



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA  
EXPERIMENTAL, A NIVEL DE LABORATORIO,  
PARA DETERMINAR LA REDUCCIÓN POR  
OZONO DE LA DENSIDAD CELULAR EN  
SUSPENSIONES COCIDES DE  
*HELICOBACTER PYLORI*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:  
**MARIE ANDRÉE PIERDANT GALLARDO**



MÉXICO, D. F.

Agosto 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***JURADO ASIGNADO:***

<b><i>PRESIDENTE:</i></b>	Profesor: Jorge Manuel Vázquez Ramos
<b><i>VOCAL:</i></b>	Profesor: Víctor Manuel Luna Pabello
<b><i>SECRETARIO:</i></b>	Profesor: María Teresa Orta Ledesma
<b><i>1er. SUPLENTE:</i></b>	Profesor: José Pedraza Chaverri
<b><i>2° SUPLENTE:</i></b>	Profesor: Martha Giles Gómez

***SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:***  
***Instituto de Ingeniería***

***asesor del tema:***  
***Dra. María Teresa Orta Ledesma***  
(nombre y firma)

***supervisor técnico:***  
***Dr. Ignacio Monje Ramírez***  
(nombre y firma)

***SUSTENTANTE (S):***  
***Marie Andrée Pierdant Gallardo***  
(nombre (s) y firma (s))

## I. ÍNDICE

---

I. ÍNDICE .....	3
II. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS .....	5
III. RESUMEN.....	6
IV. ANTECEDENTES.....	7
Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i> .....	7
Microbiología.....	8
Aislamiento y cultivo.....	8
Características microscópicas.....	9
Características macroscópicas.....	9
Pruebas bioquímicas.....	9
Formas cocoides de <i>Helicobacter pylori</i> .....	10
Condiciones para el desarrollo de formas cocoides.....	10
Formas cocoides y su relevancia patológica.....	11
Aspectos clínicos sobre <i>Helicobacter pylori</i> y enfermedades asociadas.....	12
Factores de riesgo.....	14
Vías de transmisión y fuentes de infección.....	15
Oral-oral.....	15
Gastro-oral.....	15
Fecal –oral.....	15
El agua como posible vehículo de transmisión de <i>Helicobacter pylori</i> .....	16
Evidencias de la transmisión acuática de <i>H. pylori</i> .....	16
Estrategias de supervivencia de <i>H. pylori</i> en ambientes acuáticos.....	17
Biopelículas.....	18
Estado viable no cultivable.....	19
Aspectos generales en la desinfección del agua.....	19
Métodos para la potabilización del agua.....	21
Demanda inmediata y concentración residual del desinfectante.....	21
Factor Ct.....	22
El ozono como desinfectante.....	22
Reacciones del ozono.....	23
Demanda de ozono.....	23
Modo de acción.....	24
Efectos sobre bacterias.....	25
Relevancia y antecedentes de la detección de <i>Helicobacter pylori</i> en fuentes acuíferas por PCR.....	26
V. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	28
VI. HIPÓTESIS.....	29
VII. OBJETIVOS.....	29
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares.....	29
VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	30
IX. METODOLOGÍA.....	31
Materiales y reactivos.....	31
Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> .....	32
Inducción de formas cocoides de <i>Helicobacter pylori</i> .....	32

Estabilidad y vida media del ozono en agua destilada .....	33
Demanda inmediata de ozono en una suspensión de formas cocoides de <i>H. pylori</i> .....	33
Desinfección de una suspensión de formas cocoides de <i>H. pylori</i> a diferentes concentraciones de ozono .....	34
Identificación de <i>Helicobacter pylori</i> por PCR punto final .....	34
Cuantificación relativa de <i>Helicobacter pylori</i> por PCR tiempo real .....	36
X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
Inducción de formas cocoides.....	38
Curva de decaimiento de ozono en agua destilada .....	40
Dosis de ozono necesaria para la desinfección de una suspensión cocoide de <i>Helicobacter pylori</i> .....	42
Análisis mediante PCR de las fases post-centrifugación de una muestra sin tratamiento de desinfección .....	48
Determinaciones preliminares mediante qPCR de la densidad celular infectiva en suspensiones de <i>H. pylori</i> tratadas con diferentes dosis de ozono.....	51
Propuesta final de la metodología para la reducción celular de suspensiones de formas cocoides de <i>Helicobacter pylori</i> tratadas con ozono y su análisis por qPCR.....	53
XI. CONCLUSIONES.....	55
XII. ANEXOS.....	57
Método A1. Cuantificación de ozono en fase acuosa por el método del índigo .....	57
Equipos .....	58
Reactivos.....	58
Procedimiento espectrofotométrico.....	58
Cálculo de la concentración de ozono.....	59
Diagrama de unidad de oxidación con ozono.....	60
Método A2. Propuesta de metodología para someter las suspensiones cocoides de <i>Helicobacter pylori</i> tratadas con ozono a análisis por qPCR .....	61
XIII. AGRADECIMIENTOS .....	62
XIV. BIBLIOGRAFÍA .....	63

## **II. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS**

---

**PCR**, Reacción en cadena de la polimerasa

**mpb** millones de pares de bases

**G** guanina

**C** citosina

**ADN** ácido desoxirribonucleico

**ARN** ácido ribonucleico

**kDa** kiloDaltones

**PMN** polimorfonucleares

**IL-8** interleucina 8

**MALT** tejido linfoide asociado a mucosa

**EPA** Environmental Protection Agency

### III. RESUMEN

---

Recientemente, la Oficina de Agua Bebestible y de Riego de la EPA ha incluido a *H. pylori* en su lista de microorganismos contaminantes, preocupación que refleja su posible transmisión por el agua. Por lo tanto, la potencial presencia de *H. pylori* en agua requiere del estudio de la eficacia de los procesos de tratamiento contra *H. pylori* en fuentes proveedoras de agua bebestible. Para ello, el uso de ozono ha tomado relevancia en los procesos desinfección, debido a su gran potencial oxidante comparado con otros desinfectantes y la rápida descomposición del ozono residual. De esta manera, es importante evaluar y optimizar la cantidad de ozono necesario para lograr los niveles requeridos de desinfección, en función de las características fisicoquímicas y microbiológicas de los procesos unitarios en cuestión. Así pues, el objetivo de esta investigación fue proponer una metodología que permita la reducción de la densidad celular infectiva de la forma cocoide de *H. pylori* por medio de ozono y su cuantificación. En este sentido, dado que el comportamiento del consumo de ozono, el cual puede ser caracterizado mediante la demanda de ozono inmediata (DI) y la constante de decaimiento ( $k_c$ ), varía de acuerdo a las características del agua que está siendo investigada, fue importante estudiar el comportamiento cinético de su decaimiento en las matrices de trabajo que convenían a los intereses de esta investigación. En la actualidad, el aislamiento de células de *H. pylori* a partir de aguas ambientales o bebestibles mediante cultivo no ha sido posible, lo cual puede ser debido a la transformación de esta bacteria al estado cocoide, lo cual representa una limitante en lo que respecta a una detección y cuantificación mediante técnicas clásicas de microbiología. Como resultado de esto, un gran número de investigaciones han propuesto como método de detección más viable a la filtración y posterior análisis por PCR. Considerando esta revisión y los resultados, se observó que el paso de centrifugación post desinfección con las condiciones empleadas en esta investigación no es el más adecuado para separar células íntegras de material lisado para su análisis por PCR. En este sentido, la filtración parece ser el método más conveniente de acuerdo a la experimentación que se ha realizado hasta el momento. En consecuencia, con el objetivo de establecer un método de detección más fiable, sugerimos someter las muestras que han sido tratadas con ozono a un procedimiento de filtración por membrana. Pese a que el método de qPCR para cuantificar *H. pylori* ha sido aplicado en el contexto clínico y de desinfección, intentos para utilizar esta tecnología en el análisis del efecto sanitizante del ozono sobre los niveles de formas cocoides de *H. pylori* en muestras de agua no fueron encontrados en la parte bibliográfica de esta investigación. Por lo tanto, en lo que concierne a la relevancia microbiológica y sanitaria de ésta, los resultados derivados de la misma representan la primera evidencia que demuestra la factibilidad de un tratamiento con ozono para reducir formas cocoides de *H. pylori*, y del análisis mediante qPCR para evaluar dicha reducción. De esta manera, los datos de los experimentos preliminares de qPCR presentados aquí son suficientes para concluir que tratamientos de ozono con dosis iniciales mayores a 0.4 mg/L de ozono pueden ser adecuadas para lograr reducir la densidad celular infectiva en muestras de agua.

#### IV. ANTECEDENTES

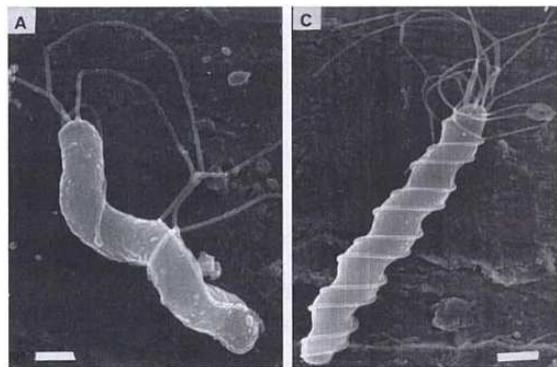
---

##### Generalidades de *Helicobacter pylori*

---

*Helicobacter pylori* fue aislada, por primera vez, de biopsias de tejido gástrico por Barry Marshall y Robín Warren en 1982 (Moblely *et al.*, 2001), a quienes les fue otorgado el premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 2005. Inicialmente este microorganismo fue llamado “organismo similar a *Campylobacter*”, “organismo gástrico similar a *Campylobacter*”, “*Campylobacter pylori*” y finalmente, en 1989, se estableció un nuevo género denominado *Helicobacter*, al cual fue asignado este microorganismo (Kusters *et al.*, 2006).

Las principales características taxonómicas que permitieron el surgimiento del nuevo género *Helicobacter* fueron las siguientes: presencia de flagelos polares envainados que proveen movilidad celular, un glicocálix externo producido *in vitro* en medio líquido, presencia en mayor proporción del isoprenoide menaquinona-6 (MK-6) y 35-44 % mol de contenido de G+C en su ADN cromosomal (Owen *et al.*, 1998).



**Figura 1.** Microscopía electrónica de *Helicobacter pylori* tomada de Mobley *et al.*, 2001

## Microbiología

---

El género *Helicobacter* pertenece a la subdivisión  $\epsilon$  de *Proteobacteria*, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae*. Esta familia incluye a los géneros *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira* y *Thiovulum*. El género *Helicobacter* incluye 20 especies reconocidas y están en espera de ser reconocidas 194, siendo *H. pylori* la especie que se encarga de colonizar a humanos (Kusters *et al.*, 2006).

### *Aislamiento y cultivo*

---

Si bien, las condiciones para el desarrollo de las diferentes formas morfológicas son diversas, en general la forma bacilar requiere, para un óptimo crecimiento, una concentración atmosférica de O<sub>2</sub> de 2-5 %, 5-10 % de CO<sub>2</sub>, alta humedad y una temperatura de 37 °C. A pesar de que su hábitat natural es en medio ácido (pH 4), se considera una bacteria neutrófila, ya que su crecimiento *in vitro* ocurre normalmente en un rango de pH de 5.5 a 8.0 (Kusters *et al.*, 2006). Por otra parte, la mayoría de las cepas alcanzan su máximo desarrollo entre 3 y 5 días, aunque algunos aislamientos requieren de 7 a 10 días de incubación, principalmente cuando se trabaja con un primer aislamiento (Saldivar, 2007).

Debido a que su desarrollo requiere de medios nutritivos complejos, es considerado un microorganismo fastidioso (Navarro *et al.*, 2007). Con el objetivo de incrementar su recuperación, estudios microbiológicos previos realizados con este microorganismo, reportan la necesidad de adicionar una mezcla de antibióticos (ácido nalidíxico, anfotericina B, Trimetoprim, Vancomicina, polimixina y bacitracina) principalmente cuando el aislamiento se realiza a partir de biopsias gástricas (Kusters *et al.*, 2006; Ortega, 2008; Saldivar, 2007).

### Características microscópicas

---

*Helicobacter pylori* es un bacilo gram negativo que mide de 0.5 a 1 µm de ancho y de 2 a 4 µm de largo, de forma helicoidal o espiral, aunque su morfología microscópica puede variar *in vitro*, ya que se han reportado las formas U, V y cocoide. Adicionalmente, *H. pylori* es un microorganismo microaerófilico que no forma esporas y posee de 4 a 6 flagelos polares en ramillete (Kusters *et al.*, 2006).

### Características macroscópicas

---

En placas de medio para prueba de *Haemophilus* (*Haemophilus Test Medium*, HTM) suplementado con 7% de suero de caballo, el microorganismo presenta colonias de <1 mm, circulares de borde entero o definido, grisáceas y translúcidas (Ortega, 2008). En agar sangre de carnero se aprecian colonias de color gris de alrededor de 1-2 mm de diámetro, circulares, convexas y translúcidas, observándose una ligera beta-hemólisis (Owen *et al.*, 1998; Kusters *et al.*, 2006).

### Pruebas bioquímicas

---

*H. pylori* es inactivo en la mayor parte de las pruebas bioquímicas convencionales. Los carbohidratos no son oxidados ni fermentados. Al producir *H. pylori* catalasa y citocromo oxidasa, se realiza la prueba de identificación de estas enzimas, sin embargo las pruebas bioquímicas más recurrentes son la producción de ureasa y actividad de fosfatasa alcalina. (Owen *et al.*, 1998; Cervantes, 2006).

## Formas cocoides de *Helicobacter pylori*

---

Todos los organismos vivos disponen de mecanismos que les permiten extender su supervivencia en ambientes adversos. Para algunos de ellos esta respuesta implica, además de adaptaciones metabólicas, cambios en su morfología celular.

Por ejemplo, para el caso de *H. pylori*, estudios previos han reportado la nula capacidad de aislamiento de este microorganismo a partir de muestras ambientales. Esta característica se debe a una respuesta de estrés, que es inducida cuando el microorganismo se encuentra en condiciones no favorables para su desarrollo. En este sentido, se ha reportado que las poblaciones de *H. pylori* que se encuentran naturalmente en el medio ambiente, como pueden ser suelos y fuentes acuíferas, tienen una capacidad para entrar rápidamente a un estado viable pero no cultivable (VNC) (Adams *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2008). Es por ello que *H. pylori* puede ser aislado mediante técnicas de laboratorio de rutina, únicamente cuando este microorganismo se encuentra en un contexto infeccioso, es decir en su forma bacilar.

## Condiciones para el desarrollo de formas cocoides

---

Se sabe que *Helicobacter pylori* se encuentra en forma espiral-bacilar en el huésped humano (Azevedo *et al.*, 2007), sin embargo, como consecuencia del tratamiento con antibióticos como amoxicilina o inhibidores de la bomba de protones, la forma bacilar de *H. pylori* puede transformarse a una forma intermedia en forma de "U" antes de pasar a una estructura cocoide (Nilson *et al.*, 2002).

Las formas cocoides también se pueden desarrollar cuando las formas bacilares se exponen a determinadas condiciones de estrés ambiental como: aerobiosis, pH alcalino, cambios de temperatura e incubación prolongada en medios con pocos nutrientes. Se ha visto que las formas

cocoides son el resultado de una incubación prolongada en agua, y esta puede ser una ruta de infección en países en vías de desarrollo (Cole *et al.*, 1997; Nilson *et al.*, 2002).

