



Detecció d'*Helicobacter pylori* en aigua

Núria Queralt i Díaz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departament de Microbiologia

Programa de Doctorat:
Microbiologia Ambiental i
biotecnologia

Detecció d'*Helicobacter pylori* en aigua

Memòria presentada per

Núria Queralt i Díaz

per a optar al grau de

Doctora en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Rosa Maria Araujo Boira
(Professora titular en Microbiologia) en el Departament de Microbiologia,
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Directora,

Autor,

Dra. Rosa M^aAraujo Boira

Núria Queralt i Díaz

Barcelona, Setembre 2012

**Al meu pare.
A tu, Xavi.**

***Hi ha una força motriu més poderosa que el vapor, que la electricitat i que l'energia atòmica. És la força de la voluntad.
Albert Einstein.***

Agraïments

Anys, molts anys han passat des de que vaig començar aquesta aventura en el departament de Microbiologia, la meva segona casa. Em sembla increïble (i crec que a molts de vosaltres també) que aquest moment, la fi de la meva tesi doctoral, hagi arribat. Ha estat una aventura plena d'alegries i tristeses, dificultats i superacions que m'han permès créixer professional i, sobretot, personalment. Però aquest somni no hauria estat possible sense tota la gent que m'he trobat, que m'han acompanyat i que m'han recolzat incondicionalment durant tot aquest llarg camí.

En primer lloc, voldria agrair a la Dra. Rosa Maria Araujo el haver-me donat l'oportunitat de poder realitzar la tesi doctoral al seu costat. Però sobretot voldria donar-te les gràcies per la infinita paciència que has tingut amb mi, per haver confiat en mi, per entendre'm, per escoltar-me, per respectar-me, per donar-me llibertat... Gràcies per les nostres converses sobre la vida i la família i per ajudar-me a créixer com a persona. Gràcies, moltes gràcies.

Agrair també als membres titulars del grup d'aigües, els anys d'experiències compartides. Joan Jofre, gràcies per la teva serenitat, ànims i consells. Francisco Lucena, gracias por tu manera de ver la vida y consejos. ¡Me has enseñado que no todos tenemos que verla igual!. Anicet Blanch, gràcies per la teva ajuda i amabilitat. Rosina, gràcies per la teva alegria i experiència.

No puc oblidar a la resta de titulars del departament de Microbiologia que sempre m'han mostrat la seva ajuda, col·laboració i amabilitat durant tots aquests anys.

El meu grup, tot i ser petit, ha estat sempre ple de gent molt interessant i fantàstica. Anna Puig, la meva primera gran professora en el laboratori. Moltes gràcies per haver-me ensenyat les bases de la microbiologia tan clara i correctament!. Sempre has estat un dels meus referents. Eli, no em puc oblidar de tu. Ets una treballadora incansable. Nuria Contreras,

silenciosa companya de laboratori però gran persona. Un plaer haver compartit experiències, resultats i aventures amb tu!. Sara, una gran companya i una gran professional. La teva alegria i optimisme van envair el laboratori. T'agraixo molt totes les estones que m'has dedicat a ajudar-me, les teves explicacions i la teva generositat. Et desitjo molta sort i estic segura que vagis on vagis, aconseguiràs el que volguis!. Alejandra, itoda una experiencia haber coincido contigo!. Silvia, no hem treballat juntes però m'hauria agradat. Ets pura alegria i optimisme!. Segueix així!.

Voldria recordar a tota la gent del departament amb qui he compartit tantes hores de la meva vida. Maite Muniesa, la meva altra gran professora a qui sempre he pogut demanar ajuda. Gràcies per estar-hi sempre, pels teus consells i experiència. Inolvidables les converses al despatx de la Rosario!. Laura Mocé, gràcies per ensenyar-me a "mimar" les cèl·lules dels tapets celulars. Quantes hores compartides a l'hora de dinar a la biblioteca de l'edifici vell xerrant sobre la vida!!. Ana Emilia, icuánta alegría y vitalidad nos transmitiste!. Ruth, per on pares ara?. Continua tant alegre com sempre!.

Als nois i noia del grup del Francisco. Javi Mendez, igracias por tu alegría y tu sonrisa permanente!. Tu asistencia informática y estadística no tienen precio. Andrey, iqué buenos que eran tus masajes para aliviar las contracturas de la espalda!. Jordi Dellunde, gràcies per les mostres d'aigües setmanals i per aquelles xerrades filosòfiques!. Michel, on ens trovarem la pròxima vegada??. Anna C, donava gust anar al teu lab. Sempre mostraves la teva cara més amable.

El gran grup dels Rosinots no té fi. Silvia B., sempre he admirat la teva tranquil·litat en el treballar. Meritxell, quantes confidències i històries compartides!!. Zaira, que grandes cenas compartidas!. Tu guacamole ya forma parte de mi recetario!. Idoia, amb tu vam aprendre a dir Zorionak!. Gonzalo, sempre amb un somriure. Sonia, gràcies per ensenyar-me la tècnica de la PCR i els seus secrets!. Néstor, alegre i sempre disposat a ajudar!. Ayalke, icuanto optimismo que tienes, no lo agotes nunca!. Pili, discreta però present. Molta sort en la teva etapa de professora!.

Als meus veïns del grup de l'Anicet. Yolanda, una gran veïna i millor amiga. Quantes hores juntes explicant-nos la vida!. Cristina G, discreta però una gran treballadora. Marta C, la senior del grup quan vaig entrar. Gràcies pels teus sensats consells. Albert, qui ens havia de dir que ens acabaríem trobant professionalment!.

Xavi Abad, gràcies per està sempre a punt per donar un cop de mà i aconsellar sobre alguna tècnica. Les coneixies totes!!. Toni Navarrete i Jordi Urmeneta, gràcies per ensenyar-me la tècnica de la microscopia de fluorescència.

Rosario i Susanna Calle, quins grans moments que hem passat juntes!. No es poden oblidar. Gràcies per haver-me ajudat en tants moments . Sempre disposades a donar un cop de mà i amb bona cara!. A tots els de la secretaria, Macu, Manolo, Susana, Bea, per la vostra disponibilitat i ajuda.

Gràcies també a la resta de companys del departament per estar disposats a col·laborar amb mi amb tot el que necessités i per tots els moments compartits!. Segur que em deixo algú però han estat tantes persones les que m'he trobat pel camí...

També m'agradaria agrair-li a la Dra. Rosa Bartolomé del Hospital de la Vall d'Hebró la cessió de les mostres clíniques usades en aquesta tesi. També vull mostrar el meu agraïment al Dr. Julià Gómez del hospital Clínic i Provincial de Barcelona per proporcionar-me la soca TIGR 26695 desinteressadament.

I would like to thank Dr. Torkel Wadstrom and Dr. Hans Olof Nilsson allowing me to make one-month stay in his laboratory in the University of Lund, in Sweden. It was an incredible experience for me and I learned and improved some techniques during my stay in his lab.

No voldria acabar sense agrair al meus pares la possibilitat d'haver pogut estudiar i haver-me recolzat en les decisions que vaig pendre. Papa, estiguis

on estiguis, per fi sóc doctora, tal com tu volies tot i que no metge!. Mama, encara que no tinguis molt clar que he estudiat durant la meva tesi, per fi ho he aconseguit!. Gràcies per ajudar-me a compaginar la finalització de la redacció de la tesi amb la Martina. Agrair a la meva germana i cunyat per no haver-me mai jutjat pel que estava fent tot i no acabar-se mai. Sergi i Isabel, els meus nebots, ara entendreu que feia. També volia agrair a la meva sogra i a la meva "àvia" el seu recolzament i ànims per continuar endavant i cuidar-me la Martina quan ho he necessitat.

Finalment i de manera molt especial, voldria donar les gràcies a la persona que més m'ha ajudat i recolzat durant tota la tesi. Xavi, t'estimo molt i sense tu no ho hauria aconseguit. Gràcies per la teva paciència durant tots aquests anys, pels caps de setmana de reclusió sense demanar res a canvi. Gràcies pels teus ànims incansables. Gràcies per estar amb mi sempre!. Hem superat moltes situacions i ens queden moltes coses per fer junts!. I gràcies a tu, Martina, per permetre'm acabar un somni.

<u>Agraïments</u>	5
<u>Contingut de la tesi</u>	9
<u>Capítol 1: Introducció general: L'espècie <i>Helicobacter pylori</i></u>	13
1. Aigua: relació entre transmissió i infecció.....	15
2. Descobriment i història d' <i>Helicobacter pylori</i>	16
3. Característiques biològiques d' <i>Helicobacter pylori</i>	20
3.1. Característiques fenotípiques. Morfologia.....	22
3.2. Metabolisme.....	24
3.3. Genoma.....	27
3.3.1. Variabilitat genòmica.....	27
4. Espècies del gènere <i>Helicobacter</i> i hostes.....	29
5. Relació <i>Helicobacter pylori</i> - ésser humà.....	31
5.1. Síndromes clínics.....	31
5.1.1. Gastritis i duodenitis.....	32
5.1.2. Úlcera pèptica.....	33
5.1.3. Carcinomes i altres patologies relacionades amb <i>H. Pylori</i>	34
5.2. Patogènia d' <i>H pylori</i>	36
5.2.1. Enzim ureasa.....	39
5.2.2. Hipergastremia.....	42
5.2.3. Proteïna VacA i CagA.....	42
5.3. Mètodes de diagnòstic d' <i>Helicobacter pylori</i> en mostres clíniques.....	45
5.3.1. Cultiu microbiològic.....	45
5.3.2. Tinció histològica.....	48
5.3.3. Test ràpid de la ureasa.....	49
5.3.4. Test de l'alè.....	49
5.3.5. PCR.....	50

5.3.6. ELISA i detecció antigènica.....	50
5.4. Tractament. Vacunes.....	51
6. Epidemiologia del microorganisme i de la seva infecció.....	54
6.1. Reservoiris d' <i>Helicobacter pylori</i>	55
6.2. Transmissió del patogen.....	56
7. Detecció d' <i>Helicobacter pylori</i> en medi ambient.....	60
7.1. Mètodes microbiològics.....	61
7.2. Microscopia.....	61
7.3. Autoradiografia.....	63
7.4. Separació immunomagnètica.....	63
7.5. ATP bioluminescent.....	64
7.6. Tècniques moleculars.....	64
7.6.1. FISH.....	65
7.6.2. PCR.....	65
8. <i>Helicobacter pylori</i> a Catalunya.....	68

Capítol 2: Detecció d'*Helicobacter pylori* en ambients aquàtics i femtes humanes

Introducció.....	72
Objectius.....	75
Materials i mètodes.....	77
1. Mostres d'aigua de font i de riu.....	78
2. Mostres d'aigua residual.....	78
3. Mostres de femtes humanes.....	78
4. Recol·lecció de les mostres d'aigua.....	79
4.1. Determinació dels indicadors fecals a les mostres d'aigua	79
5. Soques de referència d' <i>Helicobacter pylori</i>	79

6. Estudi d' <i>Helicobacter pylori</i> en mostres d'aigua i femtes.....	80
6.1. Selecció dels medis de cultiu d' <i>Helicobacter pylori</i>	80
6.2. Selecció del crioprotector.....	81
6.3. Detecció d'àcids nucleics en mostres de femta i aigua.....	82
6.3.1. Preparació de les mostres a analitzar.....	82
6.3.2. Extracció d'àcids nucleics dels concentrats bacterians d'aigua i de femtes.....	83
6.3.3. Elecció i optimització de la reacció d'amplificació enzimàtica del gen diana <i>ureA</i>	86
6.3.4. Optimització de la reacció d'amplificació enzimàtica del gen diana <i>16S rRNA</i>	89
6.3.5. Electroforesi i visualització dels amplicons.....	91
6.3.6. Seqüenciació de l'amplicó del gen <i>ureA</i> i del gen <i>16S rRNA</i>	91
6.3.6.1. Purificació de l'amplicó.....	91
6.3.6.2. PCR de seqüenciació.....	92
6.3.6.3. Lectura i anàlisi de les seqüències.....	94
6.4. Límit de detecció i especificitat de la reacció de PCR.....	94
Resultats.....	96
1. Elecció del medi de cultiu i crioprotector.....	97
2. Elecció dels iniciadors de la PCR.....	100
2.1. Iniciadors del gen <i>ureA</i>	100
2.2. Iniciadors del gen <i>16S rRNA</i>	101
3. Selecció del protocol d'extracció d'àcids nucleics.....	102
4. Sensibilitat i especificitat de la tècnica de la PCR.....	105

4.1. Modificacions dels paràmetres de la barreja d'amplificació pel gen <i>ureA</i>	105
4.2. Modificacions dels paràmetres de la barreja d'amplificació pel gen <i>16S rRNA</i>	109
4.3. Límit de detecció per al gen <i>ureA</i> i pel gen <i>16S rRNA</i>	110
4.4. Especificitat dels iniciadors.....	112
4.4.1. Iniciadors del gen <i>ureA</i>	112
4.4.2. Iniciadors del gen <i>16S rRNA</i>	112
5. Detecció del gen <i>ureA</i> d' <i>Helicobacter pylori</i> en femtes humanes..	114
6. Detecció del gen <i>ureA</i> d' <i>Helicobacter pylori</i> i del gen <i>16S rRNA</i> en aigües amb diferent grau de contaminació fecal.....	115
Discussió	120
Capítol 3: Supervivència d'<i>Helicobacter pylori</i> en aigua	127
Introducció	128
Objectius	133
Materials i mètodes	135
1. Preparació de microcosmos contaminats artificialment amb <i>Helicobacter pylori</i>	136
2. Comportament de les cèl·lules bacterianes d' <i>Helicobacter pylori</i> en aigua mineral.....	136
2.1. Cultiu d' <i>Helicobacter pylori</i>	137
2.2. Quantificació de cèl·lules totals per DAPI.....	137
2.3. Viabilitat bacteriana amb el kit LIVE/DEAD BacLight bacterial viability.....	138
2.4. Microscopia electrònica de rastreig.....	138
2.5. ADN genòmic: extracció i quantificació.....	139

2.6. Reacció de la PCR: gen <i>ureA</i>	140
Resultats	141
1. Comptatge i viabilitat celular.....	142
2. Transformació morfològica per ultramicroscopia.....	146
Discussió	149
<u>Capítol 4: Implicació dels sistemes dentals en la transmissió</u>	
<u>d'<i>Helicobacter pylori</i> en aigua</u>	154
Introducció	155
Objectius	158
Materials i mètodes	160
1. Preparació de mostres d'aigua de xeringa.....	161
2. Preparació de mostres de saliva.....	161
3. Detecció del gen <i>ureA</i> i del gen <i>16S rRNA</i>	162
3.1. Amplificació del gen <i>ureA</i> i del gen <i>16S rRNA</i>	162
3.2. Electroforesi i visualització.....	162
3.3. Seqüenciació.....	163
Resultats	164
1. Detecció i seqüenciació de les mostres.....	165
1.1. Mostres de saliva.....	165
1.2. Mostres d'aigües de xeringa dels sistemes dentals.....	169
Discussió	172
<u>Conclusions finals</u>	176
<u>Bibliografia</u>	180
<u>Anexos</u>	212

Capítol 1

Introducció

1. – AIGUA: RELACIÓ ENTRE TRANSMISSIÓ I INFECCIÓ

“L'accés a l'aigua potable és un dret i una necessitat fonamental per a tots els éssers humans. L'aigua contaminada compromet tant la salut física i social de la gent. És una ofensa a la dignitat humana”.

Kofi Annan, Ex-Secretari General de les Nacions Unides.

L'aigua és un recurs vital, limitat i cada cop més escàs. El desenvolupament humà i el creixement poblacional exerceixen tal pressió sobre els recursos hídrics que la seva qualitat i quantitat en resulten afectats.

Des del principi de la nostra història escrita, ja es reconeixia l'aigua com un potencial vehicle de transmissió de malalties. Durant l'imperi Romà, es va establir una connexió entre el subministrament d'aigua potable i la salut de la població. Però no va ser fins al segle XIX que es va demostrar la importància de l'aigua de beguda en la transmissió de patògens. L'any 1855, el doctor John Snow estudiant una epidèmia de còlera a Londres va considerar, per primera vegada, l'aigua com a vehicle de transmissió d'una malaltia. Tot i no conèixer en aquella època l'origen microbiològic de la malaltia, es va associar el consum d'aigua contaminada amb excrements de persones malaltes de còlera amb el seu contagi.

Amb l'abocament continuat de matèria fecal tant humana com animal amb patògens de tot tipus, l'aigua ha esdevingut la font d'infeccions més important. Per aquest motiu, la detecció i control dels patògens presents en els recursos hídrics és imprescindible. Com que la detecció de tots els patògens (bacteris, virus i protozous) presents en l'aigua és impossible, els esforços per controlar la qualitat de l'aigua es centren en la detecció d'organismes indicadors.

