problema	Objetivos	Marco teórico	Variables e indicadores	Metodología
¿Habrá <i>Helicobacter pylori</i> en muestras de agua de consumo humano, naturales y residuales de la ciudad de Ayacucho?	Objetivo General: - Detectar <i>Helicobacter pylori</i> en muestras de agua de consumo humano, naturales y residuales de la ciudad de Ayacucho. Objetivos Específicos: - Detectar <i>Helicobacter pylori</i> en muestras de agua del afluente y efluente de las Planta Potabilizadora de Agua de la ciudad de Ayacucho. - Detectar <i>Helicobacter pylori</i> en muestras de agua de los ríos Alameda, Huatatas, Muyurina y Chacco. - Detectar <i>Helicobacter pylori</i> en muestras de agua del afluente y efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la ciudad de Ayacucho.	- Antecedentes - Agua - Características del agua - Clasificación del agua - Importancia del agua - Importancia del agua como medio de infección <i>Helicobacter pylori</i> - Historia - Biología de <i>Helicobacter pylori</i> - Microbiología, estructura y taxonomía de <i>Helicobacter pylori</i> - Factores patogénicos de <i>Helicobacter pylori</i> - Infección y transmisión de <i>Helicobacter pylori</i> - Enfermedades digestivas asociadas con <i>Helicobacter pylori</i> - Enfermedades digestivas asociadas con <i>Helicobacter pylori</i> - Diagnóstico de la infección de <i>Helicobacter pylori</i> - Epidemiología	Variables en estudio - Tipo de muestra de agua - Localidad - Presencia/ausencia de <i>Helicobacter pylori</i> Indicadores - Tiempo y temperatura de incubación - Medio de cultivo	1. Tipo de investigación Descriptivo 2. Análisis de datos Población 160 muestras de agua Técnicas - Para el aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i> se realizó la siembra por agotamiento en superficie. - Para la identificación de <i>Helicobacter pylori</i> se realizó la coloración Gram y las pruebas bioquímicas de ureasa, oxidasa y catalasa. Equipos Estufa, microscopio, etc.