La transformación *in vitro* de la forma bacilar de *H. pylori* a la forma U y subsecuentemente a la forma cocoide, se inicia con el crecimiento interno del periplasma en un sitio de la bacteria. Las primeras etapas de las formas cocoides conservan la membrana celular, y los flagelos bacilares (Benaïssa *et al.*, 1996); desarrollando a los tres meses su propia membrana celular, citoplasma y pared celular, lo que le confiere una mayor resistencia (Mobley *et al.*, 2001).

A su vez, las formas cocoides han sido subdivididas por Nilson y cols. (2002) en formas intactas (IC) y degenerativas (DC), dependiendo de la densidad y tamaño de su citoplasma. El cuerpo citoplasmático de las formas IC es de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 3 a 4  $\mu\text{m}$  en las formas DC, estas últimas con un cuerpo citoplasmático menos denso comparado con las IC (Mobley *et al.*, 2001).

### Formas cocoides y su relevancia patológica

---

En 1996, Cole y cols. reportaron que la colonización por formas cocoides de *H. pylori* se encuentra asociada a graves daños de las células del epitelio gástrico, identificando formas cocoides de *H. pylori* alrededor de tumores gástricos, en el 93% de biopsias tomadas a pacientes con adenocarcinoma.

Por otro lado Shahamat y cols. (1993) indicaron la persistencia de formas cocoides en ambientes acuáticos y otros autores han reportado que son capaces de mantener metabolismo oxidativo y respiración celular hasta por 250 días cuando son mantenidas en medios con pocos nutrientes a 4 °C, aunque toda actividad respiratoria se pierde al incubarse por 24 h a 37 °C (Gribbon *et al.*, 1995; Nilson *et al.*, 2002; Cellini *et al.*, 1998; Mobley *et al.*, 2001).

Dado que las formas cocoides tienen la capacidad de mantener estructuras y elementos funcionales necesarios para la viabilidad, se ha sugerido que esta morfología podría representar unos de los estadios del ciclo biológico de *Helicobacter pylori* (Benaïssa *et al.*, 1996)

Estudios previos han demostrado que la actividad ureasa de las formas cocoides de *H. pylori* es menor que la presente en formas bacilares (Benaïssa *et al.*, 1996), sin embargo estas diferencias no son determinantes para impedir la capacidad de colonización gástrica de las primeras (Benaïssa *et al.*, 1996). En este contexto, una inoculación de ratones con formas cocoides y bacilares de *H. pylori* por vía oral confirmó que las formas cocoides son capaces de colonizar la mucosa gástrica y además de reconvertirse a bacilos (She *et al.*, 2003), siendo la acidez gástrica un factor esencial para este cambio morfológico (Mizoguchi *et al.*, 1998). Adicionalmente Chaput *et al.* (2006) y Nagai *et al.* (2007) demostraron que la conversión de *H. pylori* a su forma cocoide en las células gástricas e intestinales estimula el sistema inmune del hospedero, indicando que la morfología cocoide es una forma viable y activa de la bacteria.

Los datos presentados anteriormente, apoyan la hipótesis de que las formas VNC (viables no cultivables) de *H. pylori* pueden ser infecciosas, por lo tanto, la morfología de este organismo tiene implicaciones importantes en la epidemiología y la prevención de enfermedades asociadas.

### Aspectos clínicos sobre *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas

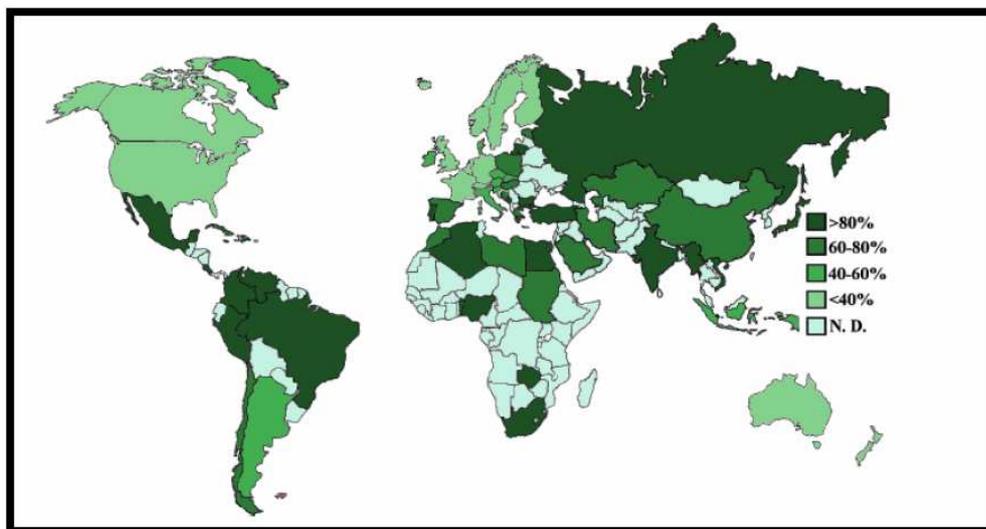
---

*Helicobacter pylori* es ampliamente reconocido como un patógeno gastrointestinal y un agente causante de gastritis superficial crónica, un factor contribuyente importante a la patogénesis de úlceras duodenales (Eurogast, 1993; Jerris, 1995). Puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico, a tal grado de ser clasificado como carcinógeno de clase I por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la

Salud (OMS) (De la vega, 2005). Actualmente, la infección por *H. pylori* es reconocida como una de las infecciones más comunes en humanos (Graham, 1994).

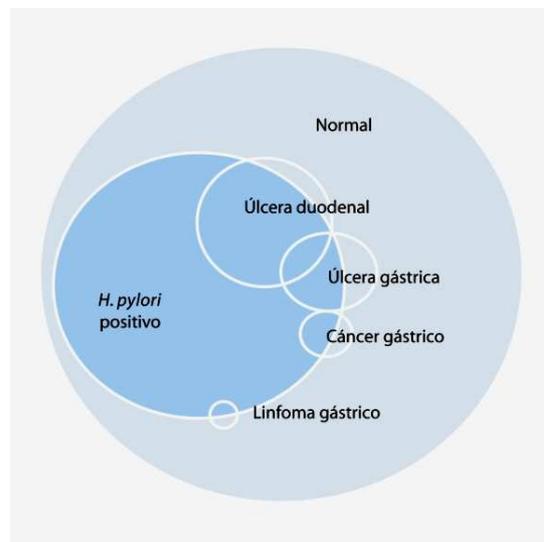
La epidemiología de la infección por *H. pylori* es aparentemente diferente entre países desarrollados y en vías de desarrollo, ya que la prevalencia total está altamente relacionada con las condiciones socio-económicas de las poblaciones (Figura 2). De esta manera, los países en desarrollo mantienen una alta prevalencia (70-90%) con una rápida adquisición en la infancia, mientras que en países desarrollados la prevalencia es menor (25-50%), donde la infección se adquiere en etapas de desarrollo tardías. En ambos casos, se ha encontrado que las tasas de infección incrementan en función de la edad del individuo (Olaya, 2008).

Estudios en México, en los cuales se mide la presencia de *Helicobacter pylori* mediante análisis inmunológicos, indican que el 20% de los niños son seropositivos para *H. pylori* a la edad de 1 año y el 50% están infectados a la edad de 10 años. Además, más del 80% de los adultos son seropositivos a la edad de 25 años (Torres *et al.*, 1998).



**Figura 2. Mapa de seroprevalencia de *H. pylori* en humanos a nivel mundial (Tomado de Azevedo *et al.*, 2007).** N.D. indica los países donde no se ha hecho un estudio consistente sobre la prevalencia de *H. pylori*

A pesar de la cantidad de personas que se encuentran colonizadas por *H. pylori*, se estima que los pacientes *H. pylori* positivos tienen de 10 a 20% de riesgo de desarrollar la enfermedad de úlcera gástrica y un riesgo del 1 al 2% de desarrollar cáncer gástrico distal (Kusters *et al.*, 2006). El riesgo del desarrollo de estos trastornos y la gravedad de los mismos en presencia de *H. pylori* están asociados a la suma de varios factores provenientes del huésped, factores ambientales y características genéticas de la bacteria (González, 2004; Cervantes, 2006).



**Figura 3. Epidemiología y enfermedades asociadas a *Helicobacter pylori* (Tomado de Marshall, 2002).** El círculo más grande representa toda la población dentro de la cual existe un grupo que están infectados con *H. pylori*. La mayoría de las personas que desarrollan úlcera duodenal, úlcera gástrica, cáncer gástrico y linfoma gástrico están infectados con *H. pylori*. Estas enfermedades son muy poco frecuentes en personas no infectadas.

### Factores de riesgo

---

Inicialmente, la alta prevalencia de *H. pylori* en los países en desarrollo sugería una predisposición genética para la infección, sin embargo, la epidemiología global muestra que el nivel de vida es el factor de riesgo más importante (Marshall *et al.*, 2005). En consecuencia, un

bajo nivel socioeconómico y educativo, higiene deficiente, hacinamiento y edad, son los factores de riesgo que han sido asociados a la infección por *H. pylori* (Ortega, 2008).

### Vías de transmisión y fuentes de infección

---

El mecanismo exacto mediante el cual *H. pylori* es adquirido es, en gran medida, desconocido. Aunque rara vez ha podido ser aislada de mascotas, se ha observado que solo hombres y primates pueden ser infectados por esta especie, por lo que se ha concluido que la infección por *H. pylori* es la consecuencia de la transmisión directa de humano a humano (Kusters *et al.*, 2006).

En relación a su transmisión, tres vías se han propuesto: oral-oral, gastro-oral y fecal-oral (Ortega, 2008; Kusters *et al.*, 2006; Alcántara, 2007; Olaya, 2008).

**Oral-oral:** La base de tal propuesta ha sido el hallazgo de la detección, mediante PCR, de ADN de *Helicobacter* en la placa dental, así como las reacciones positivas de ureasa en muestras de saliva. Las razones que dan soporte a esta vía son las siguientes: 1) recambio constante de la mucosa gástrica; 2) presencia de *H. pylori* en jugo gástrico, 3) reflujo de jugo gástrico que puede alcanzar la cavidad oral y por lo tanto colonizarla y 4) presencia de *H. pylori* en saliva.

**Gastro-oral:** Es la menos común y se sustenta en los argumentos de la vía oral-oral, además del hecho de que el reflujo y el vómito pueden ser los mecanismos por los cuales *H. pylori* sale eventualmente del estómago. También es conocida como vía iatrogénica ya que ocurre a través del contacto entre los tubos o endoscopios infectados y la mucosa gástrica de pacientes. Esta posibilidad se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con el manejo y desinfección inadecuada de algunos gastroscopios.

**Fecal –oral:** Esta vía sustenta fuertemente la mayor prevalencia de *H. pylori* en países en desarrollo, cuyo patrón guarda cierto paralelismo con la tasa de enfermedades diarreicas en estos

mismos países. Los argumentos que apoyan esta vía de transmisión son los siguientes: 1) presencia de *H. pylori* en jugo gástrico, 2) el jugo gástrico y por lo tanto su contenido de *H. pylori* son eliminados a través del intestino 3) capacidad de sobrevivencia de *H. pylori* en heces y, por consecuencia, puede ser eliminado al ambiente, y finalmente 4) las heces y los alimentos contaminados pueden ser el vehículo de transmisión, siguiendo el modelo de *Shigella* o *Salmonella typhi*. Adicionalmente, se ha demostrado que la transmisión a través de agua contaminada con *H. pylori* ocurre con una prevalencia importante en países en desarrollo (Kusters *et al.*, 2006).

### El agua como posible vehículo de transmisión de *Helicobacter pylori*

Una variedad de métodos moleculares y ensayos con anticuerpos han sido utilizados para detectar la presencia de *Helicobacter pylori* en pozos, ríos, agua de consumo humano, *biofilms* asociados, tanques de almacenamiento de agua y tuberías de redes de distribución (Montero, 2009; Bracança *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2003). Estudios recientes han evidenciado que el ambiente acuático puede ser un reservorio de *H. pylori* (Park *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2001; Mazari *et al.*, 2001; Shahamat *et al.*, 1993), sin embargo, no se ha podido explicar con exactitud su vía de transmisión.

### Evidencias de la transmisión acuática de *H. pylori*

Las primeras evidencias sobre la ruta de transmisión acuática de este microorganismo a humanos fueron aportadas por estudios epidemiológicos realizados en algunos países en vías de desarrollo como Perú, Colombia, Chile y Venezuela.

En Perú, Hulten y cols. (1996) estudiaron la asociación entre la prevalencia de *H. pylori* en niños 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 *H. pylori* del 69%, incrementando las tasas de infección con el uso de arroyos como fuente de agua potable, además de utilizar agua contaminada en el riego de verdura y hortalizas crudas, especialmente lechuga (Goodman *et al.*, 1996).

En Venezuela, Domínguez y cols. (2002) encontraron que la frecuencia de infección por *H. pylori* es significativamente más alta (96 %) durante los meses de lluvia, sugiriendo que esto podría ser debido a un aumento en la densidad bacteriana y/o a cambios de formas cocoides en estado de latencia a formas bacilares en división celular.

En Japón se hicieron estudios en agua de río y se examinó la prevalencia de la bacteria en niños que asistían a jardín de niños y guarderías ubicados en las cercanías de los ríos estudiados. En este sentido Fujimora y cols. (2004), encontraron que la presencia de *H. pylori* en estos ríos estuvo estrechamente relacionada a los asentamientos humanos, concluyendo que el agua de río puede ser un factor de riesgo para la transmisión de la bacteria a humanos.

Los resultados que aportan estos estudios indican el importante papel del agua en la transmisión de diferentes especies de *Helicobacter*. Probablemente el agua es un intermediario en la transmisión fecal-oral, actuando como un reservorio, en el cual la bacteria puede permanecer por períodos prolongados antes de su uso como agua potable.

### Estrategias de supervivencia de *H. pylori* en ambientes acuáticos

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar las estrategias de supervivencia de las bacterias patógenas como *H. pylori* en ambientes acuáticos. La formación de biopelículas y el

estado viable no cultivable (VNC) han sido las estrategias más importantes reportadas para este microorganismo (Fernández, 2008).

### *Biopelículas*

---

Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos adheridas a superficies o asociadas a interfases aire-líquido (Davey y O'toole, 2000). La supervivencia de microorganismos patógenos, incluyendo *H. pylori*, puede ser prolongada a través de la formación de biopelículas como las que se encuentran en los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable. Las biopelículas le proporcionan a la microbiota asociada, un sustrato que le permite su multiplicación, la adquisición de nutrientes, el mantenimiento de un ambiente fisicoquímico apropiado y la resistencia a agentes antimicrobianos (Park *et al.*, 2001; Davey y O'toole, 2000; Fernández, 2008). Existen estudios *in vitro* con *H. pylori* que demuestran su capacidad de formación de biopelículas en medios de cultivo. Esta capacidad podría representar una estrategia de supervivencia que permite a la bacteria continuar en el ambiente en un estado latente (Cole *et al.*, 2004).

Existen numerosas investigaciones que demuestran la formación de biopelículas en sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable en las cuales se encuentra participando *H. pylori*. Por ejemplo, Azevedo y cols. (2003) demostraron que *H. pylori* puede formar biopelículas en conjunto con otros microorganismos en un modelo de sistema *in vitro* de agua potable. Adicionalmente, Park y cols. (2001) también detectaron por PCR la presencia de *Helicobacter sp.* en una biopelícula de agua potable tomada de un sistema municipal de distribución de agua localizado en Escocia. Sin embargo, la detección por PCR no fue confirmada por secuenciación y no excluye la posibilidad de falsos positivos. Por otro lado, Bunn y cols. (2002) y Watson y cols. (2004) demostraron la presencia del ADN de *H. pylori* en material de biopelículas de sistemas de

distribución de agua, mediante la confirmación de la secuencia del gen 16S del ARNr. Estos resultados evidencian que el agua potable puede ser una ruta de transmisión de *H. pylori* y que las biopelículas pueden actuar como ambientes de acumulación de especies de *Helicobacter* o como un reservorio importante de infección.

