



# Revista MINERVA

Plataforma digital de la revista: <https://minerva.sic.ues.edu.sv>



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

### Detection of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in irrigation and drinking water

Emerson Pocasangre<sup>1</sup>, Lorena Cardona<sup>2</sup>, Mario Romero<sup>3</sup>, Coralia González<sup>3</sup>

Correspondencia:  
emerson.pocasangre@uees.edu.sv

Presentado: 16 de julio de 2021  
Aceptado: 6 de octubre de 2021

- 1 Universidad Evangélica de El Salvador, Facultad de Medicina, Jefe de Departamento de Microbiología e Inmunología
- 2 Universidad de El Salvador, Maestría en Microbiología e Inocuidad de Alimentos
- 3 Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental

#### RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* causa cuadros clínicos gastrointestinales con síntomas leves y graves, puede colaborar en la causalidad de un cáncer estomacal. La prevención de la transmisión es lo más importante, para ello se debe conocer el mecanismo exacto y reservorio de este patógeno. El objetivo del estudio fue detectar molecularmente los genes *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en aislados de agua de riego y agua potable recolectadas en el Sub-comité El Astillero del Distrito de Riego de Zapotitán, municipio de Ciudad Arce en el departamento de La Libertad. Durante los meses de mayo de 2019 a diciembre de 2020. Las muestras se examinaron por medio de filtración por membrana, utilizando medios de cultivo selectivo para aislar la bacteria, pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa y ureasa), extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA en inglés), Reacción en cadena de la polimerasa punto final y antibiograma por el método de kirby bahuer. Las muestras de agua potable en su etapa de aislamiento resultaron ser negativas. Para las aguas de riego, el 20% resultaron positivas en la etapa de enriquecimiento por lo que se confirmó con las pruebas bioquímicas y PCR de punto final (Polymerase chain reaction, por sus siglas en inglés) ARN 16S (colocar el nombre completo porque es la primera vez que se menciona). Los resultados determinaron que el 100% de las cepas aisladas son portadoras de los genes *vacA* y *cagA*. El antibiograma realizado mostró una sensibilidad a claritromicina y levofloxacina; y resistencia a Amoxicilina y Metronidazol, antibióticos tradicionales usados en el tratamiento contra la infección de esta bacteria, sospechando que el agua de riego es una potencial vía de transmisión.

**Palabras clave:** Antibiograma, extracción de ADN, genes de virulencia, reacción en cadena de la polimerasa, vía de transmisión.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* infection causes gastrointestinal clinical pictures with mild and serious symptoms, which may contribute to the causality of stomach cancer. The prevention of transmission is the most important thing for this must know the exact mechanism and reservoir of this pathogen. The objective of the study was to molecularly detect the genes *vacA* and *cagA* of *Helicobacter pylori* in irrigation water and drinking water isolates collected in the El Astillero Sub-committee of the Zapotitán Irrigation District, municipality of Ciudad Arce in the department of La Libertad. During the months of May 2019 to December 2020. Samples were examined by membrane filtration, using selective culture media to isolate the bacteria, biochemical tests (oxidase, catalase and urease), DNA extraction, end point polymerase chain reaction and antibiogram by the method of kirby bahuer. Samples of drinking water at the isolation stage were negative. For irrigation waters, 20% were positive in the enrichment stage so it was confirmed with biochemical tests and PCR final point for which it was obtained that 100% of the isolated strains are carriers of the genes *vacA* and *cagA*. The antibiogram performed showed a sensitivity to claratromycin and levofloxacin; and resistance to Amoxicillin and Metronidazole, traditional antibiotics used in the treatment of infection of this bacterium. Suggesting that irrigation water is a potential transmission pathway.

**Keywords:** Antibiogram, DNA extraction, virulence genes, polymerase chain reaction, transmission pathway.

## INTRODUCCIÓN

Dentro del género *Helicobacter* se han descubierto 31 especies, por su morfología y reacción a la coloración al Gram, se clasifican como bacilos Gram-negativos, curvos o rectos, de 0.3-1.0 µm de ancho y de 1.5-5 µm de largo. Presenta extremos redondeados y cuando son curvados muestran periodicidad espiral. La especie más patógena para el ser humano (*pylori*), posee múltiples flagelos laterales (lofótrico), envainados con una protuberancia terminal, de 30 µm de longitud y 2.5 nm de grosor, confiriéndoles movilidad. Se ha sugerido que la vaina del flagelo es una adaptación para vivir y moverse a través de la mucosa y protegerse contra el ácido del estómago. (1)