Però la relació entre alguns d'aquests patògens i l'aigua no es coneix suficientment. Especialment els que no es poden cultivar ni identificar fàcilment pels mètodes microbiològics tradicionals. És per això que en el darrers anys s'han aplicat les tècniques moleculars per detectar aquest tipus de microorganismes al medi ambient. I dins d'aquest grup es localitza el microorganisme objecte del nostre estudi, *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori ha estat objecte d'una important investigació des del seu descobriment per Warren i Marshall l'any 1982. Des d'un principi, va despertar l'interès de microbiòlegs i gastroenteròlegs i en el moment en que *H. Pylori* es va considerar un possible agent etiològic de malalties gàstriques, metges de família i altres especialistes com epidemiòlegs, patòlegs i oncòlegs també van interessar-se. Actualment, aquest microorganisme capta l'atenció de molts científics, arribant a superar en nombre de publicacions a gèneres tant coneguts com *Salmonella* i *Bacillus* durant el període 1997-2000 .

2.-DESCOBRIMENT I HISTÒRIA D'HELICOBACTER PYLORI

Els primers indicis documentats de l'existència de bacteris helicoïdals gàstrics s'atribueixen a Bizzozero, famós anatomista italià l'any 1893 (Bizzozero, 1893). Aquest científic va observar l'existència d'espироquetes que habitaven en les glàndules de la mucosa gàstrica de gossos. Actualment, aquests organismes s'han identificat com *Helicobacter canis*, *Helicobacter felis* (Lee i col., 1988) i *Helicobacter heilmanni* (Marshall i col., 1985).

L'any 1896 Salomon, deixeble de Bizzozero, va ser capaç de propagar aquests microorganismes espiril·lats en l'estómac de ratolins després d'alimentar-los amb mucosa gàstrica infectada de gos i de gat (Salomon, 1896) Aquest treball s'ha convertit en el precursor dels actuals estudis

sobre elaboració de vacunes i teràpies per a l'eradicació d'*Helicobacter* (Chen i col., 1995) on s'usen els ratolins infectats amb *H. felis* com a model.

A principis del segle XX, anatomistes i patòlegs van observar la presència de microorganismes espiril·lats en la mucosa gàstrica humana pròxima a regions afectades per carcinoma. Aquestes microorganismes identificats com espiroquetes, també van ser observades en mostres gàstriques de macacos per Doenges l'any 1939 (Doenges, 1939) i en humanes per Freedberg i Baron al 1940 (Freedberg i Baron., 1940). Aquests dos metges van generar una forta discussió en la comunitat científica al establir una relació entre l'ús de sals de metalls pesants (mercuri, arsènic i bismut) en el tractament de malalts de sífilis i la remissió completa de les úlceres pèptiques. Es calcula que en aquella mateixa època, aproximadament un 40% de la població dels Estats Units estava infectada pel que ara coneixem com *H. pylori*.

L'any 1954, la teoria de la presència d'espiroquetes en la mucosa gàstrica en humans defensada pels investigadors Doenges i Freedberg va ser rebatuda per Palmer. Aquest investigador no va trobar cap evidència de la presència d'aquest microorganisme en més de 1000 biòpsies. Tot i que el resultat seria, molt probablement, causat per problemes metodològics, aquest treball va ser un fre en l'estudi d'*Helicobacter* (Palmer., 1954). No obstant, quan a la dècada dels 60, es van començar a fer estudis anatòmics detallats de la mucosa gàstrica usant el microscopi electrònic, es van tornar a trobar bacteries espiril·lades. L'any 1967, Ito va publicar una excel·lent fotografia d'*Helicobacter pylori* en una cèl·lula parietal humana amb la seva típica morfologia espiral i varis flagels amb la seva beina (Ito., 1967). També es van poder fotografiar microorganismes del gènere *Helicobacter* en la mucosa de gossos i gats l'any 1970.

L'any 1975, Sterr i Colin-Jones (Sterr i Colin-Jones., 1975) van estudiar la presència del microorganisme en la mucosa gàstrica humana i els canvis que hi tenien lloc quan la úlcera gàstrica es tractava amb carbenoxolone, que era l'agent terapèutic propi de l'època. Malgrat la remissió de la úlcera no van apreciar canvis en la inflamació del teixit. I a

més, van trobar que una bactèria espiril·lada estava present en un 80% de les mostres d'úlceres gàstrica. Desafortunadament, no van poder cultivar cap d'aquests microorganismes, però van publicar excel·lents fotografies de la histologia de la mucosa gàstrica que mostraven tant *H. pylori* lliures dins de la capa de mucus com fagocitats per neutròfils.

Els estudis realitzats durant el període 1979-1984 van ser claus per determinar la importància sanitària d'*Helicobacter pylori*. L'any 1979, el Dr. Robin Warren, patòleg de l'hospital Royal Perth d'Austràlia, s'adonà de la presència d'un bacteri helicoïdal en les biòpsies de pacients que patien gastritis. Aquesta observació va ser rebuda amb escepticisme, ja que fins llavors anatomistes i patòlegs no consideraven l'origen bacterià de les malalties gàstriques i ignoraven la literatura referent a aquestes "espiroquetes". Però Warren va continuar el seu estudi confirmant que la infecció era comú entre la població i que estava associada amb un tipus concret de gastritis. L'any 1981, el Dr. Barry Marshall, gastroenteròleg del mateix hospital, va començar a treballar amb el Dr. Warren i junts va iniciar l'estudi del microorganisme. Van poder demostrar la presència de bacteris Gram negatius però no els van poder cultivar. Per confirmar la relació entre el bacteri i la inflamació gàstrica van iniciar un estudi per cultivar el microorganisme així com determinar la seva associació amb la gastritis i/o altres símptomes clínics. Van ser estudiats 100 pacients amb símptomes gàstrics, dels quals més d'un 65% estaven infectats amb la bactèria helicoïdal i, d'aquests tots ells patien gastritis. També era destacable que el 100% dels pacients amb úlceres duodenals se'ls hi va trobar el microorganisme i que en un 82% de pacients amb úlceres gàstriques també tenien el patògen. D'aquesta manera van confirmar l'associació entre la gastritis i el bacteri, proposada 2 anys abans per Warren. Al 1983, Warren i Marshall van fer públics els seus treballs que relacionaven la gastritis gàstrica amb la presència d'un microorganisme espiril·lat no identificat, publicant-ho a la revista *Lancet* amb el títol *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis* (Warren i Marshall., 1983).

Una altra gran fita en la història d' *Helicobacter pylori* va ser el seu cultiu. Els resultats havien estat negatius fins que cultius fets a partir d'una biòpsia gàstrica d'un pacient van deixar-se dins d'incubador durant les vacances de Setmana Santa de l'any 1982. Aleshores, els cultius de mostres gastrointestinals eren descartats a partir de les 48 hores per evitar creixement de biota acompanyant. En aquella ocasió, unes petites colònies com gotes d'aigua d'1 mm de diàmetre van aparèixer en les plaques de cultiu. Les bactèries que hi van créixer eren bacils Gram negatius helicoidals. Era el primer cop que *Helicobacter pylori* es podia cultivar a partir de mostres gàstriques. McNulty i Skirrow van ser els primers en cultivar fora d' Austràlia aquest patògen a partir d'una biòpsia gàstrica d'un pacient d'Anglaterra (McNulty i Watson., 1984). Aquestes troballes van despertar l'interès de gastroenteròlegs i ràpidament aquestes conclusions es van poder confirmar en altres països.

Des del seu descobriment, el nom d'aquest bacteri espiril·lat ha anat canviant a mesura que es coneixien moltes de les seves característiques. Els espirils aïllats de l'estómac humà van rebre el nom genèric de "Campylobacter" like organism (CLO). Posteriorment, Marshall el va batejar amb el nom de *Campylobacter pyloridis* l'any 1984 i, finalment, amb el de *Campylobacter pylori* (1987) (Marshall i col., 1984; Marshall i Goodwin, 1987). El seu percentatge en G+C, 34%, li incloïa dins del gènere *Campylobacter*. L'any 1989 va ser renombrat per Goodwin com a *Helicobacter pylori* i es va convertir en el primer membre del nou gènere *Helicobacter* (Goodwin i col., 1989). *Helicobacter pylori* significa "bacil helicoidal de la part baixa de l'estómac". La presència d'un únic conjunt de flagels amb beina, un únic patró d'àcids grassos i l'anàlisi de la seqüència gènica del gen 16Sr RNA va evidenciar una distància entre les bactèries del gènere *Campylobacter* i els del gènere *Helicobacter* suficientment elevada per a considerar-los dos gèneres independents.

D'acord amb la segona edició del *Taxonomic outline of the prokariotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (http://141.150.157.80/bergeysoutline/outline/bergeysoutline_5_2004.pdf, versió electrònica consultada el Gener de 2009), el gènere *Helicobacter*

pertany a la classe èpsilon de les proteobactèries. S'inclou dins de la família *Helicobacteraceae* juntament amb el gènere *Sulfurimonas*, *Thiovulum* i *Wolinella*. Fins l'any 2009, s'han descrit 23 espècies del gènere *Helicobacter*, classificades en espècies gàstriques i intestinals tant humanes com animals i 11 possibles espècies encara no acceptades com a tals. Molt propera a aquesta família es troba la família *Campylobacteraceae* a la qual pertanyen els gèneres *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Dehalospirillum* i *Sulfurospirillum*.

3.-CARACTERÍSTIQUES BIOLÒGIQUES D'*H. pylori*

3.1.-Característiques fenotípiques. Morfologia

Helicobacter pylori és un espiril. entre 1 i 3 girs, mòbil flagel·lat amb un nombre variable de flagells, entre 2 i 7 flagells unipolars, de distribució lofòtrica amb beina, Gram negatiu i microaeròfil. Mesura entre 0,5-1 µm d'amplada i entre 2,5-5 µm de longitud (Figura 1).



Figura 1: Fotografia electrònica de *Helicobacter pylori*. www.cab.unimelb.edu.au/images/helico.jpg

Quan es cultiva en medis sòlids, adopta una aparença més rectilínia, amb un grau menor de curvatura. Pot presentar flagels deficientes o inclús poden arribar a desaparèixer. D'altra banda, la morfologia d'*Helicobacter pylori* que s'observa en aïllats de biòpsies és la típica espiril·lada. El bacil és

la seva forma habitual, també pot trobar-se en forma de coc tot i que no està clar el motiu d'aquesta morfologia.

H. pylori s'identifica per posseir citocrom C en la seva cadena de transports d'electrons, l'enzim catalasa i ureasa en la seva membrana, l'enzim fosfatasa alcalina, leucina i arginina arilamidasa i DNAasa. Es capaç de reduir nitrats i produir sulfur d'hidrogen (H₂S) (Velazquez i Feirtag., 1999). Es incapaç d'hidrolitzar hipurat. Presenta resistència a l'àcid nalidíxic i és susceptible a la cefalotina i al metronidazole (Goodwin i col., 1989).

H. pylori té l'embolcall típic de les Gram negatives: membrana externa amb LPS i membrana interna amb una capa intermitja de peptidoglicà.

La composició de la membrana externa és única pel seu contingut proteic i estructura lipopolisacàridica. El peptidoglicà d'*Helicobacter pylori* difereix considerablement del d'*E. coli* (Costa i col., 1999). Conté una gran proporció de muropèptids. A més, les proteïnes encarregades de la incorporació del precursor del peptidoglicà en la capa de peptidoglicà, les PBPs ("penicillin-binding proteins"), són úniques per *H. pylori*. (Harris i col., 2000). El seu patró d'àcids grassos el diferencia del gènere *Campylobacter*, essent l'àcid gras més abundant l'àcid mirístic. Un altre tret diferencial és la presència de glucòsids de colesterol, lípid molt rar tant en animals com en bactèries.

L'embolcall cel·lular presenta la doble membrana típica dels Gram negatiu envoltada per un glicocàlix d'uns 40 nm de gruix. La membrana externa està separada de la interna per un periplasma de 30 nm. Varies proteïnes de l'embolcall cel·lular han estat descrites. Les més importants són la ureasa, la catalasa i la HspB, un homòleg de la proteïna GroEL de *Escherichia coli*. Són proteïnes citoplasmàtiques que s'uneixen a la superfície cel·lular en estadis avançats del creixement bacterià.

La composició d'àcids grassos varia segons la bactèria i té valor identificatiu a nivell quimiotaxonòmic. Les espècies del gènere *Helicobacter*

poden classificar-se segons el seu patró d'àcids grassos. *H. pylori* i la majoria de bacteris de colonització gàstrica, contenen un alt percentatge d'àcids grassos tetradecanoics (14:0) i nonedecanoics (19:0 cyc) i un baix percentatge d'octadecanoic (18:1). *H. pylori* és l'únic en posseir l'àcid 3-hidroxiocetadecanoic (3-OH-18:0).

El lipopolisacàrid (LPS) és un element essencial de la membrana externa. Tot i que en la majoria de bactèries el LPS és fortament antigènic, en *H. pylori* presenta una baixa activitat endotòxica i immunològica. Aquest comportament degut principalment a la composició de Lípid A del LPS seria el resultat d'una adaptació del microorganisme a la mucosa gàstrica, permetent a la bactèria prolongar la infecció durant més temps. Tot i la baixa capacitat immunològica del patogen, la seva colonització implica una inflamació de la mucosa de l'estómac. Les cadenes laterals dels LPS contenen antígens específics de cada soca d'*H. pylori*.

Un element molt important per a les cèl·lules d'*Helicobacter pylori* és la presència de flagels en el seu embolcall cel·lular. El floc de flagels permet a la bactèria penetrar dins la capa de mucus de l'epiteli gàstric per protegir-se del pH àcid del lumen de l'estómac. Cada flagel mesura aproximadament 3 µm de longitud. Té la típica estructura *bulb-like* en el seu extrem distal que representa una dilatació de la beina flagel·lar. La beina és una extensió de la membrana externa que té com a funció la protecció de l'estructura flagel·lar de l'atac àcid de l'estómac.

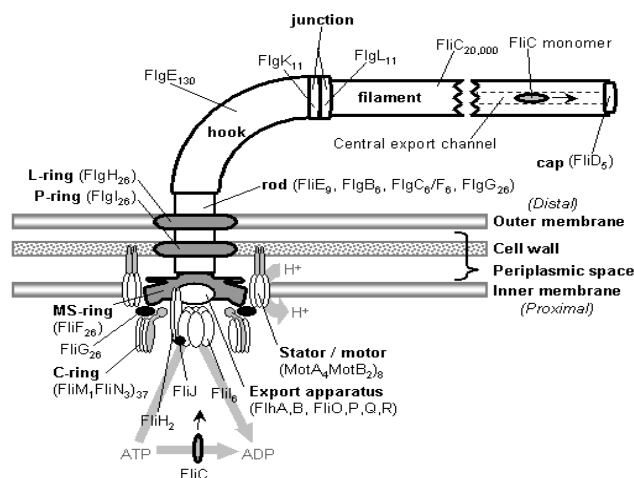


Figura 2: Esquema de l'estructura d'un flagel i les proteïnes implicades. www.talkdesign.org/faqs/img/fig2.gif

El flagel d'*H. pylori* està compost per 3 elements estructurals: el **cos basal** que està insertat en la paret cel·lular i que conté les proteïnes necessàries per la rotació i quimiotaxi; el **filament extern** helicoidal encarregat de propulsar la bactèria quan el cos basal rota; i el **ganxo** que uneix el cos basal amb el filament flagel·lar (Figura 2). Més de 50 proteïnes intervenen en l'expressió, secreció i assemblatge de l'aparell flagel·lar. Com a mínim, 20 d'aquestes proteïnes són components estructurals.

3.2- Metabolisme

Helicobacter pylori és un microorganisme microaeròfil. El seu genoma conté gens propis d'un microorganisme aeròbic que li permeten obtenir ATP per la via de la fosforilació oxidativa. En aquesta bactèria la cadena transportadora d'electrons és relativament simple i no gaire ramificada. La glucosa, l'àcid fòrmic, el lactat, el succinat, el piruvat i el malat poden ser usats per *H. pylori* com substrats en la fosforilació oxidativa. També es capaç d'oxidar hidrogen ja que posseeix en la seva membrana activitat hidrogenasa (Maier i col., 1996). El principal donador d'electrons en la cadena respiratòria d'*H. pylori* és NADPH, mentre que en la majoria de bactèries ho és el NADH. El complex citocrom C tipus bc1 (Nagata i col., 1996) que expressa *H. pylori* és molt important per la seva respiració aeròbica.

