



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA DESINFECCIÓN  
CON OZONO SOBRE *Helicobacter pylori* EN ESTADO  
VIABLE NO CULTIVABLE (VNC) MEDIANTE Q-PCR  
COMBINADA CON PROPIDIO MONOAZIDA (PMA)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**AXAYACATL LUNA MARTÍNEZ**

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ISAURA YÁÑEZ NOGUEZ

ASESOR INTERNO:

M. EN C. GERMÁN CALVA VÁSQUEZ

CD.MX.,2016





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



**“Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental que cuenta con certificación de la calidad ISO 9001:2008 otorgada por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C. (IMNC) con registro RSGC 960 de fecha 11 de enero de 2016, vigente al 11 de enero de 2019”**

# Agradecimientos

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su patrocinio a través de los PROYECTOS DE DESARROLLO CIENTÍFICO PARA ATENDER PROBLEMAS NACIONALES 2014. SOLICITUD 247605. “Desinfección eficaz de agua con presencia de bacterias emergentes resistentes (*Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium avium*) evaluando las formas viables no cultivables mediante técnicas moleculares”.

De igual manera agradezco el apoyo brindado por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, departamento de Infectología, su infraestructura fue particularmente importante para el desarrollo de este proyecto.

Quiero agradecer al instituto de ingeniería y todo su personal por brindarme la oportunidad de ser parte de su comunidad y realizar mi tesis en esta institución.

A la facultad de estudios superiores Zaragoza y a todos mis maestros por mi formación académica y de darme la oportunidad de conocer a increíbles personas.

Al pueblo trabajador de México que hace posible la educación pública gracias.

“Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad.”

— Karl Popper

# *Agradecimientos*

Mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis Isaura Yáñez Noguez por su apoyo, dirección y la paciencia para guiarme durante el desarrollo de esta tesis y más que nada por su amistad.

Lidia te agradezco tu amistad, ánimo, compañía y tantas risas, durante este largo trayecto, por fin lo logramos. Mucha suerte en tu siguiente objetivo.

A mis compañeros del cubículo 410 Tere, Andrea, Isaac, Regina, Gris y Vero con los que he compartido gran parte de mi trabajo les agradezco toda la ayuda que me han prestado, así como los buenos momentos que he pasado en su compañía.

Eli, Marianne, Julieta, Miriam, Jenni, Iván Emanuel y Daniel, quiero agradecerles todas las risas y divertidos momentos que pasamos juntos.

A mis amigos que son muy especiales para mi Erick, Janet, Saúl, Tania, Sharon y Rebeca, que pasar de no verlos tanto como antes les agradezco acompañarme siempre.

## *Dedicatorias*

Dedico esta tesis a mis padres por su amor, comprensión y confianza. Porque han fomentado en mí, el deseo de superación y triunfo en la vida.

A mi hermana Quetzali por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada momento.

A mi tía Elodia y mis primos David y Tzitzire, por su ejemplo de dedicación y esfuerzo en busca de cumplir sus sueños.

A mi primo Tonatiuh mi gran compañero de juegos y risas.

A la familia Luna por el amor y apoyo de todos mis tíos y primos.

A mí querida segunda familia mis amigos Gabi, Mariell, Dianelly, Mara, Toño y Levinn que aunque ya hemos emprendido otros caminos, compartimos increíbles momentos que recordare por siempre.

<b>RESUMEN .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
2.1 Características generales.....	13
2.1.1 Factores de Virulencia de <i>H. pylori</i> .....	14
2.2 Aspectos clínicos .....	16
2.2.1 Gastritis.....	16
2.2.2 Úlcera péptica .....	16
2.2.3 Cáncer gástrico.....	17
2.3 Epidemiología .....	17
2.4 Vías de transmisión.....	18
2.4.1 Vías de transmisión directa.....	19
2.4.2 Vías de transmisión indirecta .....	20
2.5 Estado viable no cultivable .....	24
2.5.1 Características del estado VNC .....	25
2.5.2 Importancia del estado VNC .....	26
2.5.3 VNC de <i>H. pylori</i> .....	27
2.6 Métodos de detección de patógenos.....	30
2.6.1 Cultivo.....	30
2.5.4 Métodos moleculares .....	30
2.5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
2.6.4 PCR en tiempo real.....	33
2.6.5 PMA-PCR .....	34
2.7 Desinfectantes para el Tratamiento de Agua.....	36
2.7.1 Cloración.....	38
2.7.2 Radiación Ultravioleta (UV).....	39
2.8.3 Ozono .....	40
2.8.4 Eficacia de las diferentes tecnologías de desinfección.....	41

<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>43</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
4.1 General .....	45
4.2 Particulares .....	45
4.3 Justificación .....	45
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>46</b>
5.1 Microbiología .....	47
5.1.1 Cultivo de <i>H. pylori</i> .....	47
5.1.2 Inducción del estado VNC de <i>H. pylori</i> .....	48
5.2 Experimentos de desinfección con ozono .....	48
5.2.1 Proceso de ozonación.....	49
5.2.2 Desinfección del inóculo de <i>H. pylori</i> .....	51
5.2.3 Recuperación celular de <i>H. pylori</i> .....	52
5.3 q-PCR PMA.....	52
5.3.1 Intercalación PMA.....	52
5.3.2 Extracción de ADN.....	53
5.3.3 Amplificación por PCR en tiempo real .....	54
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
6.1 Cultivo .....	55
6.2 q-PCR .....	56
6.3 Cuantificación .....	59
6. 4 Desinfección .....	59
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>



Índice de figuras

<b>Figura 1</b> <i>Helicobacter pylori</i> imagen 3-D (Marshall 2002).....	13
<b>Figura 2</b> Vías de trasmisión de <i>H. pylori</i> (Azevedo et al., 2007.) .....	19
<b>Figura 3</b> Modelo conceptual de las vías de trasmisión por agua de <i>H. pylori</i> .....	24
<b>Figura 4</b> Conversión de <i>H. pylori</i> en forma espiral a forma cocoide.....	29
<b>Figura 5</b> Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.....	32
<b>Figura 6</b> Gráfico de amplificación de PCR a tiempo real. ....	33
<b>Figura 7</b> Estructuras químicas Etidio monoazida y Propidio monoazida .....	34
<b>Figura 8</b> Principio de detección selectiva de células viables utilizando PMA .....	35
<b>Figura 9</b> Etapas de estudio.....	46
<b>Figura 10</b> Cultivo en medio agar y Caldo BHI en condiciones anaerobias.....	47
<b>Figura 11</b> Organización de la unidad de oxidación utilizada en este estudio. ....	50
<b>Figura 12</b> Proceso de foto activación PMA-ADN. ....	52
<b>Figura 13</b> Equipo de extracción de ADN .....	53
<b>Figura 14</b> Cultivos de <i>H. pylori</i> .....	55
<b>Figura 15</b> Monitoreo del crecimiento de <i>H. pylori</i> en caldo BHI .....	55
<b>Figura 16</b> Diagrama de amplificación señal positiva de detección de <i>H. pylori</i> y señales negativas. ....	56
<b>Figura 17</b> Diagrama de amplificación de la curva estándar .....	57
<b>Figura 18</b> Determinación del número de genomas bacterianos .....	58
<b>Figura 19</b> Cuantificación del número de copias de <i>H. pylori</i> para cada ciclo umbral .....	59
<b>Figura 20</b> Reducción logarítmica de <i>H. pylori</i> en estado viable respecto al CT aplicado. ....	61
<b>Figura 21</b> Grafica de reducción log con forme el aumento de concentración para <i>H pylori</i> VNC.....	62

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Métodos de detección de <i>H. pylori</i> (Fernández et al., 2008).....	21
<b>Tabla 2</b> Ventajas y limitaciones de los sistemas de desinfección (EPA, 2011). ...	42
<b>Tabla 3</b> Condiciones experimentales para la desinfección con ozono. ....	49
<b>Tabla 4</b> secuencia de sonda y primers utilizados.....	54
<b>Tabla 5</b> Reactivos de q-PCR .....	54
<b>Tabla 6</b> Reducción en log de <i>H. pylori</i> estado viable sometida a un proceso de desinfección con ozono.....	60
<b>Tabla 7</b> Reducción en log de <i>H. pylori</i> estado VNC sometida a un proceso de desinfección con ozono.....	61

## RESUMEN

La presente tesis se realizó con el fin de evaluar la aplicación del ozono como proceso para la desinfección de agua contaminada con *Helicobacter pylori* en estado viable no cultivable (VNC), para lo cual es preciso determinar la viabilidad de las células una vez que son sometidas a desinfección. Dicha viabilidad no puede ser evaluada por métodos tradicionales como el cultivo en placa, dado que se encuentra en un estado, que como su nombre lo indica no puede ser cultivado. Para resolver ésta problemática se aplicó la técnica de PCR cuantitativa (q-PCR) combinada con un colorante de viabilidad, el propidio de monoazida (PMA). Los resultados muestran que la dosis y tiempo de contacto ideales, corresponden a un CT de 0.8 O<sub>3</sub> mg/L·min (0.6·1.33) en este CT se consigue una inactivación 3 log, lo cual corresponde a una inactivación de 99.9% de microorganismos. La metodología q-PCR PMA permite la cuantificación selectiva de células viables de *H. pylori* sometidas a desinfección con ozono y es posible determinar de manera precisa la reducción de microorganismos, esta técnica permite resultados independientes a condiciones de cultivo.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades relacionadas con la contaminación del agua de consumo constituyen un problema importante para la salud humana, el abastecimiento de agua para uso y consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades, es por ello necesario dirigir investigaciones que permitan lograr una calidad del agua potable tan segura como sea posible (WHO 2003).

Los patógenos de importancia en el agua pueden sobrevivir y seguir siendo infeccioso en el medio durante largos períodos de tiempo, además de ser resistentes a los tratamientos de desinfección (Arnone y Walling, 2007). Dentro de las bacterias patógenas con potencial transmisión hídrica se encuentra *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), la cual es una bacteria gram-negativa que se ha consolidado como el agente etiológico de gastritis aguda o crónica y un factor predisponente en la enfermedad de úlcera péptica y cáncer gástrico (Asaka *et al.*, 2001). Se estima que cerca del 80% de la población en países en vías de desarrollo está infectada con dicha bacteria y menos del 40% en países de primer mundo (Kusters *et al.*, 2006, Marshall, 2002).

Existe evidencia de que el agua puede ser un importante vehículo para la transmisión de *H. pylori* a los humanos. Esto es apoyado por la presencia de ADN de *H. pylori*, en agua del río, agua de pozo, aguas residuales, sistema de distribución, así como de aguas superficiales y subterráneas (Hulten *et al.*, 1996; Hegarty *et al.*, 1999; Mazari *et al.*, 2001; Nurgalieva *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2003; Mazari *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2008 y Santiago *et al.*, 2015). Específicamente, los estudios llevados a cabo por Mazari y colaboradores en 2001 y 2005, han informado de la presencia de ADN de *H. pylori* en algunas de las fuentes de abastecimiento de agua ubicadas en la Ciudad de México.

Se encuentra reportada la dificultad de aislar *H. pylori* directamente de fuentes ambientales, y se ha postulado que su incapacidad de cultivo se debe a su entrada en el estado viable pero no cultivable (VNC). El estado VNC es el estado en cual las bacterias no crecen en los medios bacteriológicos de rutina en la que normalmente deberían crecer y desarrollarse, sin embargo son viables. La mayoría de los investigadores creen que es una estrategia de supervivencia en respuesta a condiciones ambientales adversas, lo que constituye un importante reservorio de patógenos en el medio ambiente (Oliver 2005).

La capacidad de identificar las células en el estado de VNC es crucial, a lo largo de los años se han utilizado varios métodos para evaluar la viabilidad bacteriana, siendo las técnicas dirigidas a la integridad de la membrana las más empleadas (Li *et al.*, 2014). El método molecular enfocado en el ADN, como la PCR cuantitativa (del inglés, quantitative Polymerase Chain Reaction; o q-PCR) ha revolucionado la detección microbiana y hasta hace pocos años la mayor desventaja era su incapacidad para diferenciar entre células viables y no viables.

El enfoque para detectar células viables mediante q-PCR es la implementación del colorante de intercalación en ácidos nucleicos propidio de monoazida (PMA), el cual penetra selectivamente las células con las membranas celulares comprometidas, mientras que una membrana celular intacta presenta una barrera para esta molécula (Fittipaldi *et al.*, 2012).

Dentro de este contexto, para evaluar la desinfección del agua la metodología descrita en la presente tesis tiene un papel clave con el fin identificar los mecanismos más adecuados en la inactivación de *H. pylori* en estado VNC, ya que la aplicación de la metodología de q-PCR combinada con PMA es posible detectar bacterias en estado viables y comprobar la eficacia de los procesos de desinfección del agua.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Características generales

El género *Helicobacter* pertenece a la subdivisión *Proteobacteria*, clase *Epsilonproteobacteria*, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae*. Hasta la fecha, el género *Helicobacter* compone de más de 20 especies reconocidas. Las especies *Helicobacter* se pueden subdividir en dos grandes linajes, especies gástricas y especies no gástricas. Las especies gástricas se han adaptado a las condiciones inhóspitas que se encuentran en la superficie de la mucosa gástrica (Kusters *et al.*, 2006).

*H. pylori* es una bacteria gram-negativa en forma de S, la cual mide de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud y de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho, posee 6 flagelos unipolares que le dan gran movilidad. Esta bacteria se encuentra implicada en la etiología de la mayoría de las úlceras duodenales, gastritis y se cree que desempeñan un papel importante en el desarrollo de cáncer gástrico en humanos (Figura 1).

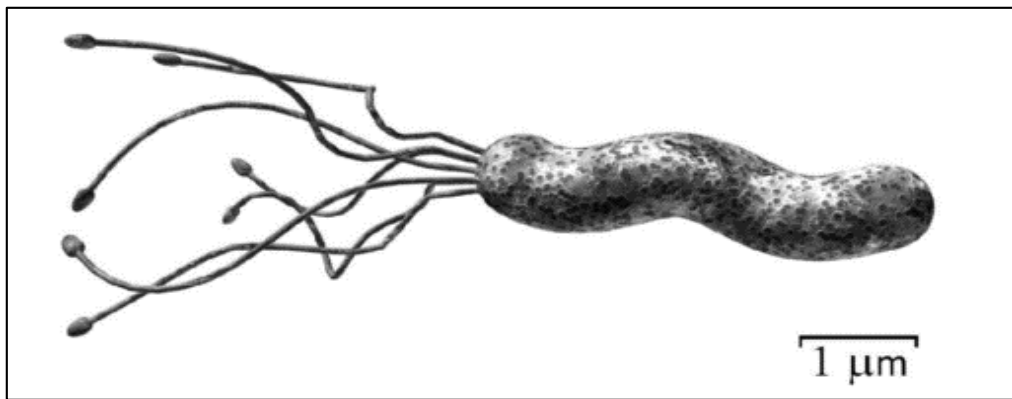


Figura 1 *Helicobacter pylori* imagen 3-D (Marshall 2002).

En general los cultivos de *H. pylori* tienen poca tolerancia de oxígeno, usualmente se cultiva en un ambiente microaerófilo en cámaras anaeróbicas. Crece en diferentes medios sólidos que contienen sangre. Las características de los cultivos, de *H. pylori* son colonias pequeñas (0.5 a 2 mm), de un color translúcido a amarillento, y debido a su pequeño tamaño, dichas colonias suelen ser difíciles de identificar y aislar cuando son pocas o se encuentran contaminadas con microbiota oral complementaria (Andersen *et al.*, 2003).

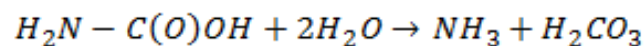
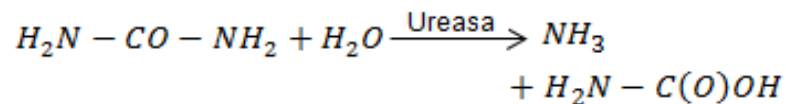
### 2.1.1 Factores de Virulencia de *H. pylori*

Para considerar un microorganismo como patógeno, la bacteria debe expresar atributos de virulencia. Hay varios factores de virulencia que influye en las capacidades de *H. pylori* para colonizar la capa epitelial gástrica, inducen la inflamación, y conducen a patologías.

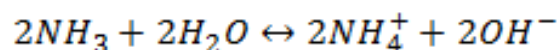
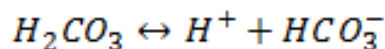
#### Ureasa

El jugo gástrico normal posee un pH <4 el cual le confiere un carácter bactericida y por tanto capaz de eliminar a muchas de las bacterias que llegan al estómago con la ingesta de agua y alimentos. La ureasa es crucial para el metabolismo de *H. pylori*, ya que es necesaria para mantener un microambiente con pH neutro durante la colonización de la mucosa gástrica.

La ureasa (amidohidrolasa de urea: EC 3.5.1.5) cataliza la hidrólisis de urea para producir amoniaco y carbamato. El último compuesto se descompone espontáneamente para producir otra molécula de amoniaco y ácido carbónico:



En soluciones acuosas, el ácido carbónico es liberado y las dos moléculas de amoniaco están en equilibrio con sus formas protonadas y desprotonadas, respectivamente.



El efecto neto de estas reacciones es un aumento en el pH, y está bien establecido que *H. pylori* crece mejor a pH neutro. La ureasa contribuye a la toxicidad celular mediante la producción de amonio como un subproducto.

Este proceso produce una respuesta inflamatoria localizada que conduce a daños del tejido epitelial gástrico (Castillo *et al.*, 2004). Esta enzima se utiliza para la identificación taxonómica, diagnóstico, y el seguimiento después del tratamiento.

### **Cag A y Vac A**

La proteína asociada a citotoxina (CagA) es el factor de virulencia más importante ya que se asocian a mayor riesgo de procesos inflamatorios. En particular, la proteína CagA es con frecuencia co-expresada con la citotoxina vacuolizante (VacA), que es la razón de la designación como una proteína asociada a citotoxina. Sin embargo la expresión de VacA es independiente de la presencia del gen CagA, e induce la vacuolización masiva en las células epiteliales. Se ha demostrado en diversos estudios, que los pacientes con altos niveles de anticuerpos contra proteínas VacA y CagA mostraron patologías gástricas severas y tienen mayor riesgo de desarrollar adenocarcinoma y linfoma gástrico (Castillo *et al.*, 2004).