### *Estado viable no cultivable*

Al entrar en contacto con el agua, *H. pylori* es capaz de adoptar el estado VNC, transformándose de la forma típica de espiral a una forma cocoide (Oliver, 2005; Bellack *et al.*, 2006). Azevedo y cols. (2008) evaluaron la viabilidad de diferentes especies de *Helicobacter* en agua en condiciones *in vitro* mediante técnicas de cultivo y de integridad de la membrana. Estos autores demostraron que diferentes cepas de *Helicobacter* pueden sobrevivir en agua por periodos prolongados, observando que *H. pylori* posee el mayor tiempo de supervivencia, sin encontrar diferencias entre especies gástricas y enterohepáticas. La determinación de la viabilidad de *H. pylori* en el agua ha sido difícil, debido a que los métodos usados no diferencian entre células vivas y muertas (Bellack *et al.*, 2006; Queralt y Araujo, 2007).

### Aspectos generales en la desinfección del agua

Debido a la importancia que tiene el agua en la vida del hombre, el agua contaminada se convierte en un medio con gran potencial para transmitir una amplia variedad de enfermedades. Debido a las consecuencias en la salud que provoca la contaminación microbiana del agua, la protección de los recursos hídricos, la selección y aplicación de una serie de operaciones de tratamiento, debe ser siempre un objetivo primordial y nunca deben comprometerse (OMS, 2006; EPA, 1999). En países desarrollados las enfermedades de origen hídrico son raras, debido a la

presencia de sistemas eficientes de abastecimiento del agua y tratamiento de agua residual. Sin embargo, en países en vías de desarrollo no existen los mecanismos adecuados de abastecimiento seguro y saneamiento de este vital recurso (Tebbut, 1998). Se estima que México genera alrededor de 236 m<sup>3</sup>/s de agua residual municipal, de los cuales se tratan solo 117.3 m<sup>3</sup>/s (INEGI, 2008).

De acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994, se entiende por desinfección a la destrucción de organismos patógenos por medio de la aplicación de productos químicos o procesos físicos. La EPA (1999) define a la desinfección como un mecanismo primario para la inactivación/destrucción de organismos patógenos, como prevención de enfermedades relacionadas con el agua contaminada. La desinfección constituye una barrera eficaz para numerosos patógenos (especialmente bacterias) durante el tratamiento del agua de consumo y debe utilizarse tanto en aguas superficiales como en aguas subterráneas expuestas a la contaminación fecal (OMS, 2006).

El abastecimiento de agua para uso y consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales y otras (NOM-127), por lo tanto, las medidas destinadas a mejorar la calidad del agua de consumo proporcionan beneficios significativos para la salud. La NOM-127-SSA1-1999 define que, el agua para uso y consumo humano es aquella que no contiene contaminantes objetables, ya sean químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos al ser humano. De igual forma, la OMS (2006) define al agua potable como aquella que no representa ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda una vida.

## Métodos para la potabilización del agua

---

La potabilización del agua proveniente de una fuente en particular debe fundamentarse en estudios de calidad y pruebas de tratabilidad a nivel de laboratorio para asegurar su efectividad. Se deben aplicar los tratamientos específicos dependiendo de los contaminantes biológicos, las características físicas y los constituyentes químicos del agua (NOM-127-SSA1-1994). De acuerdo con la EPA (1999) los microorganismos patógenos de interés en el tratamiento del agua se pueden dividir en tres categorías: bacterias, virus y protozoo.

La forma en que se puede llevar a cabo la desinfección del agua es a través de procesos físicos como la sedimentación natural o con ayuda de coagulantes, retención sobre membranas (ultrafiltración, nanofiltración u ósmosis inversa), ebullición, exposición a luz solar o luz ultravioleta, ultrasonificación, radiación con rayos gamma o magnética; o bien a través de procesos químicos como el tratamiento con cloro y sus derivados, yodo, bromo, cobre, plata, ferratos, ácidos, álcalis, ozono o permanganato de potasio (Trujillo, 2006; Ayala, 2007).

## Demanda inmediata y concentración residual del desinfectante

---

Para lograr la desinfección, se dosifica el agente activo a niveles conocidos, los cuales decrecen luego de un periodo de contacto. Cabe mencionar que para producir el efecto desinfectante, el agente activo sólo debe ser consumido parcialmente para generar de esta manera un residual. A esta variación, entre el nivel de agente añadido luego de la dosificación y el nivel del agente residual al primer minuto de tiempo de contacto se le denomina “demanda inmediata” (EPA, 1999; Trujillo, 2006). En función a estos parámetros, es necesario establecer para cada sistema de trabajo, una correlación entre la demanda inmediata y la concentración residual, con el objetivo

de mantener durante el tiempo de desinfección la concentración del agente desinfectante que permita la reducción de la densidad celular a niveles no dañinos para la salud humana.

## Factor Ct

---

Uno de los factores más importantes para determinar o predecir la eficiencia germicida de cualquier desinfectante es el factor Ct, el cual es definido como el producto de la concentración del desinfectante “C” (mg/L) y el tiempo de contacto “t” (min) requerido para inactivar cierto porcentaje de la población bajo condiciones específicas de pH y temperatura. Este valor es un parámetro para el control de microorganismos, endotoxinas y pirógenos (Trujillo, 2006; Yannuzzi, 1991).

## El ozono como desinfectante

---

La capacidad del ozono como desinfectante de agua contaminada fue reconocida en 1886 por Meritens. En 1889, el químico francés Maruis Paul Otto hizo los primeros estudios con ozono en la Universidad de París. La primera aplicación a escala industrial para el tratamiento de agua fue en 1893 en Holanda, y a partir de ese momento se extendió su uso en Europa. En 1906 en Niza, Francia, se construyó la primera planta de tratamiento de agua por ozono pero, durante la Primera Guerra Mundial, al ser descubierto el cloro, éste sustituyó al ozono por su menor costo (Le Paulouë y Langlais, 1999).

El ozono es un potente oxidante, desinfectante y desodorizante. El ozono es el estado alótopo del oxígeno en el que cada molécula se compone de tres átomos del mismo ( $O_3$ ). A temperatura y

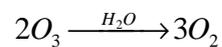
presión ambientales el ozono es un gas de olor picante e incoloro, que en grandes concentraciones puede volverse azulado (Ayala, 2007; Yannuzzi, 1991).

## Reacciones del ozono

---

Existen diversas tecnologías para generar ozono, dentro de las cuales las dos de mayor aplicación son la irradiación con rayos UV y la descarga corona. Esta última es la que logra una mayor concentración del ozono en aire u oxígeno y por ende la más conveniente en los generadores industriales. En el proceso de generación se hace circular el gas conteniendo oxígeno (por ejemplo aire seco) por un espacio en donde se aplicará un fuerte campo eléctrico. Esa energía produce la disociación del oxígeno que se recombina con nuevas moléculas para formar ozono (Yannuzzi, 1991).

Cuando se añade ozono al agua, se convierte rápidamente en oxígeno:



La descomposición del ozono en agua (considerando ausencia de contaminantes) se produce por recombinación con sí mismo para transformarse nuevamente en oxígeno. A causa de este fenómeno, no persiste en el efluente tratado ningún compuesto químico residual que pueda requerir eliminación como en el caso del cloro residual. La ozonación no produce sólidos en disolución y no se ve afectada por el pH del agua a tratar (EPA, 2002; Romero, 2005).

## Demanda de ozono

---

El comportamiento de consumo de ozono es un aspecto muy importante en los procesos de desinfección con ozono, ya que es el ozono mismo el principal responsable para inducir la inactivación de microorganismos, aunque una pequeña cantidad del radical OH puede ser

generada dependiendo de los parámetros de calidad del agua así como de los tipos y las cantidades de materia orgánica disuelta (DOM, por sus siglas en inglés), el pH, etc. (Cho *et al.*, 2003). Los comportamientos de consumo de ozono, los cuales pueden ser caracterizados mediante la demanda de ozono inmediata (IOD) y la constante de decaimiento de ozono de pseudo primer orden ( $K_c$ ), son reconocidos por diferir enormemente dependiendo de las características del agua que está siendo estudiada (Cho *et al.*, 2003). Ya que estos comportamientos de ozono pueden variar significativamente en aguas tratadas mediante diferentes procesos unitarios en plantas de tratamiento de agua potable, la posición relativa del proceso de ozonación dentro de las series de procesos unitarios usados para tratar el agua es uno de los mayores factores que afectan las eficiencias de desinfección de los procesos de ozonación (Choi *et al.*, 2007). Adicionalmente, es altamente recomendable la realización de experimentos previos a cualquier experimento de desinfección con ozono para determinar estos comportamientos.

Lo importante es alcanzar una concentración suficiente para el tratamiento deseado. Una vez incorporado en el seno del líquido, el ozono debe permanecer durante cierto tiempo para lograr su efecto oxidante. La vida media del ozono disuelto es generalmente superior a ese requerimiento. En agua neutra y a temperaturas que rondan los 18 °C el ozono tendrá una vida media de 20 min, y al paso del tiempo el residuo final será solo oxígeno (Yannuzzi, 1991).

### Modo de acción

---

El ozono es 25 veces más efectivo que el ácido hipocloroso y 2500 a 3000 veces más potente y rápido que el hipoclorito de sodio (Trujillo, 2006). Cuando el ozono se descompone en agua, los radicales hidropéroxido ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) y superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) generan la formación del radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ )

que tienen gran capacidad de oxidación y desempeñan un papel activo en el proceso de desinfección (Khadre *et al.*, 2001; EPA, 2002). En general se cree que las bacterias son destruidas debido a la oxidación protoplasmática, dando como resultado la desintegración de la pared de la célula (fisuramiento o lisis de la célula) (Khadre *et al.*, 2001). La eficacia de la desinfección depende de la susceptibilidad de los organismos a ser tratados, del tiempo de contacto y de la concentración de ozono (EPA 2002; Khadre *et al.*, 2001).

*Efectos sobre bacterias:* La muerte bacteriana puede estar dada directamente por los cambios en la permeabilidad celular, posiblemente seguida de ruptura celular (Scott *et al.*, 1963). La membrana parece ser el primer sitio de ataque del ozono, por la vía de las glucoproteínas o glucolípidos o a través de ciertos aminoácidos, como triptófano (Khadre *et al.*, 2001). Lesher y Scott (1963) indican que el ozono ataca la superficie celular alterando la permeabilidad de la membrana, hasta la lograr eventualmente la lisis y por lo tanto el contenido celular queda expuesto.

El ozono también interrumpe la actividad enzimática de las bacterias actuando sobre los grupos sulfhidrilo en ciertas enzimas. El ozono actúa sobre los ácidos nucleicos *in vitro*, fragmenta al ADN por oxidación y reduce la habilidad de transformación, además disminuye la transcripción. Christensen y Giese (1953) y Scott y Lesher (1963) mostraron que el ozono afecta purinas y pirimidinas en los ácidos nucleicos; pero solo son afectados cuando estos han sido liberados al medio después de la lisis celular.

## Relevancia y antecedentes de la detección de *Helicobacter pylori* en fuentes acuíferas por PCR

---

Dada la gran especificidad y sensibilidad de la técnica de PCR se ha abierto una nueva etapa de diagnóstico y detección para los microorganismos de difícil cultivo como es el caso de *Helicobacter pylori*. De esta manera, los intentos sin éxito para cultivar *H. pylori* a partir de muestras ambientales de agua han llevado al uso de métodos moleculares para detectar e identificar este microorganismo. Muchos artículos han publicado el uso de la PCR convencional para detectar *H. pylori* en diferentes tipos de agua, incluyendo agua de riego, agua superficial, agua bebestible tratada y no tratada, agua marina, así como biopelículas. La EPA ha estado considerando la regulación de *H. pylori* para agua de consumo en los Estados Unidos, sin embargo requiere la obtención de mayor información concerniente a su prevalencia. El uso de métodos sensibles y rápidos, como la PCR, podrían facilitar la obtención de esta información (McDaniels *et al.*, 2005)

Muchos autores han evaluado diversas variantes de PCR para detectar la presencia de *Helicobacter pylori* en diferentes tipos de muestras, que van desde el interés clínico hasta el interés ambiental; de igual forma se han utilizado bacterias en forma de espiral y forma cocoide dependiendo del enfoque del estudio.

Por ejemplo en nuestro país, Mazari y cols. (2001) detectaron la presencia de *H. pylori* por medio de PCR en tres sistemas acuáticos situados en la zona de la Ciudad de México. Ellos amplificaron la región 16S rARN de esta bacteria y 21 % de las muestras recolectadas en este estudio resultaron positivas.

En 2004, Benson y cols. utilizaron esta técnica para detectar la presencia de *Helicobacter pylori* en agua subterránea y después en agua contaminada de manera natural. Ellos concluyen que la PCR directa utilizada en sus estudios, proporciona un método rápido para evaluar la contaminación del agua por *H. pylori*. En ese mismo año Watson y cols., detectan mediante PCR la

presencia de *Helicobacter pylori* en su forma viable no cultivable en agua potable en Inglaterra y resaltan que la formación de biopelículas dentro de los sistemas de distribución de agua puede actuar como sitios para la acumulación de esta bacteria y ser un agente importante de infección. De igual forma Shahamata y cols. (2004) hace uso de la PCR convencional para la detección de la forma bacilar y la forma cocoide de *H. pylori*.

## V. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Resultados de investigaciones realizadas en nuestro país, demuestran que el agua usada para consumo humano e irrigación puede jugar un papel importante como vehículo de transmisión de *H. pylori*, un elemento importante en la patogénesis del cáncer gástrico.

Adicionalmente, estudios previos han reportado la nula capacidad de aislamiento de este microorganismo a partir de muestras ambientales. Esta característica se debe a una respuesta de estrés, que es inducida cuando el microorganismo se encuentra en condiciones no favorables para su desarrollo. En este sentido, se sabe que las poblaciones de *H. pylori* que se encuentran naturalmente en el medio ambiente, como pueden ser suelos y fuentes acuíferas para consumo humano, tienen una capacidad para entrar rápidamente a un estado viable pero no cultivable (VBNC) (Adams *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2008) cuya morfología principal corresponde a las formas cocoides (Adams *et al.*, 2003). En consecuencia, las formas cocoides de *H. pylori* que están en el estado VNC son capaces de establecer eventos infecciosos en su hospedero, como sugieren Cellini *et al.* (1998) y She *et al.* (2003). Por lo tanto, el papel del estado viable no cultivable en este organismo tiene implicaciones importantes en la epidemiología y la prevención de enfermedades asociadas a esta bacteria.

De esta manera, dada la importancia epidemiológica en nuestro país de las formas cocoides de *H. pylori* y de la nula información que existe en relación al tema, se buscó en esta investigación, a través de experimentos preliminares, establecer las condiciones a nivel de laboratorio para la implementación de una técnica, rápida y eficiente, que permita reducir la densidad celular de una suspensión cocoide de *Helicobacter pylori* por medio de ozono en fase líquida.

## VI. HIPÓTESIS

---

Es posible reducir la densidad celular infectiva de una suspensión de *Helicobacter pylori* en forma cocoide, aplicando la dosis de ozono recomendada por los criterios sanitarios europeos y, mediante el uso de la metodología propuesta, cuantificar dicha reducción.

## VII. OBJETIVOS

---

### Objetivo general

---

Proponer una metodología que permita la reducción de la densidad celular infectiva de la forma cocoide de *Helicobacter pylori* por medio de ozono en una fase líquida y su cuantificación.