Malgrat tenir la fumarat reductasa, enzim que s'indueix a baixes concentracions d'oxigen i que és una via alternativa d'obtenció d'energia (ATP) (Mendz i Hazell., 1993), el bacteri no pot créixer en condicions anaeròbiques i necessita una concentració mínima d'oxigen (6%) per al seu cultiu. L'excés d'oxigen afecta negativament a enzims d'*H. pylori* molt sensibles a l'oxigen com ara algunes oxidoreductases. Tot aquests factors contribuirien al comportament microaeròfil d'*Helicobacter pylori*.

Per fer front als efectes tòxics dels oxidants resultants de la reducció d'electrons, *H. pylori* posseeix mecanismes de defensa per contrarestar l'estrès oxidatiu, com ara la superòxid dismutasa, la catalasa i l'alquilhidroperòxid reductasa que trobem en la seva membrana. També hi

ha proteïnes que limiten la formació d'oxidants i altres que reparen els danys que causen en el ADN.

H. pylori també requereix nivells elevats de diòxid de carboni per al seu creixement òptim. L'enzim acetil-coenzimA carboxilasa és el responsable de l'elevat nivell de CO₂ necessari pel creixement de *H. pylori*. (Dunn i col., 1997). És capaç de créixer en concentracions atmosfèriques d'oxigen sempre i quan el de CO₂ sigui superior al 10% v/v (Tuckwell i Chalk, 1993). Per això se'l considera un organisme capnòfil. En l'estómac, l'excreció contínua de bicarbonat per part de les cèl·lules epitelials que actua com a tampó protector de l'àcid gàstric i l'activitat de l'enzim ureasa creen les condicions òptimes de CO₂.

Helicobacter pylori disposa de dues fonts de nitrogen, els aminoàcids i la urea, en l'ambient gàstric on habita,. Aquest microorganisme és auxotròfic pels següents aminoàcids: arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, valina i, en algunes soques, alanina i serina.

El suc gàstric conté gran quantitat d'aminoàcids, pèptids i polipèptids procedents del trencament de les proteïnes per l'acció de la pepsina. Els aminoàcids poden actuar com a nutrients en absència de glucosa. El bacteri pot usar arginina, aspartat, asparagina, glutamina i serina com a substrat i ho transforma en acetat, àcid fòrmic, succinat, lactat com a principals productes metabòlics (Mendz i Hazell., 1995). Els aminoàcids són metabolitzats per la via fermentativa.

La urea és un element nitrogenat necessari per la síntesis d'aminoàcids. A més, *H. pylori* ha de tenir constantment disponibilitat d'urea per a la seva supervivència en l'ambient. Hi han autors que consideren que aquest microorganisme incorpora urea a través d'una proteïna transportadora anomenada UreI (Weeks i col., 2000) i d'un sistema de transport altament afí per a la molècula (Mendz i col., 1995).

Com en molts bacteris, el principal donador de nitrogen és l'amoni. En l'assimilació del nitrogen intervenen 2 enzims: la glutamina sintasa (GS-asa) i la glutamat dehidrogenasa (GDH-asa) activa en condicions

energètiques baixes. En canvi, *H. pylori* no codifica per la glutamat sintasa (GOGAT-asa), molt activa en concentracions baixes d'amoni, fet que suggereix que només sintetitza l'enzim necessari per a l'assimilació del nitrogen a elevades concentracions d'amoni (Figura 3). D'aquesta manera, aquest bacteri està molt adaptat al seu particular nínxol ecològic.

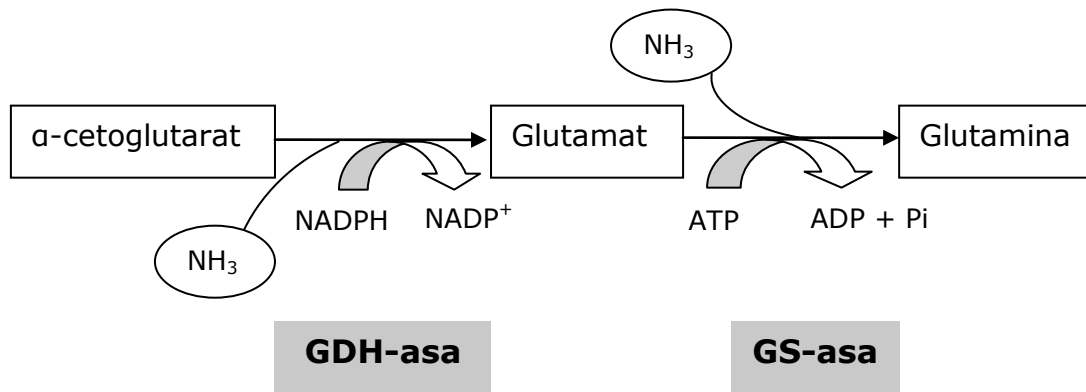


Figura 3. Via d'assimilació del nitrogen en *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori té el cicle de l'àcid cítric (Cicle de Krebs) incomplet per la manca de 2 enzims bàsics, la succinil-CoA sintetasa (SCS) i la malat dehidrogenasa.

Com la majoria de bacteris i plantes, *H. pylori* segueix la via de síntesi d'àcids grassos dissociats o de tipus II i usa la β-oxidació per catabolitzar lípids. En aquest procés intervenen 5 enzims on el pas inicial està catalitzat per l'acetil CoA sintetasa. L'activitat lipolítica i l'activitat fosfolipasa A i C s'expressen en diferents espècies d'*Helicobacter*.

3.3.-Genoma

El genoma de *H. pylori* va ser el primer genoma bacterià seqüenciat. La primera soca d'*H. pylori* que es va seqüenciar va ser *H. pylori* J9 que va aïllar-se l'any 1994 a partir d'un pacient del Estats Units amb úlcera duodenal i va ser el resultat de la col·laboració entre Astra Zeneca PLC i Genome Therapeutics Corporation (Alm i col., 1999). No obstant, la primera seqüència que es va publicar va ser la d' *H. pylori* 26695

(anomenat també com TIGR26695), duta a terme per *The Institute for Genomic Research* l'any 1997 (Tomb i col., 1997; Eaton i col., 1989) a partir d'un aïllament d'un pacient del Regne Unit amb gastritis.

El genoma presenta un únic cromosoma circular amb una mida que oscil·la entre 1,6 i 1,73 Mb (Beji i col., 1988). El percentatge de (G+C) varia entre 34-39 %.

El genoma d'*Helicobacter pylori* conté entre 1500 i 1600 pautes de lectura obertes (PLO), segons la soca. Un 70% de les proteïnes codificades per aquestes PLO tenen un punt isoelèctric teòric superior a 7,0. Aquest és bastant elevat en comparació amb altres microorganismes. Aquest fenomen es relacionaria amb l'adaptació d'aquest patògen a l'acidesa de l'estómac. A més a més, les PLO específiques de cada soca es localitzen bàsicament en les zones anomenades de plasticitat. El genoma de *H. pylori* J99 conté 89 PLO, 28 menys de les que conté *H. pylori* 26695 (Alm i col., 1999) (Taula 1).

També és destacable el baix nombre de gens relacionats amb el metabolisme, fet que explicaria els alts requeriments nutricionals del microorganisme.

Contenen dos còpies del "loci" 16S i del "loci" 23S-5S rRNA en la mateixa posició relativa (Taylor i col., 1992). Contràriament a l'organització observada en la majoria d'organismes amb el genoma seqüenciat, el loci 23S-5S i el loci 16Sr RNA no es troben continus ni en *H. pylori* 26695 ni en *H. pylori* J99.

En aquests microorganismes s'ha identificat dos seqüències d'inserció diferents: *IS605* i *IS606*. La soca 26695 d'*H. pylori* conté 5 còpies completes de la regió *IS605*, 3 de les quals es situen en regions concretes del cromosoma anomenades zones de plasticitat hipervariable. En canvi, totes dues soques contenen còpies completes de l'element *IS606* amb diferent localització dins del genoma.

Taula 1. Comparativa entre genomes de dues soques d'*Helicobacter pylori* seqüenciats

Característica	J99	26695
Mida (parells de bases)	1643831	1667867
(G+C)%	39	39
Regions diferent (G+C) %	9	8
Genotip vacA	S1b/m1	S1a/m1
PLO		
% de genoma codificant	90,8	91,0
Nº de gens	1496	1590
Nº de gens funcionals	877	899
Nº de gens específics <i>H. pylori</i>	258	279
Nº de gens únics de cada soca	89	117
Seqüències d'inserció (IS)		
Nº de còpies completes <i>IS605</i>	0	5
Nº de còpies completes <i>IS606</i>	1	2
Elements ARN		
% del genoma	0,75	0,75
23S-5S rRNA	2	2
16S rRNA	2	2
tRNAs	36	36

3.3.1.- Variabilitat genòmica

La seqüenciació de dos soques molt conservades, soca 26695 corresponent a pacient del Regne Unit i soca J99 pertanyent a pacient dels EEUU, va permetre comparar i entendre millor la diversitat genètica d'*H. pylori* malgrat que aquestes dues no representen la totalitat de les soques circulants per la població mundial. La variabilitat en les soques d'*Helicobacter pylori* és tan alta que és inclús difícil que dos aïllats clínics procedents d'un pacient tinguin el mateix patró genòmic (Taylor i col., 1992).

Aquesta elevada diversitat gènica és característica d' *Helicobacter pylori*. Variacions en l'ordre dels gens, gens en mosaic, diversitat en la seqüenciació en gens conservats, diferències en el contingut genètic de soques són les causants d'aquesta diversitat.

Els primers indicis de variabilitat genètica s'evidencien al seqüenciar alguns dels seus gens. La seqüenciació de varis gens (*cagA*, *vacA*, *flaA*...) han demostrat que la diversitat nucleotídica de gens ortòlegs entre diferents soques de *H. pylori* és elevada i que és molt poc probable trobar dos gens ortòlegs amb la mateixa seqüència. (Suerbaum i col., 1998; Go i col., 1996). La seva freqüència de canvi de nucleòtids sinònims (Ds) és més elevada que la de moltes altres espècies (Suerbaum i col., 1998).

Comparant dos genomes d'*H. pylori* s'aprecia que un 7% dels gens són específics de cada soca. A més, l'anàlisi de gens associats a la virulència del microorganisme com ara *cagA*, *vacA* mostra diferències genètiques entre soques de diferent origen geogràfic. Per exemple, només un 40-60% de les soques de Llatinoamèrica, Europa de l'Oest i Estat Units són *cagA+*. En canvi, quasi tots els habitants de l'Àsia de l'Est, independentment del seu estat de salut, són portadors de soques *cagA+* (Blaser., 1999). També s'ha observat una divisió geogràfica en el gen *vacA*. Més de la meitat de les soques d'Estats Units i Europa contenen la variant al·lèlica toxigènica de *vacA*, *vacAs1*, i la variant no toxigènica, *vacAs2*, mentre que quasi totes les soques d'Àsia són *vacAs1* (Mukhopadhyay i col., 2000). Aquesta biodiversitat geogràfica del genotips d'*H. pylori* ha demostrat ser una bona eina per investigar la història de les migracions humanes (Linz i col., 2007; Achtman i col., 1999).

La causa de tota aquesta variació genòmica és la reorganització a nivell de genoma que té lloc en les soques de *H. pylori* (Taylor i col., 1992). La variabilitat genètica actuarà com un mecanisme adaptatiu quan el patògen infecta un nou hoste. Aquesta variació s'afavoriria durant una infecció mixta o en el mateix medi ambient (Kersulyte i col., 1999).

En *H. pylori* disposa de 2 principals mecanismes que permeten el intercanvi horitzontal de gens: la transformació natural amb la implicació de plàsmids i la conjugació a través de pillis conjugatius (Kleanthous i col., 1991; Schröder i Lanka., 2005).

4.- ESPÈCIES DEL GÈNERE *HELICOBACTER* I HOSTES.

Des de que *Helicobacter pylori* va ser cultivat a partir d'una biòpsia gàstrica humana per primer cop l'any 1982, s'han descrit moltes espècies del gènere *Helicobacter* que es troben colonitzant les mucoses tant humanes com animals. S'agrupen en espècies gàstriques, localitzades en la mucosa de l'estómac, i espècies enterohepàtiques, localitzades en el tracte intestinal i en el fetge (Taula 2 i 3) (Gueneau i Loiseaux-De Goër., 2002) Les espècies gàstriques del gènere *Helicobacter* estan àmpliament distribuïdes entre els mamífers mentre que les espècies enterohepàtiques d'*Helicobacter* formen un grup divers. S'han aïllat en el tracte intestinal i en el fetge d'humans, d'altres mamífers i també en ocells. Les característiques fisiològiques i ultraestructurals d'aquestes espècies són molt similars a la d'*H. pylori* tot i que hi ha alguns trets que permeten diferenciar-les com ara l'activitat ureasa i catalasa, la temperatura de creixement o el nombre de flagels.

Tot i que l'hoste habitual d'algunes espècies del gènere *Helicobacter* no és l'home, algunes d'elles s'han aïllat en éssers humans i, per tant, podrien considerar zoonosi. *H. canadensis* s'ha aïllat en pacients amb enteritis, *H. fennelliae* en pacients immunosuprimits, *H. canis* i *H. pullorum* en humans amb gastroenteritis i *H. rapinni* en individus amb diarrea. Espècies gàstriques com *H. heilmannii*, *H. felis* i *H. bizzoreronni* també poden colonitzar l'estómac d'humans (Moblely i col., 2001).

Taula 2. Espècies gàstriques del Gen. *Helicobacter*, característiques fenotípiques i hoste

Espècie	Catalasa	Ureasa	Hoste
<i>Helicobacter pylori</i>	+	+	Humans i primats
" <i>Candidatus H. heilmannii</i> "*	+	+	Gat, gos, porcs, humans, primats
<i>H. felis</i>	+	+	Gat, gos, guepard
<i>H. nemestrinae</i>	+	+	Macaco
<i>H. salomonis</i>	+	+	Gos
<i>H. bizzozeronii</i>	+	+	Gos, humans
" <i>H. suncus</i> "	+	+	Musaranya
" <i>Candidatus H. bovis</i> "	+	+	Bestiar boví
<i>H. acinonychis</i>	+	+	Guepards
<i>H. mustelae</i>	+	+	Fura
" <i>Candidatus H. suis</i> "	+	+	Porc, homes, primats no humans
" <i>H. cetorum</i> "	+	+	Dofins, balena

*"" nom d'espècie proposat però no acceptat

Taula 3. Espècies enterohepàtiques del Gen. *Helicobacter* característiques fenotípiques i hoste

Espècie	Catalasa	Ureasa	Hoste
<i>H. hepaticus</i>	+	+	Rata
<i>H. cinaedi</i>	+	-	Gos, gat, hámster, home
<i>H. fennelliae</i>	+	-	Home
<i>H. canis</i>	-	-	Gos, gat, home
<i>H. pametensis</i>	+	-	Ocells, mamífers, home
<i>H. pullorum</i>	+	-	Ocells, mamífers, home
<i>H. canadensis</i>	+	-	Ocells, humans
<i>H. rodentium</i>	+	-	Rata

Espècie	Catalasa	Ureasa	Hoste
<i>H. typhlonius</i>	+	-	Rata
<i>H. cholecystus</i>	+	-	Hàmster
<i>H. mesocricetorum</i>	+	-	Hàmster
<i>H. muridarum</i>	+	+	Rosegadors
" <i>H. (Flexispira) rappini</i> "	-	+	Gos, ovella, home
<i>H. bilis</i>	+	+	Rata, gos, gat, home, porc, ovella, hámster
<i>H. trogontum</i>	+	+	Rata, porc, ovins
<i>H. aurati</i>	+	+	Hàmster
" <i>H. winghamensis</i> "	-	-	Home
<i>H. ganmani</i>	-	-	Rata, home
" <i>H. muricola</i> "	+	+	Rata
" <i>H. marmotae</i> "	+	+	Marmota
" <i>H. coliferis</i> "	?	?	Gat
" <i>H. mastomyricus</i> "	+	+	Rata africana

*"Nom" proposat però no acceptat
? Sense determinar

5.- RELACIÓ *HELICOBACTER PYLORI* - ÉSSER HUMÀ

5.1.-Síndromes clínics

Fins a finals del segle XX, la úlcera gàstrica es considerava una malaltia crònica, induïda per l'estrès, per hàbits alimentaris incorrectes i per una hiperproducció d'àcids gàstrics. No existia un tractament efectiu i només s'aplicaven tractaments pal·liatius. En casos extrems, es recorria a l'extirpació quirúrgica de la zona ulcerada. Però des de l'aïllament d'*H. pylori* en teixit gàstric, s'ha relacionat la seva presència amb la úlcera pèptica.