### **Flagelos**

La motilidad flagelar es una importante determinante de la colonización de estos organismos, debido a posibles presiones evolutivas de residir en los medios de moco viscoso, las especies *Helicobacter* demuestran inusualmente altas velocidades y movimientos en sustancias viscosas en comparación con muchas otras bacterias móviles (Lertsethtakarn *et al.*, 2011).

Cada flagelo de las especies *Helicobacter* está encerrado en una vaina membranosa, una propiedad relativamente atípica de flagelos bacterianos. En cuanto a la función, una posibilidad es que la vaina impide el reconocimiento por anticuerpos o receptores de inmunidad innata, esta sugerencia es apoyada por la observación de que los anticuerpos específicos de flagelina no se unen a las vainas *H. pylori* (Lertsethtakarn *et al.*, 2011).



## 2.2 Aspectos clínicos

La colonización por *H. pylori* no es una enfermedad en sí, sino una condición que conlleva al riesgo de desarrollar diversos trastornos clínicos gastrointestinales. Las pruebas clínicas para *H. pylori*, se realizan con el fin de encontrar una posible enfermedad subyacente, como podría ser una úlcera péptica, o la prevención de enfermedades como por ejemplo el cáncer gástrico. En estos casos, un resultado positivo justifica un tratamiento y un resultado negativo puede indicar la necesidad de buscar otros factores etiológicos o medidas preventivas (Kusters *et al.*, 2006).

Las primeras teorías sobre las causas de úlceras gástricas estaban relacionadas con factores patogénicos primarios tales como la producción de ácido gástrico en pacientes con glándulas hipersecretoras y como factores secundarios como el estrés, el alcohol, el tabaco, las drogas, alimentos irritantes y café. Con el trabajo de Marshall y Warren, estas teorías fueron reemplazados por la etiología bacteriana como la principal causa de la gastritis crónica, gástrica, úlcera duodenal y cáncer gástrico, puesto que la causa de la gastritis es un microorganismo, el uso de antibióticos es ahora un enfoque eficaz y seguro de tratamiento (Otero *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Gastritis

*H. pylori* coloniza la mucosa gástrica humana y produce una gastritis superficial como resultado de un proceso inflamatorio constante. Esta gastritis superficial puede permanecer asintomática durante el resto de la vida del individuo colonizado, o después de años o décadas el paciente puede desarrollar la enfermedad de úlcera péptica o gastritis atrófica. Alguna de estas patologías podría ser el primer paso en la evolución del cáncer gástrico (Otero *et al.*, 2014).

### 2.2.2 Úlcera péptica

Las úlceras gástricas o duodenales (comúnmente conocidos como úlceras pépticas) se definen como defectos de la mucosa con un diámetro de al menos 0,5 cm de penetración a través de la muscularis mucosae. En informes de todo el mundo en la primera década después del descubrimiento de *H. pylori*, aproximadamente el 95% de las úlceras duodenales y 85% de las úlceras gástricas se produjeron en la

presencia de una infección por *H. pylori*. La eliminación de *H. pylori* cambia dramáticamente el curso de la enfermedad y previene casi completamente recurrencia de la úlcera (Kusters *et al.*, 2006).

### 2.2.3 Cáncer gástrico

La inflamación crónica inducida por *H. pylori* eventualmente puede conducir a la pérdida de las funciones normales de la mucosa gástrica, así como a la destrucción de glándulas gástricas originando una condición gastritis atrófica, el riesgo de desarrollar la enfermedad depende de la distribución y el patrón de la inflamación crónica activa, a pesar de que no dan lugar a síntomas específicos, aumentan el riesgo de cáncer gástrico (Kusters *et al.*, 2006).

La evidencia de que *H. pylori* aumenta el riesgo de desarrollo de cáncer gástrico a través de la atrofia y la metaplasia se origina a partir de diversos estudios, en los que se demostró que los sujetos positivos para *H. pylori* desarrollan estas condiciones con más frecuencia que los no infectados. Esto es apoyado por asociaciones geográficas entre la prevalencia de *H. pylori* y la incidencia de cáncer gástrico. Sobre la base de estos hallazgos, se estimó que la colonización por *H. pylori* aumenta el riesgo de cáncer gástrico aproximadamente 10 veces y *H. pylori* fue designado un carcinógeno de clase I por la OMS (Kusters *et al.*, 2006).

## 2.3 Epidemiología

Se estima que más de la mitad de la población mundial es portadora de *H. pylori*, por lo que es una de las infecciones bacterianas más comunes en el mundo. En general, la prevalencia global es mayor en los países de regiones subdesarrolladas, como África y Asia, que en los países más desarrollados de Europa Occidental y América del Norte. Donde en general la prevalencia del *H. pylori* está disminuyendo como resultado de las mejoras en las condiciones sanitarias (Azevedo *et al.*, 2007).

Se estima que pacientes positivos tienen un riesgo de por vida de 10 a 20% de desarrollar la enfermedad de úlcera y un riesgo de 1 a 2% de desarrollar cáncer gástrico (Kusters *et al.*, 2006).

Sin embargo, todavía no se conoce el por qué algunos individuos colonizados permanecen relativamente asintomáticos, mientras que otros presentan enfermedades digestivas (Bellack *et al.*, 2006). Las diferencias en los resultados se cree que son el resultado de una variedad de factores, incluyendo la edad a la adquisición, los factores dietéticos y las características genéticas tanto del anfitrión, así como de la cepa de *H. pylori* presente (Otero *et al.*, 2014).

Ahora es bien sabido que la infección por *H. pylori* se adquiere sobre todo en la infancia, sin embargo los adultos también pueden adquirir la infección pero en menores tasas. La evidencia reciente también ha demostrado que varias cepas de *H. pylori* y otros *Helicobacter spp* son capaces de infectar simultáneamente el tracto gastrointestinal de un individuo. Incluso en algunos casos se pueden producir múltiples cepas como resultado de una intensiva recombinación genética (Azevedo *et al.*, 2007).

En México la seroprevalencia a la infección de *H. pylori* reportada indica que el 66% de la población es portadora, siendo la edad el factor de riesgo más importante de infección. En la edad de 1 año el 20% está infectado, para los 10 años de edad el 50% y en llegando a la edad de 25 años más de 80% de los adultos están infectados (Torres *et al.*, 1998).

## 2.4 Vías de transmisión

Se han realizado numerosos estudios con el fin de identificar los factores que influyen en la transmisión de este patógeno, sin embargo las rutas siguen siendo poco claras. Se ha propuesto como vía de infección directa tres formas principales: oral-oral, gastro-oral y fecal-oral. Además, hay al menos tres vectores posibles que se han sugerido pueden sustentar a la bacteria: el agua, los alimentos y los animales (Figura 2) (Azevedo *et al.*, 2007).

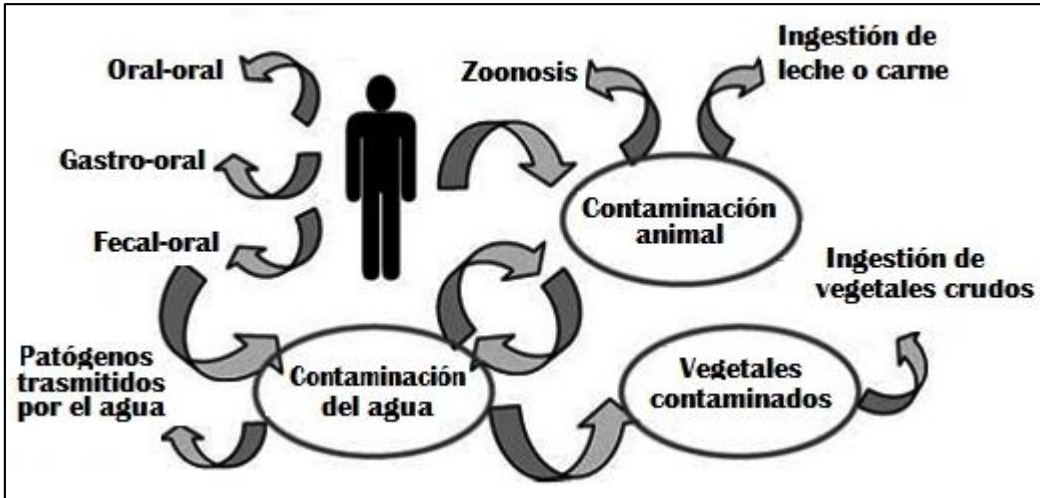


Figura 2 Vías de trasmisión de *H. pylori* (Azevedo *et al.*, 2007.)

### 2.4.1 Vías de trasmisión directa

#### Gastro-oral

La transmisión gastro-oral se ha postulado principalmente para los niños pequeños, entre los cuales vómitos y el reflujo gastro-esofágico son comunes. El estudio de Perry *et al.*, 2006 demostró que la exposición a un miembro de la familia infectado con episodios de vómitos se asocia con un riesgo seis veces mayor de infección (Azevedo *et al.*, 2007).

Las investigaciones epidemiológicas indican que el vómito es un vehículo eficaz para la transmisión de gastro-oral, se ha estudiado el vómito de sujetos infectados y el aire circundante, resultando positivas todas las muestras de vómito (a menudo en grandes cantidades) y el aire circundante fue positivo en un 37,5% de los casos (Azevedo *et al.*, 2007).

#### Oral-oral

La cavidad oral ha sido considerada como un depósito adecuado de subsistencia para *H. pylori* y la transmisión oral-oral, se ha sugerido que se produzca por besos u otro contacto con la saliva infectada. El estudio realizado por Olivier *et al.*, 2006 indicaron que la cavidad oral no favorece la colonización prolongada de *H. pylori* y concluyeron que la colonización de la boca es sólo transitoria.

## Fecal-oral

El principal argumento importante para la transmisión de *H. pylori* por medio fecal-oral fue el aislamiento y crecimiento de bacterias provenientes de heces humanas. La ruta fecal-oral demostró tener similitud de la transmisión a otras infecciones gastrointestinales bacterianas, en particular la hepatitis A (Plonka *et al.*, 2014).

### 2.4.2 Vías de transmisión indirecta

#### Transmisión Zoonótica

Este posible modo de transmisión tiene un razonamiento evidente, el contacto directo o indirecto con animales representa un riesgo a la salud humana, la transmisión zoonótica representa una de las principales causas de enfermedad y muerte por enfermedades de tipo infeccioso en todo el mundo. En el caso de *H. pylori* los vectores considerados incluyen vacas, ovejas, cucarachas, moscas y animales domésticos. En relación con el riesgo de infección por animales domésticos *H. pylori* no se ha encontrado en perros y muy raramente en los estómagos de los gatos (Azevedo *et al.*, 2007).

#### Trasmisión por agua

Un gran número de estudios epidemiológicos sobre *H. pylori* han investigado el papel del agua o de condiciones relacionadas con el agua. Por ejemplo, el estudio realizado por Cellini *et al.*, 2004 mostró evidencia sobre de la presencia de *H. pylori*, ya sea libre o unido a las células planctónicas, indicando que los ambientes marinos costeros contaminados pueden ser un reservorio importante, desarrollando la hipótesis de una transmisión fecal-oral a través de aguas marinas.

Algunas evidencias sobre la ruta de transmisión acuática de *H. pylori* a humanos fueron aportadas por estudios epidemiológicos realizados en algunos países en vías de desarrollo. En Lima, Perú, demostraron la asociación entre la prevalencia de *H. pylori* en niños (48%) y el consumo de fuentes externas de agua (drenaje comunitario). Fernández *et al.*, en 2008 recopiló información acerca las fuentes de agua donde se ha detectado *H. pylori*, así como el método de detección (Tabla 1).

Tabla 1 Métodos de detección de *H. pylori* (Fernández *et al.*, 2008).

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i> EN AMBIENTES ACUÁTICOS		
Métodos	Fuente de agua	Referencias
Cultivo	Aguas residuales	Lu <i>et al.</i> , 2002.
	Agua de pozo contaminada in vitro	Degnan <i>et al.</i> , 2003
	Agua y plancton marino	Cellini <i>et al.</i> , 2005; Fernández <i>et al.</i> , 2007. Hultén <i>et al.</i> , 1996; Hultén <i>et al.</i> , 1998; Mazari-Hiriart <i>et al.</i> , 2001; McKeown <i>et al.</i> , 1999; Sasaki <i>et al.</i> , 1999; Baker y Hegarty, 2001; Horiuchi <i>et al.</i> , 2001; Park <i>et al.</i> , 2001; Bunn <i>et al.</i> , 2002; Watson <i>et al.</i> , 2004; Mazari-Hiriart <i>et al.</i> , 2005.
PCR	Agua potable, superficial y subterránea	Hultén <i>et al.</i> , 1998; Mazari-Hiriart <i>et al.</i> , 2001; Lu <i>et al.</i> , 2002; Queralt <i>et al.</i> , 2005.
	Lagos y ríos	McKeown <i>et al.</i> , 1999; Sasaki <i>et al.</i> , 1999; Moreno <i>et al.</i> , 2003; Fujimura <i>et al.</i> , 2004; Queralt <i>et al.</i> , 2005.
	Agua y plancton marino	Cellini <i>et al.</i> , 2004; Carbone <i>et al.</i> , 2005; Cellini <i>et al.</i> , 2005; Fernández <i>et al.</i> , 2007.
Inmunofluorescencia	Agua potable, superficial y subterránea	Hegarty <i>et al.</i> , 1999; Baker and Hegarty, 2001.
FISH	Aguas residuales	Moreno <i>et al.</i> , 2003; Piqueres <i>et al.</i> , 2006.
	Ríos	Moreno <i>et al.</i> , 2003; Piqueres <i>et al.</i> , 2006.
	Agua Marina	Piqueres <i>et al.</i> , 2006.
	Agua de riego	Piqueres <i>et al.</i> , 2006.

Otro trabajo realizado en una población chilena, encontró que la seropositividad a este patógeno fue superior a 60% en los grupos socioeconómicos más bajos, los cuales consumen vegetales no procesados que pudieron haber sido irrigados con aguas residuales (Fernández *et al.*, 2008).

*H. pylori* se ha detectado en los sistemas de aguas residuales, lo cual no es sorprendente dado que los hospederos podrían arrojar la bacteria en sus heces. Sin embargo los resultados positivos tanto en aguas residuales pre-tratada y post-tratada sugiere que el tratamiento de aguas residuales puede ser ineficaz en la eliminación de *H. pylori* de este medio (Mazari *et al.*, 2001) (Moreno *et al.*, 2007) (Santiago *et al.*, 2015).

La presencia del ADN específico de *H. pylori* en fuentes de agua de la ciudad de México ha sido reportado por Mazari *et al.*, en 2005; donde se evaluó la red de distribución de agua subterránea. Analizado muestras de pozos de extracción así como puntos de bombeo, analizando antes y después de la desinfección con cloro, utilizando parámetros micro-biológicos (coliformes totales, coliformes fecales, estreptococos, *Vibrio spp.*, y *H. pylori*). Se encontró que a pesar de la cloración el 90% de las muestras fueron positivas a microorganismos, identificando nueve géneros, la mayoría de los cuales se consideran parte normal de las floras intestinales de humanos y animales. Esto sugiere la contaminación de agua subterránea a través de las heces humanas y animales.

El caso en particular de detección de *H. pylori* el 20% de las muestras fue positivo, esto contrasta con el estudio previo de Mazari *et al.*, en 2001 en el que 68% de las muestras dio positivo para *H. pylori* en aguas subterráneas de un área específica en el sur de la ciudad de México. Donde los resultados de cloro mostraron que las concentraciones eran extremadamente bajas (0.02-0.06 mg/L), que son inferiores a los estipulados por la norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002 que establece de 0.2 a 1.5 mg/L de cloro libre residual.

### 2.1.1 Trasmisión por vegetales contaminados

Los estudios epidemiológicos han encontrado una relación positiva entre el consumo de verduras crudas y transmisión de *H. pylori*. Los vegetales crudos son sospechosos de ser vulnerables a la colonización por *H. pylori* cuando se utiliza agua contaminada para el lavado o irrigación. Es importante tener en cuenta que esta ruta asume que *H. pylori* es capaz de sobrevivir en agua y por lo tanto se debería considerar todos factores asociados con esta posible vía de transmisión (Azevedo *et al.*, 2007).

En muchos países, los efluentes de aguas residuales tratadas son vertidos al medio ambiente y en algunos casos las aguas tratadas son empleadas para usos domésticos, industriales y agrícolas. Actualmente este es el método más común de la reutilización de aguas residuales. Este hecho puede conducir a un aumento del riesgo de infección humana (Moreno *et al.*, 2012).

Bellack *et al.*, 2006, con base en la evidencia de diversos estudios microbiológicos y epidemiológicos, desarrollo un modelo conceptual de la transmisión de *H. pylori* a través del agua (Figura 3). La suposición más importante de este modelo es que los seres humanos y los animales son huéspedes de largo plazo y el agua es un depósito a corto plazo en el que *H. pylori* puede permanecer un período de tiempo antes de transmitirse a los humanos a través del consumo directo o indirecto por alimentos contaminados.