Santiago, C. P., (2016) sostiene que el género *Helicobacter* lo constituyen bacterias microaerofílicas, con metabolismo de tipo respiratorio. No utilizan carbohidratos. En los medios de cultivo típicos tras 2-5 días de incubación a 37 °C originan colonias no pigmentadas, translúcidas, de 1-2 mm de diámetro. Crecen a 30 °C pero no a 25 °C. Son catalasa y oxidasa positivo. Producen H<sub>2</sub>S y no son capaces de hidrolizar el hipurato. Las

especies gástricas son productoras de ureasa. (1)

Hasta el momento se ha demostrado que la especie *pylori* del género *Helicobacter* es la de mayor importancia clínica por su estrecha relación con la gastritis, úlcera péptica y el cáncer gástrico. Cuando se encuentra en medios de cultivo por largos periodos de tiempo pueden aparecer formas cocoides así como también cuando se encuentra fuera del estómago.

El nicho ecológico de *Helicobacter pylori*, la mucosa gástrica, presenta características peculiares y únicas. La entrada de la bacteria al cuerpo humano es a través de la cavidad oral y cuyo destino es el píloro, donde el pH en el lumen del estómago es mucho más bajo, con valores de entre 1 y 4, condiciones aptas y diseñadas fisiológicamente para desnaturar la mayoría de las proteínas. *Helicobacter pylori* sobrevive a estas condiciones ya que es capaz de tamponar el pH en su zona más próxima, por su capacidad de sintetizar la enzima que junto con el cofactor níquel, catalizan la hidrólisis de urea del jugo gástrico, formando dióxido de carbono y amoníaco ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO + H<sub>2</sub>O → CO<sub>2</sub> + 2NH<sub>3</sub>). El amoníaco actúa como neutralizador de la acidez, aumenta significativamente el pH

circundante a la bacteria por lo que le permite invadir y sobrevivir en la mucosa gástrica a pesar de la acidez del lumen. <sup>(1)</sup>

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

Por otro lado, aún después de su primer aislamiento, la comunidad científica sigue en la lucha por comprender la(s) forma(s) en que *Helicobacter pylori* se transmite dentro de la población humana. Existen evidencias que sugieren la transmisión de persona a persona, por ingesta de alimentos y agua contaminada. La Organización Mundial de Gastroenterología (2010) y Azevedo *et al.* (2007) sostienen que la transmisión persona a persona dentro de las familias parece ser el modo predominante, lo que indica que el contacto íntimo es importante. No obstante, las infecciones con *Helicobacter pylori* a veces se presentan como epidemias, esto sugiere un origen común

como puede ser los alimentos o el agua, tanto potable como de riego y así llegar por medio de ella a los cultivos. <sup>(3)</sup>

Se seleccionó las Aguas del Distrito de Riego de Zapotitán del municipio de Ciudad Arce, ya que este estudio consideró evaluar la presencia del *Helicobacter pylori* en el agua potable de la zona; además, del agua del río Talnique que alimenta parte del sistema de riego de la zona mediante tuberías subterráneas que finalmente son un reservorio junto a otros ríos como el Chuchucato y Copapayo. Este río recibe descargas de aguas negras de algunas comunidades siendo este el factor principal de contaminación del río.

Si bien es cierto, no se logró aislar *Helicobacter pylori* en las muestras de agua potable, su detección en aguas de riego fue a través de medios de cultivo selectivos para este microorganismo, se logró su crecimiento en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10%, su confirmación mediante pruebas bioquímicas y mediante la observación de bacilos curvos Gram negativos al microscopio. Se obtuvo el DNA de estas colonias sugestivas de *Helicobacter pylori* para su identificación mediante una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa los genes RNA 16s, *vacA*, y *cagA*; lo que nos obliga a recomendar dar inicio a un estudio complementario en los cultivos de hortalizas producidos en la zona y confirmar la presencia de *Helicobacter pylori* en esta matriz alimentaria para poder advertir a las autoridades gubernamentales y den inicio a un sistema de tratamiento de aguas previo, con el fin de evitar una eventual infección en los consumidores que puede llegar a consecuencias graves como un cáncer en el estómago. Al momento las cepas aisladas, presentan un perfil de resistencia a antibióticos muy particular en la cual mostraron sensibilidad a Levofloxacina y Claritromicina, una resistencia a Amoxicilina (en el 20%) y una resistencia del

100% al Metronidazol.