### Objetivos particulares

---

- ✓ Determinar las curvas de decaimiento de ozono en las siguientes matrices de trabajo: agua destilada estéril y suspensión isotónica de formas cocoides.
- ✓ Definir la dosis de ozono transferida (DOT) que permita mantener los parámetros de desinfección establecidos por criterios europeos (0.4 mg de O<sub>3</sub> / L por 4 min), en muestras sometidas a desinfección.
- ✓ Establecer si las condiciones de centrifugación post-desinfección utilizadas (3,000 rpm durante 10 min), permiten una formación de fases homogéneas (separación total de células íntegras y lisadas), de tal modo que se pueda detectar el producto amplificado en el pellet de una muestra sin tratamiento y no en el sobrenadante.
- ✓ Realizar pruebas preliminares de amplificación por qPCR que posibiliten determinar la inactivación de las formas cocoides de *Helicobacter pylori* en suspensiones con concentraciones infectivas por efecto del ozono.

## VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

---

Para el desarrollo de la metodología experimental se realizó lo siguiente:

1. La inducción de la transformación de una suspensión bacilar de *Helicobacter pylori* a su estado viable no cultivable.
2. Determinaciones para conocer el perfil de consumo de ozono, construyendo una curva de decaimiento de la concentración inicial de ozono en agua destilada y en la matriz del sistema de desinfección.
3. Determinaciones para conocer la demanda inmediata de ozono en agua destilada y la matriz del sistema de desinfección.
4. Un análisis mediante PCR para determinar la presencia de ADN de *H. pylori* en las fases post-centrifugación de una muestra sin tratamiento de desinfección.
5. Análisis preliminares mediante qPCR sobre la densidad celular infectiva en suspensiones de *H. pylori* tratadas con diferentes dosis de ozono.

## IX. METODOLOGÍA

---

### Materiales y reactivos

---

Todas las soluciones fueron preparadas usando agua destilada-desionizada a pH=7 y reactivos grado analítico (Sigma-Aldrich™, Baker™). Todo el material de vidrio usado en estos experimentos fue lavado con agua destilada y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 min para asegurar esterilidad.

El ozono fue producido a partir de una corriente de aire enriquecida con oxígeno (90±5%) mediante el uso de un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA) con capacidad de producción de 19 g de O<sub>3</sub>/h. Los experimentos de oxidación con ozono se llevaron a cabo en una unidad de oxidación, compuesta por un separador de aire (Airsep modelo AS-12, USA), el generador de ozono Labo 76, una unidad de destrucción de ozono (PCI Ozone & Control Systems inc., Fairfield Crescent, West Alwell, NJ) y un analizador de ozono en fase gas (Ozone Monitor 465H, Teledyne Instruments).

La solución stock saturada de ozono (3 mg/L – 12 mg/L) fue preparada mediante el burbujeo de una corriente de gas ozono con una concentración de 80 mg/L y un flujo de 0.4 L/min, a través de una columna de contacto gas-líquido de vidrio de 2 L de capacidad que contenía agua destilada. Al final la corriente gaseosa fue enviada a la unidad de destrucción catalítica de ozono para su liberación segura al ambiente (Figura A1). La concentración de ozono en la solución stock saturada fue determinada mediante el método colorimétrico del Índigo (Standard Methods, 1992; Great Ships Initiative, procedimiento No: GSI/SOP/BS/RA/C/1, 2009) que se muestra en la sección de Anexos.

### Cultivo de *Helicobacter pylori*

---

El cultivo de la cepa 26695 de *Helicobacter pylori* se realizó por personal de la Torre de Investigación de Medicina de acuerdo a la siguiente metodología (Ortega, 2008). La cepa fue cultivada en placas de agar *Haemophilus Test Medium* (HTM) suplementado con 7% de suero de caballo y se incubó durante 72 h a una temperatura de 37 °C en condiciones microaerofílicas (10% de CO<sub>2</sub>). Una vez que se obtuvieron colonias de <1 mm, circulares, de borde entero y translúcidas, se tomó una asada y se realizó una resiembra en cajas Petri que contenían agar HTM. Las placas fueron incubadas bajo las condiciones antes descritas durante 48 h. Al terminar el periodo de incubación el microorganismo fue caracterizado mediante la realización de tinciones Gram, pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y ureasa, y amplificación del gen *rRNA 16S* por PCR como describe Mazari y cols. (2001) (datos no mostrados). Estos cultivos se mantuvieron a lo largo de la experimentación, y de ellos se tomó un paquete bacteriano para cada uno de los experimentos de desinfección.

### Inducción de formas cocoides de *Helicobacter pylori*

---

Paquetes bacterianos de resiembras realizadas a partir de cultivos primarios de la cepa 26695 de *H. pylori* (ver arriba) fueron cosechados y suspendidos en solución salina isotónica (SSI) estéril c.b.p. obtener la densidad deseada. Estas suspensiones fueron preparadas para obtener la concentración de  $9 \times 10^8$  UFC/mL que corresponden a un estándar No. 3 de la escala de McFarland y fueron almacenadas a temperatura ambiente en los laboratorios del Instituto de Ingeniería (edificio 5). Para verificar la transformación de la forma bacilar a la forma cocoide se realizaron tinciones de Gram a los 0, 1, 3, 5, 8, 10, 13 y 21 días, que fueron observadas al microscopio óptico.

## Estabilidad y vida media del ozono en agua destilada

---

Dos litros de agua destilada fueron saturados con ozono (solución stock de agua saturada con ozono) utilizando una columna de vidrio (110 cm de altura y 5.5 cm de diámetro interno) de 2 L de capacidad como se describe arriba. El ozono fue inyectado en el fondo de la columna por medio de un difusor de vidrio de placa porosa (10-15  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro) durante 25 min y 200 mL fueron recolectados en un matraz Erlenmeyer. De esta solución saturada se alicuotaron 10 mL en un matraz aforado de 100 mL que contenía 10 mL de solución de Índigo II (ver anexos), y se aforó con agua destilada para posteriormente medir la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro HACH DR-2800. Se hicieron mediciones a diferentes tiempos (0, 1, 5, 10, 17, 21 y 44 min) para determinar la estabilidad del ozono en la solución. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

## Demanda inmediata de ozono en una suspensión de formas cocoides de *H. pylori*

---

Para determinar la demanda inmediata de ozono en una suspensión de formas cocoides de *H. pylori*, se saturó agua destilada con ozono en la columna de vidrio como se describe arriba y 200 mL fueron recolectados en un matraz Erlenmeyer. Se tomaron igualmente 10 mL de esta solución y se determinó la concentración de ozono por el método del índigo II (ver anexos).

Un tubo de reacción fue preparado con 50 mL de una suspensión cocoide de *H. pylori* en SSI estéril, a una concentración de  $3 \times 10^5$  UFC/mL y una alícuota de agua saturada con ozono necesaria para aplicar una dosis equivalente a 0.4 mg  $\text{O}_3/\text{L}$  o 0.8 mg  $\text{O}_3/\text{L}$ . El tubo de reacción fue tapado y agitado por inversión 4 veces y transcurridos 2, 3, 4, 8 y 10 min, 5 mL de esta mezcla de reacción

fueron tomados para determinar la concentración de ozono residual por el método colorimétrico del Índigo I (ver anexos). Los experimentos fueron realizados por triplicado.

### Desinfección de una suspensión de formas cocoides de *H. pylori* a diferentes concentraciones de ozono

---

Tubos de reacción fueron preparados con 20 mL de una suspensión cocoide de *H. pylori* en SSI estéril a una concentración de  $3 \times 10^5$  UFC/mL y alícuotas de agua saturada con ozono necesarias para aplicar dosis de ozono equivalentes 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.8, 1.2, 1.8 y 2.4 mg O<sub>3</sub>/L. Los tubos de reacción fueron tapados y agitados por inversión 4 veces y transcurridos 4 min, se inactivó el ozono residual adicionando 1 mL de una solución 0,1 N de tiosulfato de sodio. Posteriormente, los sistemas de desinfección fueron alicuotados para su análisis por PCR. Alícuotas de 5 mL fueron o no sometidas a centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min, y el ADN de las fases obtenidas fue extraído y analizado por PCR punto final y tiempo real en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INNSZ) (como se describe en Makristathis et al. [1998]) y la Torre de Investigación de Medicina (UNAM) respectivamente. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

### Identificación de *Helicobacter pylori* por PCR punto final

---

Brevemente, 5 mL del sistema de desinfección fueron centrifugados a 3,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue almacenado a 4 °C hasta la posterior extracción de ADN de acuerdo al método “Boom” descrito en el manual del kit NucliSens®. Tanto la extracción de ADN como los

análisis por PCR punto final se realizaron por personal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ, Departamento de Infectología).

El PCR punto final se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Hammar et al. (1992) y Makristathis et al. (1998). Brevemente, el PCR consistió en la detección anidada de la secuencia de una proteína antigénica especie-específica con un  $M_r$  de 27,000 (p27). La reacción primaria fue desarrollada con los siguientes primers: 5'-(TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC)-3' y 5'-(CCTGCTGGGCATACTTCACCATG)-3' (Hammar *et al.*, 1992). Estos oligonucleótidos son idénticos a los residuos 474 al 496 y 776 al 754 de la secuencia publicada, respectivamente. Estas reacciones se desarrollaron en un volumen de 30  $\mu$ L en tubos para PCR mediante el uso de un termociclador GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems™). Las reacciones comprendieron los cuatro desoxinucleótidos, cada uno a 100  $\mu$ M, 0.5 U de AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems™) y 0.1  $\mu$ M de cada primer en buffer de incubación para PCR (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatina). El volumen de la muestra de ADN no excedió los 10  $\mu$ L. Esta amplificación consistió de un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 92 °C por 30 s, alineando a 68 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 1 min. Después del último ciclo la mezcla fue incubada a 72 °C por 5 min. La reacción de amplificación fue seguida por un PCR semi-anidado mediante el protocolo descrito en Makristathis et al. (1992). Ésta se llevo a cabo con los primers 5'-TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC-3' (sentido) y 5'-TGATCACTGCATGTCTTACTTTCATGTTTTT-3' (antisentido). Estos oligonucleótidos son idénticos a los residuos 474 al 496 y 682 al 652, respectivamente, de la secuencia publicada por O'Toole et al. (1991). Las reacciones se desarrollaron en un volumen del 30  $\mu$ L mediante el uso de un termociclador GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems™). La amplificación por PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 92 °C por 45 s, alineando a 62 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 1 min.

Después del último ciclo la mezcla fue incubada a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa 1.7 % y un fragmento de 209 pb fue considerado como un resultado positivo de PCR.

### Cuantificación relativa de *Helicobacter pylori* por PCR tiempo real

Cinco mililitros de los sistemas de desinfección ( $1.5 \times 10^6$  UFC) sometidos a las dosis de 0.4, 0.8, 1.2, 1.8 y 2.4 mg/L de O<sub>3</sub> fueron alicuotados y centrifugados después de terminado el tratamiento a 3,000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes fueron descartados. A los pellets se adicionaron 500 µL de RNAlater™ (Qiagen™) para estabilizar los ácidos nucleicos y se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior. Tanto la extracción de ADN como los análisis por qPCR subsecuentes, fueron realizados por personal de la Torre de Investigación de Medicina (UNAM) de acuerdo a la metodología que se describe a continuación (Mazari *et al.*, 2001; Castillo-Rojas *et al.*, 2008). Brevemente, las alícuotas fueron centrifugadas a 16,000 x g por 5 min, los sobrenadantes fueron descartados y los sedimentos fueron resuspendidos en 100 µL de 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) y 1 mM EDTA (TE). Luego, 500 µL de solución Sarkosyl-EDTA-Tiocianato de guanidino se adicionaron a cada tubo; las muestras fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente. En seguida, 250 µL de 7.5 M de acetato de amonio frío fueron adicionados y la suspensión fue incubada por 10 min a 4 °C. Después de la incubación, 550 µL de cloroformo-isoamílico (24:1) fueron adicionados, mezclados por 5 min y centrifugados durante 15 min a 16,000 x g. Los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos y diluidos 1:1 con alcohol isopropílico frío, incubados por 5 min a 4°C y centrifugados durante 5 min a 16,000 x g. Los sedimentos fueron lavados 2 veces con etanol al 70%, secados y almacenados a -70 °C hasta su posterior análisis por qPCR. La detección de *H. pylori* fue desarrollada a través de la amplificación de una región conservada del gen *ureB*

mediante primers y una sonda Taqman® específicos. Para los intereses de esta investigación, es importante mencionar que, por decisión de la Dra. Yolanda López Vidal, adscrita al departamento de Microbiología y Parasitología Experimental de la Torre de Investigación de Medicina (UNAM), los detalles de la metodología empleada para estos análisis no fueron accesibles y únicamente se reportan los datos derivados de éstos en la sección de resultados de “Determinaciones preliminares mediante qPCR en la densidad celular infectiva en suspensiones de *H. pylori* tratadas con diferentes dosis de ozono”.

## X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

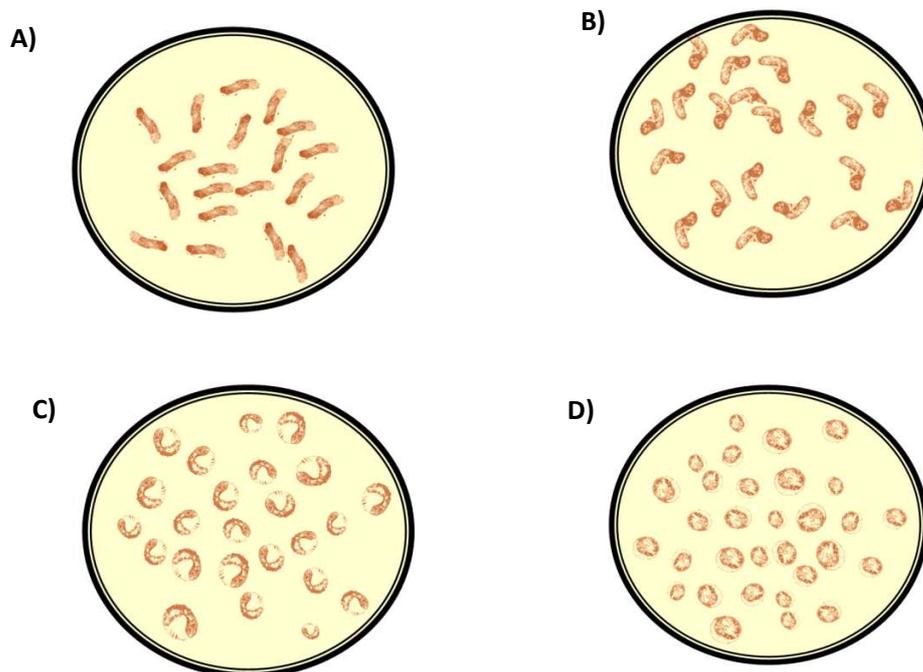
---

### Inducción de formas cocoides.

---

Al entrar en contacto con el agua, *H. pylori* es capaz de adoptar el estado VNC, transformándose de la forma típica de bacilo espiral a una forma cocoide (Oliver, 2005; Bellack *et al.*, 2006). Debido a que se ha visto que las formas cocoides de *H. pylori* son el resultado de una incubación prolongada en agua, y que esta última puede ser a su vez una ruta crítica de infección (Cole *et al.*, 1996; Nilson *et al.*, 2002) el uso de suspensiones de *H. pylori* con tales características morfológicas resultó relevante para esta investigación.