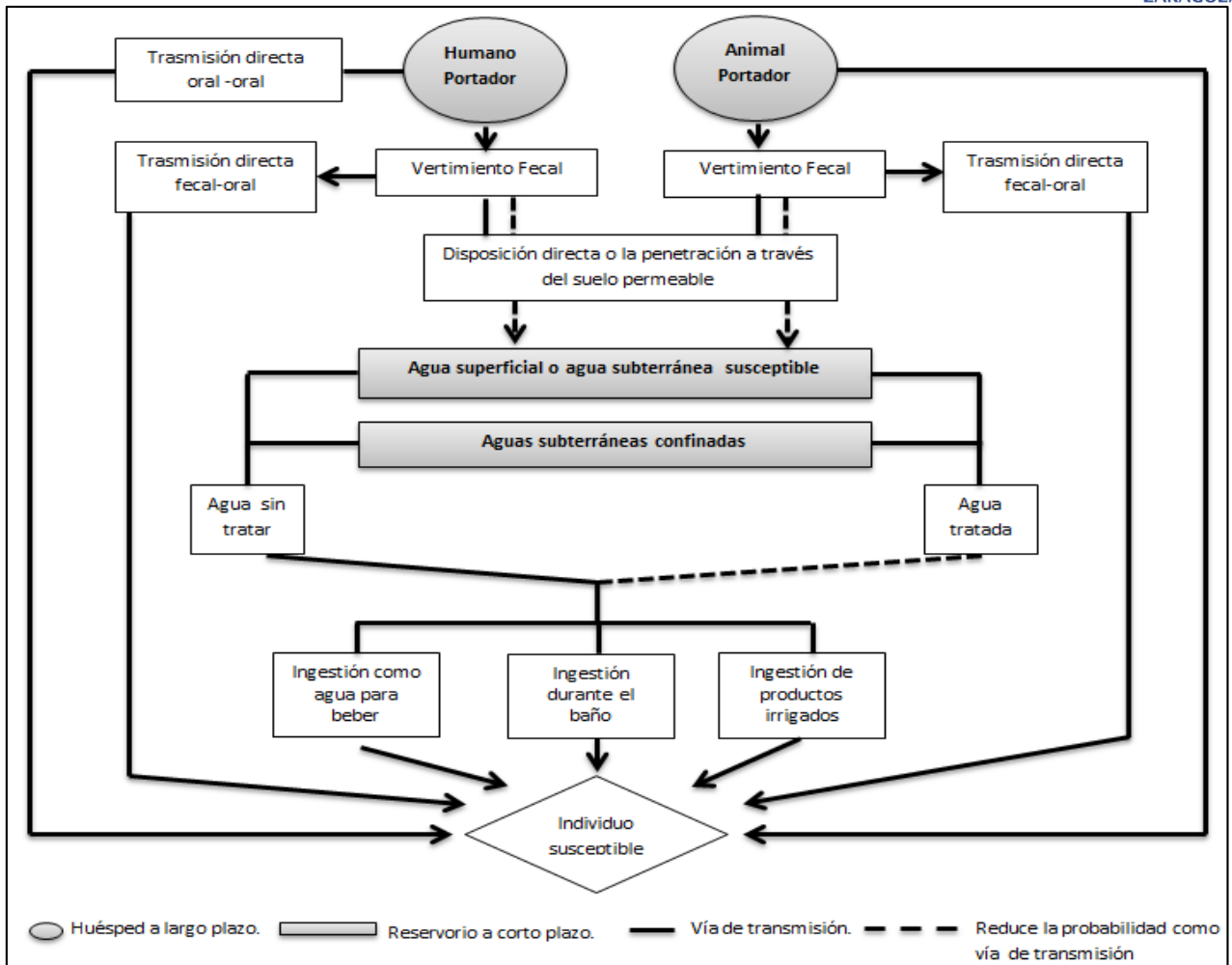


Figura 3 Modelo conceptual de las vías de transmisión por agua de *H. pylori* (Bellack *et al.*, 2006).

## 2.5 Estado viable no cultivable

Las bacterias tienen dos tipos de respuestas a nivel de población cuando se exponen a condiciones ambientales adversas: por un lado pueden sufrir una muerte celular masiva y las células supervivientes sirven como fuente para el nuevo crecimiento cuando las condiciones mejoran, o ajustan su fisiología celular para adaptarse a las condiciones adversas. Un mecanismo de supervivencia bien estudiado a largo plazo es la formación de endosporas, un mecanismo general limitado a bacterias gram-positivas (Stokell y Steck, 2006).

Esto condujo al cuestionamiento de si existe un mecanismo por el cual, las bacterias que no forman esporas pueden soportar condiciones hostiles durante largos períodos de tiempo. Un posible mecanismo de adaptación fue descrito por primera vez en 1981 con *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* donde se les identificó un estado latente en respuesta a la inanición. Dos años más tarde, el término viable pero no cultivable "VNC" (en inglés viable but non cultivable VBNC) se utilizó para describir esta condición (Stokell y Steck, 2006).

El estado VNC es definido como el estado en cual las bacterias no crecen en los medios bacteriológicos de rutina en los que normalmente deberían crecer y desarrollarse, pero están vivos y son capaces de mantener actividad metabólica. Las células VNC entran en este estado como una respuesta a alguna forma de estrés natural, tales como la falta de nutrientes, la incubación fuera del rango adecuado de temperatura, concentraciones osmóticas elevadas (por ejemplo, agua de mar), concentración de oxígeno, o la exposición a la luz blanca (Oliver, 2005).

Adicionalmente algunos estudios han encontrado que los procesos bactericidas pueden resultar en la formación de células en estado VNC. Estos incluyen tratamientos como la cloración de las aguas residuales. Lo que sugiere que se trata de una estrategia de adaptación para la supervivencia a largo plazo bajo condiciones desfavorables (Oliver, 2005).

### **2.5.1 Características del estado VNC**

Las células que adquieren el estado VNC presentan en general una reducción en el tamaño celular, además durante este período ocurre una serie de importantes cambios metabólicos, los cuales incluyen reducciones en el transporte de nutrientes, tasas de respiración y síntesis de macromoléculas. También muestran diferencias marcadas en la pared celular y composición de la membrana, incluyendo proteínas, ácidos grasos y peptidoglucanos (Li *et al.*, 2014).

Uno de los principales criterios de viabilidad se basa en la integridad de la membrana citoplásmica ya que cumple funciones vitales como separar el contenido celular del entorno exterior y regular el movimiento de las sustancias que van dentro

o fuera de la célula, entre otras. Las células muertas tienen la membrana dañada y por lo tanto no pueden retener el ADN cromosómico, mientras que las células VNC tienen una membrana intacta que contiene la información genética sin daños (Pinto *et al.*, 2013).

Para demostrar que las células se encuentren en un estado vivo comúnmente se han utilizado procedimientos de tinción diferencial y enumeración microscópica como por ejemplo, el ensayo Live/Dead® el cual utiliza el tinte fluorescente verde SYTO®9, que penetra tanto en células con membrana intacta como dañadas y el tinte fluorescente de color rojo yoduro de propidio, que sólo penetra en las membranas dañadas. Como resultado las células dañadas y muertas aparecen de color rojo, mientras que las células cultivables y VNC con una membrana intacta aparecen de color verde (Li *et al.*, 2014).

### 2.5.2 Importancia del estado VNC

La posibilidad de entrar en el estado VNC puede ser ventajoso para las bacterias, pero supone un riesgo para la salud humana. Si existen células VNC presentes, el número total de bacterias viables en una muestra será subestimado por el método de recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) debido a su inherente incapacidad de cultivo. Incluso peor si todas las bacterias en la muestra se encuentran en estado VNC, la muestra puede ser considerada como libre de patógenos debido a la no detección (Li *et al.*, 2014).

Actualmente, se han encontrado hasta 85 especies de bacterias que pueden entrar en el estado VNC bajo diferentes condiciones ambientales o experimentales. De estas 85 especies, 18 no son patógenos y 67 son patógenas (Li *et al.*, 2014). Dentro de esta lista se encuentran un gran número de patógenos humanos, incluyendo *Campylobacter spp.*, *E. coli*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, y *Vibrio vulnificus*.

### 3.2.1 Reanimación

El estado VNC sólo puede ser un medio importante de supervivencia si las células son capaces de aumentar la actividad metabólica y volver a ser cultivables. Demostrar la regeneración de las células en estado VNC ha sido problemático y una fuente de gran parte del desacuerdo sobre la validez del estado VNC (Oliver, 2010). El término "resucitación" fue utilizado por primera vez por Roszak en 1984 para describir la recuperación de células no cultivables de *S. enteritidis* después de la adición de un caldo de infusión corazón (Li *et al.*, 2014).

El principal problema que los investigadores encontraron cuando se realizan estudios de resucitación es la dificultad de diferenciar entre células que surgen de la reanimación del VNC y las células de re-crecimiento residuales. De todas las especies de patógenos humanos que pueden entrar en el estado VNC la reanimación solo se ha reportado en sólo 26 especies (Li *et al.*, 2014).

La Resucitación de estas especies fue provocada por una variedad de estímulos, tales como un aumento de la temperatura, aumento en la concentración de nutrientes, y la presencia de células huésped. Aunque la reanimación sólo se ha probado en pocos patógenos, esto no significa que los demás no pueden ser resucitados, es probable que todavía no se cumplieran los requisitos de reanimación (Li *et al.*, 2014).

### 2.5.3 VNC de *H. pylori*

La bacteria *H. pylori* se conoce principalmente por presentar una forma de espiral en el hábitat natural dentro del hospedador humano, pero esta puede convertirse en una forma cocoide cuando se expone a las circunstancias ambientales perjudiciales (Lopes *et al.*, 2014). La morfología de *H. pylori* es muy importante ya que se ha sido relacionada con la viabilidad. Varios investigadores han sugerido que la forma cocoidal de *H. pylori* solo representa una forma degenerativa sin capacidad infecciosa (Kusters *et al.*, 1997).

Sin embargo se han informado que las formas cocoides conservan una actividad metabólica, componentes estructurales importantes, así como su patogenicidad. Uno de los primeros estudios para demostrar la viabilidad del estado VNC en *H. pylori* lo realizó Bode *et al.*, en 1993, mostrando que *H. pylori* es capaz de transformarse en formas cocoides durante la exposición a los agentes antimicrobianos. Este autor identificó mediante microscopía electrónica que la forma cocoide es capaz de mantener un cierto metabolismo, lo que permite la conservación de importantes estructuras celulares como citoplasma, membrana celular, flagelos y ADN.

Adams *et al.*, 2004 examinó la entrada de *H. pylori* en VNC en cultivos de laboratorio y en un entorno natural de agua dulce, así como la relación entre la morfología y la capacidad de cultivo. Los resultados mostraron que existe una transición en la morfología a medida que se pierde la capacidad de cultivo. Además el estudio sugiere que la exposición al medio ambiente puede inducir a este organismo a entrar en el estado VNC y persistir en el medio ambiente hasta que entra en un huésped adecuado.

Acevedo *et al.*, 2007 determinó la viabilidad del estado cocoide, en superficies de cobre y de hierro galvanizado las cuales son perjudiciales para la supervivencia bacteriana. Evaluando el crecimiento mediante cultivo en placa y confirmando los resultados con la prueba de integridad de membrana SYTO9, la conversión total de todas las células a la forma cocoides se produjo en 48 h, concluyó que la forma cocoide es de hecho una manifestación de la adaptación celular a escasez de entornos óptimos, confirmando que las formas cocoides de *H. pylori* son viables pero en un estado no cultivable.

Las observaciones con el microscopio electrónico realizado por Dus *et al.*, 2013 mostraron la transformación morfológica de *H. pylori* de una forma helicoidal a una forma cocoide (Figura 4), el proceso comienza como una concavidad en la superficie bacteriana (número 1); la concavidad sigue creciendo lo que resulta en una bacteria en forma de U (números 2-3); por último se enrosca formando una célula cocoide (números 4-6).

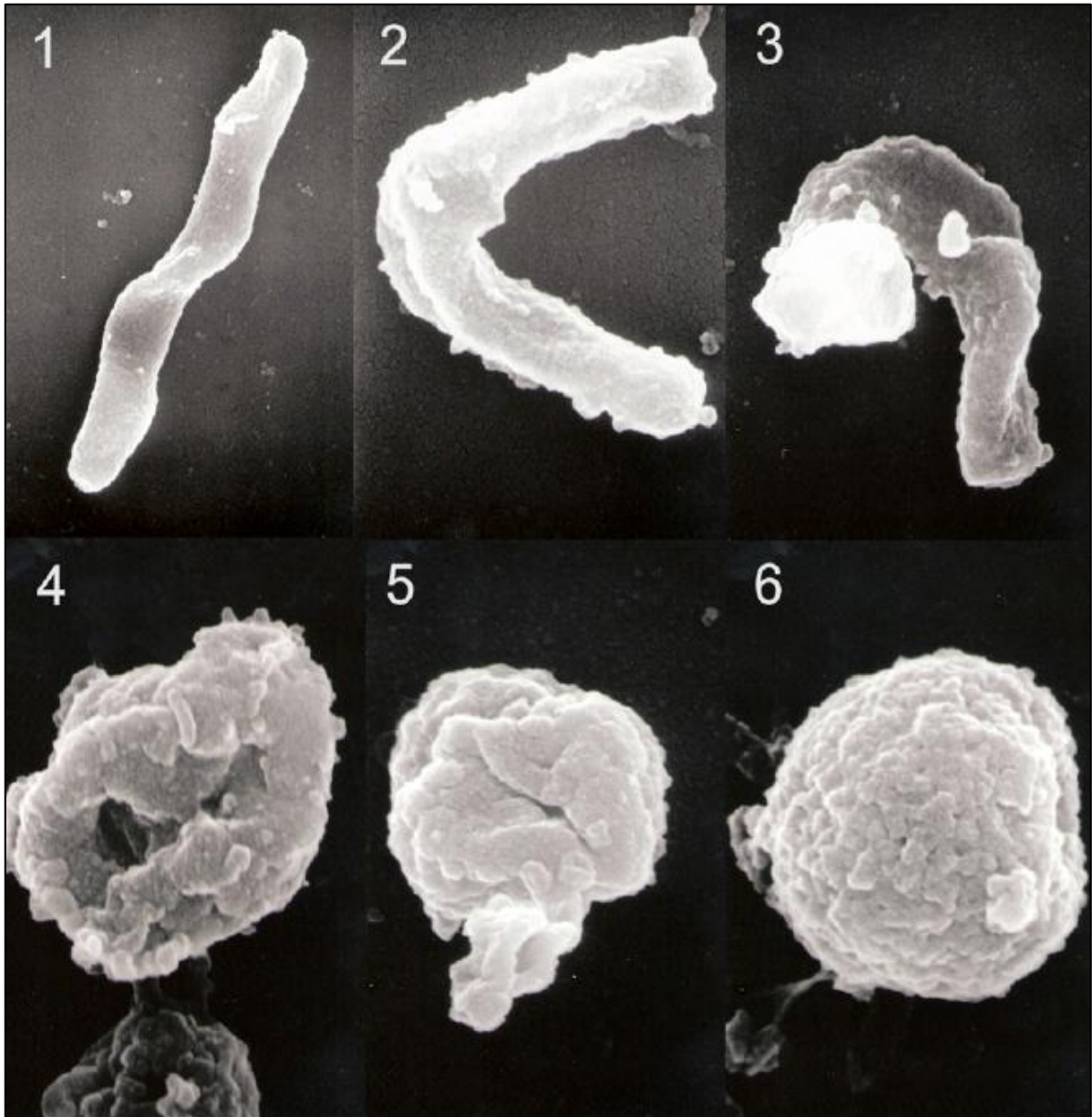


Figura 4 Conversión de *H. pylori* en forma espiral a forma cocoide (Dus *et al.*, 2013).

## 2.6 Métodos de detección de patógenos

### 2.6.1 Cultivo

La metodología clásica de cuantificación microbiológica se basa en el cultivo de bacterias específicas en medios apropiados y en su posterior caracterización bioquímica o inmunológica. Por lo tanto, el aislamiento y cultivo en medio agar permiten caracterizar sólo aquellos microorganismos capaces de crecer, multiplicarse y formar colonias en el medio y condición de crecimiento seleccionado, con lo que no es posible obtener información acerca de los organismos en estado VNC (Bottari *et al.*, 2006).

El caso *H. pylori* se han obtenido muy poco éxito en la determinación de muestras ambientales y se ha reportado que pierde rápidamente su capacidad de cultivo. Por lo tanto, la mayoría de los métodos utilizados para detectar *H. pylori* en muestras ambientales se basan en técnicas moleculares, independientes del cultivo (Moreno y Ferrús, 2012).

### 2.5.4 Métodos moleculares

Los métodos moleculares se basan en la capacidad de aislar y detectar moléculas específicas formadas por organismos patógenos. Estas técnicas se utilizan tanto para la detección específica como para la cuantificación de patógenos bacterianos. También ofrecen varias ventajas sobre los métodos convencionales: poseen alta sensibilidad y especificidad, rapidez, facilidad de estandarización y automatización (Gilbride, 2013).

Las técnicas actuales más utilizadas para estudiar los microorganismos en agua son: hibridación fluorescente in situ conocida como FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en diversas modalidades como, PCR cuantitativa (en inglés, quantitative polymerase chain reaction; qPCR) y RT-PCR (del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*) (Gilbride 2013).



### 2.5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR es ampliamente utilizada en la cuantificación de ADN, esencialmente esta técnica se basa en que cualquier secuencia de ácido nucleico presente en una muestra puede ser amplificada en un proceso cíclico para generar un gran número de copias idénticas que fácilmente pueden ser analizados (Kubista *et al.*, 2006). Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión (Figura 5).

**Desnaturalización:** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso (Tamay *et al.*, 2004).

**Hibridación:** En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. La Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN (Tamay *et al.*, 2004).

**Extensión:** La extensión de las cadenas se da en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) (Tamay *et al.*, 2004).

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar PCR las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica (Tamay *et al.*, 2004).