El objetivo de este estudio fue detectar molecularmente los genes *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en aislados de agua de riego y agua potable.

## METODOLOGÍA

La investigación adquirió un enfoque cuantitativo; según la epidemiología, fue analítica, según la secuencia temporal fue longitudinal; según la asignación de los factores del estudio, se procuró un diseño experimental, tipo ensayo clínico no controlado; además fue prospectivo.

Además se realizó con un enfoque experimental y cuantitativo, de tipo descriptivo, y según la secuencia temporal fue de corte transversal, se procuró un diseño experimental por medio del estudio de campo.

Las unidades de análisis fueron las muestras de agua potable y de riego en puntos estratégicos previamente identificados.

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

Se realizó una visita al sub comité el Astillero perteneciente al municipio de Zapotitán, departamento de La Libertad durante el mes de mayo de 2019, en la que se inspeccionó la zona, se visitaron los ríos Talnique, Copapayo y Chuchucato, los cuales alimentan el reservorio mediante tuberías subterráneas, para posteriormente ser bombeada al canal

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

## Procedimiento de la recolección de datos

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

### Agua potable

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

### Agua de riego

- Río Talnique: en su curso medio. (Ver Figura 1)
- Represa del río Talnique: en el perímetro de la compuerta de la tubería que alimenta a la pila de estación de bombeo.
- Pila de estación de bombeo
- Canal principal: desembocadura de la tubería que alimenta al canal principal.
- Canal de distribución: específicamente del canal RN-4, ubicado en el sub-comité El Astillero.

**Figura 1.**

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



A cada una de las muestras se le asignó un código.

Para la recolección de las muestras de agua potable se desinfectó el grifo, después se dejó correr el agua unos dos litros, se utilizó una bolsa estéril y se recolectaron 500 mL de cada hogar seleccionado. Se rotularon las muestras y se almacenaron en una hielera a una temperatura aproximada de 4 a 8° C para posteriormente ser trasladadas al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad Evangélica de El Salvador. Cada muestra de agua se filtró en un manifold de filtración de 6 bocas utilizando membranas estériles con poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Se incubó dicha membrana en caldo Brucella por 24 horas a 37° C y en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 10%. Lo caldos que presentaron turbidez, se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  y se sembró con una tórula estéril por método de estrías en agar Base Sangre Columbia con 7% de sangre defibrinada de carnero e inhibidores DENT bajo las mismas condiciones que el caldo Brucella.

En relación a las muestras de agua de riego,

en los puntos de muestreo seleccionados, se obtuvieron 500 mL de agua las cuales se rotularon, almacenaron a una temperatura de 4 a 8° C y se trasladaron siempre al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad Evangélica de El Salvador.

A estas muestras se les realizó un pre filtrado con una membrana con poro de 100  $\mu\text{m}$ , posteriormente se les dio el mismo tratamiento que las muestras de agua potable.

Los agares selectivos inoculados que presentaron colonias características de *Helicobacter pylori* se sometieron la prueba de catalasa y oxidasa respectivamente, finalizando con su respectiva tinción de gram en busca de bacilos curvos gram negativos.

El siguiente paso fue la extracción de DNA bacteriano mediante la técnica de columnas de sílica gel de la marca NucleoSpin Tissue™, el material genético se obtuvo en tubos eppendorf. Una vez extraído el material genético, se procedió a preparar el master mix, considerando las concentraciones estándar. Todos los componentes se calcularon para obtener un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  por cada muestra. En un tubo eppendorf se agregaron las cantidades respectivas de todos los componentes multiplicado por 6 (5 muestras positivas y 1 control positivo), a excepción de los iniciadores y el ADN, ya que estos se agregaron por separado a cada tubo de PCR donde se distribuyó el master mix, el contenido de cada tubo quedó de la siguiente manera: 10X Buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTP'S 1  $\mu\text{L}$ , Cloruro de magnesio 1.5  $\mu\text{L}$ , Oligo Forward 0.25  $\mu\text{L}$ , Oligo Reverse 0.25  $\mu\text{L}$ , taq polimerasa 0.4  $\mu\text{L}$ , Agua libre de nucleasas 36.6  $\mu\text{L}$ , y finalmente ADN 5  $\mu\text{L}$  para un volumen total de cada tubo de PCR de 50  $\mu\text{L}$ . Una vez elaborado del master mix se buscó la amplificación de los genes RNA 16S que recomienda Tomb, J.F. (1997): (Forward: 5' - CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC - 3'; Reverse: 3' - ATT ACT GAC GCT GAT TGT GC - 5'), *vacA* (Forward:

5' - GGTCAAAATGCGGTCATGG - 3'; Reverse: 3' - CCATTGGTACCTGTAGAAAC - 5'), y *cagA* (Forward: 5' - GATAACAGCCAAGCTTTTGAGG - 3'; Reverse: 3' - CTGCAAAAAGATTGTTTGGCAGA - 5'). Las condiciones de la PCR para el gen RNA 16S fueron una desnaturalización inicial por 2 min a 94 °C, luego 30 ciclos en las siguientes condiciones: 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 30 s, y concluyó con 1 ciclo para una extensión final a 72 °C por 8 min; *vacA*: desnaturalización inicial por 2 min a 94 °C, luego se completaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 30 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min; *cagA*: una desnaturalización inicial de 1 min a 94 °C, luego se completaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y terminó con 1 ciclo para una extensión final a 72 °C por 8 min.

En una cámara para electroforesis se vertieron 600 mL de TBE (Tris, Borato y EDTA) al 1X donde se sumergió un gel de agarosa al 2.5% con 3.5 µL de Gel Red como colorante de ácidos nucleicos. Para cada tubo de PCR con los genes amplificados se procedió a sembrar cada pozo del gel de agarosa de la siguiente manera: en una tira de papel encerado, se pipeteó 2 µL de buffer de carga 7 veces, los cuales se agregaron al volumen total del cada pozo a sembrar. En cada gel de agarosa, en el pozo número 1 con una micropipeta se sembró 7 µL del marcador de peso molecular previamente homogenizado con los 2 µL de buffer de carga. En el pozo número 3, se sembró 10 µL de DNA amplificado del control positivo previamente homogenizado con los 2 µL de buffer de carga. Del pozo número 4 en adelante, se sembraron 10 µL de DNA amplificado de las muestras previamente homogenizadas con los 2 µL de buffer de carga respectivamente. Se colocó la tapa a la cámara de electroforesis conectando en su parte posterior los electrodos, la fuente de la cámara de electroforesis se programó a

80 mV, 500 m/amp por 45 minutos. Después de la corrida, se sacó el gel dejándolo secar. Finalmente, se introdujo el gel de agarosa seco dentro de la campana de luz ultravioleta, se verificó la presencia de bandas en el gel y se interpretaron los resultados. Se utilizó como control positivo la cepa de *Helicobacter pylori* NTCT 11637. <sup>(4)</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

Inicialmente se planteó la sobrevivencia del *Helicobacter pylori* en ambos tipos de agua, ya que en otras investigaciones como las de Cuervo *et al.* (2017) y Ramy *et al.* (2015), se confirmó el agua potable como un mecanismo de transmisión, sin dejar de mencionar que la presencia de esta bacteria en agua de riego, la convierte en un riesgo potencial para contaminar los cultivos, esta última aseveración se confirma en este estudio, ya que la bacteria se encontró en el 20% de las muestras de agua de riego. <sup>(5,6,7)</sup>

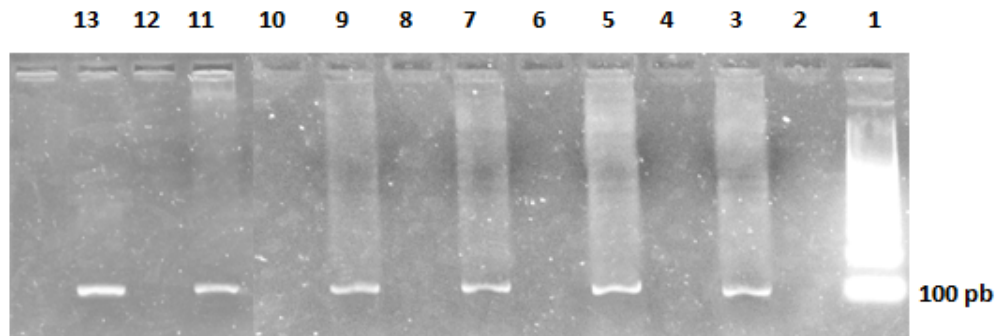
El primer gen que se amplificó fue el RNA 16s. La figura 2 muestra los productos de amplificación de PCR de la región RNA 16s de las cepas aisladas de agua de riego. Se observó una banda a 110 pb en cada muestra, lo que confirma la presencia de *Helicobacter pylori*.