En consecuencia, con el objetivo de obtener suspensiones de la forma cocoide de *H. pylori*, se llevó a cabo la inducción de formas bacilares a formas cocoides mediante la incubación en solución salina isotónica estéril sin nutrientes como se describe en la sección de metodología. Para dar seguimiento a la formación de formas cocoides, alícuotas de estas suspensiones fueron sometidas a tinciones de Gram a los 0, 1, 3, 5, 8, 10, 13 y 21 días de iniciada la inducción, y posteriormente observadas al microscopio óptico (Figura 1). Al primer día de inducción, se observó al microscopio la conversión del estado bacilar (Figura 1, panel A) a la forma “V” (Figura 1, panel B). Del tercer al octavo día se observó la predominancia de la forma “U” (Figura 1, panel C), y del día 10 en adelante, se observó la transformación total de células a la forma cocoide (Figura 1, panel D).



**Figura 1. Esquema de las tinciones de Gram realizadas para cada fase intermedia durante la transformación del estado bacilar al estado cocoide.** Alícuotas de la suspensión inducida fueron sometidas a tinciones de Gram a los 0, 1, 3, 5, 8, 10, 13 y 21 días. El esquema representa las observaciones realizadas al microscopio óptico. Para el diseño de este esquema fueron modificadas las imágenes de Benaïssa *et al.* (1996) A) Tinción de Gram para la forma bacilar observada al día 0. B) Tinción de Gram para la forma “V” observada al día 1. C) Tinción de Gram para la forma “U” observada entre el día 3 y el día 8. D) Tinción de Gram para la forma cocoide observada a partir del día 10.

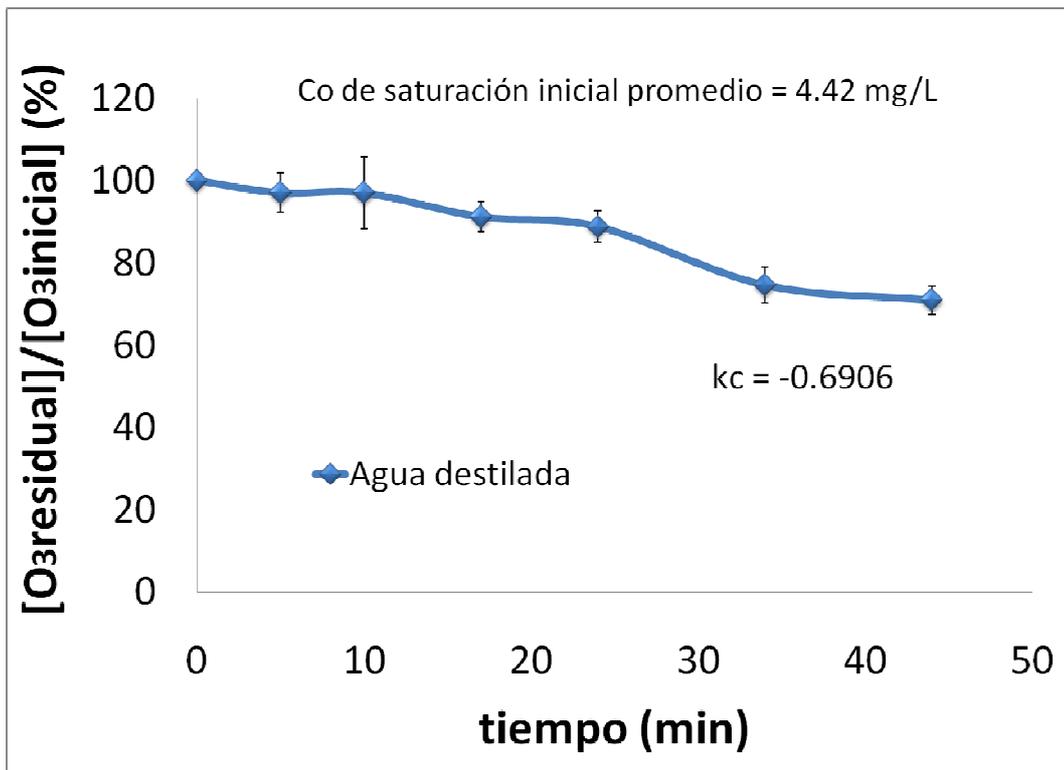
Con base a estas observaciones, se corroboró que la población celular de las suspensiones bacterianas se conformaba en su totalidad de formas cocoides de *Helicobacter pylori* y de esta manera se procedió a realizar los experimentos que se describen a continuación.

## Curva de decaimiento de ozono en agua destilada

El decaimiento de la concentración de ozono en el agua es un aspecto importante a determinar en los procesos de desinfección, ya que es el ozono mismo el principal responsable de inducir la inactivación de microorganismos, aunque una pequeña cantidad del radical  $\cdot\text{OH}$  puede ser generada dependiendo de los parámetros de calidad del agua así como de los tipos y las cantidades de materia orgánica disuelta (MOD), el pH, etc. (Cho *et al.*, 2006). Los comportamientos de consumo de ozono, los cuales pueden ser caracterizados mediante la demanda inmediata de ozono (DIO) y la constante de decaimiento de pseudo-primer orden ( $k_c$ ), son reconocidos por diferir enormemente dependiendo de las características del agua que está siendo estudiada (Cho *et al.*, 2006). Por lo tanto, es recomendable la realización de experimentos previos a cualquier experimento de desinfección con ozono para determinar estos comportamientos.

Tomando en cuenta estos antecedentes, se consideró relevante investigar el comportamiento cinético del decaimiento de la concentración de ozono al saturar agua destilada. Para este fin, agua destilada fue saturada con ozono mediante una unidad de contacto gas-líquido y se determinaron las concentraciones residuales de ozono como una función del tiempo mediante el método colorimétrico del índigo (Figura 2).

La figura 2 muestra la estabilidad del ozono en agua destilada, en donde la concentración de ozono inicial fue de 4.42 mg/L. Cuando el ozono fue directamente aplicado al agua destilada la concentración de saturación inicial se redujo en un 30% a los 45 min, manteniéndose estable durante los primeros 15 min. Estos datos indican que es posible preparar muestras de agua saturada con ozono y utilizarlas dentro de los primeros 15 min para garantizar que la dosis teórica calculada a partir de esta muestra inicial es la dosis real aplicada al sistema de desinfección.



**Figura 2. Perfil de decaimiento de ozono normalizado.** Para construir esta curva se realizaron mediciones de la concentración de ozono residual a distintos tiempos mediante el método colormétrico del índigo, y los valores fueron normalizados a la concentración de ozono de saturación inicial ( $[O_3]_{\text{saturación inicial}} = 4.42 \text{ mg/L}$  a una temperatura de  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ). La pendiente de la curva fue obtenida para establecer la constante de decaimiento ( $k_c = -0.6906$ ). Las barras de error indican los promedios de tres réplicas técnicas.

Adicionalmente, este patrón de decaimiento de la concentración de ozono y de la  $k_c$  pueden ser considerados para justificar el uso de una matriz de agua destilada en análisis de laboratorio que involucren un sistema de desinfección con ozono en fase líquida como el utilizado en este estudio.

De acuerdo a estos resultados, encontramos un comportamiento similar en el decaimiento de ozono en agua destilada al reportado por Choi *et al.* (2007). Sin embargo, observamos que de acuerdo a las condiciones empleadas en nuestros experimentos, la vida media del ozono en agua destilada puede incrementarse mientras mayor sea la concentración inicial de saturación (Tabla 1).

Lo anterior sugiere que la vida media del ozono en agua destilada podría ser una función de la concentración de saturación inicial empleada.

**Tabla 1. Vida media de ozono en agua destilada en función a la concentración de saturación inicial**

Vida media del ozono en agua destilada (min)	Concentración de saturación inicial (mg/L)	Cita
10	1.38	Choi <i>et al.</i> , 2007
74	4.42	Pierdant, 2011
20	--	Yannuzzi, 1991

#### Dosis de ozono necesaria para la desinfección de una suspensión cocoide de *Helicobacter pylori*

En un proceso unitario de desinfección con cualquier agente químico, es importante mantener una concentración suficiente durante un tiempo determinado para lograr la reducción de la densidad bacteriana a los niveles deseados. Estos valores son establecidos en cada país en función a las dosis infectivas que se han reportado para los microorganismos de interés sanitario. La normatividad de referencia en la que se sustenta nuestra investigación ha sido la establecida por estándares europeos (Langlais, 1991), en la cual se establecen los parámetros de concentración de ozono en fase líquida y de tiempo de contacto necesarios para garantizar la desinfección (0.4 mg de O<sub>3</sub>/L por 4 min).

Una vez incorporado en el seno del líquido, el ozono debe permanecer durante cierto tiempo para lograr su efecto oxidante. La vida media del ozono disuelto es generalmente superior a ese requerimiento, siendo que en agua neutra y a temperaturas que rondan los 18 °C el ozono tendrá

una vida media de 20 min, y al paso del tiempo el residuo final será predominantemente oxígeno (Yannuzzi, 1991).

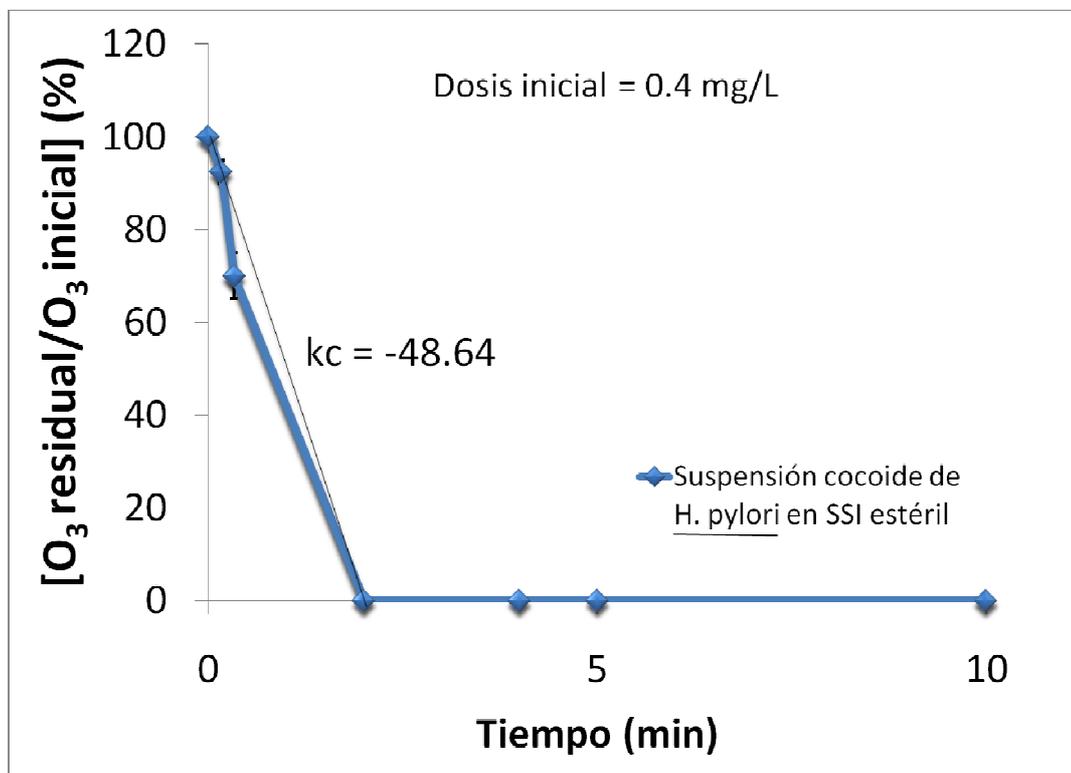
Tomando en cuenta estos antecedentes, fue relevante definir la dosis inicial de ozono que permite mantener los parámetros de concentración de ozono y de tiempo de contacto establecidos por la Unión Europea en suspensiones cocoides de *H. pylori* sometidas a desinfección. En este sentido, el análisis adquiere una mayor relevancia al considerar que todas las densidades celulares iniciales de *H. pylori* utilizadas correspondieron a la dosis infectiva reportada por Morris *et al.* (1987) ( $3 \times 10^5$  UFC/mL), además, por haber utilizado la forma viable no cultivable, la cual representa el estado morfológico de supervivencia de esta bacteria en sistemas de almacenamiento y distribución de agua.

Para este fin y como un primer experimento exploratorio, fue determinada la demanda inmediata de ozono en solución salina isotónica estéril, la cual corresponde a la matriz de trabajo utilizada en el sistema de desinfección posterior. Esta matriz de trabajo fue elegida con el objetivo de evitar el lisado del sistema microbiológico utilizado, dado que la solución salina isotónica impide que la presión osmótica en el interior de la bacteria sea mayor que en el exterior.

Para esto se prepararon suspensiones cocoides de *Helicobacter pylori* en solución salina isotónica estéril y se aplicó una dosis de ozono correspondiente a 0.4 mg/L. Posteriormente, la demanda inmediata, así como las concentraciones residuales de ozono, fueron determinadas con respecto al tiempo por el método colorimétrico del índigo. La figura 3 muestra el perfil de consumo de ozono correspondiente.

Las condiciones establecidas en el diseño de este experimento representan las reales para un sistema de desinfección a escala de laboratorio. Los resultados de éste revelaron que para un sistema de desinfección como el empleado en esta investigación, dosis iniciales de ozono menores a 0.4 mg/L no permiten mantener la concentración mínima durante el tiempo requerido, de

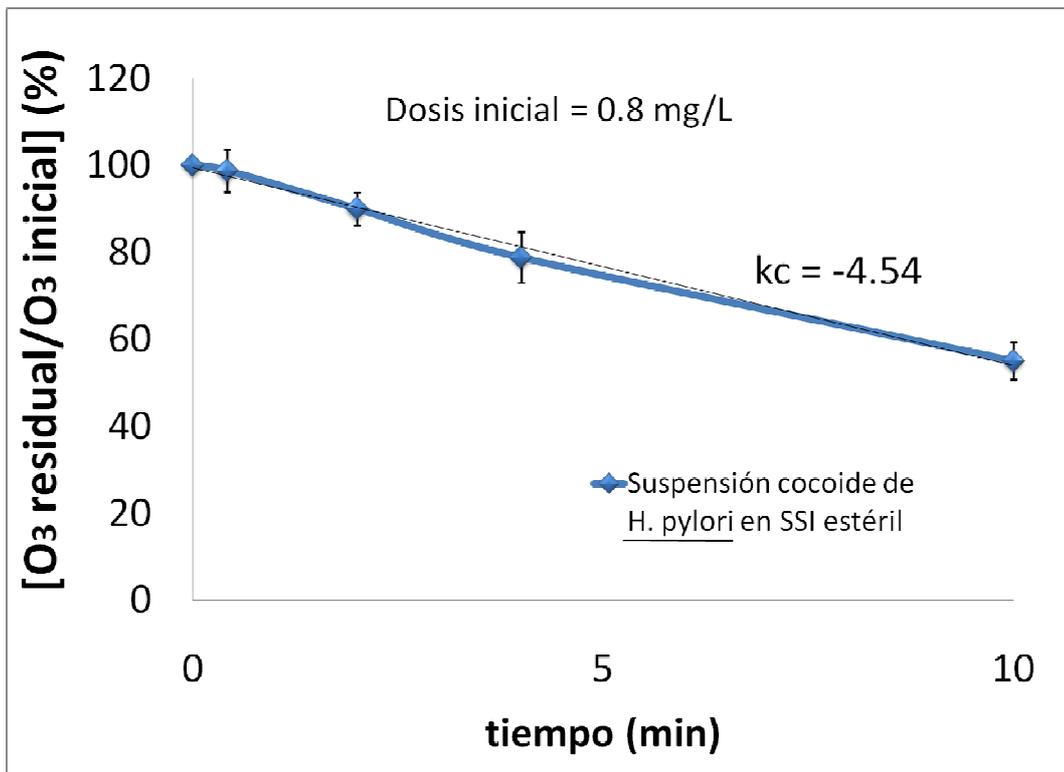
acuerdo a estándares europeos (0.4 mg/L, durante 4 min; Langlais, 1991) (Figura 3). Cuando el ozono fue aplicado al sistema de desinfección, a través de la adición de una alícuota generada a partir de una solución saturada de ozono en agua destilada, la dosis de desinfección inicial se redujo en un 100% a los 2 min de haber iniciado el proceso (Figura 3). En consecuencia, el comportamiento cinético, representado por una  $k_c = -48.64$ , nos permite concluir que en estas condiciones, la disminución del ozono residual es de tal magnitud que no permite mantener ozono disponible para continuar con la desinfección.