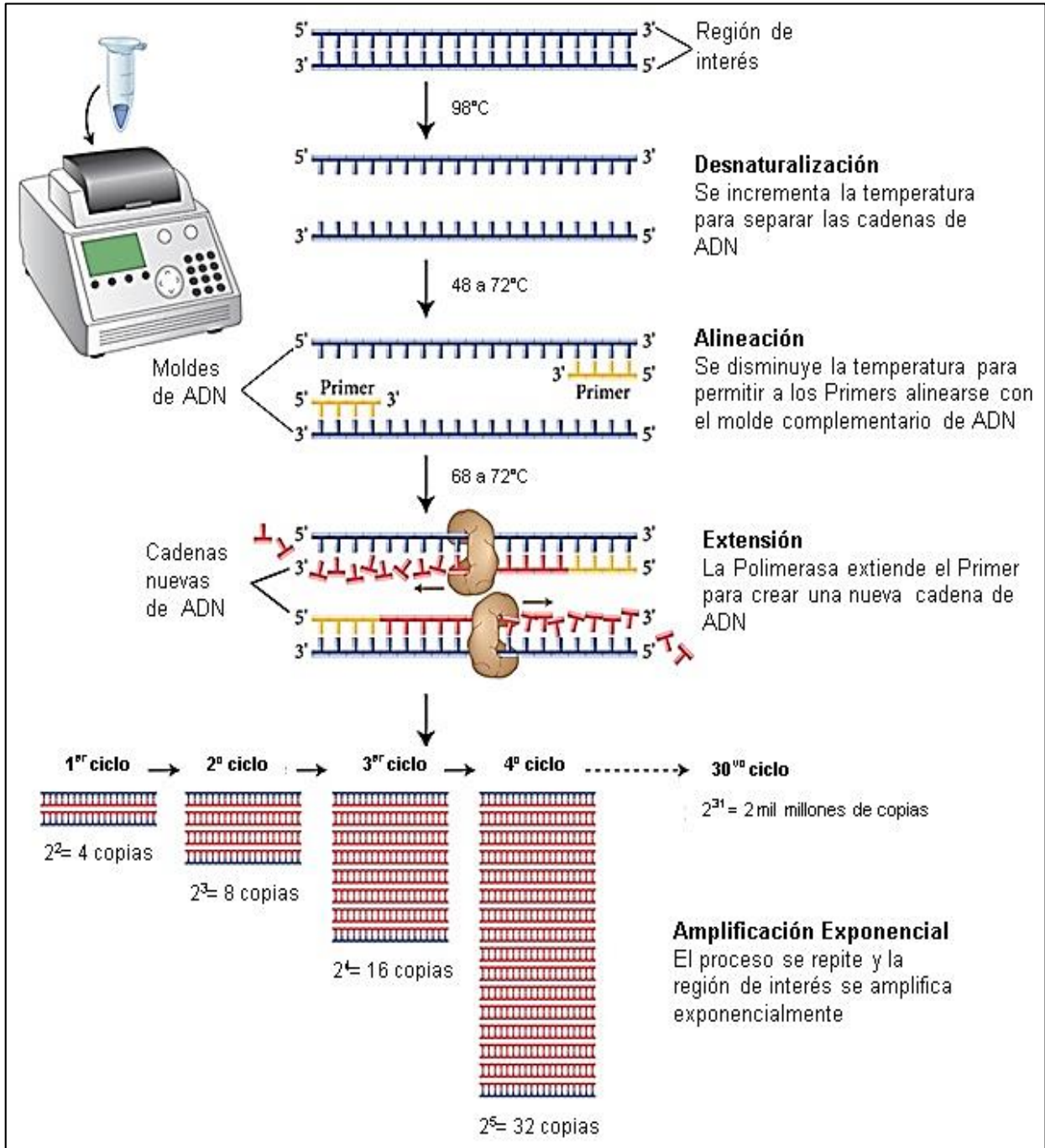


Figura 5 Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (<https://www.neb.com>).

### 2.6.4 PCR en tiempo real

La PCR a tiempo real se diferencia de la PCR convencional en que permite monitorizar en cada ciclo la aparición del ADN producto de la reacción mediante el uso de fluoróforos. Cada vez que se realiza una copia del ADN molde se libera fluorescencia, por lo que ésta es proporcional a la cantidad de ADN generado. El resultado de una PCR a tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación, en él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas.

De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador, una segunda fase en la que se da un incremento de la fluorescencia, dicho incremento es en forma exponencial en su inicio, y una tercera fase (plateau) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia (Figura 6). El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina Ct (Threshold Cycle) este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral.

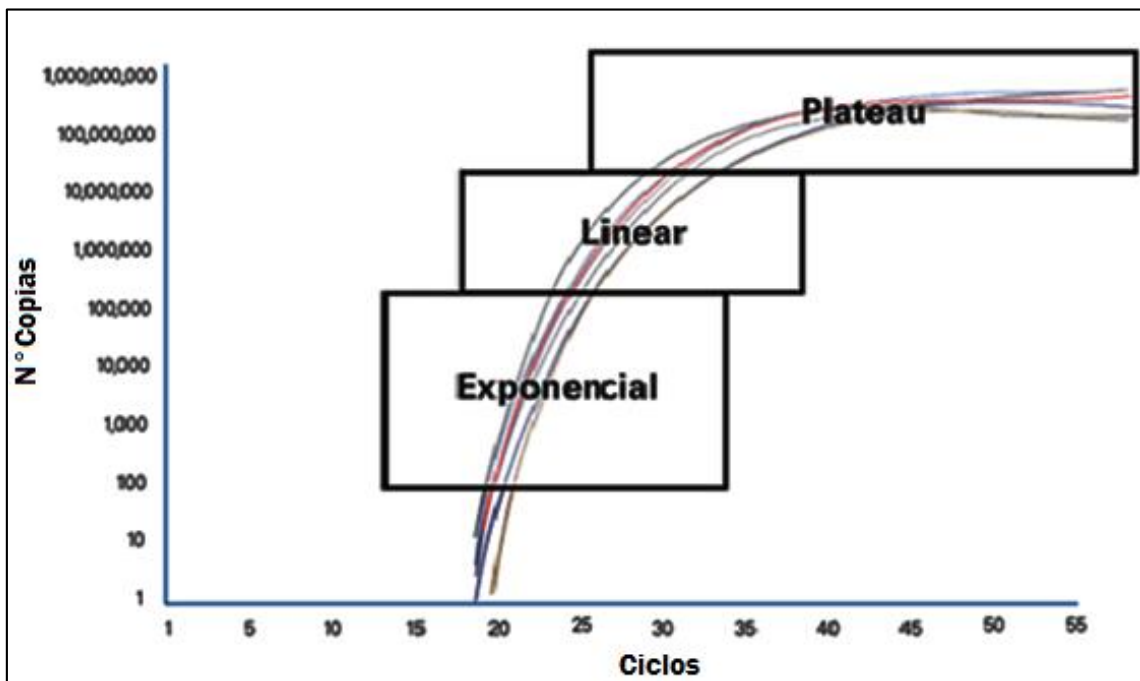


Figura 6 Gráfico de amplificación de PCR a tiempo real (<https://www.thermofisher.com>).

El análisis de PCR cuantitativa proporciona el número de genomas por volumen de agua de un patógeno específico. Este valor no es idéntico con el número de células que se pueden determinar mediante técnicas microscópicas, tales como FISH, o el de las UFC obtenidas por recuento en placa (Girones *et al.*, 2010).

### 2.6.5 PMA-PCR

Hasta hace pocos años, la mayor desventaja del método de amplificación por PCR era su incapacidad para diferenciar entre células viables y no viables. Un enfoque alternativo para detectar células viables mediante PCR fue presentado en el año 2003 mediante la implementación del colorante de intercalación en ácidos nucleicos, etidio de monoazida EMA y así mismo la invención de la molécula alternativa de propidio monoazida (PMA) por Nocker *et al.*, 2006 (Figura 7).

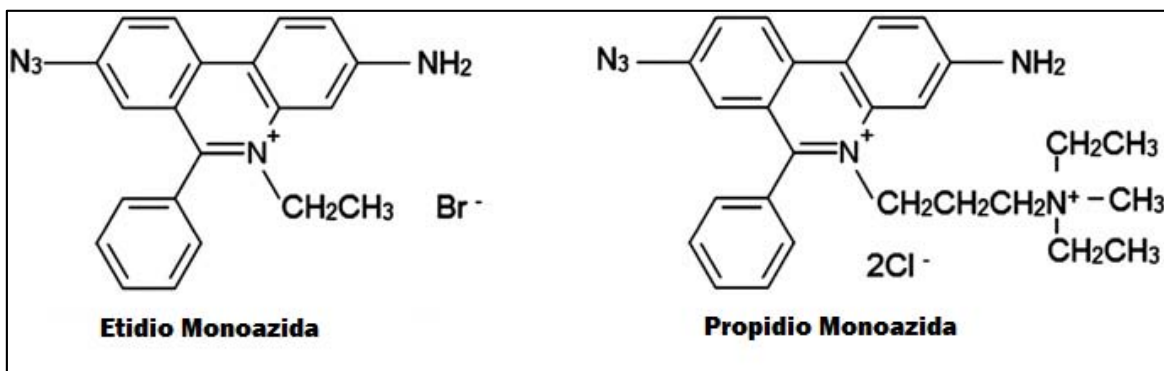


Figura 7 Estructuras químicas Etidio monoazida y Propidio monoazida (<https://biotium.com/>)

Esta técnica se basa en la capacidad de los microorganismos con membranas celulares intactas para resistir la penetración de estos colorantes, mientras que el ADN en microorganismos no viables con membranas permeables o dañadas está disponible para la interacción con los colorantes y es incapaz de ser amplificado por PCR (Varma *et al.*, 2009).

La utilización de EMA y PMA ha surgido como un medio para reducir la señal de PCR de ADN procedentes de células muertas. Desde su invención, los colorantes EMA y PMA se han aplicado a una amplia variedad de microorganismos incluyendo las células vegetativas, bacterianas, esporas bacterianas, hongos, virus, levaduras, y los protozoos (Fittipaldi *et al.*, 2012).

La aplicación general de EMA se ve obstaculizada por el hecho de que el producto químico también puede penetrar en las células vivas de algunas especies bacterianas. Las bombas del transporte activo pueden en algunos casos exportar el colorante EMA en células metabólicamente activas, en cambio PMA resulta ser altamente selectivo para penetrar sólo en las células bacterianas "muertas" o con la integridad de la membrana comprometida (Nocker *et al.*,2006).

Nam *et al.*, 2011 realizó qPCR en combinación tanto con EMA como PMA, su investigación confirmó que la aplicación de EMA para *H. pylori* se ve limitada debido a que el colorante penetra tanto en las bacterias viables como dañadas; por el contrario PMA muestra una mejor selectividad y no tiene efecto sobre el ADN genómico de células viables. Lo que sugiere que PMA es el agente ideal para ser utilizado para detectar selectivamente *H. pylori*.

El colorante PMA posee un grupo azida foto-activable el cual se convierte en un radical nitreno que se une covalentemente con cualquier resto de carbono próximo (Figura 8), incluyendo ADN tanto extracelular como de doble cadena contenido en las células con membranas comprometidas. La unión covalente del colorante al ADN causa una fuerte inhibición cuando se amplifica por PCR (Nocker *et al.*, 2006).

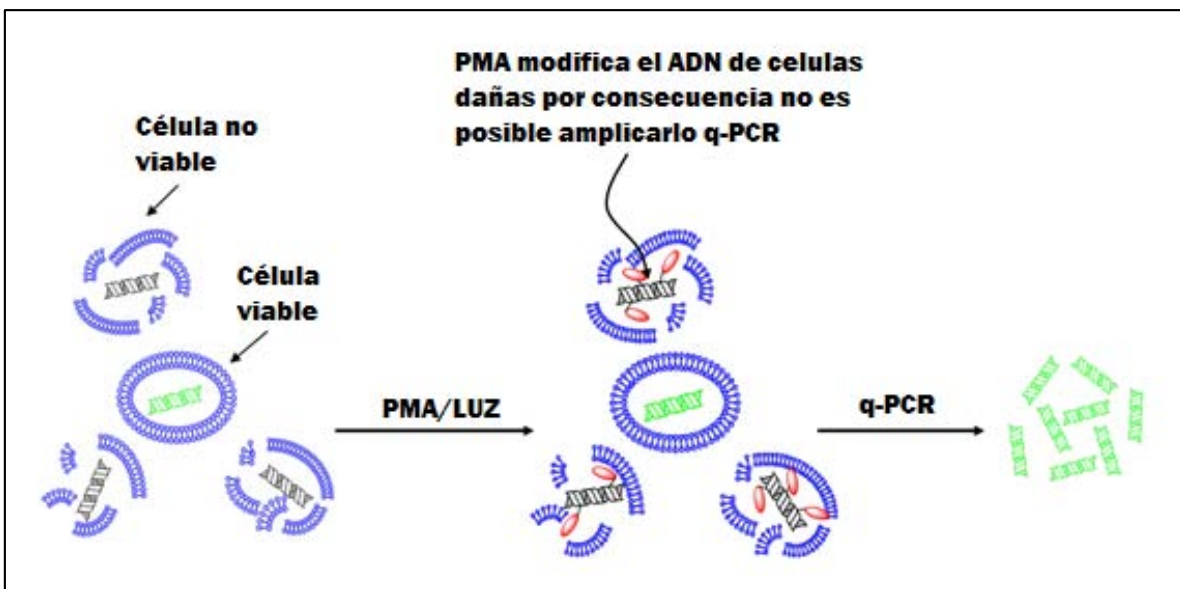


Figura 8 Principio de detección selectiva de células viables utilizando PMA (<https://biotium.com/>)

La limitante de aplicación de esta técnica radica en que la muerte celular sólo puede ser diagnosticada por v-PCR si se refleja daño en la membrana. Este método no se puede aplicar a las células sometidas a los tratamientos que infligen insuficientemente daño en la membrana siendo UV un ejemplo clásico (Nocker *et al.*, 2007).

Por otra parte, los tratamientos que afectan a la integridad de membrana varían en el grado de daño que se inflige antes de que ocurra la muerte celular. La exposición a un desinfectante oxidativo como tratamiento proporciona una mejor correlación entre la integridad de la membrana y la viabilidad, esto dado el hecho de que el daño se dirige directamente a la membrana celular (Nocker *et al.*, 2007).

## **2.7 Desinfectantes para el Tratamiento de Agua**

La desinfección es la destrucción de organismos potencialmente dañinos a niveles que no sean patógenos y comúnmente constituye la etapa final de todo tratamiento de agua para prevenir la propagación de enfermedades transmitidas por el agua (CONAGUA, 2007).

La agencia estadounidense de protección del medio ambiente (US Environmental Protection Agency), conocida por sus siglas en inglés EPA puntualiza que un desinfectante ideal para el agua debe cumplir con las siguientes características:

- Destruir todas las clases de agentes patógenos en cantidad suficiente.
- No ser tóxico para el hombre ni animales domésticos.
- No tener un sabor desagradable.
- Tener un manejo, transporte y almacenamiento, accesible y seguro.
- No reaccionar con los compuestos presentes en el agua para producir sustancias tóxicas.

### **El concepto C·T en los sistemas de desinfección.**

La eficiencia de la desinfección depende de la relación entre el tiempo de contacto y la cantidad de desinfectante dosificado. El valor CT es el producto de la concentración residual “C” del desinfectante expresado en mg/L por el tiempo de contacto “T” expresado en minutos y por tanto tiene la dimensión de mg/L/min.

El rendimiento de desinfección está determinado por la inactivación log o reducción log, se refiere al porcentaje de microorganismos eliminado o inactivado por un proceso dado. Una reducción logarítmica (1-log) significa que 90% de los microorganismos son eliminados o inactivados, dos (2-log) log corresponde a 99% de organismos inactivados, tres de registro (3-log) corresponde a 99,9% y cuatro (4-log) corresponde a 99.99% (EPA, 2003).

El concepto CT es importante ya que proporciona una medida para comparar la eficacia en los tratamientos de desinfección. Para un microorganismo dado, desinfectantes fuertes poseen valores de CT bajos y al contrario desinfectantes débiles poseen altos valores de CT. En el caso de diferentes organismos los valores de CT proporcionan una comparación de la resistencia del organismo en las mismas condiciones de desinfectante (EPA, 2003).

El desinfectante químico más común para el tratamiento de agua y que ha hecho históricamente mayor contribución a la prevención de enfermedades transmitidas por el agua es el cloro. Sin embargo el cloro no es el único desinfectante disponible. Por esta razón, los sistemas de agua pueden optar por utilizar desinfectantes alternativos. Estos desinfectantes alternativos para tratamiento de agua potable son: las cloraminas, el dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ) y radiación Ultravioleta (UV), los cuales se describen a continuación (EPA, 2003).



### 2.7.1 Cloración

El cloro es disponible como gas comprimido elemental, solución de hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ) o hipoclorito de calcio  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ . Todas las formas de cloro, cuando se aplica al agua, forman ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). El cloro gaseoso acidifica el agua, mientras que las formas líquidas y sólidas de cloro aumentan el pH en el punto de aplicación (EPA, 2011).

El cloro es el método más utilizado como tratamiento tanto para la desinfección primaria de agua y para mantener un residual en sistemas de distribución. También se utiliza comúnmente en la oxidación y eliminación de hierro y manganeso. Es muy eficaz contra una amplia gama de patógenos, incluyendo bacterias y virus. La cloración es también un proceso muy económico.

La reacción de los microorganismos ante el cloro está determinada por la resistencia de sus membranas, así como por la relativa afinidad química de este compuesto con las sustancias vitales del organismo. La cloración tiene varias desventajas como desinfectante, ya que no es eficaz contra quistes de protozoarios como *Cryptosporidium* (CONAGUA, 2007).

El cloro también reacciona con la materia orgánica en el agua formando subproductos, el más conocido de estos son los trihalometanos (THM), que pueden causar efectos nocivos en la salud a largo plazo. Existen implicaciones normativas para el uso de cloro que se refieren principalmente a los subproductos THM, así como para su aplicación, ya que el caso de cloro gas es un proceso peligroso que requiere medidas especiales de seguridad. Las altas dosis de cloro también pueden causar problemas de sabor y olor (EPA, 2011).

#### Monocloramina

Las cloraminas se forman por la reacción de cloro libre y amoníaco, la cual es más estable que el cloro libre y son muy eficaces para proporcionar protección residual en sistemas de distribución. También forman menos subproductos en comparación con el cloro.

En cuanto a la capacidad de desinfección de la monocloramina se considera un desinfectante menos eficaz que el cloro, no se utiliza como desinfectante primario, ya que es débil en la inactivación de virus y protozoos. Se utiliza generalmente para proporcionar un residual desinfectante durante la distribución. La cloraminación puede reducir los problemas referentes al olor y sabor en comparación con el de cloro, y produce significativamente menores niveles de THM (Solsana, 2002).