Actualment, es considera que *H. pylori* és el responsable del 100% de les gastritis antrals cròniques tipus B, de les quals un 15% evoluciona a

úlceres gàstrica, i de la gastritis atròfica. Causa aproximadament entre un 67-80% de les úlceres gàstriques i més d'un 90% de les úlceres duodenals. La resta d'úlceres està causada per factors etiològics com ara el síndrome Zollinger-Ellisson i l'ús d'antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) (Sonnenberg i Townsend., 1991),

Des de 1994, l'agència internacional d'investigació sobre el càncer (IARC) considera *Helicobacter pylori* com agent cancerigen de tipus 1, relacionant-lo amb el 85% d'adenocarcinomes gàstrics i amb el 90% de limfomes de MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) variant de l'anomenat limfoma gàstric de cèl·lules B no-Hongkins (www.who.int pàgina web consultada el Juny 2010; Parsonnet i col., 1994, Anonymous., 1994)

5.1.1.- Gastritis i duodenitis

Tot i que *H. pylori* està implicat en nombroses malalties del tracte gastrointestinal, molts autors el consideren un membre habitual de la microbiota humana (Blaser., 1998). La meitat de la població mundial està infectada pel microorganisme però la majoria no presenta simptomatologia tot i ser un infecció crònica que en molt casos causa gastritis.

L'origen de la gastritis té lloc quan el microorganisme ingerit penetra a través de la capa mucosa i es multiplica en la superfície de les cèl·lules epitelials de l'estómac. Aleshores, es produeixen canvis degeneratius en aquestes cèl·lules, com ara disminució de la secreció de mucina i l'exfoliació cel·lular. La bactèria allibera varies substàncies que estimulen la resposta immunològica local amb un increment de la IgA. La resposta inflamatòria va acompanyada d'hipoclorhídria i de manca de secreció d'àcid ascòrbic al suc gàstric (Sobala i col., 1993). Durant la fase aguda de la gastritis, té lloc la infiltració de cèl·lules inflamatòries mononuclears, de neutròfils tipus B en l'epiteli i es produeix un edema en la làmina pròpia. En aquest punt, és freqüent observar la invasió de les cèl·lules epitelials per *H. pylori*.

Però aquesta fase és de curta duració. En pocs casos el microorganisme s'elimina espontàniament i quan això succeeix, es produeix majoritàriament en nens. Però en la majoria d'individus, la resposta immunitària, incapaç d'eradicar la infecció, és amplificada i es produeix una acumulació gradual de cèl·lules inflamatòries que alliberen gran quantitat de mediadors químics com ara citoquines, radicals lliures d'oxigen i les proteïnes del sistema del complement que perpetuen la inflamació. La gastritis aguda deriva en una activa gastritis crònica tipus B que afecta bàsicament a la zona antral de l'estómac. A més, és característic de les gastritis cròniques causades per *H. pylori* la formació de fol·licles limfoides, que persisteixen per la contínua estimulació antigènica (IgA).

L'any 1985 Marshall i el seu equip van ser els primers en suggerir que *H. pylori* era també el responsable de la colonització de la mucosa del duodè i que provocava una inflamació crònica anomenada duodenitis (Marshall i col., 1985). El microorganisme és més difícil de reconèixer en biòpsies duodenals que en gàstriques ja que és escàs i adopta la forma coccal.

5.1.2.- Úlcera pèptica

L'úlcera pèptica es caracteritza per una pèrdua de substància localitzada de la mucosa gastrointestinal fins la capa muscular de la mucosa (*muscularis mucosae*) i pot afectar a la resta de les túniques de la paret gàstrica. Uns nivells alts d'àcids a l'estómac afavoreixen la seva formació. Té forma rodona o oval, de dimensions variables i no sempre és única. És una malaltia multifactorial, on factors familiars, psicològics, hormonals, fisiològics, ingesta d'AINEs i, sobretot, la presència d'*Helicobacter pylori* són determinants per a la seva aparició.

Principalment, es diferencien dos tipus d'úlceres pèptiques segons la seva localització: la úlcera gàstrica i la úlcera duodenal. La úlcera duodenal és més freqüent que la gàstrica. El símptoma més comú de la úlcera és el dolor epigàstric quan l'estómac està buit, de duració variable (de minuts a hores), alleugerint-se amb la ingesta d'aliments i antiàcids.

La úlcera gàstrica es localitza a la zona del antre i del càrdies amb atrofia hística. La ulcerogènesi causada per *H. pylori* s'inicia amb gastritis, fenomen que afavoreix la proliferació compensatòria de cèl·lules immadures que ocupen la superfície. La producció de la mucina i bicarbonat s'altera i la integritat de la barrera gàstrica resulta afectada. La inflamació continuada de la mucosa gàstrica produeix una atrofia del teixit glandular que és substituït per teixit fibrós i un canvi en el fenotip de l'epiteli gàstric per un fenotip d'epiteli intestinal, anomenat metaplàsia intestinal.

La úlcera duodenal apareix per la coexistència de metaplàsia gàstrica i duodenitis crònica activa. La hipersecreció d'àcid gàstric pròpia de la úlcera afecta també a la regió del duodè. Aquest estrès provoca la presència de cèl·lules secretores de mucosa amb fenotip gàstric sobre l'epiteli del duodè. Aquest canvi cel·lular, metaplàsia gàstrica, possiblement es produeix com resposta adaptativa a la inflamació causada per l'ambient àcid.

5.1.3.- Carcinomes i altres patologies relacionades amb *H. pylori*

La primera correlació entre *Helicobacter pylori* i el càncer gàstric es va publicar l'any 1991 (Decavarren-Arce i col., 1991). La presència d'*H. pylori* s'associa bàsicament amb dos tipus de càncers: càncer gàstric i limfoma de MALT. Encara que aquestes neoplàsies són infreqüents en nens, l'adquisició de la bactèria durant la infància seria un factor de risc crític per al seu desenvolupament.

El càncer gàstric és un dels tipus de càncer més freqüent en el món, tot i que la seva incidència i mortalitat ha disminuït en les últimes dècades (Parkin i col., 1988). Difícilment es desenvolupa abans dels 40 anys.

La infecció per *H. pylori* incrementa sis cops el risc de patir càncer d'estómac en comparació amb població sense infecció (Harris i col., 1999). L'associació d'*Helicobacter pylori* amb el càncer gàstric (70%-90%) s'explicaria per dos possible mecanismes: un seria que *H. pylori* promouria ell mateix la carcinogènesi i l'altre es basaria en l'establiment d'un ambient

carcinogen degut a la infecció crònica del microorganisme. Varis factors estan implicats en l'aparició de càncer gàstric com ara la metaplàsia intestinal, les proteases, els metabòlits actius d'oxigen, la disminució de la vitamina C i la presència d'amoni.

La OMS (Organització Mundial de la Salut) defensa que la combinació de varis factors com l'alimentació (elevat consum de sal, ingesta prolongada de nitrats i fumats) i l'ambient (tabac) també estarien implicats en aquest tipus de càncer així com factors genètics tant de l'hoste com del bacteri.

Al voltant d'un 90% de limfomes de MALT s'associen a *Helicobacter pylori* (Isaacson., 1992). L'adquisició i estimulació de teixit limfoide associat a mucosa durant la gastritis crònica és la base per al desenvolupament del limfoma de MALT.

Aquests tipus de càncers gàstrics són limfomes primaris monoclonals de cèl·lules B (T-dependent) on *H. pylori* actua d'estímul antigènic amb receptors específics a la cèl·lula epitelial que seria el desencadenant del procés tumoral.

La infecció per *H. pylori* s'ha associat, a més de les ja comentades, amb una ampla varietat de patologies com ara malalties coronàries, gastropaties amb pèrdua de proteïnes, infeccions entèriques recurrents, malalties periodontals, mals de cap, rosàcia, al·lèrgia a aliments, alteracions de la tiroides, retràs en el creixement en nens (Mendall i col., 1994; Parsonnet i col., 1994; Patel i col., 1994; Howden i col., 1996).

D'altre banda, dades epidemiològiques i mèdiques recolzen que la presència del patogen i, en particular la de soques *cag*⁺, actuaria com agent protector enfront de la malaltia del reflux gastroesofàgic (GERD) i adenocarcinoma d'esòfag i gàstric. El reflux gastroesofàgic es poc comú en països on la majoria d'adults estant colonitzats per *H. pylori cagA*⁺ (Kang i col., 1993). En canvi, la seva incidència incrementa en països on la prevalença del microorganisme disminueix (Parsonnet., 1995). S'ha apreciat que pacients amb úlcera duodenal causada per soques *cagA*⁺ ,tenen el

doble de probabilitats de desenvolupar reflux esofàgic si el microorganisme ha estat eliminat amb tractament amb antibiòtics (Van Doorn i col., 1998).

5.2.-Patogènia d' *H. pylori*

Es considera que la meitat de la població mundial està infectada per *H. pylori*, però només un baix percentatge desenvolupa patologies gàstriques greus. El genotip bacterià, la fisiologia i el genotip de l'hoste juntament amb els hàbits alimentaris poden influenciar en la colonització i patogènesi del microorganisme (Taula 4).

Taula 4. Factors de l'hoste relacionats amb la colonització per *H. pylori*

Factors que afavoreixen la colonització	Factors que inhibeixen la colonització
Dieta alta en sal	Lactobacillus
Nivells baixos d'antioxidants	Vitamina C
Embaràs	Ètnia (malaia, europea)
Ètnia (xinesa, índia, polinesia)	Resposta Th2
Resposta Th1	Moc gàstric
Gastrina	Inhibidors de la ureasa
Ureasa	
Motilitat/quimiotaxis	
Fosfolipasa	

En els darrers anys, la recerca de factors de virulència causants de la ulceració s'han intensificat. S'han descrit mecanismes pels quals *H. pylori* colonitza la mucosa de l'estómac i s'hi adhereix, modifica la fisiologia gàstrica i altera els mecanismes de defensa de l'hoste. D'acord amb aquest procés es distingeixen factors de manteniment o colonització (Taula 5) i factors de virulència (Taula 6) pròpiament dits.

Taula 5. Mecanismes i factors de colonització d'*Helicobacter pylori* a l'estomac

- **Motilitat**
 - Flagel
 - Forma espiril·lada
- **Enzims i proteïnes**
 - Ureasa
 - Catalasa
 - Superòxid dismutasa
 - Proteïnes de xoc tèrmic
 - ATPasa
 - Sideròfors
- **Adhesines**
- **Evasió immunitària**
 - Supressió de la resposta immune
 - Resistència atac de leucòcits
 - Mimetisme molecular

A continuació i d'acord amb la literatura destacarem, de tots aquests factors, els que es consideren els més importants com ara: el flagel, la motilitat, les adhesines i el mimetisme molecular.

El procés infecció s'inicia amb la colonització de la mucosa gàstrica. El microorganisme s'ajuda dels flagels i de la seva morfologia corbada per penetrar i mantenir-se dins la capa de moc (Goodwin i col., 1990). El baix pH al lumen de l'estómac i la constant secreció de la mucosa obliguen a la bactèria a desplaçar-se cap a la capa de les cèl·lules epitelials, evitant d'aquesta manera el rentat pel flux de moc cap al duodè o la seva mort per l'elevada acidesa de l'estómac. El moviment dels espirils és degut a un procés de quimiotaxi. Varis aminoàcids, la urea, els ions bicarbonat i sodi actuen com atraients químics.

Un cop el bacteri ha penetrat a la mucosa, proteïnes com les adhesines permeten que es mantingui en l'epiteli. *H. pylori* n'expressa d'específiques que reconeixen receptors de l'epiteli gàstric. Entre les

adhesines més importants destaquem la HpaA i la BabA. L'adhesina HpaA s'uneix a àcid siàlic de les cèl·lules epitelials de l'estómac. La adhesina BabA2 reconeix i s'uneix a l'antigen Lewis b del grup sanguini humà, que es troba també en les cèl·lules de la mucosa, permetent al bacteri resistir els moviments peristàltics de l'estómac (Lingwood i col., 1993). La presència de la proteïna BabA2 es correlaciona amb la úlcera duodenal i adenocarcinoma.

A més, aquest patogen ha desenvolupat la capacitat d'escapar de la resposta immune amb el fenomen del mimetisme molecular. Pot expressar antígens de Lewis, Le^x, Le^y, Le^a i Le^b, en el seu lipopolisacàrid iguals als que trobem en la superfície de les cèl·lules epitelials i dels eritròcits humans. Per analogia amb els antígens dels grups sanguinis A, B i 0, un hoste que expressi l'antigen Le^x formaria anticossos contra Le^y i no contra Le^x. D'aquesta manera, una soca *Helicobacter pylori* positiva per Le^x que infecta un hoste Le^x escaparia de l'atac del sistema immunitari i persistiria en el hoste mentre que una soca Le^y positiva seria eradicada pels anticossos contra Le^y creats per l'hoste. Les soques *cagA*+ tenen una major expressió d'aquest antigen que les *cagA*- (Wirth i col., 1997).

Alguns dels factors esmentats fins ara també es consideren factors de virulència, propis d'*Helicobacter pylori* (Taula 6).

Taula 6: Mecanismes i factors de virulència d'*Helicobacter pylori*

- **Inducció de la inflamació gàstrica**
 - Secreció interleukina-8 (IL-8)
 - Adherència de neutròfils a cèl·lules endotelials
 - Factor d'activació plaquetària (PAF)
 - Lipopolisacàrid
 - Ureasa

- **Alteració de la homeòstasi gàstrica**
 - Disminució d'alliberació somatostatina
 - Hipergastrinemia

- **Disrupció de la mucosa gàstrica**

- Fosfolipasa
- Mucinoso
- Radicals lliures d'oxigen
- Inducció de l'òxid nítric sintasa
- Inducció d'apoptosi
- VacA i CagA

D'aquests ens centrarem en el paper de la ureasa en la inducció de la inflamació del epitel·li gàstric, el de la hipergastrinèmia en la alteració de la homeòstasi gàstrica i, finalment, el de les proteïnes VacA i CagA en la disrupció de la mucosa gàstrica.

5.2.1.- Enzim ureasa

Un dels factors de virulència més destacats en la inflamació de la mucosa gàstrica i per la supervivència d'*H. pylori in vivo* és l'enzim ureasa (Blaser i col., 1992). La ureasa (ureaamidohidrolasa) no és un enzim exclusiu del gènere *Helicobacter* si no que també es troba present en espècies bacterianes molt diverses, com ara *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella...* Aquest enzim s'usa en la identificació taxonòmica del gènere, per al diagnòstic i pel seguiment posterior de la infecció. La seva funció principal en *Helicobacter pylori* és neutralitzar el pH àcid de l'estómac per afavorir la supervivència del bacteri. També contribueix al dany epitel·li amb la activació de fagòcits i producció de citoquines inflamatòries perquè és fortament immunogènica.

La ureasa és un metal·loenzim d'elevat pes molecular amb varies subunitats. Sembla que totes les ureases de les diferents espècies bacterianes estan estretament relacionades i tenen mecanismes de catàlisi similars. Aquest enzim que *H. pylori* sintetitza amb gran quantitat (10-15% de proteïna total) té un pes de 550 KDa amb 2 subunitats: UreaA (26,5 KDa) i la UreB (61KDa). Els gens que codifiquen per la ureasa de *H. pylori*

està localitzats en un únic grup de gens de 6,13 Kb. Són necessaris 7 gens continus i transcrits en la mateixa direcció per sintetitzar l'enzim actiu. Els tres primers gens del grup són estructurals i la resta són gens accessoris (Figura 4).