**Figura 3.** Perfil de consumo de ozono normalizado en una suspensión cocoide de *Helicobacter pylori* en solución salina isotónica estéril. Para construir esta curva se realizaron mediciones de la concentración de ozono residual a distintos tiempos mediante el método colormétrico del índigo, y los valores fueron normalizados a la concentración de la dosis inicial aplicada ( $[O_3]_{dosis\ inicial} = 0.4\ mg/L$  a una temperatura de 23 °C). La pendiente de la curva fue obtenida para establecer la constante de decaimiento ( $k_c = -48.64$ ). Las barras de error indican los promedios de tres réplicas técnicas.

Con la ecuación de la recta, obtenida a partir de los datos de la región lineal de este perfil cinético, se obtuvo la DI de ozono en la matriz del sistema de desinfección a las condiciones mencionadas (DI = 0.21 mg/L que corresponde al 52.61% de consumo de O<sub>3</sub>).

Dado que las dosis iniciales de ozono menores a 0.4 mg/L no permiten mantener la concentración mínima durante el tiempo requerido, de acuerdo a estándares europeos (Figura 3), se generó un nuevo perfil cinético de consumo de ozono partiendo de una dosis inicial mayor en las mismas condiciones experimentales del perfil anterior (Figura 4). En consecuencia, para entender el significado cinético de este fenómeno, la  $k_c$  y la DI fueron determinados a partir de los datos obtenidos de este nuevo perfil ( $k_c = -4.54$  y DI = 0.04 mg/L). Interesantemente, se observó que a dosis iniciales a partir de 0.8 mg/L es posible mantener dentro del sistema de desinfección los niveles de ozono recomendados por la normatividad europea. En este sentido concluimos que, cuando nuestro sistema de desinfección inicia su proceso con 0.8 mg/L de ozono en suspensión, se asegura una concentración de ozono por arriba de los 0.4 mg/L durante los 4 min de haberse iniciado el proceso de desinfección.



**Figura 4. Perfil de consumo de ozono normalizado en una suspensión cocoide de *Helicobacter pylori* en solución salina isotónica estéril a una concentración que permite mantener los parámetros de desinfección internacionales (0.8 mg/L).** Para construir esta curva se realizaron mediciones de la concentración de ozono residual a distintos tiempos mediante el método colormétrico del índigo, y los valores fueron normalizados a la concentración de la dosis inicial aplicada ( $[O_3]_{\text{dosis inicial}} = 0.8 \text{ mg/L}$  a una temperatura de 23 °C). La pendiente de la curva fue obtenida para establecer la constante de decaimiento ( $k_c = -4.54$ ). Las barras de error indican los promedios de tres réplicas técnicas.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, la figura 5 muestra una perspectiva comparativa de ambos experimentos. De esta manera esta gráfica revela diferencias significativas entre los procesos de desinfección cuando la operación inicia con dosis iniciales de ozono diferentes. Estas diferencias podrían explicarse desde una perspectiva de probabilidad de encuentro entre las partículas de ozono con las células del sistema. Tomando en cuenta que los sistemas de desinfección contienen el mismo número de células suspendidas en un volumen constante, se podría sugerir que, al incrementar la concentración de partículas de ozono en el sistema, la probabilidad de encuentro de las partículas de ozono con las células disminuye, debido a que un

mayor número de partículas de ozono interferirá en la interacción propia ozono-bacteria. De esta manera, observamos que en los sistemas de desinfección dosificados con menos ozono el consumo de éste es más rápido.

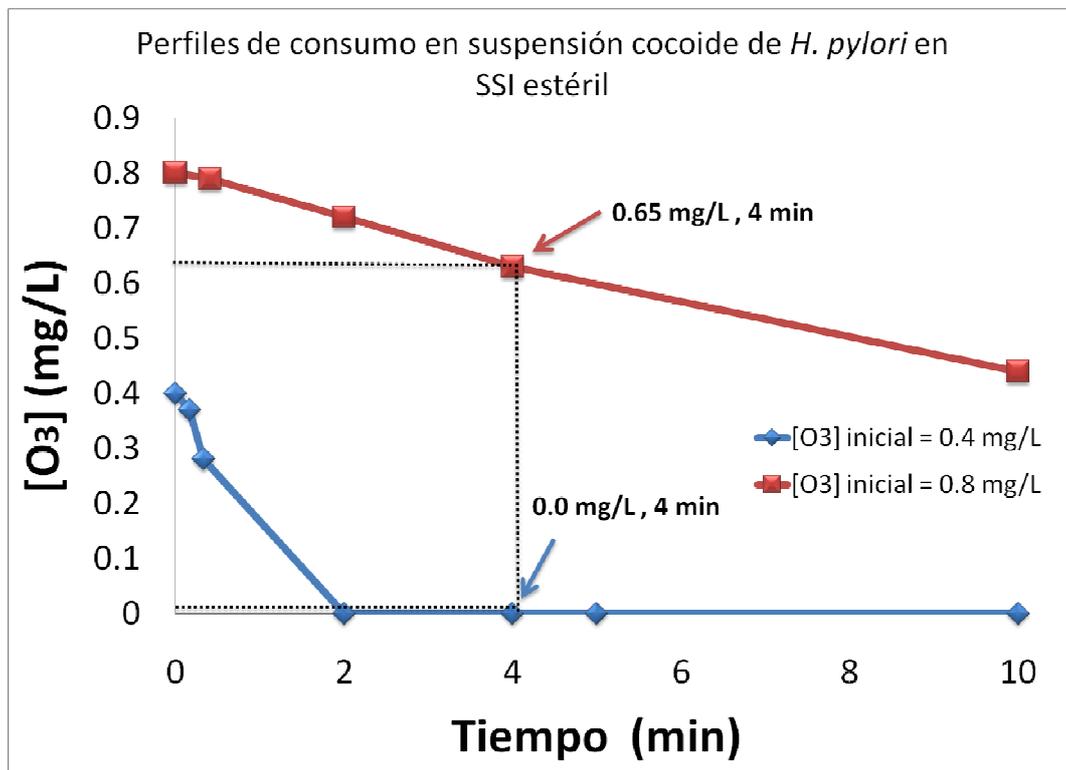


Figura 5. Comparación entre perfiles de consumo de ozono no normalizados en una suspensión coccoide de *Helicobacter pylori* en solución salina isotónica estéril a diferentes concentraciones iniciales. Para construir esta curva se realizaron mediciones de la concentración de ozono residual a distintos tiempos mediante el método colormétrico del índigo y con distintas concentraciones iniciales de ozono. Los valores de cada punto representan los promedios de tres réplicas técnicas.

## Análisis mediante PCR de las fases post-centrifugación de una muestra sin tratamiento de desinfección

---

En general se cree que en un proceso de desinfección con ozono las bacterias son destruidas debido a la oxidación protoplasmática, dando como resultado la desintegración parcial de la pared de la célula (fisuramiento) y una eventual lisis total, con lo que el contenido celular queda expuesto (Khadre *et al.*, 2001). En este sentido, muestras de suspensiones bacterianas que han sido sometidas a tratamiento con ozono habrán reducido su densidad celular, de manera que células de bacterias íntegras y subproductos celulares de bacterias lisadas quedarán en suspensión. Así pues, este fenómeno permite distinguir, mediante mediciones relativas o cuantitativas, diferencias entre la cantidad de ADN genómico en fracciones post centrifugación que han sido o no tratadas con ozono, con las cuales es posible establecer la eficiencia relativa del proceso de desinfección.

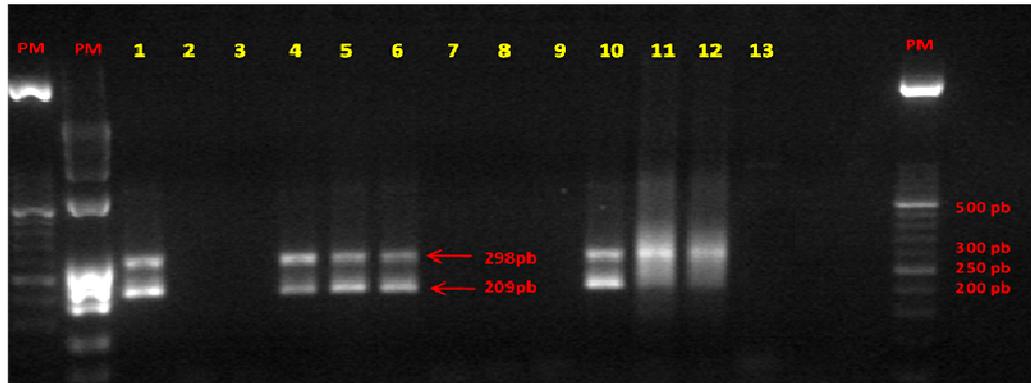
Considerando estos antecedentes, nuestro laboratorio ha venido trabajando bajo la premisa de que la centrifugación post tratamiento puede separar una fase de material de células lisadas por efecto del ozono (sobrenadante), y otra fase de células íntegras (pellet) sobre las cuales pueden realizarse análisis por PCR para medir, de forma relativa, la disminución de la densidad celular a diferentes concentraciones de ozono. Sin embargo, poco se ha profundizado en relación a la capacidad de las metodologías usadas hasta el momento en nuestro laboratorio para la obtención de resultados confiables y reproducibles en los análisis de PCR post tratamiento.

Así pues, con el objetivo de determinar si las condiciones de centrifugación post-desinfección utilizadas (3,000 rpm durante 10 min) permiten una formación de fases homogéneas (separación total de células íntegras y lisadas), se realizaron análisis de PCR *H. pylori*-específicos en una serie de muestras sometidas o no al tratamiento de desinfección con dosis de ozono menores a la dosis

establecida para cumplir con los estándares europeos (0.8 mg/L), debido a que éstas permitirían eventualmente detectar una inactivación parcial.

De esta manera, si las condiciones de centrifugación post-desinfección permiten una separación en fases de células íntegras y lisadas, entonces, para una muestra sin tratamiento, deberíamos amplificar el producto deseado mayoritariamente en el pellet. Considerando esto, nuestros resultados revelan que las condiciones experimentales que se han utilizado para los análisis de reducción de densidad celular no permiten una separación adecuada de las fases, dado que detectamos producto de amplificación en la fase sobrenadante de una muestra sin tratamiento (Figura 6, carriles 5 y 10).

Si la presencia o ausencia de ADN de *H. pylori* observado en los sobrenadantes es debida únicamente a células íntegras, y representa de manera proporcional la reducción en la densidad celular, entonces podemos pensar que a dosis iniciales de ozono de 0.1 mg/L o 0.8 mg/L, la reducción es parcial, mientras que dosis de 0.2 y 0.4 mg/L de ozono son capaces de reducir mayoritariamente la densidad celular. Siendo así y considerando los perfiles de consumo de ozono de la figura 5, podríamos sugerir que el ozono actúa con menor eficiencia cinética a dosis mayores como la de 0.8 mg/L dado que la probabilidad de interacción con las células podría ser menor. Adicionalmente, una dosis de ozono de 0.1 mg/L podría actuar de manera parcial únicamente por la falta de ozono residual. La propuesta anterior es apoyada con los datos de qPCR que se presentan en la figura 7, que muestran una tendencia de disminución de las eficiencias de la reducción de la densidad celular en función del aumento en las dosis iniciales de ozono a partir de 0.4 mg/L.



**Figura 6. Detección de *Helicobacter pylori* mediante PCR en la fase sobrenadante post-centrifugación de muestras con o sin tratamiento de desinfección.** Análisis de los productos de amplificación (209 pb) mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. **Carriles: 1 al 4**, fases sobrenadantes de muestras tratadas con 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg/L de ozono respectivamente; **6 al 9**, pellet de las fases sobrenadantes de muestras tratadas con 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg/L de ozono respectivamente, sometidas a una segunda centrifugación (7,500 rpm por 5 min); **5**, fase sobrenadante de una muestra sin tratamiento con ozono; **10**, pellet de la fase sobrenadante de la misma muestra sin tratamiento con ozono, sometida a una segunda centrifugación (7,500 rpm por 15 min); **11 y 12**, controles positivos del análisis por PCR; **13**, control negativo del análisis por PCR. La imagen fue generada mediante el software Quantity One™ (BioRad™).

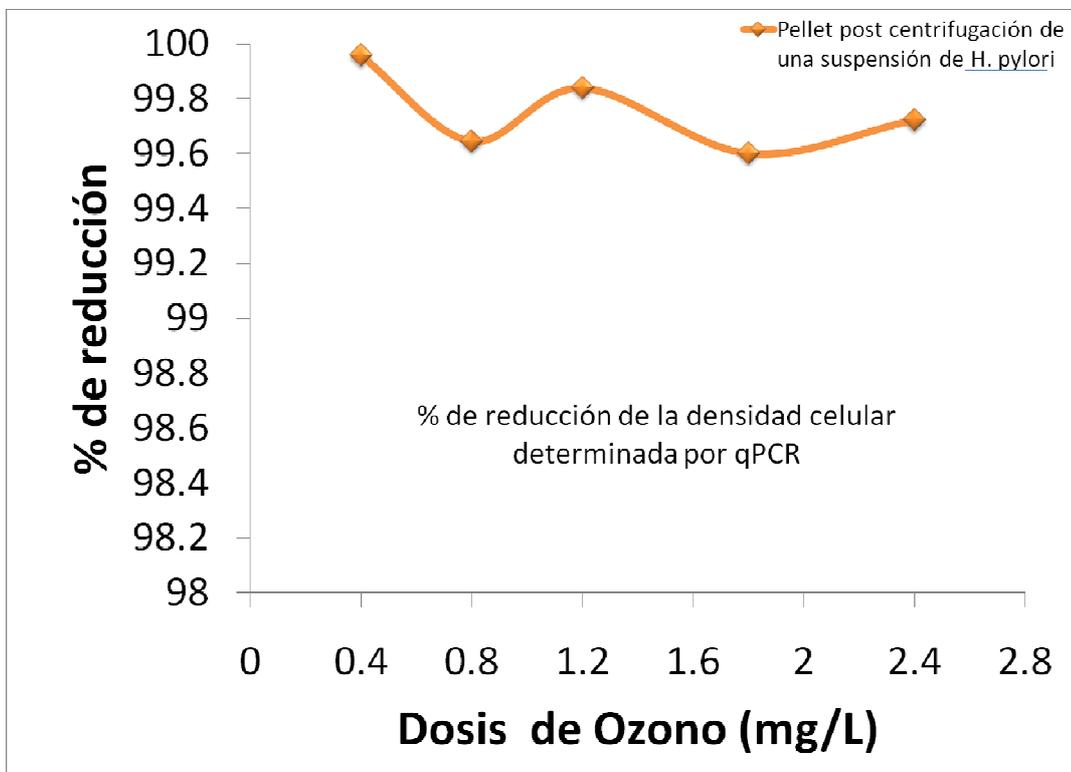
De acuerdo a la investigación bibliográfica, análisis de muestras de agua para la detección de microorganismos se han desarrollado comúnmente mediante el paso de las muestras a través de filtros y disponiendo estos filtros sobre medios específicos para crecer las células de interés (McDaniels *et al.*, 2005). En la actualidad, el aislamiento de células de *H. pylori* a partir de aguas ambientales o bebestibles mediante cultivo no se ha logrado, lo cual puede ser debido a la transformación de esta bacteria al estado cocoide (Kusters *et al.*, 1997), y/o a la falta de un medio de crecimiento adecuado. Como resultado de esto, un gran número de investigaciones han propuesto como método de detección más viable el análisis por PCR de muestras que han sido sometidas a filtración (McDaniels *et al.*, 2005; Yañez *et al.*, 2008). Considerando esta revisión y los resultados de la Figura 6, se ha demostrado que el paso de centrifugación post desinfección a las condiciones empleadas en esta investigación no es el más adecuado para separar células íntegras de material lisado para su análisis posterior por PCR.