### **Dióxido de cloro**

El dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) es un desinfectante cuya capacidad biocida sobrepasa a la del cloro y sus derivados. Su aplicación es una alternativa donde además de la desinfección mejora la calidad organoléptica del agua. Tiene un gran efecto en el control del sabor y el olor, así como para destruir sustancias orgánicas que proporcionan color o que son precursoras de THM (Solsana, 2002).

El dióxido de cloro se forma por la reacción entre el clorito de sodio y ácido clorhídrico; también se puede hacer por reacción entre el hipoclorito de sodio y cloro. El dióxido de cloro no se vende como un producto listo para su uso, por lo que debe generarse in situ. Solo se utiliza como desinfectante primario, su producción y manejo implican complejidad y riesgos. Por ello, no se recomienda para comunidades pequeñas con poca capacidad técnica; de allí su escasa popularidad en los países en desarrollo (MWS, 2005).

### **2.7.2 Radiación Ultravioleta (UV)**

La luz ultravioleta es una radiación electromagnética que está presente en el espectro natural de la radiación solar. Tiene una longitud de onda menor a la de la luz visible (400 nm) y mayor a la de los rayos X (100 nm). Mientras menor es la longitud de onda mayor es la energía contenida, por lo que, la radiación ultravioleta tiene una energía inferior a la de los rayos X pero mayor que la de la luz visible (CONAGUA, 2007).



A diferencia de la mayoría de los desinfectantes, la luz ultravioleta no inactiva a los microorganismos por interacción química, la inactivación de estos es el resultado de la penetración de los rayos UV en la pared celular, la energía reacciona con los ácidos nucleicos y otros componentes vitales de la célula, lo que resulta en el daño y la consecuente muerte de las células expuestas (EPA, 1998).

La radiación UV se disipa rápidamente en el agua para ser absorbida o reflejada por el material en el agua. Como resultado no se produce un residual, lo cual es ventajoso desde el punto de vista de una formación de subproductos de desinfección. Sin embargo, se requiere un desinfectante químico secundario para mantener un residual en todo el sistema de distribución, ya que puede estar sujeto a una nueva contaminación (MWS, 2005).

### 2.8.3 Ozono

El ozono ( $O_3$ ) es un gas alótropo del oxígeno, a temperatura y presión ambiental es un gas inestable que se descompone rápidamente para volver a la molécula de oxígeno ( $O_2$ ). Debido a esta característica, no se puede almacenar o envasar, sino que debe generarse in situ (Solsana, 2002).

En las bacterias Gram-negativas, las capas de lipoproteínas y lipopolisacáridos son los principales sitios del efecto destructivo del ozono, lo que contribuye al aumento en el daño en la membrana celular de los microorganismos y resulta en su lisis. El ozono actúa como un oxidante intracelular general, mientras que el cloro solo destruye selectivamente ciertas enzimas (Wysok *et al.*, 2006).

El ozono requiere menos tiempo de contacto y concentraciones más bajas que las de cloro, dióxido de cloro y las cloraminas para lograr la desinfección, pero es inestable y por lo tanto no proporciona una desinfección residual duradera en la distribución, a 15 °C y un pH de 7.5 se ha reportado que el residual útil está en el orden de 40 minutos, pero a temperaturas más altas puede ser tan bajo como 10-20 minutos. Esto ocurre debido a una disminución en la eficiencia de la transferencia del ozono en el agua a medida que aumenta la temperatura (EPA, 2011).

Por lo general, la ozonización se utiliza cuando se requiere su propiedad más importante: su elevado potencial oxidante, permite eliminar los compuestos orgánicos que dan color, sabor u olor desagradables al agua incluyendo micro contaminantes como compuestos fenólicos y algunos pesticidas. Además mejora muchos otros aspectos como la floculación, eliminación de algas, oxidación de hierro y manganeso, y la reducción en los niveles de carbono orgánico como precursores de THM (EPA, 2011).

El inconveniente principal ha sido el costo inicial y el de operación. Sin embargo, cuando las fuentes de agua accesibles están muy contaminadas (biológica y químicamente), puede ser el método más recomendable para la oxidación de las sustancias orgánicas y desinfección primaria (Solsana, 2002).

#### **2.8.4 Eficacia de las diferentes tecnologías de desinfección**

Las diferentes tecnologías poseen distintas cualidades que pueden ser utilizadas para gestionar la fuente de riesgos como consecuencia de la presencia de impurezas orgánicas e inorgánicas en las fuentes de agua y para satisfacer las demandas de inactivación de patógenos de un sistema de suministro de agua (EPA, 2011).

El proceso para la selección de alguna de las diferentes tecnologías requiere un análisis cuidadoso de todos los factores normativos, sociales, técnicos y económicos que pueden influir de una manera u otra para que la selección del sistema de desinfección sea la más adecuada posible (OPS, 2007).

La información sobre las condiciones generales relacionadas con la selección del sistema de desinfección puede incluir: el clima, precipitación pluvial, temperatura, topografía, transporte, infraestructura comercial y fiabilidad de la energía eléctrica. También es necesario tener suficiente información sobre el tipo, capacidad y cantidad de las fuentes de agua, así como su calidad química, biológica y física. La Tabla 2 muestra en general las ventajas y desventajas de cada uno de los desinfectantes comúnmente utilizados (OPS, 2007).

Tabla 2 Ventajas y limitaciones de los sistemas de desinfección (EPA, 2011).

Proceso	Ventajas	Limitaciones
Cloración	Su capacidad de desinfección está bien definida. Tecnología de dosificación establecida.	<p>Genera subproductos de desinfección.</p> <p>El sabor y olor pueden afectar su aceptabilidad.</p> <p>Inefectivo contra <i>Cryptosporidium</i>.</p>
Cloraminación	No hay problemas significativos con subproductos de desinfección. Generalmente presenta menos problemas con el sabor y olor en comparación con el cloro.	<p>Comparado con la cloración, es considerablemente menos efectivo. Usualmente no es empleado como proceso de desinfección primario.</p>
Ozono	<p>Es un fuerte oxidante y un desinfectante altamente efectivo comparado con el cloro.</p> <p>Destruye microcontaminantes orgánicos (pesticidas, componentes del sabor y olor).</p>	<p>El equipo es complejo, de alto consumo energético y de mayor costo en comparación con la cloración. El residual no es lo suficientemente duradero para la distribución.</p>
Dióxido de cloro	Comparado con el cloro puede ser más efectivo en un pH elevado, tiene menores problemas de sabor, olor y subproductos.	<p>Como oxidante es más débil que el ozono o el cloro. La dosis está considerablemente limitada debido a los subproductos inorgánicos (clorato y clorito).</p>
Radiación ultravioleta	Generalmente es altamente efectivo contra protozoarios, bacterias, la mayoría de virus y particularmente para <i>Cryptosporidium</i> . No hay implicaciones significativas en la generación de subproductos.	<p>Menor efectividad contra virus en comparación con el cloro.</p> <p>No genera residual para distribución.</p>

### 3. ANTECEDENTES

El estado VNC de *H. pylori* ha surgido como una estrategia de adaptación para la supervivencia a largo plazo bajo condiciones desfavorables, incluyendo tratamientos de desinfección (Oliver 2005; She *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2007). En general, existe poca información acerca de la resistencia de *H. pylori* a los procesos convencionales de desinfección. El primer trabajo sobre la inactivación fue el realizado por Johnson *et al.*, 1997 en el cual con una concentración 0,2 mg Cl<sub>2</sub>/L/min logró un 99% de inactivación. Sin embargo su trabajo se basó únicamente en recuento en medios de cultivo por UFC.

De igual forma Baker *et al.*, 2002 determinó el efecto de desinfectantes oxidantes (cloro y ozono) en cultivos de *H. pylori*, sus resultados muestran que la exposición a 0.1 mg Cl<sub>2</sub>/L/min resultó en una reducción de 0.3 Log (49% de inactivación), mientras que la misma dosis aplicada a *E. coli* logró reducción de 0.9 log (89% de inactivación). La diferencia entre los dos organismos es más pronunciada a dosis más altas; la exposición a 0.2 mg Cl<sub>2</sub>/L/min se asoció con una reducción de 1.8 log (98% de inactivación) para *H. pylori* y el caso de *E. coli* se logró una reducción 4.0 log (99.99% de inactivación).

Los experimentos de ozonización de Baker *et al.*, 2002 mostraron un patrón similar, *H. pylori* requiere una mayor concentración de ozono 0,24 mg O<sub>3</sub>/L/min para obtener 99% de inactivación, mientras *E. coli* solo requiere 0.09 mg O<sub>3</sub>/L/min. Concluyendo que *H. pylori* es significativamente más resistente que *E. coli* a desinfectantes oxidantes como cloro y ozono. Asimismo menciona como factor principal que la dosis máxima de cloro está limitada por restricciones de sabor y olor.

Aunque los estudios realizados por Johnson *et al.*, 1997 y Baker *et al.*, 2002 han demostrado que *H. pylori* se puede inactiva eficazmente, sus conclusiones están basadas en la falta de recuperación de bacterias utilizando métodos de cultivo, para los cuales no consideran a las células que han entrado en VNC.

Casasola *et al.*, 2013 realizó la cuantificación de *H. pylori* en estado VNC mediante q-PCR en agua desinfectada con ozono, en el cual observó solo un 1 log de inactivación con la aplicación de 1 mg O<sub>3</sub>/min/L. Una inactivación de 3 log se obtuvo con un CT de 2 mg O<sub>3</sub>/L/min, estos valores son mucho más altos que los obtenidos por Baker *et al.*, 2001 y Johnson *et al.*, 1997. Además menciona que es necesario el uso de un ensayo de viabilidad para verificar la eficacia del proceso de desinfección.

Un estudio dirigido a la supervivencia de *H. pylori* en agua clorada fue realizado por Moreno *et al.*, 2007, mediante FISH y un colorante de ácidos nucleicos SYTO®RNASelect™, evaluó la viabilidad y supervivencia de *H. pylori* cuando es inoculado en agua clorada (0.9 mg/L cloro libre) durante 10 s, 40 s, 1 min, 5 min, 3 h y 24 h. El examen microscópico indicó que al inicio del experimento la mayoría de las células (70-80%) presentaban forma de espiral. El porcentaje de formas cocoides aumentó después de 40s de exposición de cloro hasta un 60-70%.

Al comienzo del estudio, el número de células totales determinado por FISH, fue de  $2.7 \times 10^7$  células/mL. El número promedio de células VNC después de 3 h de exposición de cloro fue de  $7.5 \times 10^4$  células/mL y fueron necesarias 24 horas de exposición al cloro para conducir a la no detección de células viables. Moreno *et al.*, 2007 concluyen que este período de supervivencia fue determinado para una sola cepa y se ha reportado que diferentes cepas de *H. pylori* muestran variaciones significativas en su resistencia al estrés ambiental, de acuerdo con esto, las prácticas de desinfección utilizadas normalmente para el tratamiento de agua potable no serían totalmente adecuadas para el control de este microorganismo.

Recientemente Santiago *et al.*, 2015 logró detectar la presencia de *H. pylori* viable en el agua potable de consumo, mediante las técnicas moleculares qPCR, PMA-qPCR y DVC-FISH. Entre las 24 muestras analizadas, 16 muestras fueron positivas para ADN de *H. pylori* por qPCR y la presencia de *H. pylori* viable se detectó por medio de FISH en 6 de las 24 muestras. En estas pruebas la dosis de cloro residual en las muestras osciló entre 0.5 y 0.9 mg/L, que son los niveles de cloro habituales en sistemas de distribución en el agua potable.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Evaluar la eficacia de la desinfección sobre *Helicobacter pylori* en estado viable no cultivable (VNC) sometido a un proceso de desinfección con ozono, utilizando la metodología de q-PCR combinada con la aplicación del indicador de viabilidad, propidio monoazida (PMA).

### 4.2 Particulares

Establecer las condiciones de concentración y tiempo de contacto idóneos para inactivar la bacteria *H. pylori* VNC, mediante la utilización de ozono.

Implementar la metodología q-PCR para la cuantificación de *H. pylori* VNC, utilizando agua inoculada sintéticamente con la bacteria *H. pylori*.

Evaluar la eficacia de la desinfección con ozono para inactivar *H. pylori* VNC, por medio de q-PCR combinado con PMA.

### 4.3 Justificación

El reconocimiento de la transmisión de *H. pylori* a través del agua, ha dilucidado la posibilidad de su supervivencia a los procesos de desinfección normalmente utilizados en el tratamiento de agua potable, debido a la adquisición del estado VNC. El enfoque metodológico de qPCR-PMA podría ser la alternativa para proporcionar información sobre viabilidad de *H. pylori* en estado VNC cuando es sometido a proceso de desinfección, en este caso ozono.

## 5. METODOLOGÍA

El presente estudio se realizó en el Instituto de Ingeniería de la UNAM, en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA). Así también, se contó con el apoyo del instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ).

La metodología general se presenta en la Figura 9, el cual está organizado en etapas que se describen posteriormente.

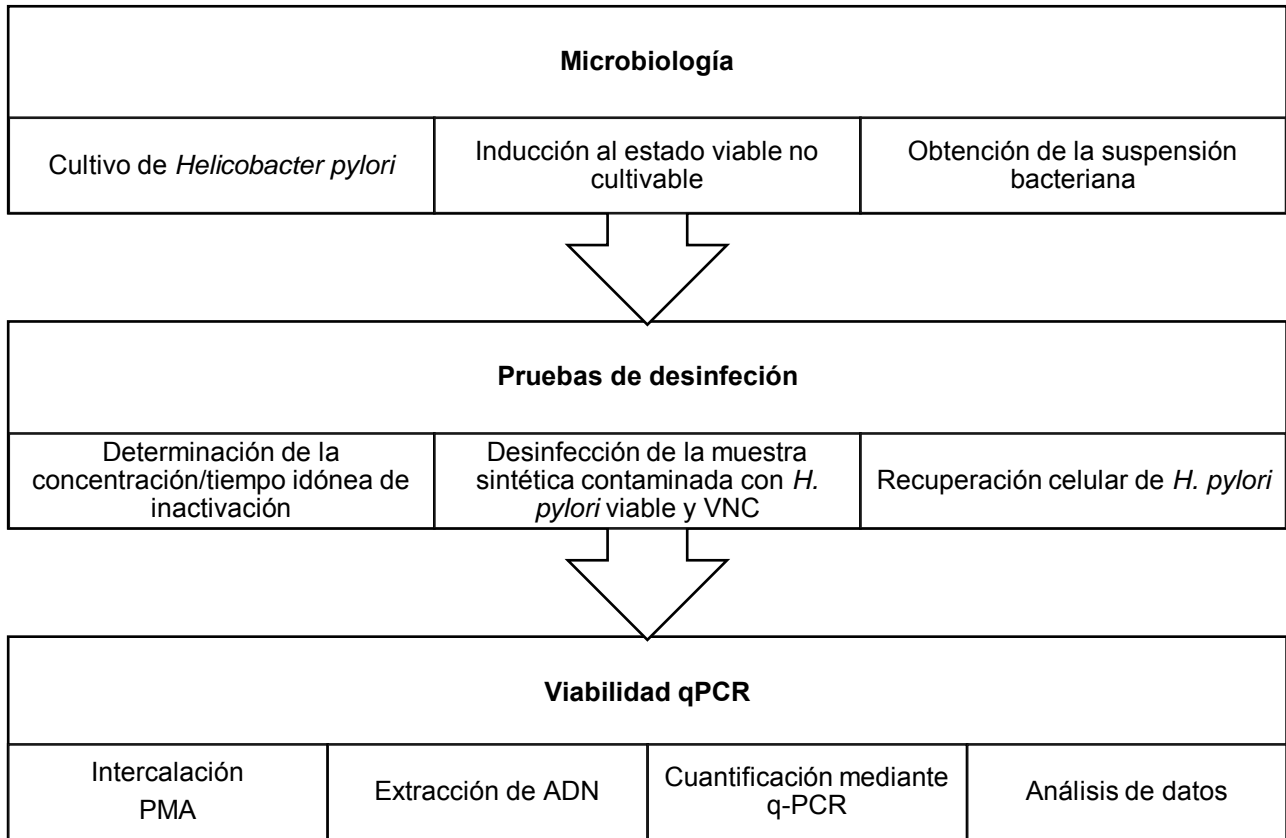


Figura 9 Etapas de estudio

## 5.1 Microbiología

### 5.1.1 Cultivo de *H. pylori*

La cepa de *H. pylori* fue proporcionada por INCMNSZ, esta fue aislada de pacientes con úlcera gástrica por medio de biopsia. La bacteria aislada se cultivó inicialmente en agar BHI (Brain Heart Infusion) suplementado con antibióticos: anfotericina y vancomicina (6 µg/L). Este cultivo fue colocado en una cámara de anaerobiosis Oxoid con atmósfera de CO<sub>2</sub> e incubado a 37°C.

Para mantener el cultivo de la bacteria, se llevaron a cabo resiembras periódicas (cada 2 días) en el mismo tipo de agar (BHI-anfotericina-bancomicina). Y con el fin de obtener una mayor propagación de la bacteria, se realizó el cultivo en medio caldo BHI-anfotericina-bancomicina en condiciones de agitación constante, a 37°C en una cámara oxoid de anaerobiosis con atmósfera de CO<sub>2</sub> (Figura 10).

Con la finalidad de garantizar la pureza del cultivo durante el tiempo de experimentación, se realizó un monitoreo constante (cada 24 hrs), mediante la resiembra de alícuotas en agar de carnero, el cual se incubo en condiciones aerobias a 37° por 24 hrs. La presencia de colonias era indicativo de contaminación por otro tipo de bacterias.



Figura 10 Cultivo en medio agar y Caldo BHI en condiciones anaerobias.



A partir del cultivo en caldo BHI se construyó una curva de crecimiento de *H. pylori* para ello se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$ , a las cuáles se les midió la concentración de células mediante la determinación de absorbancia utilizando un espectrofotómetro SmartSpec Plus spectrophotometer, teniendo como punto inicial el caldo sin inocular.