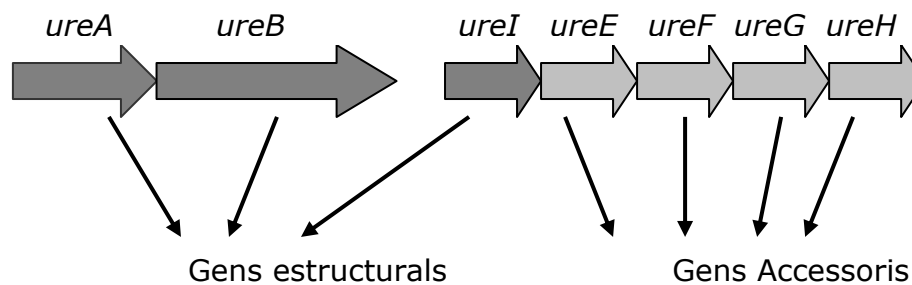


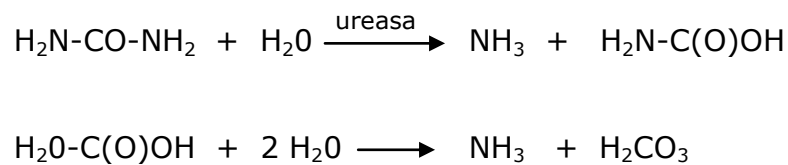
Figura 4. Gens implicats en la síntesi de la ureasa activa

Tots aquests excepte *ureI* comparteixen part de la seva seqüència amb els gens de ureases d'altres gèneres com ara *Bacillus* sp TB-90, *K. aerogenes*, *P. mirabilis* i *Yersinia* enterocolítica. La subunitat A d' *H. pylori* es caracteritza per ser sintetitzada únicament per un únic gen *ureA*, a diferència de la de totes les altres espècies que codifiquen UreA amb 2 gens separats. L'assemblatge de l'apoenzim és suficient amb l'expressió de *ureA* i *ureB* i de les proteïnes accessòries a les subunitats estructurals. La unió d'ions níquel és necessària per a l'activació catalítica de la ureasa. *H. pylori* importa aquest ió de l'exterior amb l'ajut d'una proteïna citoplasmàtica unida a la membrana anomenada NixA (Mobley i col., 1995). També col·laboren en l'aport extra de níquel, proteïnes addicionals amb propietats per unir-se a metalls en general: la proteïna Hpn, la proteïna CadA i la proteïna HspA.

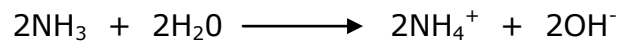
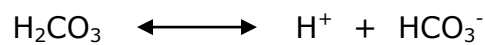
A diferència d'altres espècies bacterianes que usen el pH, els nivells de nitrogen i de ferro o la inducció per urea per controlar l'expressió de la ureasa, *H. pylori* controla l'expressió constitutiva d'aquest enzim per una degradació selectiva del seu mRNA. A més a més, altres gens també estarien implicats en la modulació de l'expressió del gen ureasa, com ara les DNA helicases o el *flbA* (McGee i col., 1999).

Totes les ureases comparteixen un ancestre comú. S'ha de tenir en compte que aquest enzim malgrat està compost per múltiples còpies de 1 subunitat (el fesol), 2 subunitats (tots els *Helicobacters*) ó 3 subunitats (totes les altres espècies) diferents, la seqüència aminoacídica es troba ben conservada (Jones i Mobley., 1989; Labigne i col., 1991; Riddles i col., 1991).

Aquesta molècula catalitza la hidròlisi de la urea a amoni i àcid carbònic, amb carbamat com a compost intermedi.



De l'equilibri entre l'àcid carbònic i l'amoni amb la seves formes deprotonades i protonades resulta un increment de pH de la zona.



El substrat de la ureasa és la urea que es sintetitza en el fetge i es pot trobar en sèrum, saliva i suc gàstric a concentracions inferiors a 10mM. El pH òptim de la ureasa d'*H. pylori* oscil·la entre 7,5 i 8,5. A pH inferior a 4,5, no hi ha activitat. Weeks i col·laboradors van postular que el transportador d'urea, UreI, formava un porus específic per aquesta molècula en la membrana citoplasmàtica (Weeks i col., 2000). S'obre a pH inferiors a 6,5 i es tanca a pH elevats, regulant la urea disponible per la ureasa citoplasmàtica.

A diferència d'altres ureases d'altres espècies bacterianes, aquest enzim no és exclusivament citoplasmàtic. En cultius envellits, la ureasa es pot trobar adherida a la superfície de la cèl·lula o en el medi. La importància de la ureasa externa encara no està definida. Hi han autors que consideren que aquesta ureasa contribueix a la tolerància del microorganisme enfront

l'entorn àcid del medi (Krishnamurthy i col., 1998). En canvi, d'altres investigadors proposen que la ureasa de superfície s'inactiva a pH inferiors a 5 tot el contrari del que fa la interna. Per tant, creuen que la ureasa citoplasmàtica és la responsable de la resistència d'*H. pylori* a pH baixos. (Scott i col., 1998). No obstant, la ureasa externa també pot contribuir a elevar el pH de la zona on es troba el microorganisme si el pH és superior a 4,5. El resultat de l'activitat d'aquesta ureasa superficial pot fer que el pH superi superiors a la neutralitat i, en aquest condicions, els neutròfils no poden sobreviure.

5.2.2.- Hipergastrèmia

La infecció indueix l'expressió de la gastrina, responsable de la secreció dels sucus gàstrics, i inhibeix l'expressió de la somatostatina, inhibidora de la secreció d'àcid gàstric, alterant l'equilibri gàstric. L'increment de la secreció àcida a l'estómac (hipergastrinèmia) està relacionada amb el grau d'inflamació gàstrica. S'ha demostrat que si la secreció àcida s'inhibeix amb omeprazol, s'altera la presència del bacteri en l'antre i l'obliga a migrar cap al corpus de l'estómac. (Logan i col., 1995).

5.2.3.- Proteïna Vac A i CagA

La proteïna VacA (citotoxina vacuolitzant) i la proteïna CagA (proteïna associada a toxicitat) a més a més de ser factors de virulència es consideren marcadors de patogenicitat. Clínicament, ajuden a determinar el grau de virulència d'una soca que està infectant un individu.

La capacitat que té *Helicobacter pylori* d'induir resposta immune, activació cel·lular i un major dany cel·lular i hístic varia segons el genotip de la soca (taula 7). Les soques amb el genotip tipus I (CagA) són capaces de secretar proteïnes citotòxiques (CagA) i toxines vacuolitzants (VacA), amb alt poder inflamatori i major virulència. Les soques amb el genotip tipus II (VacA) són incapaces de secretar ni toxines vacuolitzants ni citotoxines. Són menys citotòxiques.

Taula 7. Tipus de soca d'*Helicobacter pylori* en funció dels marcadors de patogenicitat.

Tipus de soca	Gen <i>cagA</i>	Proteïna CagA	Gen <i>vacA</i>	Proteïna VacA
I	+	+	+	+
II	-	-	+	-

El gen *vacA* codifica per una pretoxina de 140KDa que durant el procés de secreció madura i genera una proteïna, VacA, d'alt pes molecular (88KDa). Aquesta proteïna es localitza en forma de monòmer en la superfície del patogen o es secretada a l'exterior com oligòmer de 900KDa. Les formes oligomèriques són inactives i es dissolen en monòmers actius al produir-se canvis en el pH. La presència d'aquesta toxina indueix la formació de vacuoles àcides en el citoplasma de les cèl·lules eucariotes, causant la mort cel·lular i la inflamació de la mucosa gàstrica (Cover i col., 1992). També afavoreix l'alteració de la permeabilitat de la membrana epitelial incrementant el flux de molècules de baix pes molecular cap a l'interior de la cèl·lula. La proteïna VacA forma canals aniònics en la bicapa lipídica, bàsic per al procés de vacuolització.

Bàsicament, totes les soques d'*H. pylori* contenen el gen *vacA* que codifica per aquesta toxina però només la meitat poden expressar-la. En aquest gen trobem una enorme variabilitat deguda a l'existència de 2 regions principals: la regió s (que codifica per la seqüència senyal) i la regió m (que codifica per la regió central). Existeixen 3 tipus al·lèlics de s (s1a, s1b i s2) i 2 tipus al·lèlics m (m1 i m2). Les soques amb les variants al·lèliques s1a i s1b produeixen els nivells més alts de citotoxina a diferència de la soca s2 que en produeixen molt poca (Atherton i col., 1995). Les soques m1 s'associen amb danys importants en l'epiteli gàstric mentre que les s1a es relacionen amb una elevada inflamació de la mucosa de l'estómac. Per tant, la combinació al·lèlica de *vacA* s1/m1 codifica per una proteïna VacA amb una alta activitat vacuolitzant citotòxica. Aquesta proteïna també interfereix en la regularització de la adherència cel·lular i en

la organització del citoesquelet i provoca una pèrdua de la adhesió cel·lular i una desorganització de la estructura de la mucosa.

La proteïna CagA amb un pes molecular que oscil·la entre els 128KDa i els 145KDa està codificada pel gen *cagA*, localitzada en l'illa de patogenicitat (PAI), de 40 Kb. En la regió *cag*, s'hi troben 31 pautes de lectura oberta (ORF) que codifiquen per un factor de virulència i per un sistema de secreció tipus IV específic d'*Helicobacter* (Parsonnet i col., 1997)

No totes les soques d'*Helicobacter pylori* contenen el gen *cagA*. Les soques *cagA*⁺ són especialment virulentes. S'ha pogut establir una relació directa entre la presència d'aquest gen amb l'adenocarcinoma gàstric ja que més d'un 90% dels pacients amb aquest tipus de patologia presenten el gen (Covacci i col., 1997). La CagA és una fosfoproteïna que actua com una oncoproteïna que penetra en el citoplasma de la cèl·lula eucariota. Altera el cicle cel·lular de la cèl·lula hoste modificant les seves proteïnes reguladores, afavorint la transformació cel·lular i desencadena, d'aquesta manera, el procés cancerós (Peek i col., 1999).

Soques *cag*⁺ i *cag*⁻ poden circular dins d'una mateixa població i també està presents en un mateix hoste (Pérez- Pérez i col., 1997; Figura i col., 1998). La seva distribució a nivell mundial és molt variable. Amèrica del sud, Europa i Estats Units es caracteritzen per tenir només un 40-60% de les soques *cag*⁺ mentre que la majoria de la població de l'est d'Àsia són portadores de soques *cag*⁺. Les soques *cag*⁺ es relacionen amb la úlcera duodenal, gastritis atròfica i adenocarcinoma gàstric. Això es deu a que aquestes soques produeixen més danys a les cèl·lules epitelials, secreten més citoquines proinflamàtòries (IL-8), afavoreixen una major infiltració de neutròfils i cèl·lules polimorfonucleades i provoquen canvis en la secreció gàstrica. Les soques que presenten una major virulència són aquelles que contenen el gen *cagA* i *vacA* amb expressió de les seves proteïnes.

5.3.-Mètodes de diagnòstic d'*Helicobacter pylori* en mostres clíniques.

Des de que *Helicobacter pylori* es va descobrir com a responsable d'una de les infeccions més esteses del planeta, la necessitat de mètodes de diagnòstic es van fer més evidents. No hi ha cap mètode eficaç ni específic al 100%. La distribució de l'*Helicobacter pylori* i la inflamació associada a la seva presència té una distribució desigual en l'estómac que pot implicar la detecció de falsos negatius en les proves de diagnòstic. Per això, molt cops es recomana l'ús de varies proves diagnòstiques. L'elecció d'una tècnica determinada estarà en funció del quadre clínic del pacient.

Els mètodes de diagnòstic es poden classificar en directes i indirectes, si es el microorganisme el que es detecta o no, i en invasius o no invasius, segons com s'obtingui la mostra (taula 8).

Taula 8. Mètodes directe i indirecte.

Mètodes directes *	Mètodes indirectes
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cultiu microbiològic ▪ Tinció histològica ▪ Tècniques moleculars ▪ Test de la ureasa 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Test de l'al·lè amb urea-C¹³ (UBT) ▪ Tests serològics ▪ Tècniques moleculars ▪ Detecció de coproantígens

* Cohen i col., 1997

5.3.1.- Cultiu microbiològic

El cultiu microbiològic és un dels mètodes més usats en clínica. Cultivar *H. pylori* a partir de mostres biològiques comporta principalment dos avantatges: caracteritzar la soca aïllada i determinar la susceptibilitat antimicrobiana. Normalment, el patogen s'aïlla a partir de biòpsies gàstriques tot i que es possible recuperar-lo de suc gàstric, femtes i, inclús, saliva (Parsonnet i col., 1999; Bravos i Gilman., 2000; Kabir., 2004). Dins del món del diagnòstic clínic, la mostra que es cultiva més habitualment és el de les biòpsies gàstriques. El cultiu permet determinar la sensibilitat

antibiòtica i la posterior caracterització molecular de la soca bacteriana. També s'ha pogut cultivar a partir de sucs gàstrics i de femtes. L'any 1992 *H. pylori* es va cultivar per primer cop de femtes de nens de Gàmbia (Thomas i col., 1992). Des de llavors, s'han succeït múltiples estudis centrats en la seva detecció en aquest tipus de matriu (Enroth i Engstrand., 1995; Parsonnet i col., 1999; Kelly i col., 1994). Varis autors han aconseguit l'aïllament d' *H. pylori* de femta malgrat que no és rutinari. No és fàcil el cultiu del microorganisme a partir de matèria fecal i el seu grau de dificultat variarà en funció del temps del trànsit fecal (Megraud., 1995).

Però és un microorganisme difícil de fer créixer (*fastidious*) que requereix un medi complex complementat amb sang o derivats de la sang com ara la sang completa, lisada, desfibrinada o el sèrum. Molts d'aquests suplementes es comporten tant com a nutrients com a detoxificants del medi, protegint al microorganisme d'agents químics o biològics. La sang també actua com agent reductor (Velázquez i Feirtag., 1999).

No hi ha cap medi definit que s'usi com a referència per a cultivar *H. pylori*. Uns dels medis sòlids més usats per al creixement d'aquest patogen són l'agar Brucella i l'agar Columbia. Aquests medis es suplementen amb una concentració de sang, tant de cavall com d'ovella, que varia entre el 5 i el 20%. *H. pylori* també pot créixer en medi líquid com el *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementat amb sang o sèrum de cavall o amb emulsió de rovell d'ou. La presència de microorganismes contaminants pot emascarar el resultat final, degut a que aquests poden créixer més ràpidament que *H. pylori* en aquest medi. Per evitar aquest problema, és necessari l'ús de biocides en mostres clíniques per eliminar la biota acompanyant. Els suplementes antibiòtics més habituals van ser formulats per Skirrow (1997) i Dent (1998). En la taula 9 es detalla la composició d'aquest suplement antibiòtics.

Taula 9. Composició dels suplementes antibiòtics.

Suplement de Skirrow		Suplement de Dent	
Vancomicina	10 mg/L	Vancomicina	10 mg/L
Trimetoprim	5 mg/L	Trimetoprim	5 mg/L
Polimixina B	2500 IU/L	Cefsulodina	5 mg/L
		Amfotericina B	5 mg/L

Helicobacter pylori és microaeròbic i necessita una proporció de gasos molt concreta. La concentració d'oxigen (O₂) pot oscil·lar entre el 3 i el 7%, la de diòxid de carboni (CO₂) entre un 5 i 10% i la d'hidrogen (H₂) entre un 0 i un 10%. S'usen habitualment sobres comercials generadors de gasos que dins de gerres d'anaerobiosi creant l'atmosfera adient (Campylobacter Gas Generating Kit, Oxoid, Regne Unit; CampyPack Plus, Becton Dickinson, Cockeysville, MD). Una alternativa són els incubadors de CO₂ o les cambres anaeròbiques amb un ambient microaeròbic. La humitat ha de ser elevada (a prop del nivell de saturació) i la temperatura de cultiu estàndard és 37°C. El seu creixement és lent i difícil tant en agar com en medi líquid. Les petites colònies translúcides, que apareixen després de 3-5 dies si es tracta d'un cultiu pur i 7-10 si són mostres clíniques, tenen un diàmetre que oscil·la entre 0,5 i 2 mm.

La identificació del cultiu es basa en el reconeixement de la morfologia colonial, de la morfologia bacteriana (bacils prims a vegades helicoidals), ha de ser Gram negatiu i han de reaccionar positivament a les proves de la ureasa, catalasa i oxidasa. Altres proves menys variables i més ràpides permeten completar la identificació (Taula 10).

Altres mètodes d'identificació d'*H. pylori* usats en laboratoris clínics són la tinció de teixit gàstric procedent de biòpsies i la microscopia òptica, fonamental per l'estudi histològic i pel diagnòstic d'aquest microorganisme.