Ya que este gen se utiliza como herramienta

estandarizada de identificación genética.

### Figura 2.

Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 3: control positivo NCTC 11637; carril 5: RTA-04; carril 7: RTA-05; carril 9: RRT-03; carril 11: RRT-04; carril 13: RRT-05. Banda correspondiente al gen RNA 16S de 110 pb.

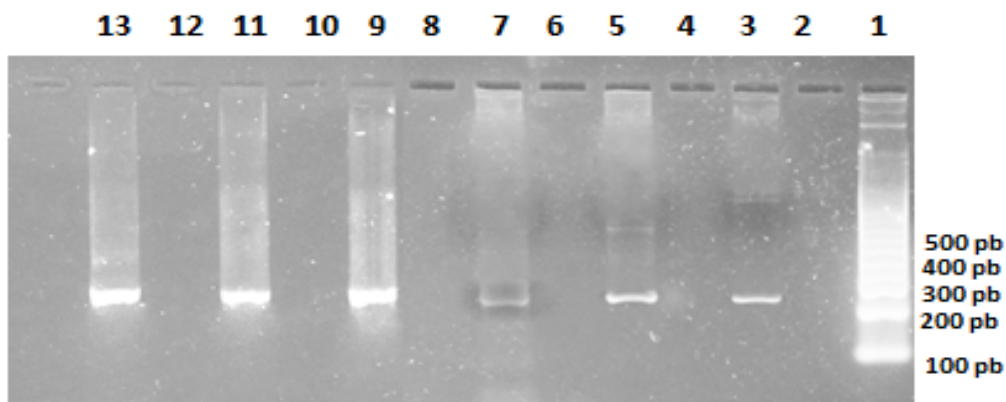


El segundo gen amplificado fue el *vacA m1A*. La figura 3 muestra los productos de amplificación de PCR del gen de las cepas aisladas de agua de riego, mediante la aparición de una banda a 290 pb en cada muestra. Aunque este gen está

presente en todas las cepas de *Helicobacter pylori*, se logró identificar en las cepas aisladas que son portadoras del alelo m1, el cual se asocia con un mayor daño al tejido gástrico.

### Figura 3.

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



Mientras que el tercer gen amplificado fue el *cagA*. En este estudio, el 100% (5 de 5) de las muestras positivas para *Helicobacter pylori* presentaron el gen *cagA*. Este gen codifica la proteína *cagA*, que confiere características patógenas a las cepas que lo contienen. Fidson J. (2018), en su investigación realizada en aguas crudas y potables en tres plantas de potabilización en la ciudad de Bogotá

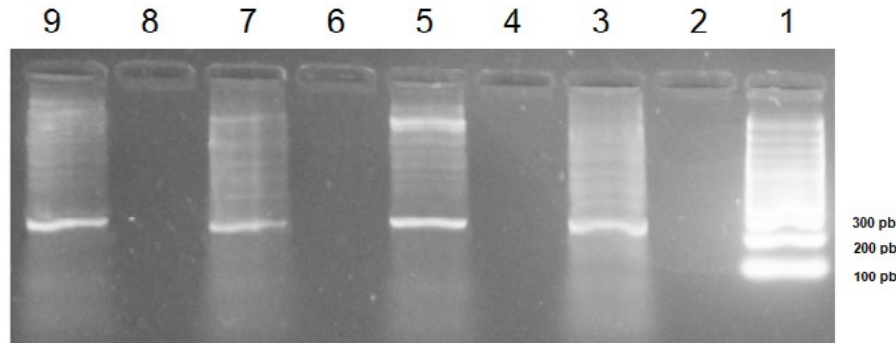
menciona que las cepas *cagA+* se asocian con mayor inducción de interleukina 8 (IL-8) en el epitelio y mayor riesgo de producir úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer. La presencia de cepas *cagA+* en muestras clínicas se asocia con síntomas relacionados con gastritis severa, reflujo gatroesofágico, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico. Las figuras 4 y 5 presentan los productos de amplificación de PCR del gen de

las cepas aisladas de agua de riego, mediante la aparición de una banda a 300 pb en cada muestra. Esto confirma que las cepas aisladas

son portadoras de un gen que confiere una mayor patogenicidad en una eventual infección en el ser humano.