### **5.1.2 Inducción del estado VNC de *H. pylori***

La inducción del estado VNC de *H. pylori* se realizó a partir de los cultivos sembrados en caldo BHI. Volúmenes de 50 mL fueron colocados en tubos Corning™, los cuales fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 10 min, posteriormente el pellet celular obtenido, fue resuspendido en 40 mL de solución salina (NaCl al 0.8%). La suspensión bacteriana fue ajustada al tubo No. 3 conforme a la escala nefelométrica de Mc Farland, el cual equivale aproximadamente a una densidad celular de  $9 \times 10^8$  células por mililitro (cel/mL) utilizando un nefelómetro.

Para realizar la inducción del estado VNC de la bacteria, la suspensión bacteriana obtenida anteriormente con densidad de  $9 \times 10^8$  cel/mL es mantenida a temperatura ambiente durante 5 días. Se dio seguimiento a la transformación de la forma bacilar a la forma cocoide mediante tinción de Gram, posteriores a la preparación de la suspensión; utilizando microscopía óptica (Leitz labor luxs, S513558). Así mismo para monitorear la entrada al estado VNC de la bacteria se realizó cultivo en placá, esto con el fin de determinar la pérdida en la capacidad de cultivo.

### **5.2 Experimentos de desinfección con ozono**

Para determinar la concentración del ozono para inactivar *H. pylori* en agua, se tomaron como base los tiempos de contacto reportados por Baker *et al.*, 2002 y Casasola., *et al* 2013. Así como los datos de inactivación de la bacteria para cloro (Johnson *et al.*, 1997., Baker *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2003). Los tiempos establecidos para este experimento se muestran en la Tabla 3, los cuales consideran la concentración residual más estable determinada experimentalmente.

*Tabla 3* Condiciones experimentales para la desinfección con ozono.

<b>Concentración residual</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Tiempo de contacto (CT)</b>
<b>Mg/L O<sub>3</sub></b>	<b>Min</b>	<b>Min-mg/L</b>
<b>0.6</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>
<b>0.6</b>	<b>0.6</b>	<b>0.4</b>
<b>0.6</b>	<b>1</b>	<b>0.6</b>
<b>0.6</b>	<b>1.33</b>	<b>0.8</b>
<b>0.6</b>	<b>1.66</b>	<b>1</b>
<b>0.6</b>	<b>2.33</b>	<b>1.4</b>
<b>0.6</b>	<b>3</b>	<b>1.8</b>
<b>0.6</b>	<b>3.33</b>	<b>2</b>

### 5.2.1 Proceso de ozonación

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), un generador de ozono Labo 76 (Emery Trailigaz, USA) con capacidad de producción de 1.9 g de O<sub>3</sub>/h. Al final de la corriente gaseosa se encuentra la unidad de destrucción catalítica de ozono (PCI Ozone Monitor 465H, Teledyne Instruments), para la liberación segura del gas sobrante al ambiente (Figura 11).

Se utilizó como unidad de contacto gas-líquido, una columna de vidrio de 2 L de capacidad la cual es llenada con agua destilada. El ozono fue inyectado en el fondo de la columna por medio de un difusor de placa porosa durante 30 min con el fin de conseguir la saturación del agua con ozono a una concentración 5 mg/L (solución stock).

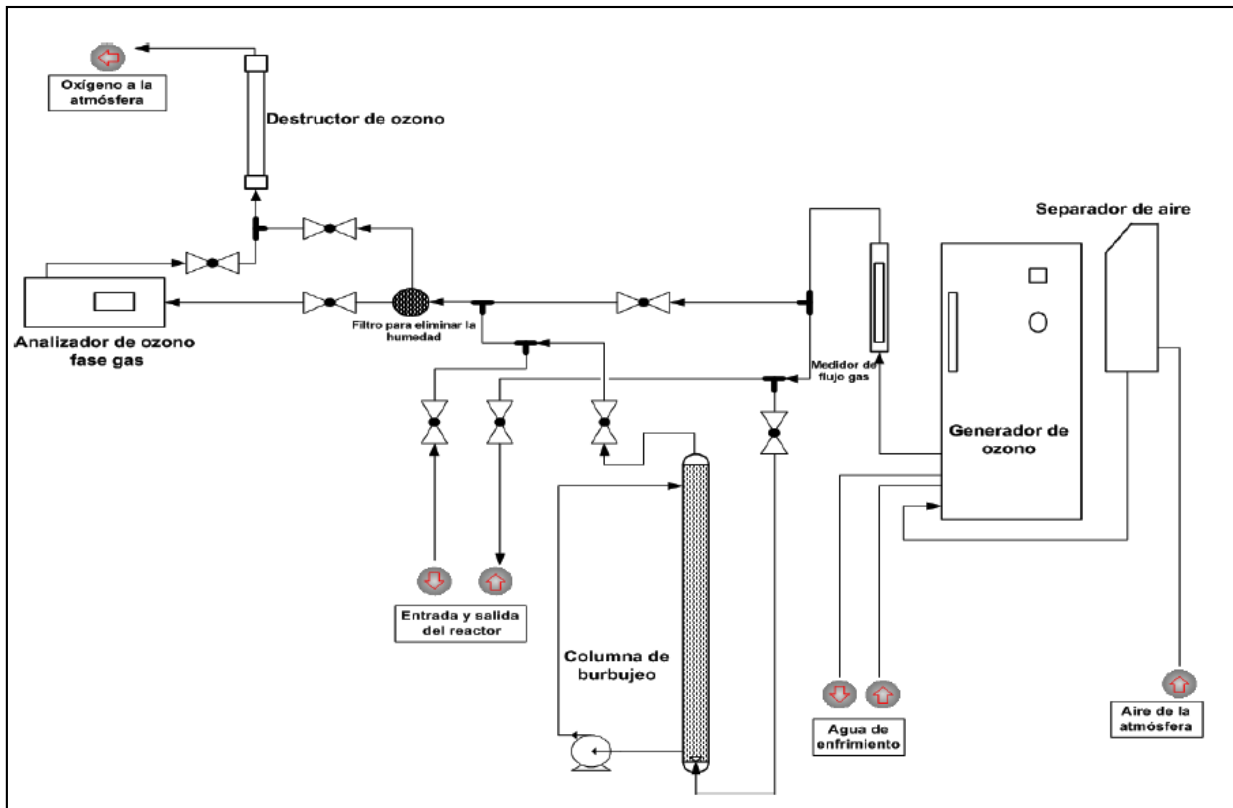


Figura 11 Organización de la unidad de oxidación utilizada en este estudio.

La concentración de ozono residual es medida mediante el método colorimétrico de índigo, el cual tiene como principio que en una solución acida el ozono actúa sobre el reactivo de índigo, decolorándolo rápidamente pasando de azul a incoloro. La disminución de la absorbancia es proporcional al aumento de la concentración (APHA 2000), esta disminución de absorbancia es determinada mediante un espectrofotómetro en este caso se utilizó un espectrofotómetro HACH DR 3900.

El procedimiento consiste en añadir el reactivo índigo en un matraz volumétrico de 100 mL y llenar al aforo con agua destilada para generar la solución blanco. En el caso de las muestras a analizar se añadieron 10 mL de reactivo índigo y una alícuota de 10 mL del agua saturada con ozono y de igual forma se lleva al aforo a 100 mL. Inmediatamente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro HACH DR 3900 a una longitud de 600 nm para conocer la contracción de ozono en cada experimento.

La concentración de ozono residual es obtenida con la siguiente fórmula:

$$Cr: \frac{100 \times (A_b - A_m)}{(f) \times (V_m) \times (C)}$$

$Cr$ : concentración de ozono residual mg/L	$F$ : Factor de sensibilidad de 20.000/cm para el cambio de absorbancia para el cambio de absorbancia (600nm) por mol de ozono añadido por litro (0.42).
$A_b$ : Absorción de blanco	$C$ : recorrido de la luz en la celda (cm)
$A_m$ : Absorción de la muestra	
$V_m$ : volumen por muestra (mL)	

### 5.2.2 Desinfección del inóculo de *H. pylori*

Las pruebas de desinfección con ozono se realizaron a partir de la suspensión inicial de  $9 \times 10^8$  cel/mL de *H. pylori* de la cual se tomó 1 mL y se añadió a los tubos de reacción Corning de 50 mL con agua salina. Se calcularon las concentraciones y volúmenes necesarios para cada CT requerido mediante la siguiente fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Se realizaron mediciones a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 minutos) para determinar la estabilidad del ozono en el agua. El proceso de desinfección consiste en preparar el inóculo esto añadiendo 1 mL de solución bacteriana, a la cual se añade el volumen adecuado para cada caso de solución salina y por último la solución Stock de ozono para tener un volumen final de reacción de 40 mL. El tubo de reacción fue tapado y agitado manualmente. Transcurridos los tiempos de contacto establecidos, la reacción fue detenida inmediatamente agregando 1 mL de una solución 0.1 N de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_3\text{O}_3$ ) 0.1 N.

### 5.2.3 Recuperación celular de *H. pylori*

Posterior a la desinfección con ozono, se realizó la recuperación celular de *H. pylori* por medio de filtración, para ello se filtró la totalidad del volumen (40 mL) en una unidad de filtración Millipore™, empleando una membrana Isopore™ de policarbonato con diámetro 47 mm y tamaño de poro de 0.22 µm. La membrana con las células recuperadas fue colocada en un tubo de 15 mL conteniendo 10 mL de solución SSI y fue agitado utilizando un vórtex hasta desprender el paquete celular de la membrana, posteriormente se tomó una alícuota de 1mL de esta suspensión y se colocó en tubos Eppendorf de 2.5 mL.

## 5.3 q-PCR PMA

### 5.3.1 Intercalación PMA

En cada tubo de muestra con 1mL de suspensión bacteriana sometida a ozonación, se agregaron 200 µL de PMA. Los tubos se incubaron inmediatamente en oscuridad durante 5 minutos, después de este periodo las muestras fueron expuestas a luz halógena de 650 W aproximadamente a 20 cm de los tubos, los cuales fueron mezclados constantemente para garantizar una exposición homogénea a la luz. Durante la exposición las muestras se colocaron en hielo para evitar el calentamiento excesivo (Figura 12).

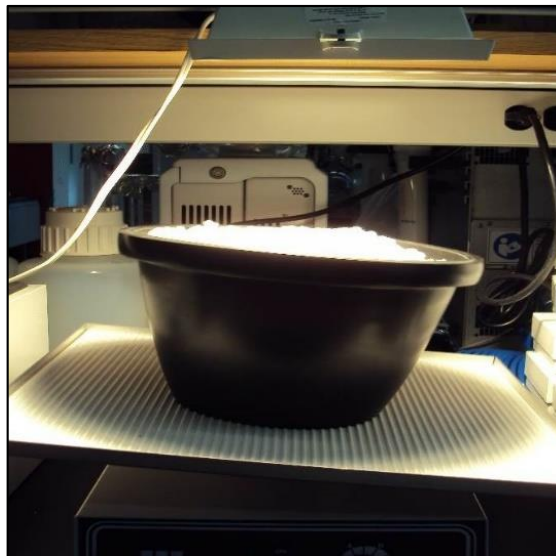


Figura 12 Proceso de foto activación PMA-ADN.

### 5.3.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó en un equipo NucliSENS® easyMAG® (Figura 13) el cual es una plataforma automatizada que se basa en la tecnología de extracción con partículas de sílice magnéticas, esta tecnología permite la captura de ácidos nucleicos y el lavado de sílice sin pérdida de material genómico.

La extracción se realizó conforme a las instrucciones del fabricante. Las cuales consisten brevemente en seleccionar el tipo de protocolo de extracción de acuerdo al volumen, en este caso se utilizó la extracción para 25  $\mu$ L, por lo tanto se usó un volumen de muestra de 200 $\mu$ L, al cual se le agregaron 100  $\mu$ L de buffer de lisis a cada muestra. Esta mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, la muestra lisada fue transferida al pocillo del recipiente de extracción con 100  $\mu$ L de sílice. Posteriormente se ingresó dicho equipo para iniciar la extracción, la cual duró aproximadamente 45 min.

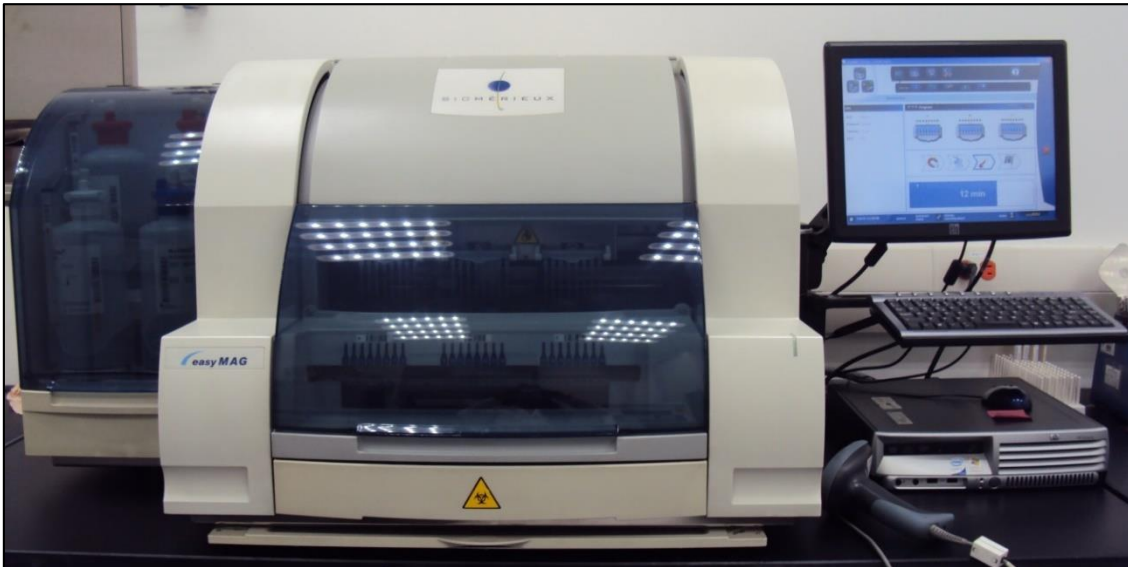


Figura 13 Equipo de extracción de ADN NucliSENS® easyMAG®.

Para llevar a cabo la cuantificación de la densidad bacteriana, se realizó la extracción del ADN de *H. pylori* viable, con el cual se construyeron las curvas estándar para los ensayos de PCR tiempo real. La cantidad y calidad del DNA se estimó espectrofotométricamente en el equipo Qubit®.

### 5.3.3 Amplificación por PCR en tiempo real

Para esta técnica se utilizó el Gen urea A, como se ha mencionado, la producción de ureasa es factor fundamental para el éxito en la infección en la mucosa y ha sido reportado en la literatura como un gen muy conservado en un gran número de cepas (McDaniels *et al.*, 2005). Todas las pruebas se realizaron con la sonda (TaqMan®) marcadas con 6-FAM como indicador fluorescencia y TAMRA como inhibidor terminal la sonda y los primers utilizados se muestran en la Tabla 4.

*Tabla 4* secuencia de sonda y primers utilizados.

---

HPYP1: 6FAMAAACTCGTAACCGTGCATACCCCTATT- GAG-TAMRA  
 HPYF1: GGGTATTGAAGCGATGTTTCCT  
 HPYR1: GCTTTTTTGCCTTCGTTGATAGT

---

Los ensayos de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PCR Fast 7500 en tiempo real (Applied Biosystems), en cada placa de PCR se colocaron muestras, curva estándar, control negativo y control positivo. Cada pozo contenía los reactivos necesarios mostrados en la Tabla 5, llegando a un volumen final de 25 µL. Las condiciones de amplificación fueron 10 min de desnaturalización inicial a 95 °C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C, para las etapas de alineación y elongación. Cada ensayo de reacción de q-PCR se realizó por triplicado.

*Tabla 5* Reactivos de q-PCR

Reactivo	Concentración µL
Taq Man universal master mix	12.25
Primer Hpy Forward	0.25
Primer Hpy Reverse	0.25
Sonda HpyP1	0.25
H2O	7
DNA	5

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Cultivo

A partir del medio BHI suplementado con antibióticos se lograron mantener los cultivos de *H. pylori*, los cuales presentaron la siguiente morfología: colonias pequeñas de color traslucido, con crecimiento visible a partir de 48 horas (Figura 14).

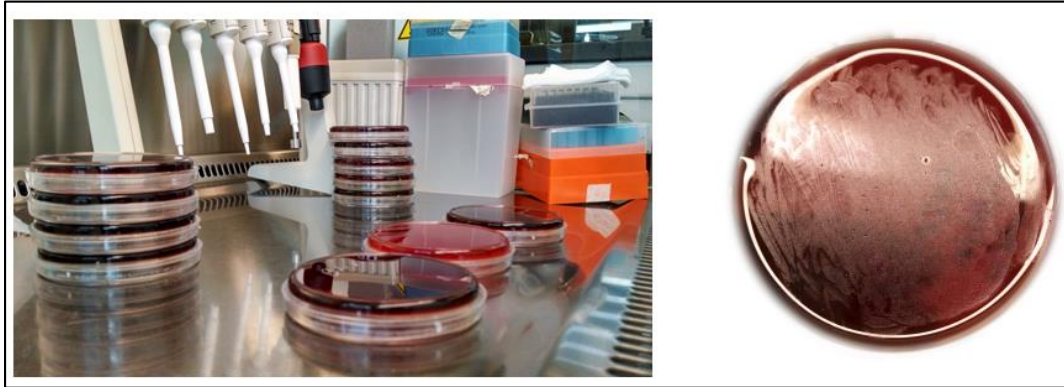


Figura 14 Cultivos de *H. pylori* en placas de agar BHI suplementado.

Se dio seguimiento al crecimiento de los cultivos mediante el monitoreo en caldo BHI midiendo la absorbancia. Durante cinco días el cultivo mostró un crecimiento bacteriano típico con una fase lag, crecimiento exponencial y una fase estacionaria (Figura 15).