Taula 10: Sensibilitat i especificitat de les proves diagnòstiques de *Helicobacter pylori* (Dunn i col., 1997)

Prova	Sensibilitat	Especificitat	
Cultiu microbiològic	Biòpsia	90-95%	100%
	Femta	30-50%	100%
Histologia Giemsa	93-98%	95-98%	
Test de la ureasa	89-98%	93-98%	
Test de l'alè	90-95%	90-95%	
PCR	85-96%	90-100%	
	Variable en funció dels iniciadors emprats		
Serologia (ELISA)	88-95%	86-95%	
Detecció Antigènica HpSA	90-98%	90-95%	

5.3.2.- Tinció histològica

La tinció histològica de hematoxilina i eosina (H&E) identifica la inflamació del teixit gàstric però difícilment permet apreciar el microorganisme. No existeix cap tinció ideal però s'apliquen tincions especials que faciliten la visualització i la identificació. La tinció Gram identifica positivament *H. pylori* entre el 60 i el 100% dels casos (Nichols i col., 1991). La poca presència de bactèria pot dificultar la seva tinció, de manera que es pot complementar amb tincions més complexes com ara la de Wathin-Starry, la de Giemsa modificada (Genta i col., 1994) que s'usen de manera rutinària en molts laboratoris clínics o el taronja d'acridina. Una triple tinció combinació de H&E, Alcian blue i la tinció Genta o El-Zimaity, faciliten la identificació de *H. pylori* i visualització de la morfologia del teixit gàstric (el-Zimaity i col., 1996). Tècniques immunohistoquímiques incrementen la probabilitat de detectar el microorganisme i disminueix els falsos negatius.

5.3.3.- Test ràpid de la ureasa

Una bona manera de determinar la presència d'*H. pylori* és avaluar l'activitat ureàsica en una mostra gàstrica a partir de biòpsies amb el test ràpid de la ureasa. L'eficàcia d'aquesta tècnica dependrà de la quantitat de patogen present en la biòpsia. El primer test de diagnòstic comercial de *H. pylori* i el més utilitzat és CLOtest[®] (Delta West Ltd, Bentley, West Australia). La prova es basa en la variació de pH que es produeix quan la urea afegida al medi es hidrolitzada per la ureasa del microorganisme. En el mercat es troben altres proves diagnòstiques similars com ara el Hpfast (GISupple, CampHill, Pa) i PyloriTeK[®] (Seuim Research Corp., Elkhart, Ind). És una prova de resultat immediat (10-60 minuts) tot i que es pot arribar a esperar 24h per a la seva lectura. És possible l'aparició de falsos negatius pel baix nombre de microorganismes, per l'ús de antibiòtics, per la presència de sals de bismut o per la presència d'inhibidors de la bomba de protons.

5.3.4.- Test de l'alè

El test de l'alè (UBT) és no invasiu, qualitatiu, ràpid i fiable. Es basa en la ingestió d'urea marcada. Si el microorganisme es troba present en l'estómac, la seva ureasa hidrolitzarà la urea i el CO₂ marcat exhalat serà recollit i avaluat. La urea es pot marcar amb l'isòtop radioactiu ¹⁴C (PYTest, Ballard Medical Productc, Draper, Vials) i amb l'isòtop no radioactiu ¹³C (Meretek Diagnostic, Nashville, Tenn), essent aquest darrer el més recomanable. La microbiota pròpia de la boca conté microorganismes ureasa positiu que podrien donar falsos positius. Però aquest problema s'ha solucionat administrant la urea en forma de pastilla o càpsula.

5.3.5.- PCR

Actualment també s'apliquen tècniques de detecció molecular com ara l'amplificació d'ADN i ARN, immunodetecció. La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es caracteritza per tenir una alta sensibilitat i especificitat, rapidesa en l'obtenció de resultats i permet tipificar la soca bacteriana sense

requeriments especials en el seu transport. Aquesta tècnica s'usa per detectar *H. pylori* en tot tipus de mostres clíniques com ara biòpsies gàstriques, suc gàstric, femta, saliva i placa dental. La tècnica de la PCR és la més usada per la detecció de ADN d'*H. pylori* en femtes. El percentatge de mostres positives per aquest microorganisme en diferents tipus de mostres oscil·la entre el 10% fins al 100% (Li i col., 1996; Mapstone i col., 1993; Namavar i col., 1995; Notarnicola i col., 1996; Watanabe i col., 1998). La variabilitat de resultat en la seva detecció per mètodes moleculars recorda que la troballa del seu ADN no significa necessàriament la presència de cèl·lules viables d'*Helicobacter pylori*.

En mostres clíniques, les zones d'amplificació escollides més freqüentment per detectar aquest patogen són fragments del gen *16S rRNA* i del gen de la ureasa *ureA*. Per establir el grau de virulència i de patogenicitat d'una soca en concret, es detecta el gen associat a citotoxina (*cagA*) i el gen vacuolitzant (*vacA*).

5.3.5.- ELISA i detecció antigènica

La possibilitat de detectar d'anticossos IgG, IgM i IgA en sang, sèrum, saliva i orina ha permès desenvolupar kits de diagnòstic no invasius, ràpids i econòmic. Productes comercials en format ELISA i basats en l'aglutinació de làtex permeten obtenir resultats en temps molts breus (10-15 minuts) i amb un baix cost. L'únic contrapunt és la seva sensibilitat, més baixa en comparació amb altres mètodes (Cohen i col., 1996).

Recentment, s'ha incrementat el interès en identificar la presència d'antígens d'aquest patogen en femta com a marcador de la infecció. Aquests mètodes d'identificació d'*H. pylori* es basen en l'ús d'anticossos tant policlonals com monoclonals. Són ràpids i no invasius. Resultats positius en aquests tipus de test ens indiquen infecció en el moment de la recollida de la mostra, fet que ens ajudaria a controlar l'eficiència del tractament i, en conseqüència, la seva eradicació.

En el mercat hi ha varis mètodes de determinació d'antígens específics d'*H. pylori* en femta: Premier Platinum HpSA, Femtolab Hpylori, HePy-stool, ImmunoCard STAT!HpSA.

Premier Platinum HpSA (Meridian Diagnostics Inc, Cincinnati, Ohio, EEUU) va ser el primer kit desenvolupat per a la detecció d'antígens d'aquest patogen. És una ELISA que usa anticossos policlonals contra *H. pylori* adherits a micropouets, als quals s'hi afegeix la femta i l'anticòs policlonal de revelat conjugat amb peroxidasa i el seu substrat. Els anticossos policlonals s'obtenen a partir d'un pool d'antígens bacterians infectats en conills. La resposta immunològica variable de la IgC de l'animal és la causa de la variabilitat entre lots.

La reacció enzimàtica colorimètrica de revelat es mesura a una λ de 450/630nm. És capaç de detectar una concentració d'antígens de ≥ 184 ng/ml en aquesta matriu. La sensibilitat i la especificitat d'aquest kit oscil·len entre el 84-100% i el 77,8%-100%, respectivament. Són comparables a les de la histologia o al test de l'alè (UBT) (Braden i col., 2000; Ni i col., 2000). Aquest kit és l'únic kit aprovat per l'administració per al control de medicaments i aliments dels Estats Units (FDA). Només s'ha autoritzat aquest kit per al diagnòstic primari de la infecció i el seguiment del tractament d'eradicació.

5.4.- Tractament. Vacunes

L'objectiu del tractament és eradicar *Helicobacter pylori* de l'estómac i prevenir les malalties associades, com ara la úlcera gàstrica o duodenal causada pel microorganisme que ha de ser tractada per cicatritzar la zona ulcerada. El Consens de Maastricht (2002) va establir les recomanacions d'eradicació de la infecció d' *H. pylori* en tots els pacients amb úlcera (Manes i col., 2002). L'Associació Americana de Gastroenterologia recomana el tractament d'eradicació en casos d'úlcera gàstrica i duodenal, gastritis severa i limfoma de MALT. En la resta de casos, els beneficis de l'eradicació són posats en dubte (Lee i col., 2008)

La úlcera pèptica causada per *Helicobacter pylori* es tracta amb antibiòtics i medicaments per disminuir la secreció d'àcids gàstrics com ara bloquejadors H⁺ i inhibidors de la bomba de protons i per protegir el revestiment de l'estómac.

Els bloquejadors de protons (cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina) bloquegen l'efecte de la histamina que estimula la secreció àcida. Els inhibidors de la bomba de protons (omeprazol, lansoprazol i pantoprazol) suprimeixen la producció d'àcid al interrompre el mecanisme de bombeig de l'àcid cap a l'estómac. Durant molt anys, els bloquejadors i els inhibidors de la bomba de protons van ser administrats com únic tractament de les úlceres. Però per si sols, aquests medicaments no eradicaven *H. pylori* i, per tant, tampoc curaven les úlceres. Una excepció podria ser el subsalicat de bismut que s'usa per protegir el revestiment de l'estómac de l'acció de l'àcid i també destrueix al microorganisme.

Actualment, hi han dos tractaments recomanats per eliminar *Helicobacter pylori* i curar les úlceres d'estómac: la triple i quàdruple teràpia. La triple teràpia és la més freqüent. S'administren dos antibiòtics que poden ser metronidazole, amoxicil·lina, claritromicina, gentamicina o tetraciclina juntament amb un inhibidor de la bomba de protons durant dues setmanes.

La teràpia triple evita la recurrència de la úlcera amb més d'un 90% de pacients. Una eficàcia d'eradicació similar té la teràpia quàdruple: bismut, metronidazole, tetraciclina i omeprazol. Aquesta teràpia es recomana a pacients amb al·lèrgia a la penicil·lina o que hagi estat exposats prèviament a la claritromicina. Recentment, una tercera línia terapèutica alternativa ha sorgit amb una alta efectivitat i baixos costos. Combina el rabeprazol, levofloxacina i la furazolidona administrats en una única dosi diària durant 10 dies (Coelho i col., 2005).

En els darrers anys, s'estan incrementant les resistències a antibiòtics (metronidazole, claritromicina i derivats) en diferents regions del món.

Després del tractament, s'ha de fer un seguiment del pacient per assegurar-se que s'han eliminat totalment les bactèries d'*Helicobacter pylori*. Es pot comprovar realitzant una endoscòpia de seguiment o la prova de l'alè entre 6 i 12 mesos després del tractament.

L'eradicació efectiva d' *Helicobacter pylori* no implica que el pacient no es pugui tornar a infectar, sobretot si les condicions socio sanitàries no són les més adients. Es classifiquen dos tipus de recurrència de la infecció per aquest patogen: la recrudescència, definida quan en la reaparició de la infecció es detecta una soca bacteriana molt similar a la detectada anteriorment al tractament i la reinfecció pròpiament dita, fenomen que es produeix quan l'individu s'infecta amb una soca diferent d' *H. pylori*.

En països subdesenvolupats, la taxa de reinfecció oscil·la entre el 2,4% de la Índia fins al 22,7% de Mèxic (Carta i col., 2000; Leal-Herrera i col., 2003). La majoria d'aquest pacients es reinfecten per varies soques alhora, la qual cosa suggereix que els individus estan exposats a múltiples factors d'infecció després de la eradicació i que viuen en zones on el risc d'infecció és elevat (Parsonnet., 2003). En els països desenvolupats, la taxa d'eradicació oscil·la entre un 80-90% i la de reinfecció en adults és molt poc freqüent, entre un 1% i un 2%. A Espanya, la taxa de reinfecció és de 2,4 pacients/l'any, la de recrudescència de 4,75% i la de recurrència de 3,6% als 6 mesos i de 1,5% als 12 mesos i als 2 anys (Ramos i col., 1997; Gisbert i col., 1998; Gómez Rodríguez i col., 2004). Les recurrències representen freqüentment un fracàs en el tractament de la infecció primària i no pas una nova infecció (Parsonnet, 2003). Tot i això, infants de països desenvolupats poden estar exposats a aquest fenomen com succeeix a Itàlia on s'han descrit taxes de reinfecció elevades (12,8%) (Magistà i col., 2005).

La eradicació farmacològica d' *H. pylori* canvia freqüentment la història natural de la malaltia. Fins fa pocs anys, el tractament quirúrgic era l'únic que tenia aquest efecte. Els tractaments mèdic prolongats mantenien la malaltia amb poques recidives però no curaven la patologia ja que quan els fàrmacs eren retirats, tornava a aparèixer la úlcera.

Actualment, varis estudis suggereixen la creació de vacunes per eradicar *H. pylori* a causa de la contínua emergència de soques resistents a antibiòtics que provoquen fallides en el tractament habitual d'aquest patogen. Fins ara, totes les vacunes s'han provat en models animals amb més o menys èxit: gats, garrins lliures de gèrmens i en mono *Rhesus* (Batchelder i col., 1996; Krakowka i col., 1995; Lee i col., 1999). L'any 2001, es va desenvolupar la primera vacuna contra *H. pylori* en humans en caràcter experimental (Vargas i Skromne, 2001). Es tractava d'una vacuna obtinguda a partir de cèl·lules bacterianes irradiades amb radiació β a dosi letal mitja procedents de biòpsies. Es va administrar oralment en pacients positius pel microorganisme i en voluntaris que van ingerir el patogen. Les proves de diagnòstic serològic aplicades posteriors van resultar negatives per *H. pylori*. És el inici del desenvolupament efectiu d'una vacuna humana contra *Helicobacter pylori*.

6.- EPIDEMIOLOGIA DEL MICROORGANISME I DE LA SEVA INFECCIÓ

La infecció per *Helicobacter pylori* és ubiqua i afecta tant a homes com a dones (Woodward i col., 2000). Tot i que la infecció afecta a tots els grups humans, la prevalença és més baixa en països desenvolupats que en països en desenvolupament (Graham i col., 1991). Aquesta diferència s'ha atribuït a l'adquisició del patogen durant la infantesa. En països desenvolupats, la proporció de nens infectats menors de 10 anys varia entre el 0% i el 5% mentre que el percentatge incrementa fins al 13-60% en nens de països en desenvolupament. Aquesta diferència entre països segons el seu estatus socioeconòmic deixa de ser significatiu en la població major de 10 anys (Mitchell i col., 1992).

La gran majoria de persones adquireixen el bacteri durant la infantesa. El més habitual és que el patogen s'instal·li a la mucosa gàstrica i hi persisteixi durant tota la vida de l'individu. En els darrers anys, s'ha registrat un descens dels nivells d'infecció per aquest microorganisme en la població infantil en països en desenvolupament. Una millor atenció mèdica i millors condicions sociosanitàries han estat la causa d'aquesta disminució.

Però diversos estudis també suggereixen que la infecció per *H. pylori* podria ser transitòria durant la infància, és a dir, el microorganismes seria eliminat espontàniament (Klein i col., 1994; Grandstrom i col., 1997; Redlinger i col., 1999). Tot i això, no es pot oblidar el continu risc d'adquisició del patogen durant l'edat adulta (Vanzanten i col., 1994).

6.1.- Reservoiris d'*Helicobacter pylori*

L'únic reservori natural reconegut d'*Helicobacter pylori* és el tracte gastrointestinal humà. Encara que *H. pylori* colonitzi l'estómac i travessi el intestí, el bacteri no està ben adaptat al trànsit intestinal. És sensible als efectes letals de la bilis, fet que dificultaria la seva supervivència en aquest habitat.

La identificació d'*Helicobacter pylori* en animals fa considerar la possibilitat que també sigui una zoonosi. L'any 1999, Dore i col·laboradors van establir una relació positiva entre la prevalença del microorganisme en pastor d'ovelles i les ovelles a Sardenya. També van aïllar *H. pylori* de la llet d'ovella. Arran de tot això, aquests autors van proposar que el cicle d'aquest patogen incloïa fases en l'ambient, en animals i, finalment, en homes i que la ovella podria ser un hoste ancestral d' *H. pylori* (Dore i col., 1999a; Dore i col., 1999 b). Els gats domèstics també es suggereixen com a possible reservoris d' *H. pylori* però es posa en dubte la validesa dels estudis realitzats ja que aquests gats havien estat criats en captivitat (Handt i col., 1994). Les mosques domèstiques han estat proposades com a possibles vectors i reservoris d' *H. pylori* ja que aquest microorganisme s'ha aïllat en aquests insectes (Sasaki i col., 1999; Grubel i col., 1998).

El material genètic d'*H. pylori* s'ha detectat en aigües d'origen molt diversos: de pou, de font, de basses, de riu, de mar, d'aigües residuals, d'aigües d'aixetes domèstiques... (Sasaki i col., 1999; Hulten i col., 1996; Hulten i col., 1998). L'elevada dificultat per cultivar-lo a partir d'aigua es relaciona amb l'entrada de la bactèria en un estat viable però no cultivable degut a l'exposició a les condicions ambientals (Bode i col., 1993).

Tot i que s'han dedicat molts esforços a la recerca d'un font d'*Helicobacter pylori* ambiental, no hi ha prou evidències significatives que permetin afirmar l'existència d'un reservori natural fora de l'estómac humà.

6.2.- Transmissió del patogen

Molts estudis proposen que la via de transmissió més comuna d' *H. pylori* és l'ambiental, considerant els animals i l'aigua com a potencials fonts d'infecció però tenint com origen del microorganisme l'ésser humà. Però encara queden aspectes per resoldre.