## Determinaciones preliminares mediante qPCR de la densidad celular infectiva en suspensiones de *H. pylori* tratadas con diferentes dosis de ozono

---

Pese a que el paso de centrifugación post desinfección a las condiciones empleadas en esta investigación no fue el más adecuado para separar células íntegras de material lisado, se realizaron determinaciones preliminares mediante qPCR de las densidades celulares de los pellets originados, con el fin de evaluar la inactivación relativa de las formas cocoides de *H. pylori* por efecto del tratamiento con ozono. Para ello, fueron tomados 5 mL de los sistemas de desinfección (densidad celular inicial =  $1.5 \times 10^6$  UFC) sometidos a las dosis de 0.4, 0.8, 1.2, 1.8 y 2.4 mg/L de  $O_3$  y centrifugados después de terminado el tratamiento a 3,000 rpm durante 10 min. Estas dosis fueron establecidas con base a la concentración de ozono inicial mínima que permite mantener las condiciones de los estándares de desinfección europeos. Posteriormente los pellet fueron sometidos a extracción de ADN y evaluados mediante qPCR. En consecuencia, con base a la información cedida por el personal académico de la Torre de Investigación de Medicina de la UNAM, la detección se llevó a cabo mediante la amplificación del gen *ureB* y los datos de  $C_T$  fueron normalizados mediante una curva patrón de  $C_T$  en función a la concentración de UFCs en muestras sintéticas de formas cocoides de *H. pylori* en SSI estéril (Figura A2). A partir de estos datos se logró obtener los porcentajes de reducción haciendo la correlación entre los  $C_T$ s de los pellet resuspendidos y el factor de dilución de 1:4 respecto a los 20 mL del sistema total a una concentración inicial de  $3 \times 10^5$  UFC/mL. De esta manera, en tres réplicas biológicas, observamos que las dosis de ozono empleadas en este experimento permiten una reducción de la densidad celular de al menos 99 % (2-log) (Figura 7). Estos datos nos permiten establecer que a estas concentraciones de ozono la densidad celular disminuye significativamente respecto a la concentración inicial de células. Aunque las condiciones de centrifugación no nos permiten establecer una separación adecuada de células íntegras y lisadas, podemos concluir que la

metodología planteada en esta investigación permite inactivar formas cocoides de *Helicobacter pylori* (Figura 7), y que a concentraciones mayores de 0.4 mg/L de ozono ya no es observable una tendencia lineal de incremento en los porcentajes de reducción celular en función a la concentración como se ha reportado para otros microorganismos en agua potable (Choi *et al.*, 2007). La tendencia de disminución en la eficiencia de reducción de la densidad celular, puede explicarse de acuerdo a lo propuesto en los apartados anteriores.



**Figura 7. Porcentaje de reducción en la densidad celular de los pellet de suspensiones de *Helicobacter pylori*, determinado mediante la detección del gen *ureB* por qPCR.** Sistemas de desinfección de 20 mL (densidad celular inicial =  $3 \times 10^5$  UFC/mL) fueron sometidos a las dosis de 0.4, 0.8, 1.2, 1.8 y 2.4 mg/L de  $O_3$  durante 4 min y alícuotas de 5 mL fueron tomadas y centrifugadas a 3,000 rpm durante 10 min. Los pellet fueron sometidos a extracción de ADN y evaluados mediante qPCR. La detección se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento del gen *ureB* y los datos de  $C_T$  fueron normalizados mediante una curva patrón de  $C_T$  en función a la concentración de UFCs en muestras sintéticas de formas cocoides de *H. pylori* en SSI estéril. Los porcentajes de reducción se obtuvieron haciendo la correlación entre los  $C_T$ s de los pellet resuspendidos y el factor de dilución de 1:4 respecto a los 20 mL del sistema total a una concentración inicial de  $3 \times 10^5$  UFC/mL.

## Propuesta final de la metodología para la reducción celular de suspensiones de formas cocoides de *Helicobacter pylori* tratadas con ozono y su análisis por qPCR

---

Los datos anteriores, así como la revisión bibliográfica que se realizó para los intereses de esta investigación, nos llevó a realizar la propuesta de un diseño experimental, mediante el cual se pudiera analizar el efecto del ozono sobre los niveles de densidad celular en suspensiones de *H. pylori*. El modelo primario de este diseño contempla, dentro de su fase inicial, la preparación de suspensiones al 100 % de formas cocoides de *H. pylori* mediante la inducción durante 10 días en solución salina isotónica estéril a partir de paquetes celulares obtenidos de las resiembras de cultivos primarios de la cepa bacilar 26695 (ver Figura 1 panel D). En seguida, para garantizar que la dosis de desinfección teórica de ozono, calculada a partir de una muestra inicial saturada, es la dosis real aplicada al sistema de desinfección, se propone, de acuerdo a los datos preliminares (Figura 2), planificar la dosificación inicial del sistema de desinfección durante los primeros 15 min de haber obtenido la solución saturada con ozono. Ahora bien, una vez incorporado en el seno del líquido debe permanecer cierto tiempo para lograr su efecto oxidante. Para ello, de acuerdo a nuestros resultados (Figura 5), es recomendable iniciar los procesos de desinfección con una concentración mínima de ozono de 0.8 mg/L en la suspensión, asegurando así mantener los niveles de ozono recomendados por estándares europeos. Adicionalmente, con base a los datos preliminares de las determinaciones por qPCR en suspensiones cocoides de *H. pylori* tratadas con diferentes dosis de ozono, estimamos que con concentraciones entre los 0.4 y 2.4 mg/L de ozono como dosis iniciales es posible reducir en un 99 % (2-log) la densidad celular de las muestras a los 4 min de tratamiento (Figura 7).

Considerando la revisión bibliográfica y los resultados de la figura 6, se sugiere someter las muestras que han sido tratadas con ozono a un procedimiento de filtración por membrana. Esto permitirá seleccionar y contener, en un medio apropiado para su cuantificación, células íntegras

de las cuales ADN podrá ser extraído, para su posterior análisis por qPCR. De esta manera, podrán ser comparables las cantidades relativas de producto amplificado *H. pylori*-específico, cuantificadas en muestras que han sido o no sometidas a tratamiento por ozono. Adicionalmente, curvas estándar podrán ser generadas mediante este método de análisis, a partir de filtros a través de los cuales se han pasado suspensiones no tratadas con concentraciones conocidas de formas cocoides de *H. pylori*. El número de células sobre los filtros de las curvas patrón y de las muestras reales podrán ser determinados mediante una extracción rápida de ADN y su posterior análisis por qPCR eligiendo como blanco los genes aquí empleados (*p27*, *ureB*), o bien los reportados por otros autores (*ureA*, *ureB*, *ureC*). Para implementar lo anterior se sugiere el desarrollo de la metodología mostrada en anexos (método A2), tomada de McDaniels *et al.* (2005).

Adicionalmente, se propone acotar el rango de dosis de ozono aplicada a los sistemas de desinfección de 0 a 0.6 mg/L para eventualmente observar diferencias en la reducción de la densidad celular al realizar una comparación entre las distintas dosis.

## XI. CONCLUSIONES

---

Los perfiles de decaimiento de ozono en agua destilada y de consumo en la suspensión cocoide de *H. pylori* en SSI presentaron las diferencias esperadas que se corroboran con la constante de decaimiento ( $k_c$ ), cuyos valores fueron  $-0.69 \text{ min}^{-1}$  para el agua destilada,  $-48.64 \text{ min}^{-1}$  para suspensión cocoide de *H. pylori* en SSI con una dosis inicial de ozono de  $0.4 \text{ mg/L}$  y  $-4.54 \text{ min}^{-1}$  para suspensión cocoide de *H. pylori* en SSI con una dosis inicial de ozono de  $0.8 \text{ mg/L}$ . Dichas constantes reflejan la estabilidad del ozono transferido a las matrices de trabajo en función del tiempo, generando criterios para la selección de las condiciones más adecuadas para la desinfección. Adicionalmente, la demanda inmediata refleja el consumo de ozono en las matrices de trabajo al primer minuto de haber transferido el ozono, con valores de  $0 \text{ mg/L}$  en agua destilada,  $0.21 \text{ mg/L}$  en una suspensión cocoide de *H. pylori* en SSI con una dosis inicial de ozono de  $0.4 \text{ mg/L}$  y de  $0.04 \text{ mg/L}$  en una suspensión cocoide de *H. pylori* en SSI con una dosis inicial de ozono de  $0.8 \text{ mg/L}$ . En consecuencia, el comportamiento cinético representado por estos valores, permite concluir que en estas condiciones el incremento en los valores de  $k_c$  y DI refleja un consumo de ozono adicionado, y el residual permite mantener una disponibilidad para continuar con la desinfección.

La dosis requerida de ozono que es indispensable transferir al sistema de desinfección estudiado es de  $0.8 \text{ mg/L}$ , lo que significa que dicha dosis decae de tal forma que permite mantener concentraciones de ozono por arriba de  $0.4 \text{ mg/L}$  durante al menos 4 minutos, con lo que se da cumplimiento a los estándares europeos.

En lo que concierne a la metodología propuesta, se observó que el paso de centrifugación post desinfección a las condiciones empleadas en esta investigación no es el más adecuado para separar células íntegras de material lisado para su análisis por PCR. En este sentido, la filtración parece ser el método más conveniente de acuerdo a la literatura. Por lo tanto, se propone desarrollar futuros experimentos que integren la metodología A2 de filtración propuesta en anexos.

Los experimentos preliminares de qPCR realizados en esta investigación indican que la dosis de ozono de 0.8 mg/L podría reducir la densidad celular infectiva de *H. pylori* de  $3 \times 10^5$  UFC/mL a  $1.2 \times 10^3$  UFC/mL en muestras de agua.

## XII. ANEXOS

---

### Método A1. Cuantificación de ozono en fase acuosa por el método del índigo

---

La dificultad de medir el ozono residual en una solución acuosa es estrictamente una consecuencia de su naturaleza, ya que el ozono se descompone con suma facilidad. El método de índigo es cuantitativo, selectivo y simple; además reemplaza a los métodos basados en la determinación de oxidantes totales. Es aplicable a agua de lagos, ríos, aguas subterráneas conteniendo manganeso, agua subterránea extremadamente dura y agua residual tratada biológicamente. Este método se basa en que la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de ozono. Esta constante de proporcionalidad a 600 nm es de  $0.42 \pm 0.01 \text{ cm} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  (Standar Methods, 1992; Great Ships Initiative, No: GSI/SOP/BS/RA/C/1, 2009 ).

Se tiene conocimiento de que existe algunos compuestos que interfieren en la medición, tal es el caso del peróxido de hidrogeno y de los peróxidos orgánicos, que decoloran el reactivo de índigo muy lentamente. El peróxido de hidrogeno no interfiere si el ozono se miden en menos de 6 horas después de añadir los reactivos. Los peróxidos orgánicos pueden reaccionar con mayor rapidez. El Fe (III) y Mn (III) no interfieren pero este último es oxidado por el ozono a formas que decoloran el reactivo. El cloro también interfiere, pero puede ser enmascarado por el ácido malónico. El bromo, que puede formarse por la oxidación de  $\text{Br}^-$ , interfiere (1 mol Br corresponde a 0.4 moles de ozono). De esta manera el uso de agua destilada-desionizada fue de suma importancia en el desarrollo de los experimentos de esta investigación.

## Equipos

---

Espectrofotómetro HACH DR-2800

## Reactivos

---

*Solución madre índigo.* En un matraz aforado de 1L, agregar 500 mL de agua, agregar 1 mL de ácido fosfórico concentrado y añadir con agitación, 770 mg de trisulfonato potásico de índigo, aforar con agua destilada. Una dilución 1:100 exhibe una absorbancia de 0.02 cm a 600 nm. La solución madre es estable por cuatro meses almacenada en frasco ámbar.

*Reactivo I.* En una matraz aforado de 1 L, añadir 20 mL de solución madre, 10 g de fosfato monobásico de sodio y 7 mL de ácido fosfórico concentrado. Diluir hasta el aforo (almacenar en frasco ámbar).

*Reactivo II.* Proceder como el reactivo de índigo I, añadiendo 100 mL de solución madre en lugar de 20 mL.

## Procedimiento espectrofotométrico

---

*Para un intervalo de concentración de ozono de 0.01 a 0.1 mg/L.* Añadir 10 mL de reactivo de índigo I a dos matraces aforados de 100 mL. Llenar uno de ellos hasta el aforo con agua destilada (blanco) y el segundo con la muestra a analizar. Medir la absorbancia a 600 nm lo antes posible y siempre dentro de las 4 horas siguientes. Utilizar celdas de 10 cm de largo y 1 cm de ancho.

*Para un intervalo de concentración de ozono de 0.05 a 0.5 mg/L.* Proceder como el punto anterior pero utilizar 10 mL de reactivo índigo II en lugar del reactivo I. Medir preferentemente la absorbancia en celdas de 4 o 5 cm.

*Para concentraciones superiores a 0.3 mg/L.* Se procede a utilizar el reactivo de índigo II, pero utilizando un volumen menor de muestra. Diluir la mezcla resultante a 100 mL con agua destilada.

## Cálculo de la concentración de ozono

---

Determinar la concentración de ozono en las muestras usando la siguiente ecuación:

$$[O_3]_r = \frac{(A_b - A_m)(100)}{0.42(V_m)(l)} \quad \text{donde}$$

$[O_3]_r$ : concentración de ozono en fase acuosa (mg/L)

$A_b$ : absorbancia del blanco

$A_m$ : absorbancia de la muestra

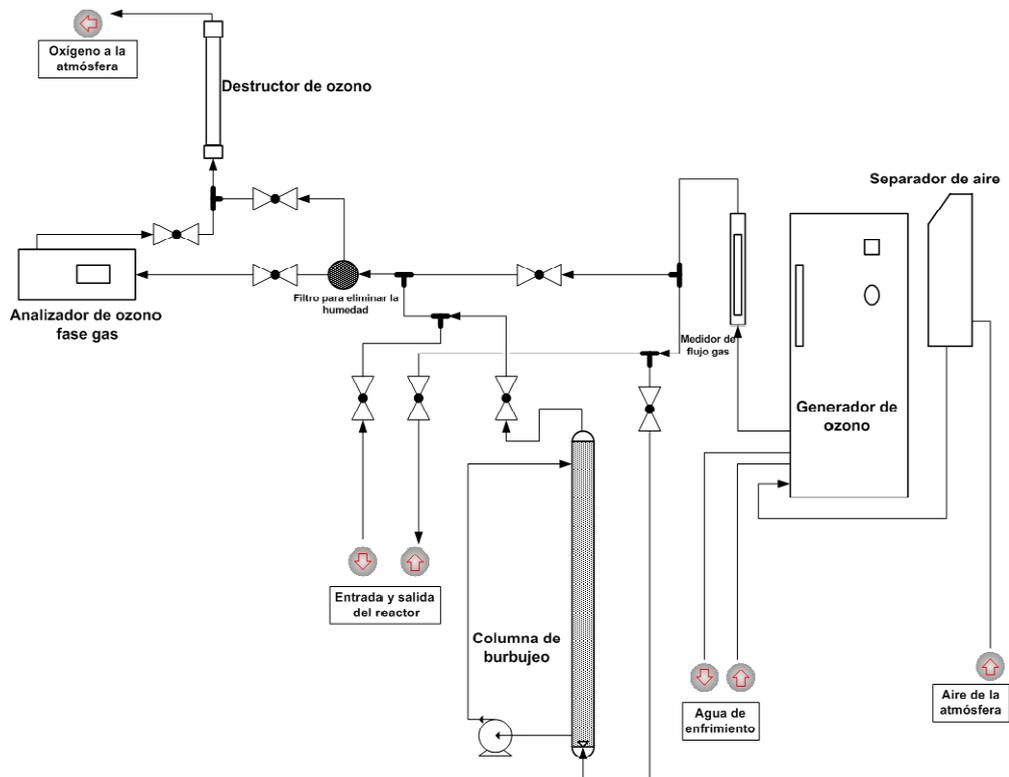
0.42: factor de sensibilidad de 20000/cm para el cambio de absorbancia (600 nm) por mol de ozono añadido por litro.