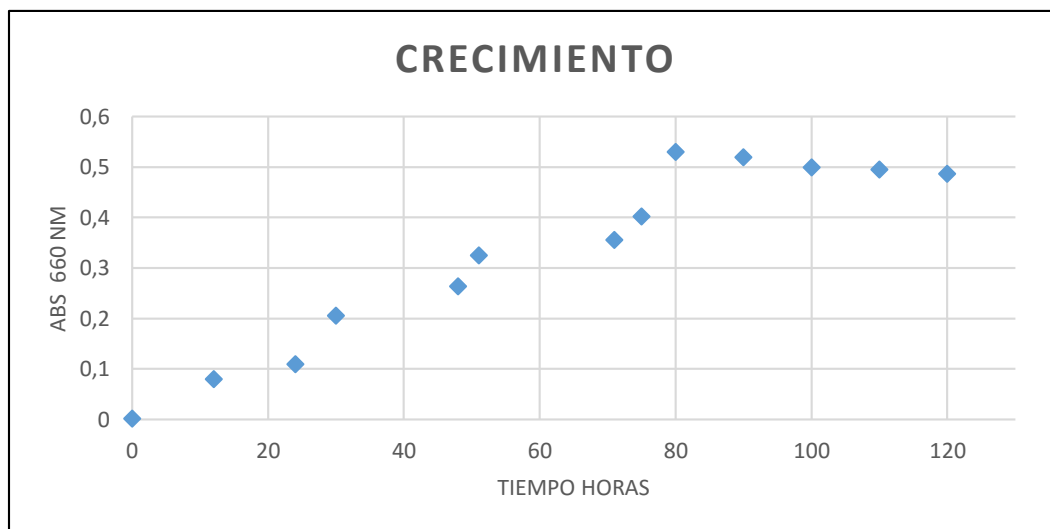


Figura 15 Monitoreo del crecimiento de *H. pylori* en caldo BHI mediante la medición de la absorbancia.



## 6.2 q-PCR

Como parte del desarrollo del análisis q-PCR, se comprobó que tanto la sonda como los primers utilizados fueran específicos para el gen Gen urea A, como se ha mencionado, la producción de ureasa es factor fundamental para el éxito de este microorganismo y ha sido reportado en la literatura como un gen muy conservado en un gran número de cepas de *H. pylori* (McDaniels *et al.*, 2005). Para ello se realizó la amplificación con un control negativo ADN de la bacteria *V. cholerae* y como blanco únicamente reactivos de PCR (Figura 16). Se representa la amplificación del ADN de *H. pylori* donde el eje “X” muestra el número de ciclos de PCR y el eje “Y” muestra delta Rn, que es la fluorescencia del colorante.

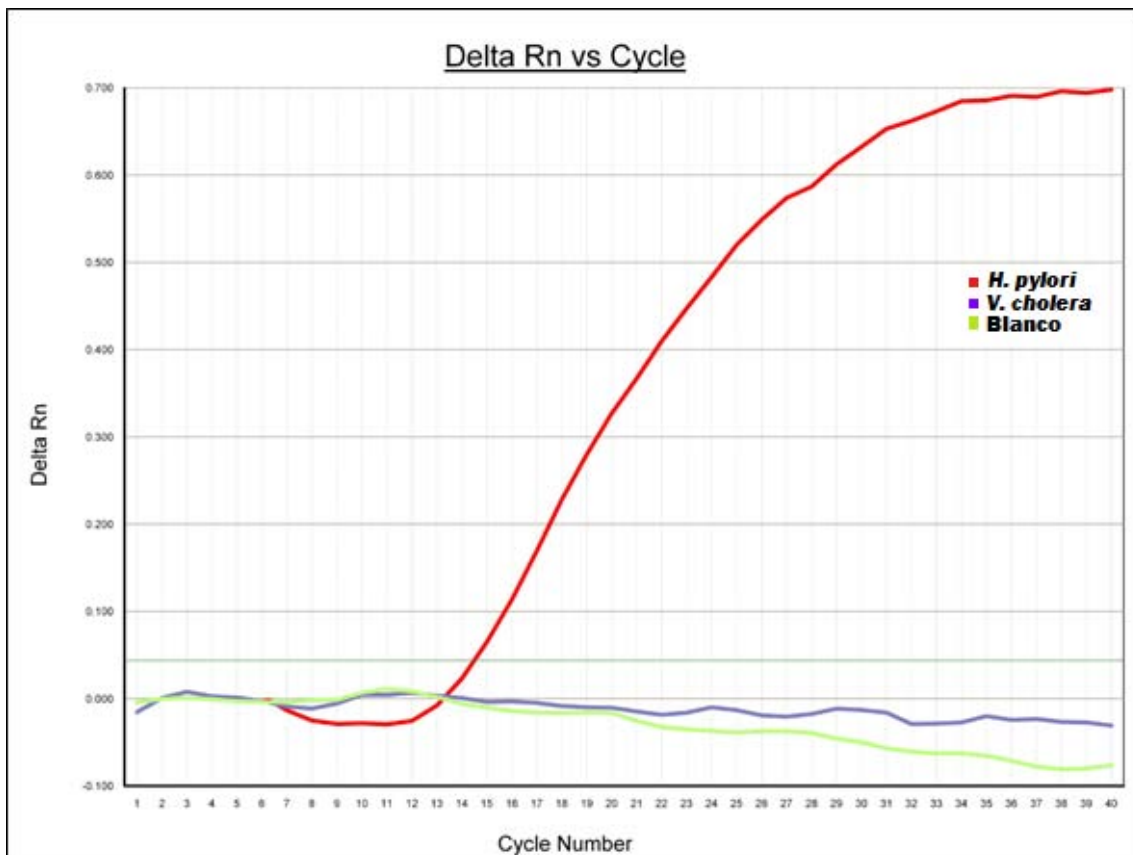


Figura 16 Diagrama de amplificación señal positiva de detección de *H. pylori* y señales negativas.

Las curvas estándar de *H. pylori* utilizadas en esta tesis fueron elaboradas a partir de ADN extraído de cultivos puros, estas fueron realizadas con diluciones consecutivas determinando la cantidad de ADN requerida en cada dilución con ayuda de la herramienta en línea: DNA copy number and dilution calculator (thermo scientific), con ello se estimó el número de copias requeridas para cada punto de la curva estándar.

En la Figura 17 se muestra el diagrama de la amplificación de una de las curvas estándar utilizadas en estos experimentos, la curva se realizó por triplicado con cada dilución en un volumen final de 25  $\mu$ L. los datos se analizaron con el software de sistemas de detección de secuencias, versión (applied biosystems). El Ct está determinado en la fase exponencial de la reacción y es inversamente proporcional al número de copias del ADN; es decir a mayor concentración menor Ct medido.

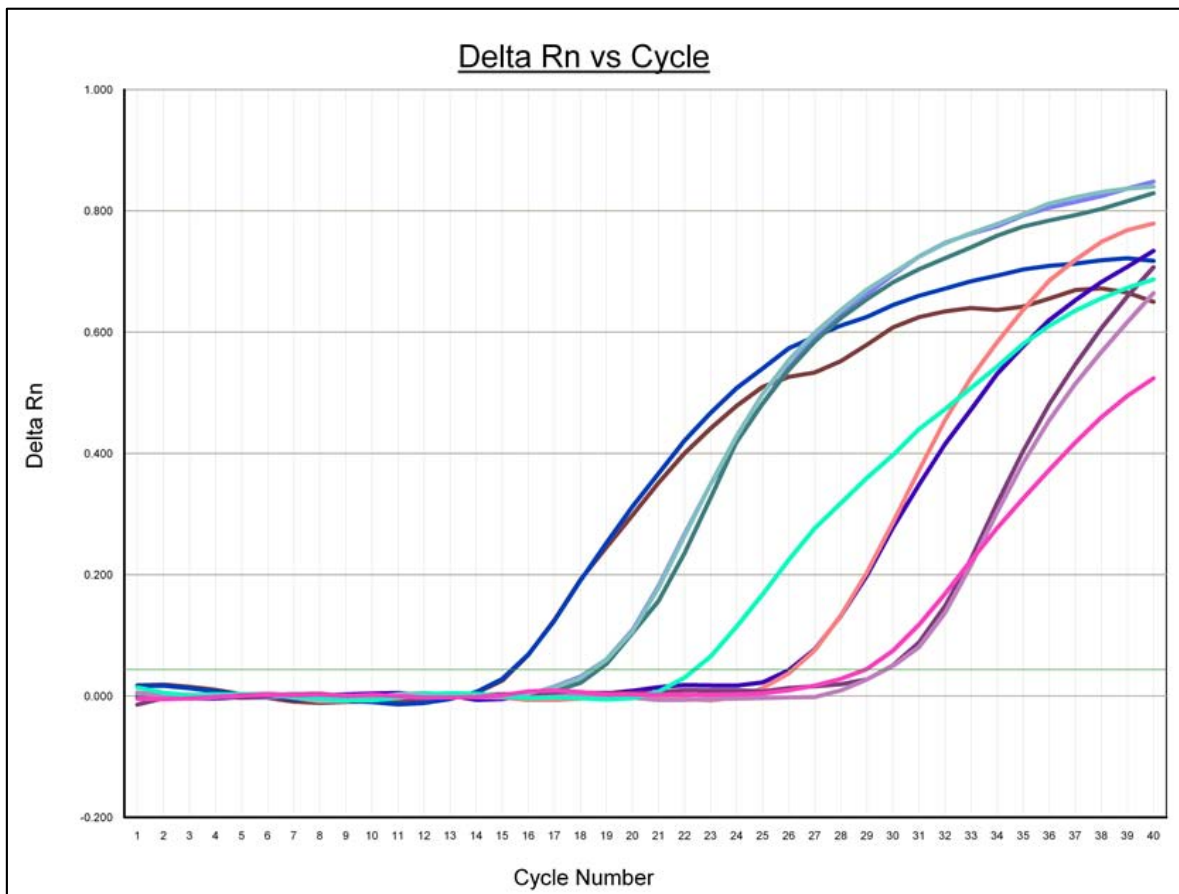


Figura 17 Diagrama de amplificación de la curva estándar con cinco puntos.

Para determinar el número de genomas bacterianos de *H. pylori* presentes en cada una de las condiciones experimentales probadas, se llevó a cabo la interpolación del Ct obtenido de la amplificación en la curva estándar con el software del mismo equipo de q-PCR como se ejemplifica en la Figura 18.

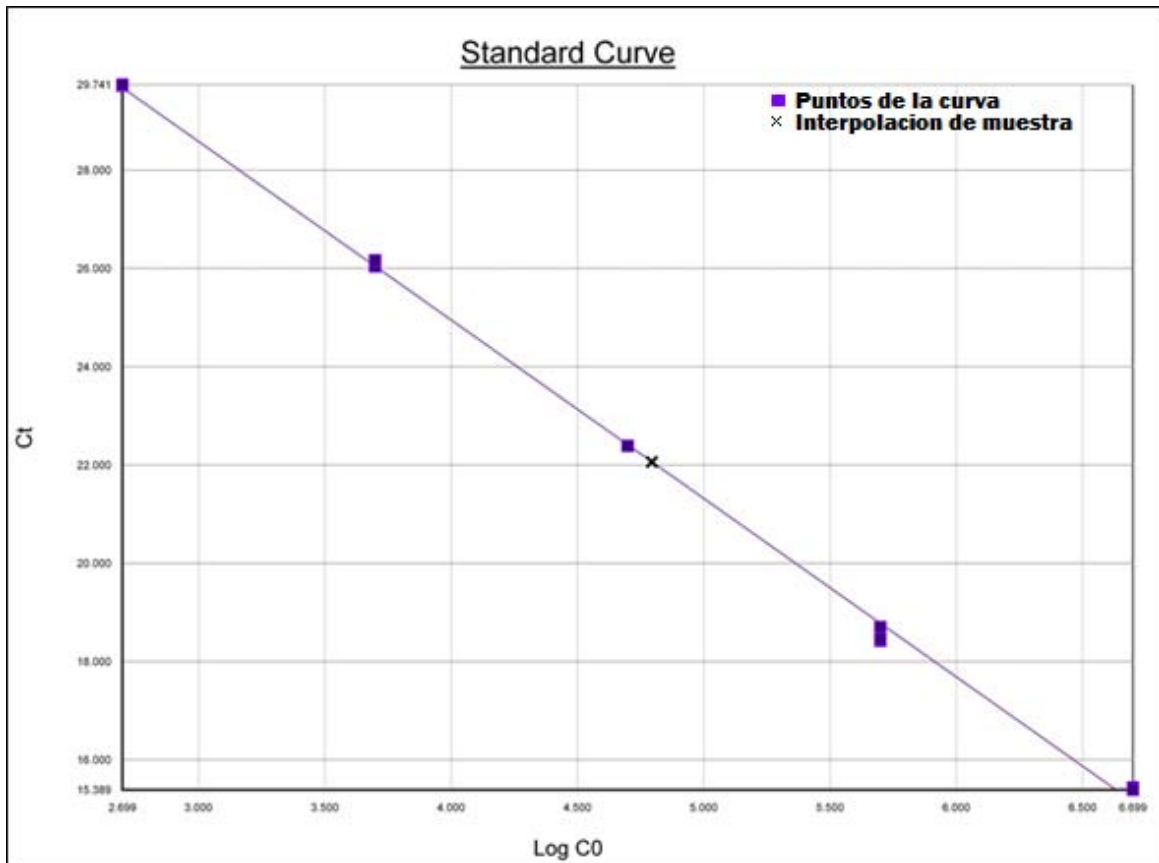


Figura 18 Determinación del número de genomas bacterianos. La gráfica de la curva estándar se realizó usando el valor de Ct en función del logaritmo del número de copias, sobre la cual se interpolaron los valores de Ct para cada muestra.

### 6.3 Cuantificación

Se logró la cuantificación selectiva de células viables en ambos estados de *H. pylori* mediante la implementación de del colorante PMA. En el caso de la cuantificación de copias de *H. pylori* viable los valores de ciclo umbral variaron de 16 ( $3.22E+06$  copias) a 22 ( $2.68E+04$  copias) y los valores de ciclos en el caso del estado VNC fueron de 17 ( $1.92E+06$ ) a 23 ( $3.96E+04$ ). En la Figura 19. Se muestra la comparación de la cuantificación de cada ciclo de los dos estados morfológicos.

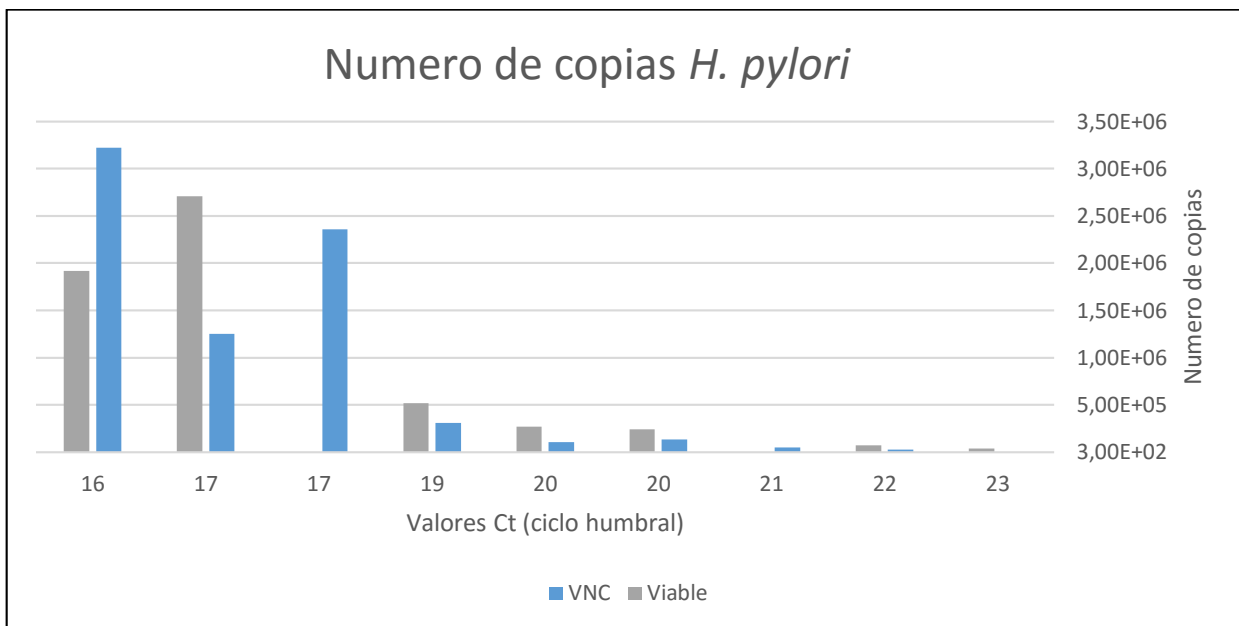


Figura 19 Cuantificación del número de copias obtenido para *H. pylori* para cada ciclo umbral.

### 6.4 Desinfección

En los experimentos de desinfección se probaron las diferentes condiciones de análisis, las cuales se presentan en la Tabla 3, estos corresponden a cada CT presentado en la Tabla 6. En la cual se muestran los valores de ciclo, número de copias y la reducción obtenida. Cabe hacer mención que cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

*Tabla 6* Reducción en log de *H. pylori* estado viable sometida a un proceso de desinfección con ozono

<b>Dosis (CT) Min-mg/L</b>	<b>Ct (threshold cycle)</b>	<b>No. copias</b>	<b>Dvs</b>	<b>Reducción log</b>	<b>Porcentaje de Reducción</b>
<b>0.2</b>	16	3,22E+06	4.62E+05	-2.39	99.59
<b>0.4</b>	17	2,36E+06	3.75E+05	-2.56	99.72
<b>0.6</b>	17	1,25E+06	2.15E+05	-2.86	99.86
<b>0.8</b>	19	3,11E+05	4.88E+04	-3.48	99.96
<b>1</b>	20	1,37E+05	1.55E+04	-3.77	99.98
<b>1.4</b>	20	1,04E+05	1.51E+04	-3.88	99.98
<b>1.8</b>	21	5,23E+04	3.97E+03	-4.19	99.99
<b>2</b>	22	2,68E+04	1.42E+03	-4.49	99.99

Los resultados obtenidos en los experimentos de desinfección con ozono para la inactivación de *H. pylori* en estado viable cultivable mostraron una inactivación de 2.39 log con un CT de 0.2 lo cual es equivalente a 99.59 % de reducción de microorganismos. Los resultados obtenidos son comparables con lo reportado en la literatura para células viables de *H. pylori*, por Baker *et al.*, 2002 en el cual probó la inactivación de *H. pylori* utilizando ozono para cultivos en placa; dichos resultados muestran una reducción 2 log con un CT de 0.24 O<sub>3</sub> mg/L·min.