Varies hipòtesis han estat proposades sobre quina és la ruta de transmissió que segueix el microorganisme però cap d'elles no s'ha pogut confirmar totalment. El que sembla evident es que no hi ha un sola via de transmissió. Goodman i col·laboradors (1996) van proposar la coexistència de varies rutes de transmissió del patogen alhora amb el predomini d'una sobre les altres. La detecció de *H. pylori* en aigua (Hultén i col., 1998; Horiuchi i col., 2001; Lu i col., 2002), llet (Dore i col., 1999), femtes (Nilsson i col., 1996), saliva i placa dental (Hultén i col., 1996), vòmits i suc gàstrics (Leung i col., 1999; Varoli i col., 1991) i animals (Handt i col., 1994) recolzen la teoria que el patogen podria adquirir-se per diverses vies.

La ruta de transmissió més provable seria el contacte persona-persona, essent les possibles vies de propagació del patogen la via gastro-oral, la via oral-oral i la via fecal-oral. Una altre ruta que ha estat plantejada per la comunitat científica és la iatrogènica. En aquest cas, es produiria tant per la introducció d'endoscòpis contaminats amb mucosa gàstrica d'individus infectats com pel contacte continu d'aquests aparells amb el personal mèdic (Akamatsu i col., 1996; Lin i col., 1994). La millora en la desinfecció dels endoscòpis i una millor protecció del personal mèdic ha reduït la incidència de la transmissió (Tytgat, G, N., 1995).

Possiblement, la ruta d'adquisició d'*H. pylori* més freqüent entre els nens sigui la via gastro-oral, a través del vòmit i del reflux gastroesofàgic. Leung i col·laboradors van detectar la presència del patogen en vòmits de

nens de 6 anys per mètodes moleculars i serològics (Leung i col., 1999). El mateix any, es va aconseguir aïllar-lo i cultivar-lo de vòmit d'adults i de l'aire que envoltava al individu en el moment de l'emesi (Parsonnet i col., 1999). Aquestes dades reforçarien la hipòtesi que el vòmit actuaria com a vehicle en la transmissió de la infecció bacteriana.

La via oral-oral es basa en que *H. pylori* també formaria part de la microbiota autòctona de la boca (Song i col., 2000). La complexitat de la biota oral dificulta l'aïllament del microorganisme de la cavitat bucal. Tot i l'esforç realitzat per molts investigadors per cultivar *H. pylori* a partir de placa dental i saliva, l'èxit ha estat relatiu, amb uns baixos percentatges de recuperació del microorganisme (Cellini i col., 1995; Ferguson i col., 1993; Parsonnet i col., 1999). En canvi, la detecció de ADN d'*H. pylori* de la cavitat oral és molt més eficient, amb percentatges més alts i variables en funció de l'especificitat dels iniciadors emprats. S'ha detectat en mostres procedents de placa dental, del dors de la llengua, de saliva i de bosses periodòntiques (Bonamico i col., 2004; Mapstone i col., 1993; Dowsett i col., 1999; Song i col., 2000). Tot i això, la prevalença d'infecció d'*H. pylori* entre dentistes no incrementa, la qual cosa suggeriria que l'exposició habitual a secrecions orals no és un factor de risc per infectar-se. (Lin i col., 1998).

El contagi d'*H. pylori* per contacte persona-persona s'afavoreix en col·lectius i, sobretot, dins de l'àmbit familiar. La incidència d'infecció de la bactèria incrementa dins de famílies amb nens infectats amb el patogen (Drumm i col., 1990). El paper dels pares, sobretot el de la mare, i el contacte continu entre germans és clau en la transmissió via oral-oral. Nens amb mares infectades pel microorganisme tenen un risc d'infecció 5 vegades superior al dels nens amb mares no infectades (Malaty i col., 2000). La infecció també es transmet fàcilment entre germans (Goodman i Correa., 2000; Rothenbacher i col., 2002; Roma-Giannikou i col., 2003). La troballa de soques genèticament idèntiques entre membres d'una mateixa família recolza la transmissió intrafamiliar (Bamford i col., 1993). Però aquest fenomen no és clar entre esposos. Alguns autors defensen el contagi oral-oral entre parelles i altres atribueixen l'adquisició del patogen a la

presència de nens infectats en la família (Georgopoulos i col., 1996 ; Suzuki i col., 1999; Kuo i col., 1999).

A més a més, certs comportaments culturals podrien incrementar el risc d'infecció d'*H. pylori*. En certes zones d'Àfrica, es freqüent la premasticació del menjar per part de la mare abans d'alimentar els seus fills (Albenque i col., 1990). L'ús de bastons xinesos també s'ha relacionat amb la transmissió oral-oral (Chow i col., 1995) tot i que s'ha posat en dubte el seu paper en l'adquisició de la infecció (Leung i col., 1999).

La transmissió fecal-oral es considera una via important de transmissió del microorganisme, sobretot en països en desenvolupament. En zones amb poca infraestructura socio sanitària, la matèria fecal entra més fàcilment en contacte amb l'aigua de beguda i de regadiu, contaminant-la i convertint l'aigua en un vector de transmissió del patogen, ja que es capaç de sobreviure en l'aigua en forma viable no cultivable (Adams i col., 2003). Els estudis realitzats per Klein i col·laboradors van mostrar la importància de l'origen de l'aigua alhora d'adquirir la infecció (Klein i col., 1991). En aquest treball dut a terme entre nens del Perú, Klein va relacionar el consum d'aigua d'un subministrament extern a la casa amb un increment en l'adquisició del patogen fins a 3 cops superior si la font d'aigua es trobava dins la casa. D'aquest estudi es conclouïa que la falta de potabilització de l'aigua de beguda, la manca d'un sistema de distribució de l'aigua eficient a les cases i unes condicions higièniques poc adequades incrementaven el risc d'adquirir la infecció. També s'ha associat un increment de la proporció d'individus d'una població que posseeix *H. pylori* amb el consum de verdures crues regades amb aigua contaminada fecalment (Goodman i col., 1996; Hopkins i col., 1993). El mateix estudi realitzat per Goodman i col·laboradors associava l'adquisició de la infecció amb el fet de nedar en rius, rierol i piscines a Colòmbia (Goodman i col., 1996).

La femta humana té una composició complexa i variable. Està constituïda per microorganismes propis de la microbiota entèrica i per compostos químics. La microbiota normal està composta per un 99,9 % de

microorganismes anaeròbics (10^{11} /g de femta normal) i per anaerobis facultatius, on *E. coli* és el membre més representatiu (10^7 /g de femta) (<http://tratado.uninet.edu/c030303.html> pàgina web consultada a 19/06/2010). A més, també pot contenir bacteries i virus patògens, protozous i ous de paràsits que poden causar malalties en altres hostes.

El volum i la composició de les femtes varia en funció de la dieta, del clima, de la salut del individu i del país de procedència. Els europeus i nord-americans produeixen diàriament entre 100 i 200 grams de femta mentre que els habitants de països en desenvolupament aquesta mitja incrementa a 130-520 grams (Feachem i col., 1983). Tenint en compte el seu contingut bacterià i la quantitat diària que s'evacua, la femta es converteix en una important font d'infecció de diverses malalties si no són eliminades adequadament i si les aigües fecals que es generen no són tractades correctament.

El pH de la femta varia entre 7-7,5. L'aigua representa el 75-90% del pes total. El component principal és la matèria orgànica mentre que altre elements com el calci, el potassi, el clor, el sodi, el carboni, el nitrogen fecal estan presents en proporcions variables (Taula 11). Però la presència de components de la bilis i de productes de degradació de la hemoglobina (urobilinogen, estercobilines i coproporfirines) juntament amb la grassa fecal converteixen a la femta en una de les matrius biològiques més difícils de treballar alhora d'extreure amb qualitat els àcids nucleics.

Un baix nivell socioeconòmic està associat directament amb un increment de la prevalença d'infecció d'*Helicobacter pylori*. La importància de l'estatus social és particularment clara quan s'examina la prevalença d'infecció d'*H. pylori* en els grups més desfavorits dins de països desenvolupats. El nombre d'individus infectats és inversament proporcional a la classe social, corresponent les prevalences més elevades als nivells socials més baixos, en especial durant la infantesa (Malaty i col., 1994; Malaty i col., 1998). Altres factors com la higiene, la sanitat, la densitat de població i el nivell educatiu influïrien en el nivell d'infecció en una població. La superpoblació i el nivell educacional són dos factors que és relacionen

amb l'índex de la prevalença d'infecció tant en països desenvolupats com en països en via de desenvolupament. Evitar elevades densitats de població i posseir un major nivell educacional ajuden a disminuir la incidència de la infecció (McCallion i col., 1996; Malaty i col., 1998; Olmos i col., 2000). A part del fet socioeconòmic, s'ha demostrat una predisposició genètica per a l'adquisició de la infecció (Malaty i col., 1994).

Taula 11. Característiques de les femtes humanes (Mobley i col., 2001)

Component	Quantitat
Pes mitja diari	100-200 gr
pH	7-7,5
Aigua	75% pes total
Sodi	35 mEq/L
Potassi	75 mEq/L
Clor	73 mEq/L
Calci	70-600 mg/24h
Nitrogen fecal	<2 gr/dia
Urobilinogen	40-280 mg/24h
Estercobilina	Fins 250 mg/dia
Coproporfirines	100-400 µgr/24 h
Grassa fecal	5 gr/dia

7.- DETECCIÓ D'*HELICOBACTER PYLORI* EN AMBIENT

Els estudis epidemiològics descrits anteriorment han demostrat que tot i que *H. pylori* és un patogen humà, també es troba present en el medi ambient, juntament amb altres microorganismes que podrien interferir en la seva detecció i identificació.

H. pylori es considera un microorganismes emergent. Tot i això, es raonable pensar que el que és realment emergent és la nostra capacitat d'estudiar-los i detectar-los. La elevada dificultat per aïllar aquest microorganismes ha obligat a buscar metodologies alternatives més efectives per poder-los detectar i identificar. La selecció del millor mètode

en funció de la mostra a estudiar, aigua, biofilms, aliments, femtes d'animals, sòl, insectes... determina l'èxit de la detecció.

Actualment, les tècniques moleculars són els protocols de detecció i identificació més utilitzats en la detecció del microorganismes en el medi ambient. Però tot i que ens permeten incrementar la sensibilitat i la especificitat obtenint resultat en un breu període de temps, no ens informa sobre l'estat de les cèl·lules bacterianes, que només es pot obtenir amb estudis de viabilitat.

7.1.- Mètodes microbiològics

Insistentment, s'ha intentat el cultiu i aïllament microbiològic d'*H. pylori* a partir de mostres ambientals però sense gaire èxit. Poms (1997) només va poder cultivar-lo a partir d'aliments (enciam i pollastre) i amb una molt baixa eficiència (10% del casos). Encara més baixa és l'eficiència d'aquest mètode quan la mostra a analitzar és aigua. Fins ara, només s'ha pogut cultivar aquest patogen en un sola ocasió (Lu i col., 2002). Es va aïllar *H. pylori* a partir d'aigua residual no tractada combinant la separació immunomagnètica (IMS) i tècniques de cultiu.

El cultiu està limitat per les elevades exigències nutritives del microorganisme, per la seva viabilitat en la mostra i per la microbiota acompanyant que interferiria en el seu creixement.

7.2.- Microscopia

H. pylori s'ha observat en mostres d'aigua usant la immunofluorescència (Hegarty i col., 1999). La unió d'anticossos monoclonals fluorescent ens proporciona una elevada especificitat.

El microscopi òptic de fluorescència permet l'observació de la viabilitat de les cèl·lules del medi tenyint la mostra d'aigua amb colorants fluorescent. (Hegarty i col., 1999). En els darrers anys s'està aplicant el kit

comercial "LIVE/DEAD BacLight bacterial viability" (Molecular Probes, Life Technologies) per estudiar la viabilitat d'*Helicobacter pylori*. Aquest kit està compost per 2 colorants vitals, SYTO[®]9 i iodur de propidi (IP), que permeten diferenciar la viabilitat d'una bactèria en funció de la integritat de la seva membrana. El colorant SYTO[®]9 amb fluorescència verda travessa fàcilment la membrana bacteriana mentre que IP amb fluorescència vermella només penetra en aquelles cèl·lules amb la membrana malmesa

El colorant vital SYTO 9 pertany al grup dels SYTO que emeten en verd. Són permeables a totes les membranes cel·lulars, incloent-t'hi mamífers i bactèries. Pot unir-se a ADN i a ARN tant en la regió citoplasmàtica com en la nuclear. Aquest colorant es capaç de penetrar en bactèries Gram positives i Gram negatives a través de les seves membranes intactes degut al seu petit mida. Per tant, entrarà en totes les cèl·lules, vives o mortes. L'excitació màxima es produeix al incidir amb llum blava a 480nm.

El colorant vital IP al igual que el bromur d'etidi (EtBr) presenta una estructura similar als intercaladors de fenantridini. IP és soluble en aigua i tot i que penetra a través de la membrana, no pot travessar les membranes intactes de les cèl·lules viables degut al seu major mida que el SYTO9. També pot unir-se als dos tipus d'àcid nucleic presents en la cèl·lula. L'excitació màxima té lloc per la incidència d'un feix de llum verda a 490nm.

Aquest dos colorants es diferencien en el seu comportament alhora de penetrar en les cèl·lules bacterianes intactes "*no injured*". Quan s'usen de manera independent, el colorant SYTO 9 tenyeix totes les cèl·lules d'una població (aquelles cèl·lules amb les membranes intactes i aquelles amb la membrana alterada). Contràriament, el iodur de propidi només penetra en les bactèries amb la membrana malmesa i causa una reducció de la fluorescència del SYTO 9 quan ambdós estan presents. D'aquesta manera, quan la barreja de SYTO 9 i IP és la apropiada, les bactèries intactes es tenyeixen de verd mentre que cèl·lules amb les membranes malmeses o mortes apareixen de color vermell o groc (Figura 5).

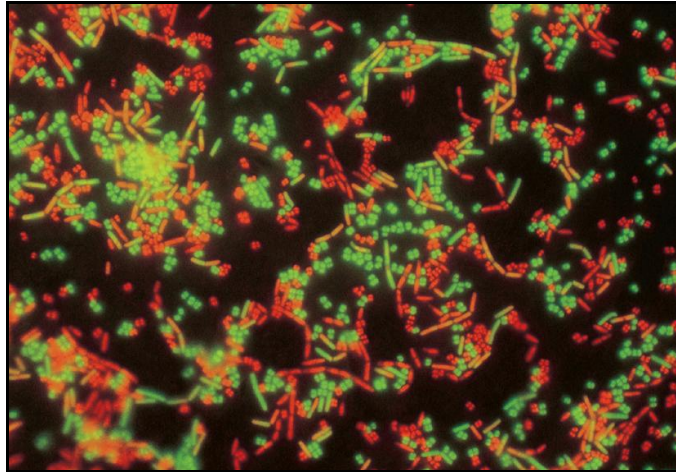


Figura 5. Bactèries amb les membranes intactes (color verd) i bactèries amb les membranes alterades o mortes (color vermell) en una barreja de *Micrococcus luteus* i *Bacillus cereus* amb LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit.

<http://www.invitrogen.com/>

7.3.- Autoradiografia

La detecció per autoradiografia tot i no ser un mètode gaire comú va marcar el inici de l'estudi de la viabilitat del microorganisme en model de sistemes aquàtics. Usava timidina marcada amb triti [^3H] que s'incorporava a les cèl·lules d'*Helicobacter pylori* en funció de la seva activitat metabòlica (Shahamat i col., 1993). La detecció de formes viables no cultivables per autoradiografia va ser el començament dels estudis per determinar el paper dels coccoïds en la transmissió de la malaltia.

7.4- Separació immunomagnètica

La separació immunomagnètica (SIM) és efectiva tant per recuperar cèl·lules eucariotes de fluids com per separar patògens procarïotes de mostres tant heterogènies com la sang, el menjar o les femtes (Olsvik i col., 1994) per al seu estudi amb tècniques moleculars. La SIM és el pas previ a la detecció del microorganisme per mètodes moleculars. La combinació de SIM i PCR faciliten el diagnòstic per ADN d'alguns bacteris, virus i paràsits.