$V_m$ : volumen de muestra (mL)

$l$ : longitud de la celda (2.54 cm)

## Diagrama de unidad de oxidación con ozono

La preparación del agua saturada con ozono se llevó a cabo en una unidad de oxidación, compuesta por un separador de aire (Airsep modelo AS-12, USA), un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA) con capacidad de producción de 19 g de O<sub>3</sub>/h. Como unidad de contacto gas-líquido se utilizó una columna de burbujeo de vidrio de 2 L de capacidad, al final la corriente gaseosa fue enviada a una unidad de destrucción catalítica de ozono para su liberación segura al ambiente (Figura A1).



**Figura A1. Arreglo experimental del sistema de oxidación.** En la figura se muestra un diagrama que representa la unidad de oxidación usada en estos experimentos, localizada en el laboratorio de Ingeniería ambiental, Edificio 5 del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Método A2. Propuesta de metodología para someter las suspensiones cocoides de *Helicobacter pylori* tratadas con ozono a análisis por qPCR

---

Veinte mililitros obtenidos de las suspensiones cocoides de *H. pylori* sometidas o no a desinfección por ozono serán filtrados a través de filtros de policarbonato blanco Nucleopore™ (0.4 µm de porosidad y 47 mm de diámetro) (Whatman, Clifton, NJ) y los filtros serán sometidos a extracción de ADN y análisis por qPCR para medir la prevalencia de *H. pylori*. Adicionalmente, una solución stock con una concentración de  $3 \times 10^5$  UFC/mL será diluida serialmente 10 veces y filtrada como se describe arriba, para construir una curva patrón. Los filtros usados para la curva patrón, así como los usados para la recuperación de células de muestras reales, serán doblados y colocados en tubos Eppendorf de 2 mL (PGC Scientific, Gaithersburg, MD) que contendrán 0.3 g de perlas de vidrio estériles (Sigma) y 300 µL de una solución 0.2 mg/mL de ADN de salmón (Sigma) en buffer comercial AE (Qiagen, Stanford, CA) como control interno. Los tubos que contienen los filtros serán después agitados en vortex a máxima velocidad durante 2 min y centrifugados a 12,000 rpm por 1 min. Los sobrenadantes serán transferidos a tubos estériles para el posterior análisis por duplicado mediante qPCR tanto para el blanco de *H. pylori* como para el de salmón como se describe en las metodologías y en McDaniels *et al.* (2005), respectivamente.

### **XIII. AGRADECIMIENTOS**

---

Esta tesis se desarrolló en el marco del proyecto "*Identificación de subproductos y posibles daños celulares en Helicobacter pylori por acción del cloro y el ozono en agua potable*", que tiene lugar en el Instituto de Ingeniería de la UNAM, al cual se agradece enormemente el apoyo económico dado a la sustentante (Beca Ordinaria L2). Igualmente, se agradece la colaboración en los análisis de PCR punto final al Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

## XIV. BIBLIOGRAFÍA

---

- ❖ Adams, B., Bates, T., Oliver, J. (2003) Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment, Appl Environ Microbiol, 69 (12), 7462–7466.
- ❖ Alcántara, M. (2007) Detección de *Helicobacter pylori* mediante PCR en la saliva de pacientes con gastritis crónicas. Tesis de Licenciatura. México. Edo de Méx.
- ❖ Ayala, A. (2007) Efecto desinfectante del ozono sobre huevos de helmintos, bacterias y amibas en aguas residuales, Tesis de Licenciatura, México, D. F.
- ❖ Azevedo, N., Almeida, C., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C., Vieira, M. (2007) Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment, Appl. Environ. Microbiol, 73 (10), 3423–3427.
- ❖ Azevedo, N., Almeida, C., Fernandes, I., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C., Vieira, M. (2008) Survival of Gastric and Enterohepatic *Helicobacter spp.* in Water: Implications for Transmission, Appl Environ Microbiol, 74(6), 1805-1811.
- ❖ Azevedo, N., Vieira, M., Keevil, C. (2003) Establishment of a continuous model system to study *Helicobacter pylori* survival in potable water biofilms, Water Sci Technol, 47 (5), 155-60.
- ❖ Baker, K., Hegarty, J., Redmond, B., Reed, N., Herson, D., (2002) Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*, Appl Environ Microbiol, 68 (2), 981-984.
- ❖ Benaissa, M., Babin, P., Quellard, N., Pezzenec, L., Cenatiempo, Y., Fauchere, J. (1996) Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form, Infect Immun, 64(6), 2331-2335.
- ❖ Benson, J., Fode-Vaughan, K., Collins, M. (2004) Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR, Letters in Applied Microbiology , 39, 221–225.
- ❖ Bellack, N., Koehoorn, M., Macnab, Y. , Morshed, M. (2006) A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence, Epidemiol Infect, 134, 439–449.

- ❖ Bragança, S., Azevedo, N., Simoes, L., Vieira, M., Keevil, C. (2005) Detection of *H.pylori* in biofilms formed in a real drinking water distribution system using nucleic acid fluorescence in situ hybridization, *Biofilm Communities*, 231-239.
- ❖ Bunn, J., MacKay, W., Thomas, J., Reid, D., Weaver, L. (2002) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life, *Lett Appl Microbiol*, 34(6), 450-4.
- ❖ Cellini, L., Robuffo, I., Di Campli, E. (1998) Recovery of *Helicobacter pylori* ATCC43504 from a viable but not culturable state: regrowth or resuscitation? *APMIS*, 106, 571-579.
- ❖ Cervantes, E. (2006) *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas, *Rev Fac Med UNAM*, 49 (4), 163-168.
- ❖ Chaput, C., Ecobichon, C., Cayet, N., Girardin, S., Werts, C., Guadagnini, S. (2006) Role of AmiA in the Morphological Transition of *Helicobacter pylori* and in Immune Escape, *PLoS Pathog*, 2 (9): e97.
- ❖ Cho, M., Kim, J., Yoon, J. (2006) Investigating synergism during sequential inactivation of *Bacillus subtilis* spores with several disinfectants, *Wat Res*, 40, 2911 – 2920.
- ❖ Choi, Y., Cho, M., Lee, Y., Choi, J., Yoon, J. (2007) Inactivation of *Bacillus subtilis* spores during ozonation in water treatment plant: Influence of pre-treatment and consequences for positioning of the ozonation step, *Chemosphere*, 69, 675–681.
- ❖ Cole, S., Cirillo, D., Kafnoff, M., Guiney, D., Eckmann, L. (1997) Coccoid and Spiral *Helicobacter pylori* Differ in Their Abilities To Adhere to Gastric Epithelial Cells and Induce Interleukin-8 Secretion, *Infect Immun*, 65(2), 843–846.
- ❖ Cole, S., Harwood, J., Lee, R., She, R., Guiney, D. (2004) Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*, *J Bacteriol*, 186 (10), 3124-3132.
- ❖ Cortés, Ch. (2006) Estudio de la glicoproteína alfa-1 ácida (AGP) en línea celular THP-1. Estandarización de PCR en tiempo real, Tesis de Licenciatura, México D.F.
- ❖ Davey, M., O’toole. G. (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics, *Microbiol Mol Biol Rev*, 64 (4), 847-867.

- ❖ De la Vega R., González W., Stupka S. (2005) Relación entre Neoplasia Gástrica maligna, *Helicobacter pylori* y otros factores asociados, Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina, 162, 8-10.
- ❖ Domínguez, M., Beker, B., Guelrud, M., Vivas, J., Peraza, S., Pérez, M., Pericchi, L. (2002) Short report: socioeconomic and seasonal variations of *Helicobacter pylori* infection in patients in Venezuela, Am. J. Trop. Med. Hyg. 66(1), 49–51.
- ❖ Ernst, P., Gold, D. (2000) The disease Spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer, Annu Rev Microbiology, 54, 615-640.
- ❖ EUROGAST Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Lancet 1993;341:1359.
- ❖ Fernández, M., Contreras, M., García, M., Michelangeli A., Suárez P. (2008) Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*, Interciencia, 33 (6), 412-417.
- ❖ Fujimura, S., Kato, S., Kawamura, T. (2004) *Helicobacter pylori* in Japanese river water and its prevalence in Japanese children, Lett Appl Microbiol, 38 (6), 517-21.
- ❖ Giese, A., Christensen, E. (1953) Changes in absorption spectra of nucleic acids and their derivatives following exposure to ozone and ultraviolet radiations,
- ❖ González, J., Leal, L., Guzmán, S., Guzmán, G., González, N. (2004) *Helicobacter pylori* y enfermedad, Revista Alergia México, 51 (6), 218-225.
- ❖ Goodman, K., Correa, P., Aux, H., Ramírez, H., DeLany, J., Guerrero, O., Lopez, M., Collazos, T. (1996) *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways, Am J Epidemiol, 144 (3), 290-299.
- ❖ Graham, D. (1994) Evolution of concepts regarding *Helicobacter pylori*: from a cause of gastritis to a public health problem., Am J Gastroenterol, 89, 469.
- ❖ Gribbon, L., Barer, M. (1995) Oxidative Metabolism in nonculturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* cells studied by substrate-enhanced tetrazolium reduction and digital image processing. Appl Environ Microbiol, 61(9), 3379–3384.



- ❖ Makristathis, A., Pasching, E., Schütze, K., Wimmer, M., Rotter, M., Hirschl, A. (1998) Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay, *J Clin Microbiol*, 36 (9) 2772–2774.
- ❖ McDaniels, A., Wymer, L., Rankin, C., Haugland, R. (2005) Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water, *Wat Res*, 39, 4808–4816.
- ❖ Mizoguchi, H., Fujioka, T., Kishi, K., Nishizono, A., Kodama, R., Nasu, M. (1998) Diversity in protein synthesis and viability of *Helicobacter pylori* coccoid forms in response to various stimuli, *Infect Immun*, 66(11), 5555-5560.
- ❖ Mobley, H., Mendz, G., Hazell, S. (2001) Epidemiology of Infection. In: *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington, DC, ASM Press, 7-30.
- ❖ Montero, V. (2009) Enfoques ambientales en la epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*, *Rev Costarr Salud Pública*, 18 (2), 84-93.
- ❖ Nagai, S., Mimuro, H., Yamada, T., Baba, Y., Moro, K., Nochi, T., Kiyono, H., Suzuki, T., Sasakawa, C., Koyasu, S. (2007) Role of Peyer's patches in the induction of *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *PNAS*, 104 (21), 8971–8976.
- ❖ Navarro, H., Perea, T., Pineda, M., Díaz, A. (2007) Evaluación de la productividad de tres medios de cultivo para la recuperación de *Helicobacter pylori*, *Universitas Scientiarum, Revista de la Facultad de Ciencias*, 12 (3) 79-86.
- ❖ Nilson, H., Blom, J., Abu, W. (2002) Effect of cold starvation acid Stress, and Nutrients on metabolic Activity of *Helicobacter pylori*, *Appl Environ Microbiol*, 68 (1), 11-19.
- ❖ NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".
- ❖ Olaya, S. (2008) Comparación de una técnica estandarizada de PCR en tiempo real y PCR convencional para la detección del gen *cagA*, de *Helicobacter pylori*. Tesis de Licenciatura. Bogotá. D. C.
- ❖ Oliver, J. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria, *J Microbiol*, 43 (S), 93-100.
- ❖ Organización Mundial de la Salud, (2006) Guías para la calidad del agua potable: recomendaciones, 3ª. Edición, 1.

- ❖ Ortega, N. (2008) Detección y aislamiento de *Helicobacter pylori* en muestras de agua de la Ciudad de México. Tesis de Licenciatura. México. D.F.
- ❖ Owen, R. (1998) *Helicobacter*-species classification and identification, *British medical bulletin*, 54 (1), 17-30.
- ❖ Park, S., Mackay, W., Reid, D. (2001) *Helicobacter sp.* recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system, *Wat Res*, 35 (6), 1624-1626.
- ❖ Queralt, N., Araujo, R. (2007) Analysis of the survival of *H. pylori* within a laboratory-based aquatic model system using molecular and classical techniques, *Microb Ecol*, 54(4), 771-777.
- ❖ Romero, R. (2005) Desinfección de agua potable y de aguas residuales tratadas por métodos de cloración, Tesis de Licenciatura, México, D. F.
- ❖ Saldivar, H. (2007) Determinación de la diversidad genética de la región secuencia señal del gen vacA de *Helicobacter pylori* por RFLP-PCR, Tesis de Licenciatura, Edo de México.
- ❖ Scott, Mc., Leshner, E. (1963) Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 85, 567- 576.
- ❖ Shahamat, M., Alavi, M., Watts, J., Gonzalez, J., Sowers, K., Maeder, D., Robb, F. (2004) Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*, *J Clin Microbiol*, 42 ( 8), 3613–3619.
- ❖ Shahamat, M., Mai, U., Paszko-Kolva, C. (1993) Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water, *Appl Environ Microbiol*, 59 (4), 1231-1235.
- ❖ She, F., Lin, J., Liu, J., Huang, C., Su, D. (2003) Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice, *World J Gastroenterol*, 9(3), 516-520.
- ❖ Tebbut ,T. H. Y. 1998. Principles of water quality control. 5<sup>th</sup> edition. pp 1-57.
- ❖ Torres, J., Herrera, Y., Perez, G., Gomez, A., Camorlinga, M., Cedillo, R, Tapia, R., Muñoz, O. (1998) A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico, *J Infect Dis*. 178, 1089–94.

- ❖ Trujillo, J. (2006) Evaluación del ácido peracético, radiación ultravioleta y cloro para la desinfección de una fuente no convencional de agua (Valle de Tula), Tesis de Maestría, México, D.F.
- ❖ USEPA, (1999) Combined sewer overflow technology fact sheet: Alternative disinfection methods, Office of Water Washington, D.C., EPA 832-F-99-033.
- ❖ USEPA (2002) Ozone, EPA Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants, 1-17.
- ❖ Yannuzzi, H. (1991) el ABC del ozono, FG Ingeniería.
- ❖ Yáñez, M., Barberá, V., Soria, E., Catalán, V. (2008) Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the *cag* pathogenicity island gene, *cagE*, J Appl Microbiol, 107, 416-424.
- ❖ Watson, C., Owen, R., Said, B., Lai, S., Lee, J., Surman-Lee, S., Nichols, G. (2004) Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England, J Appl Microbiol, 97(4), 690-8.