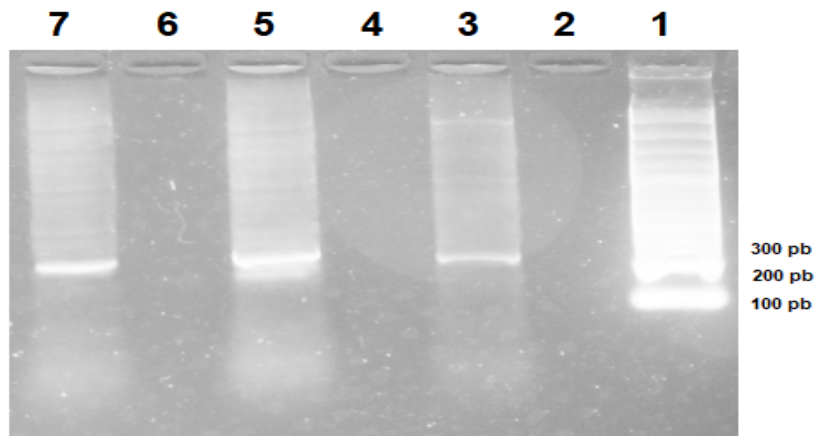
**Figura 4.**

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



**Figura 5.**

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



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

tomate, pepino, repollo, berenjena, ayote, güisquil, limón, maracuyá, pipián, chipilín, mora) y que son altamente comercializados.

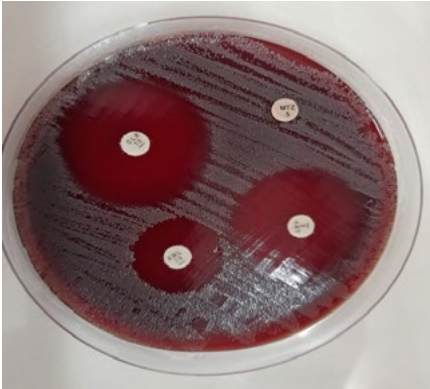
Los subcultivos obtenidos y confirmados con los 3 genes en estudio se utilizaron para realizar un antibiograma con los siguientes antibióticos: Claritromicina, Amoxicilina, Metronidazol y Levofloxacina. La figura 6 muestra los halos obtenidos en una placa con agar Muller Hinton con 7% de sangre de carnero desfibrinada.

Los resultados indican que el 100% de las muestras de los aislados de *Helicobacter*



**Figura 6.**

Halos de inhibición obtenidos con los antibióticos de prueba.



*pylori* son sensibles a Claritromicina, ya que se obtuvieron halos entre 34 – 37 mm, muy por encima del rango de referencia y Levofloxacina con halos de 32 – 33 mm. Por otra parte, el 80% de los aislados presentó resistencia a Amoxicilina y el 20% sensibilidad a dicho antibiótico, ya que solamente el halo de un aislado superó los 25 mm de diámetro. No obstante, con metronidazol no se observaron halos de inhibición en el ensayo, lo que indica que no presenta actividad antibacteriana sobre la cepa de *Helicobacter pylori* aisladas de las diferentes muestras de agua de riego. (Ver Tabla N° 1).

Álvarez A. *et al* (2009), evaluaron la resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia y concluyeron que de las 88 cepas estudiadas ninguna fue resistente a tetraciclina y amoxicilina, 2.2% (2/88) fueron resistentes a claritromicina y 88% (68/88) fueron resistentes a metronidazol. <sup>(8)</sup>

Pereyra L. *et al* (2017) evaluaron la sensibilidad a los antimicrobianos de 30 aislamientos de *Helicobacter pylori* obtenidas de biopsias gástricas mediante los métodos de difusión por discos y tiras de E-test. Los antimicrobianos evaluados fueron amoxicilina, claritromicina, metronidazol y ciprofloxacina. No se

encontraron cepas resistentes a amoxicilina, el 17% (5/30) fueron resistentes a claritromicina, el 20% (6/30) a ciprofloxacina por ambos métodos, y el 37% (11/30) a metronidazol por E-test. No pudo determinarse una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de lesión histológica y el patrón de resistencia encontrado. <sup>(9)</sup>