LA metodología q-PCR-PMA presentada en ésta tesis muestra una mayor exactitud en el monitoreo de inactivación de *H. pylori*, ya que fue posible determinar una inactivación de la bacteria superior a los de 3 log, esto debido a la especificidad de la técnica (Figura 19). La q-PCR-PMA permite entonces evaluar con mayor precisión la eficacia del proceso de desinfección utilizado.

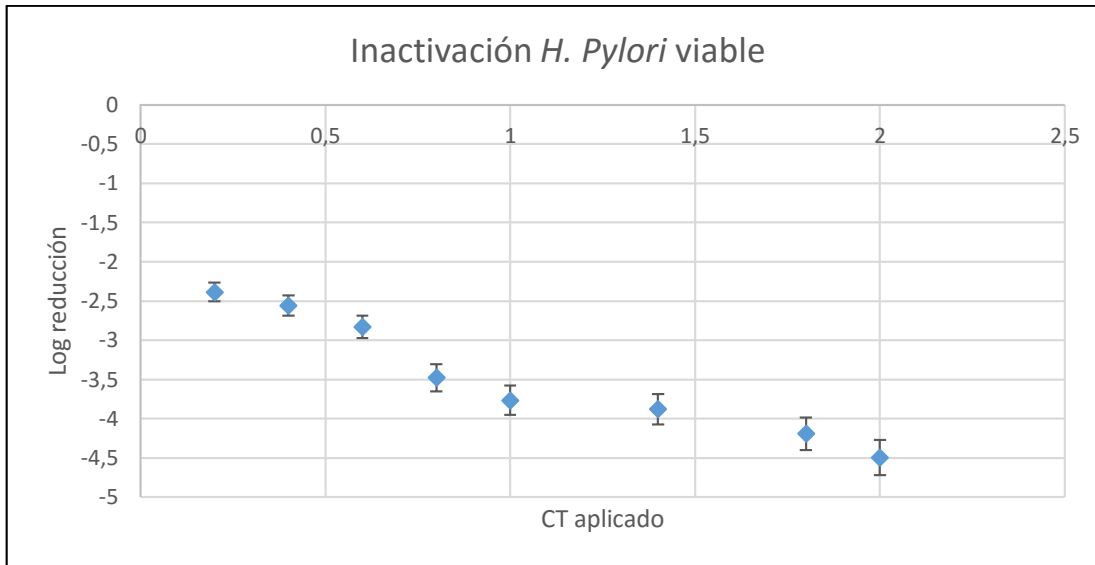


Figura 20 Reducción logarítmica de *H. pylori* en estado viable respecto al CT aplicado.

Para el caso de *H. pylori* en estado morfológico viable no cultivable, los resultados muestran una menor reducción de bacterias que para el estado viable cultivable, ya que se obtuvieron menores porcentajes de inactivación. No obstante, el efecto del ozono sigue siendo eficaz en la inactivación, los resultados obtenidos demuestran que con CT 0.2, 0.4 y 0.6 se lograron reducciones superiores a los 2 log. La inactivación del 99.9 % es posible a partir de un CT de 0.8 (Tabla 7).

Tabla 7 Reducción en log de *H. pylori* estado VNC sometida a un proceso de desinfección con ozono

Dosis CT	Ct (threshold cycle)	No. copias	Dvs	Reducción log	Porcentaje de Reducción
0.2	16	9.05E+06	4.08E+05	-2.01	99.02
0.4	16	1.92E+06	2.10E+05	-2.68	99.79
0.6	17	2.71E+06	2.01E+05	-2.53	99.70
0.8	19	5.16E+05	9.16E+04	-3.25	99.94
1	20	2.72E+05	1.97E+04	-3.53	99.97
1.4	20	2.43E+05	2.30E+04	-3.58	99.97
1.8	22	7.38E+04	5.49E+03	-4.58	99.99
2	23	3.96E+04	2.63E+03	-4.37	99.99

Lo reportado acerca del estado VNC por Casasola *et al.*, en 2013 utilizando q-PCR, determina una reducción -2.69 log con un CT de 1.16 O<sub>3</sub> mg/L·min. En dicha investigación, con un CT de 1.0 O<sub>3</sub> mg/L·min se tiene como resultado una reducción superior a los -3 log (Figura 21). Los valores de reducción log más altos podrían deberse principalmente al pretratamiento con el colorante PMA, ya que actúa selectivamente impidiendo la amplificación de células no viables a diferencia de la qPCR tradicional.

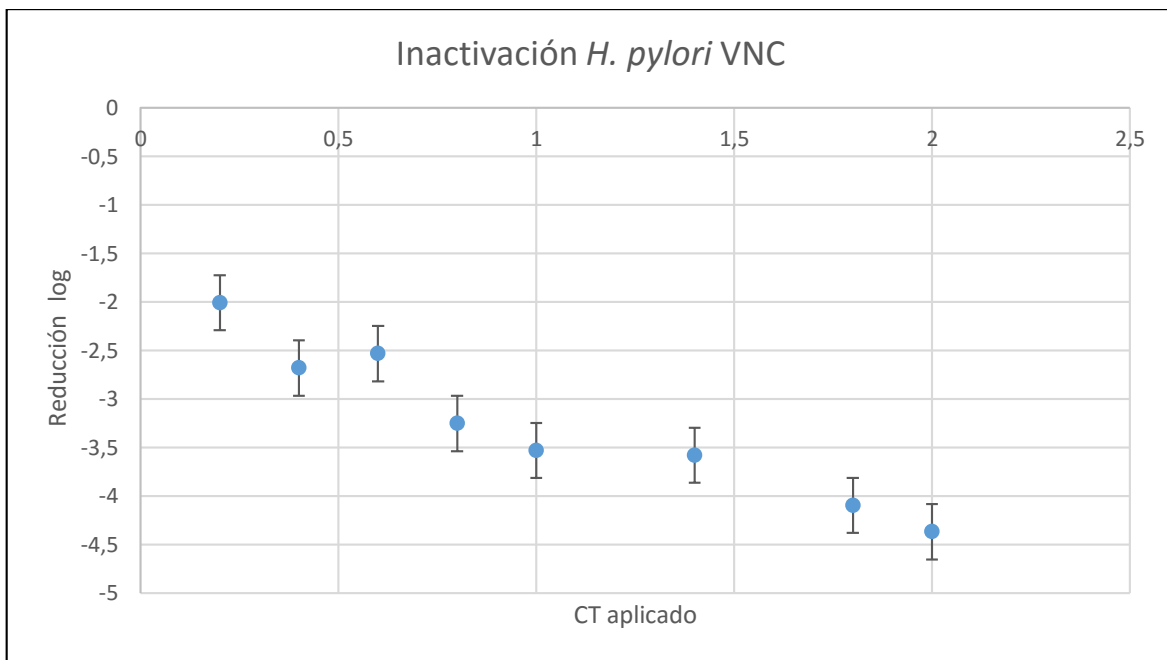


Figura 21 Grafica de reducción log con forme el aumento de concentración para *H pylori* VNC.

La dosificación más adecuada para la inactivación de *H. pylori* es CT 0.8 mg/L·min, con la cual es posible obtener una inactivación 3 log, que corresponde a una inactivación de 99.9% de *H. pylori* tanto en estado viable como el VNC.

Esta dosis se encuentra dentro del rango en el que se satisface los parámetros de aceptabilidad, como color, sabor y olor, en lo estipulado por la norma europea UNE-EN 1278 la cual rige el tiramiento con ozono para el agua destinada para consumo humano.

Cabe señalar que esta norma considera dosis una de 0.4 mg/L con un tiempo de contacto de 4 min (CT de 1.6) para la inactivación virus y parásitos los cuales se consideran los organismos más resistentes, esta dosis es muy superior al estimada en este trabajo.

Las condiciones de desinfección mediante la aplicación del ozono utilizadas en éste trabajo, mostraron ser eficaces para inactivar *H. pylori*, tanto en el estado viable, como en el estado VNC. Así mismo la metodología q-PCR-PMA permitió evaluar la eficacia del proceso aplicado, con la certeza de cuantificar correctamente el número de bacterias removidas, así como las que se conservaron viables al final del tratamiento.



## 7. CONCLUSIONES

La metodología q-PCR PMA permite la cuantificación selectiva de células viables de *H. pylori* sometidas a desinfección con ozono y es posible determinar de manera precisa la reducción de microorganismos. La técnica permite resultados independientes a condiciones de cultivo, las cuales son lentas y se basan en el crecimiento bacteriano e incluyen el conteo en placa de colonias.

q-PCR-PMA muestran que la dosis y tiempo de contacto ideales, utilizados en el proceso de desinfección con ozono para inactivar los estados morfológicos de *H. pylori* en agua, corresponden a un CT de 0.8 O<sub>3</sub> mg/L·min (0.6 · 1.33) ya que en este CT se consigue una inactivación -3 log lo cual corresponde a una inactivación de 99.9% de los microorganismos presentes para ambos estados morfológicos celulares.

La metodología desarrollada en la presente tesis, q-PCR-PMA es una técnica prometedora que permite diferenciar células vivas de células muertas, lo cual es un progreso en las técnicas actualmente utilizadas para el monitoreo relacionado con la eficacia de los desinfectantes utilizados en el tratamiento de agua para consumo humano.

Actualmente *H. pylori* se encuentra en la lista 3 de contaminantes candidatos de la US EPA (Contaminant Candidate List 3), la cual hace referencia a los contaminantes que actualmente no están sujetos a ningún reglamento de agua potable promulgado, pero es de conocimiento su presencia en los sistemas de agua públicos. Los contaminantes en esta lista posiblemente requieran regulación bajo la Ley de Agua Potable Segura (US Safe Drinking Water Act).

En México no se cuenta con regulación o vigilancia alguna sobre la presencia de *H. pylori*, no obstante, es relevante dar seguimiento a ello debido a que la bacteria ha sido identificada en diversos sistemas de agua en la ciudad de México, inclusive en fuentes de suministro, lo cual implica un riesgo a la salud de la población mexicana.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, B. L., Bates, T. C., y Oliver, J. D. (2003). Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7462–7466.
- Andersen LP, Wadström T. Basic Bacteriology and Culture. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC); 2001. Capítulo 4.
- Azevedo, N. F., Guimarães, N., Figueiredo, C., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. (2007). A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(3), 157–69.
- Asaka M, Kimura T, Kato M, et al. Possible role of *Helicobacter pylori* infection in early gastric cancer development. *Cancer* 1994;73(11):2691–4.
- Arnone, R. D., & Walling, J. P. (2007). Waterborne pathogens in urban watersheds. *Journal of Water and Health*, 5(1), 149.
- Azevedo, N. F., Pacheco, A. P., Keevil, C. W., and Vieira, M. J. (2004). Nutrient Shock and Incubation Atmosphere Influence Recovery of Culturable *Helicobacter pylori* from Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 490–493.
- Baker, K. H., Hegarty, J. P., Redmond, B., Reed, N. A., and Herson, D. S. (2002). Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 981–984.
- Bellack, N. R., Koehoorn, M. W., MacNab, Y. C., and Morshed, M. G. (2006). A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiology and Infection*, 134(3), 439–449.
- Bode, G., Mauch, F., y Malfertheiner, P. (1993). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiology and Infection*, 111(3), 483–90.
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., and Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 485–494.

- Casasola-Rodríguez, B., Orta de Velásquez, M. T., Luqueño-Martínez, V. G., and Monje-Ramírez, I. (2013). Quantification of *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state by quantitative PCR in water disinfected with ozone. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 68(11), 2468–72.
- Castillo-Rojas, G., Mazarí-Hiriart, M., and López-Vidal, Y. (2004). *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública de México*, 46(6), 538–548.
- Comisión Nacional del Agua (2007), Manual de agua potable alcantarillado y saneamiento: desinfección para sistemas de agua potable y saneamiento.
- Duś, I., Dobosz, T., Manzin, A., Loi, G., Serra, C., y Radwan-oczko, M. (2013). Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research, 261–268.
- Environmental Protection Agency. (1998) Alternative disinfectants and Oxidants guidance.
- Environmental Protection Agency. (2003) Disinfection Profiling and Benchmarking
- Environmental Protection Agency. (2011) Water Treatment Manual: Disinfection, Environmental Protection Agency, Johnstown Castle, Co. Wexford, 187.
- Fernández Delgado, M., Contreras, M., García-amado, M. A., Michelangeli, F., y Suárez, P. (2008). Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*. *Interciencia*, 33(6), 412–417.
- Fittipaldi, M., Nocker, A., y Codony, F. (2012). Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 91(2), 276–289.
- Gilbride, K. (2013). *Molecular Methods for the Detection of Waterborne Pathogens. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Applications.*
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44(15), 4325–4339.
- Hultén, K., H. Enroth, T. Nystrom, and L. Engstrand. 1998. Presence of *Helicobacter species* DNA in Swedish water. *J. Appl. Microbiol.* 85:282–286.

- Hegarty JP, Dowd MT, Baker KH (1999) Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *J Appl Microbiol* 87:697–701.
- Johnson, C. H. (1997). Inactivation of *Helicobacter pylori* by Chloramination. *Journal of Environmental Monitoring and Restoration*, 4(12), 83–87.
- Secretaría de Salud. (2002). NOM-230-SSA1-2002. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. [www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html) (12 de julio de 2005).
- Kusters, J. G., Gerrits, M. M., Van Strijp, J. A., and Vandenbroucke-Grauls, C. M. (1997). CoFccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*, 65(9), 3672–3679.
- Kusters, J. G., Van Vliet, A. H. M., and Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449–490.
- Lertsethtakarn, P., Ottemann, K. M., and Hendrixson, D. R. (2011). Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 389–410.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., and Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5, 258.
- Life technologies. (2014), Real time PCR handbook. <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
- Manitoba Water Stewardship (2005) Chlorine and Alternative Disinfectants Guidance Manual. 117.
- Marshall, B. (2002). *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clinical Medicine (London, England)*, 2(2), 147–52.
- Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Castillo-Rojas, G., De León, S. P., and Cravioto, A. (2001). *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. *Archives of Medical Research*, 32(5), 458–467.

- Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Ponce-de-León, S., Calva, J. J., Rojo-Callejas, F., & Castillo-Rojas, G. (2005). Longitudinal study of microbial diversity and seasonality in the Mexico City metropolitan area water supply system. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5129–37.
- McDaniels, A. E., Wymer, L., Rankin, C., and Haugland, R. (2005). Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water. *Water Research*, 39, 4808–4816.
- Mobley HLT. Urease. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001. Chapter 16.
- Moreno, Y., and Ferrús, M. A. (2012). Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter*, 17(5), 327–32.
- Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J. L., Jiménez, A., González, A., and Ferrús, M. A. (2007). Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Research*, 41, 3490–3496.
- Moter, A., and Göbel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2), 85–112.
- Nocker, A., Cheung, C.-Y., and Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 310–20.
- Nocker, A., Sossa, K. E., and Camper, A. K. (2007). Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 252–60.
- Nurgalieva, Z. Z., Malaty, H. M., Graham, D. Y., Almuchambetova, R., Machmudova, A., Kapsultanova, D., Zhangabylov, A. (2002). *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: Effect of water source and household hygiene. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(2 SUPPL.), 201–206.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 93–100.

- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415–425.
- Olivier, B. J., Bond, R. P., Zyl, W. B. Van, Delport, M., Slavik, T., Ziady, C., Terhaar, J. S. (2006). Absence of *Helicobacter pylori* within the Oral Cavities of Members of a Healthy South African Community Absence of *Helicobacter pylori* within the Oral Cavities of Members of a Healthy South African Community, 44(2), 635–637.
- Organización Panamericana de la Salud. (2007) Guía para la selección de sistema de desinfección, 33.
- Otero, L. L., Ruiz, V. E., and Pérez Pérez, G. I. (2014). *Helicobacter pylori*: The balance between a role as colonizer and pathogen. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 28(6), 1017–1029.
- Pinto, D., Santos, M. a, & Chambel, L. (2013). Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 7828, 1–16.
- Plonka, M., Targosz, A., and Brzozowski, T. (2014). Can Drinking Water Serve as a Potential Reservoir of *Helicobacter pylori*? Evidence for Water Contamination by *Helicobacter pylori*. 100-120.
- Santiago P, Moreno Y, Ferrus MA. Identification of viable *Helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques. *Helicobacter*. 2015; 20:252–9.
- She, F. F., Lin, J. Y., Liu, J. Y., Huang, C., and Su, D. H. (2003). Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 9(3), 516–520.
- Solsona, Felipe; Méndez, Juan Pablo (2003); Water disinfection Environmental Protection Agency. Lima; CEPIS.
- Stokell, J. R. and Steck, T. R. 2012. Viable but Nonculturable Bacteria. eLS. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley and Sons, Ltd. Chichester.
- Tamay de Dios, L.; Ibarra, C. and Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad 2 (2)*: 70-78.

- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Pérez-Pérez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Muñoz, O. (1998). A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(4), 1089–1094.
- Varma, M., Field, R., Stinson, M., Rukovets, B., Wymer, L., and Haugland, R. (2009). Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater. *Water Research*, 43(19), 4790–4801.
- World Health Organization (2003) Emerging Issues in Water and Infectious Disease, 24 pp.
- Wysocki, B., Uradziński, J., and Gomó<sup>3</sup>ka-Pawlicka, M. (2006). Ozone as an alternative disinfectant a review. *Polish journal of food and nutrition sciences Pol. J. Food Nutr. Sci*, 1556(1), 3–8.