Otero W. *et al* (2018), en su investigación sobre los aspectos básicos del tratamiento de *Helicobacter pylori*, menciona que ocasionalmente este microorganismo es resistente a amoxicilina, tetraciclina, furazolidona y rifabutina (3,6,20-22). La resistencia a esos antibióticos es de 0-2%, menor a 1%, <3% y 0,6 a 1,3% respectivamente. En este trabajo el 80% (4 de 5) de los aislados evaluados fueron resistentes a amoxicilina, esto puede asociarse al uso desmedido que hoy en día se hace de este antibiótico ya sea por automedicación, por ser primera elección de tratamiento en diversas enfermedades y por ser de venta libre (sin receta médica) en nuestro país. <sup>(10)</sup>

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

<sup>(11)</sup>

La resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias desarrollan la capacidad de sobrevivir a la exposición a medicamentos diseñados para matar o detener su crecimiento. Es una de las mayores amenazas para la salud mundial en la actualidad, ya que causa más de 750.000 muertes cada año y, sin una acción urgente, se espera que este número aumente dramáticamente en el futuro.

Los hallazgos experimentales presentados en

**Tabla 1.**

Halos de inhibición con los antibióticos de prueba sobre *Helicobacter pylori*.

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

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

## CONCLUSIONES

La información que se presenta en este estudio sienta un precedente sobre la presencia de *Helicobacter pylori*, ya que se encontró en el 20% de las muestras de agua de riego estudiadas del distrito de riego del sub-comité El Astillero. Se confirmó la ausencia de *Helicobacter pylori* en agua potable de la zona, sin embargo, esto no garantiza que el agua no contenga otros microorganismos patógenos que se utilizan como indicadores de contaminación fecal. Al analizar el total de las muestras de agua de riego, se logró aislar *Helicobacter pylori* en los 2 puntos muestreados del río Talnique probablemente porque funcionan como abrevaderos para el ganado y destino final de desechos de grandes empresas y de los habitantes de la zona. El uso de técnicas

moleculares como la PCR de punto final permitieron la identificación de *Helicobacter pylori* portador de genes *vacA* y *cagA* los cuales pueden potencialmente estimular el crecimiento de tumores malignos a nivel estomacal con el tiempo de la infección de este patógeno. Basados en los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, por sus siglas en inglés) el perfil de resistencia a antimicrobianos obtenidos de las muestras de agua de riego positiva y confirmada por PCR, mostraron sensibilidad a Claritromicina, sensibilidad intermedia a Levofloxacin y resistencia a Amoxicilina y Metronidazol. Un factor que pudo interferir con tener un mayor número de muestras positivas en agua de riego es que *Helicobacter pylori* adopta una forma de cocobacilo cuando no se encuentra en su hábitat natural, lo cual al tener esta morfología traduce que se encuentra en un estado viable pero no cultivable. La presencia de *Helicobacter pylori* portador de genes *vacA* y *cagA* en agua de riego supone un alto riesgo para los cultivos cosechados en la zona, en la medida que los alimentos se pueden convertir en vía de transmisión al ser humano.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada con el apoyo financiero de la Universidad Evangélica de El Salvador

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roque, S. F., (2015) “*Helicobacter pylori*, hoy”. Una historia de 30 años. Santiago: Universidad del Desarrollo/Clínica Alemana Facultad de Medicina. Chile. Vol.26. Número 5.
2. Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. U.S.A. Nature.
3. Organización Mundial de Gastroenterología, (2010). *Helicobacter pylori* en los países de desarrollo.
4. Azevedo, N. F., Guimarães, N., Figueiredo, C., Keevil, C. W. y Vieira, M. J., (2007). A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: Role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. Crit Rev Microbiol. Braga: Portugal.
5. Cuervo, C.M., Gaviria, A. M., (2017). Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua y biopelícula de los grifos de las instituciones educativas oficiales en la ciudad de Medellín. Colombia: Acta Médica Colombiana.
6. Ramy, K. A., Mohammed, M. K. y Radwa, R. S., (2015). Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection. Cairo: Journal of Advanced Research.
7. Santiago, C. P., (2016). Transmisión de *Helicobacter pylori* a través del agua: estudio de la presencia del patógeno e identificación de formas viables mediante técnicas moleculares. España: Universidad Politécnica de Valencia.
8. Álvarez, A., (2009). Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. Revista Médica de Chile.
9. Pereyra, L. et al (2017). Sensibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Helicobacter pylori* aislados de lesiones gástricas. Revista Argentina de Microbiología. Volumen 49.
10. Otero, W., et al (2018). *Helicobacter pylori*: ¿cómo se trata en el 2018? Revista de Gastroenterología del Perú.