S'usen boles magnètiques recobertes amb anticossos contra antígens de superfície de la bactèria, permetent la seva separació i concentració de la

mostra. Les bactèries unides a les boles formen agregats per l'acció d'un d'ímant, que actua en la base del tub d'anàlisi i els inhibidors de la mostra són eliminats amb el tampó de rentat. Els microorganismes encara units a les boles poden o bé ser lisats, essent el seu ADN amplificat posteriorment en una PCR o bé sembrats en una placa de medi de cultiu. Amb aquesta tècnica, *H. pylori* s'ha detectat en aigua, femtes i terra (Enroth i Engstrand., 1995; Monteiro i col., 2001; Sasaki i col., 1999). Per exemple, Flannigan i col·laborador van optar per l'enriquiment de la mostra d'aigua prèviament a l'anàlisi per PCR davant de la impossibilitat del cultiu del microorganisme directament de l'aigua (Flannigan i col.,2003). En aquest cas, aquest tractament no va facilitar el seu cultiu però si que va permetre l'amplificació del seu material genètic per PCR.

7.5.- ATP bioluminescent

És una altra tècnica que permet l'estudi de la viabilitat del microorganisme. El mètode es basa en detectar els nivells d'ATP mitjançant la reacció bioluminescent de la luciferin-luciferasa. Aquest enzim s'activa termodinàmicament per l'energia derivada de l'ATP intracel·lular. (Lehninger i col., 1993).

És un mètode simple, ràpid i econòmic. S'aplica majoritàriament per determinar la seva viabilitat en cultius purs (Sörberg i col., 1997), en aliments i aigua ambiental tot i que en aquest cas la tècnica no permet diferenciar l'ATP del microorganisme problema del de la microbiota acompanyant. (Schram, 1991).

7.6.- Tècniques moleculars

El desenvolupament de les tècniques moleculars ha permès la detecció i identificació de microorganismes difícils de cultivar o presents en baix nombre en tot tipus de mostres (aigua, aliments, femtes, biofilms, teixits vius, terra) proporcionant una elevada sensibilitat i especificitat.

Ens els darrers anys, s'han desenvolupat noves tècniques moleculars, apart de les habituals com la PCR i la hibridació, que s'han adaptat a la detecció de *Helicobacter pylori*: PCR basada en l'amplificació aleatòria de ADN polimòrfic (RAPD *fingerprinting*), sondes d'àcid nucleopèptic PNA, hibridació *in situ* fluorescent (FISH). Els mètodes moleculars més habituals com ara la PCR i la hibridació han sofert diverses adaptacions i modificacions segons han anat avançant el coneixement de la bactèria i de la tecnologia.

7.6.1.- FISH

Recentment, s'ha demostrat que la fluorescència en hibridacions *in situ* (FISH) amb un oligonucleòtid de rRNA com a sonda és un mètode ràpid i sensible per a la detecció de *H. pylori* en mostres ambientals (Moreno i col., 2003). Aquest mètode no es veu interferit pels possibles inhibidors de la matriu. Tampoc necessita cap protocol d'extracció de ADN i el resultat es pot observar directament en la mostra. Permet la identificació de les formes viables no cultivables (Amann i col., 1995) i, en mostres clíniques, és molt més sensible que el cultiu (Rüssmann i col., 2001).

7.6.2.- PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) va rebre el premi Nobel de Química l'any 1993, vuit anys després que Mullis l'inventés (Siki i col., 1985). La idea base d'aquesta tècnica és l'amplificació d'una seqüència d'ADN flanquejada per dues regions de parells de bases conegudes. El procés consta de 3 etapes bàsiques: la desnaturalització, la hibridació i l'elongació de les cadenes a partir dels iniciadors. Les dues primeres etapes es repeteixen tants cicles com sigui necessari. Finalment, hi ha una etapa d'elongació final.

La quantitat de ADN generada incrementa geomètricament a cada cicle. El increment del N^o de copies segueix l'equació $N \times 2^c$, on N és el N^o de molècules motlle inicials i c el N^o de cicles.

Quan es necessita millorar la capacitat de detecció (mostres amb baixa concentració de ADN) i la especificitat, s'introdueix una segona amplificació sobre el producte de la primera PCR combinant un iniciador extern i un intern a la regió ja amplificada, PCR semiimbricada ("PCR seminested") o dos iniciadors interns, PCR imbricada ("PCR nested").

La PCR (Polimerasa Chain Reaction) és la tècnica molecular més usada per detectar i identificar *H. pylori* en medi ambient. Aquesta tècnica també s'aplica per amplificar el material genètic del patogen en diferents matrius com ara aigua, biòpsies, femtes humanes i animals, biofilms, sorra, llet, mosques, protozous... (Sasaki i col., 1999; Dore i col., 1999; Park i col., 2001).

L'aigua acapara gran part de la recerca d'*H. pylori* en el medi ambient. S'ha detectat en aigües d'origen molt diversos: d'aigües residuals, de riu, de basses, de pou, de font, d'aigües d'aixetes domèstiques, de mar... (Sasaki i col., 1999; Hulten i col., 1998). Degut a la dificultat que representa cultivar *Helicobacter pylori* a partir d'aigua d'ambients naturals, la tècnica de la PCR és una de les tècniques més usades per a la seva detecció. És més sensible i específica que altres tècniques més tradicionals com ara el cultiu o la hibridació però per aconseguir-ho és necessiten uns bons iniciadors que permetin la màxima especificitat.

Fins ara, no s'ha adoptat cap protocol que es pugui usar com estàndard per poder detectar i identificar aquest patogen en el medi ambient. S'apliquen PCR simples, semiimbricades i imbricades tant amb ADN com amb ARN. En el procés d'elaboració d'un protocol de PCR s'ha de tenir en compte el ADN diana, la preparació de la mostra i la densitat bacteriana. Hi ha molta diversitat de gens diana per detectar *H. pylori*: el gen de la ureasa (*ureA*), el gen que codifica per l'adhesina (*hpsA*), el gen de la citotoxina CagA (*cagA*) i el gen vacuolitzant (*vacA*)... dificultant les comparacions entre estudis (Taula 12). També és freqüent l'ús de iniciadors pel fragment del gen *16S rRNA* per detectar el gènere *Helicobacter*.

Taula 12. Gens diana per a la detecció d'*Helicobacter pylori*

Iniciadors	Fragment	Matriu	%detecció	Referència
16S rRNA	109 pb	Aigua-biofilm	-	Ho et al., 1991
		Aigua diversa	21-42%	Mazari-hiriart., 2001
	500 pb	Aigua residual	12%	Hulten i col., 1998
		Aigua dest.	12%	
		Aigua fonts	38%	
	521 pb	llet	60%	Dore 1999
ureA	200 pb	Aigua fluvial	66%	Fuyimura i col, 2004
	200 pb	Aigua de distribució	0%	Sasaki i col., 1999
		Aigua de font	8%	
		Aigua de manantial	1%	
		Aigua fluvial	3%	
		Aigua de bassa	7%	
		Aigua de tanc	0%	
	203 pb	Aigua de distribució	80%	Baker i Hegarty., 2005
Adhesina	375 pb	Aigua de distribució	50%	Hulten i col., 1996
VacA	??	llet	10%	Dore i col., 1999
CagA	307 pb	Aigua fluvial	60%	Fuyimura i col, 2004

A més a més, la veracitat dels resultats variarà en funció de la sensibilitat i especificitat dels iniciadors usats. La variació en els resultats dels anàlisis en diferents assajos d'un mateix tipus d'aigua es podria atribuir a la concentració de ADN d'*Helicobacter pylori* i/o a la presència d'inhibidors els quals interferirien en el procés d'amplificació. Per evitar aquest problema, la tècnica de la PCR es complementa amb altres protocols tant de concentració de la mostra (filtració, IMS...) com eliminació de substàncies interferents (aplicació de resines, partícules de sílice, IMS...).

Les diferents tècniques emprades en la detecció i identificació d' *Helicobacter pylori*, en especial les moleculars com ara la PCR, aporten dades i informació clau per esbrinar la transmissió del microorganisme i de la diversitat gènica entre soques.

8.- HELICOBACTER PYLORI A CATALUNYA

En aquest treball es van usar, com a mostres d'estudi, aigües procedents de rius (riu Congost, riu Noguera Ribagorçana i riu Llobregat) i de depuradores (depuradora de Sant Adrià, depuradora de Gavà-Viladecans) de diferents punts de la geografia catalana.

El riu Congost pertany a la conca fluvial del riu Besòs i travessa la zona de l'Osona i el Vallès Oriental. Els abocaments que rep aquest riu són tant d'origen urbà (aigües fecals humanes) com d'origen ramader i industrial (indústries pel·leteres, tèxtils...). La introducció de petites depuradores d'aigua dins de les mateixes indústries i el mecanisme d'autodepuració del riu redueixen el impacte ambiental dels abocaments. Tot i això, els nivells de contaminació bacteriana en l'aigua incrementen a prop de zones urbanes o industrials respecte zones més allunyades.

El riu Noguera Ribagorçana és un riu pirinenc d'orientació nord-sud de 130 km de longitud i afluent del Segre. Neix a la Vall d'Aran. Està embassat pels pantans d'Escales, de Canelles i de Santa Anna. Les mostres usades en aquest estudi es van recollir en el riu just superat el pantà de Sant Anna.

El riu Llobregat, amb un llargada de 157 km, travessa les comarques del Berguedà, el Bages i el Baix Llobregat, desembocant al Prat del Llobregat. El seu cabdal mig a Martorell és de 20,77 m³/s. El Llobregat, segons dades del Departament de Medi ambient, transporta un 60% de les aigües residuals urbanes no depurades.

L'aigua residual de la zona metropolitana de Barcelona necessita ser tractada i depurada. La xarxa de tractament d'aigües residuals de l'àrea metropolitana de Barcelona està constituïda per 7 estacions depuradores (Figura 6). L'estació depuradora d'aigües residuals (EDAR) de Gavà i la de Sant Adrià del Besòs són dos exemples de plantes situades molt a prop de zones urbanes. La contaminació fecal de les aigües que reben aquestes EDARS és molt recent.



Figura 6. EDARS de l'àrea metropolitana de Barcelona

La planta depuradora i de sanejament de Gavà-Viladecans, en funcionament des de 1986, tracta les aigües de Gavà, Viladecans, Castelldefels, Botigues de Sitges, Sant Climent de Llobregat i del sector sud est de Sant Boi i serveix a una població de 300000 habitants, equivalent a tractar 72 milions de litres al dia. Disposa d'un tractament biològic amb reducció de nutrients i regeneració d'aigua. La primera remodelació va realitzar-se al 1999 i incorporarà una infraestructura per a la reducció de nutrients i regeneració de l'aigua. La seva funció és retornar l'aigua residual i pluvial al medi en les millors condicions. Part d'aquesta aigua tractada és retornada als municipis per garantir el subministrament d'aigua per activitat agrícola, reg de zones verdes o neteja de carrers (<http://www.gavamar.com/ES/index1.php?ruta=http://www.gavamar.com/ES/depuradoramurtra.htm>; pàgina consultada a 25/04/2012)

L'estació depuradora i de sanejament de Sant Adrià del Besòs és una de les depuradores integrades en l'àmbit urbà més grans del món i la que té més capacitat de processament de Catalunya. Tracta les aigües residuals de les poblacions de Badalona, Barcelona (65%), Montgat, Sant Adrià de Besòs, Santa Coloma de Gramenet i Tiana, i part del municipi de Montcada i Reixac. Es va dissenyar per treballar amb un cabal de 535000m³/dia, podent arribar a assolir puntes màximes de 800000m³/dia i amb una capacitat de tractament equivalent a l'ús d'aigua de 3 milions d'habitants. Aquesta estació de sanejament d'aigües residuals i fluvials està en funcionament des del 1977. Fins l'any 2002, aquestes aigües es sotmetien a un pretractament i un tractament físico-químic. Des del 2003, la depuradora va iniciar un procés de remodelació integral per incorporar el tractament biològic, procés que millora la qualitat de l'aigua, i que s'aplica des de 2005. (http://www.amb.es/web/emma/aigua/sanejament/depuradores/depurador_a_besos pàgina consultada a 25/04/2012).

Capítol 2

Detecció d'Helicobacter pylori en ambients aquàtics

INTRODUCCIÓ

La introducció de mètodes moleculars ha facilitat la detecció i identificació de ADN d' *H. pylori* tant en l'ambient com en femtes. La presència d'aquest patogen mitjançant aquests mètodes ha estat estudiada en ambients aquàtics de diversos països com ara Perú, Mèxic, Japó i Suècia, entre d'altres.

Assaigs de PCR basats en diferents gens d'*Helicobacter pylori* van usar-se com mètode per detectar aquest patogen en aigües amb diferent grau de contaminació. A Perú, els investigadors es van centrar en la subunitat codificant del gen de l'adhesina per identificar el patogen en aigües de beguda (Hulten i col., 1996). Mazari-Hiriart i col·laboradors van ampliar el tipus d'aigües a analitzar, a Ciutat de Mèxic. Van ésser capaços de detectar *H. pylori* en aigües procedents de presses, fonts i d'aigües residuals tractades i sense tractament usant la PCR imbricada pel gen *16S rRNA* amb posterior confirmació per hibridació (Mazari-Hiriart i col., 2001 a). Al Japó, es van obtenir resultats positius pel gen *ureA* obtinguts per PCR imbricada que procedien de mostres tant d'aigua de beguda (aixeta com font) com de femtes d'animals (Sasaki i col., 1999). A Suècia, la presència del patogen es va evidenciar per la detecció dels gens de l'adesina i del *16S rRNA* per PCR en aigües de fonts, d'aixetes i en aigües residuals (Hulten i col., 1998).

Tot i que a Espanya la taxa de prevalença és força elevada, d'un 46% en adults i un 15% en infants, només dos grups de recerca del país s'han interessat per la presència d' *Helicobacter pylori* en ambients aquàtics (Moreno i col., 2003; Yañez i col., 2009). El grup de la Dra. Moreno va detectar el microorganisme en 2 mostres d'aigües de riu analitzades per la tècnica del FISH i només en 1 d'aigua residual emprant la tècnica de la PCR a temps final. La PCR a temps real, usada pel grup del Dr. Yañez, també va permetre detectar ADN d'*Helicobacter pylori* en 3 mostres d'aigües residuals d'un total de 40. Cap resultat positiu va obtenir-se en les 29 mostres d'aigües netes (potable i de superfície) estudiades.

En aquest capítol de la memòria, es determina la presència o absència d' *Helicobacter pylori* en aigües procedents de fonts, rius i efluent primaris de depuradores d'aigües residuals de la nostra zona geogràfica (Catalunya) i

en femtes humanes. Davant la impossibilitat d'usar el cultiu com a mètode per identificar *H. pylori* de les mostres, es va decidir emprar la reacció en cadena de la polimerasa. Dos aspectes són claus per obtenir l'èxit en aquest tipus d'estudi: un bon procés d'extracció d'àcids nucleics i uns bons iniciadors.

Tot i que durant la fase de concentració de les mostres ja s'ha eliminat part del material que podria interferir en l'anàlisi de la mostra, molt inhibidors queden retinguts en el concentrat. La presència d'inhibidors dels enzims que intervenen en la PCR és un dels problemes més habituals d'aquesta tipus de tècniques aplicades, sobretot, a estudis ambientals. Per evitar aquest problema, es convenient usar bons mètodes d'extracció i purificació de l'ADN que siguin capaços d'eliminar la major part possible d'inhibidors.

A més a més, i per poder establir una correlació entre la presència de *H. pylori* i el grau de contaminació de les aigües estudiades, es va determinar la qualitat de les aigües estudiades analitzant paràmetres microbiològics i físico-químics.

OBJECTIUS

➤ Determinar la presència d' *Helicobacter pylori* en aigües amb diferent grau de contaminació fecal (fonts, rius i aigües residuals) de la nostra àrea geogràfica emprant la tècnica de la PCR.

- Desenvolupar un mètode específic i sensible per a la detecció de ADN d'*Helicobacter pylori* en el medi aquàtic
- Detectar la presència d'*Helicobacter pylori* en les mostres d'aigua i quantificar la contaminació fecal amb l'ús d'indicadors bacterians i paràmetres fisicoquímics
- Estudiar el paper de l'aigua en la ruta de transmissió del microorganisme

➤ Determinar la presència del ADN del microorganisme en femtes humanes, com a possible origen de la seva presència en les aigües amb contaminació fecal.

➤ Comparar l'eficàcia de detecció de la tècnica d'amplificació per PCR a temps final amb la de la detecció d'antígens d'un test clínic en pacients amb patologia gastrointestinal.

MATERIALS I MÈTODES

1.- MOSTRES D'AIGUA DE FONT I DE RIU

Es van analitzar 19 mostres d'aigües procedents de 9 fonts de la zona de Centelles, a l'Osona: 3 mostres de la Font Calenta, 3 de la Font de l'Estrada, 3 de la Font de Sant Martí de Centelles, 3 de la Font del Regàs, 3 de la Font dels Enamorats, 2 mostres de la Font de Sant Pau i 1 mostra de la Font Grossa i 1 de la Font Terrades.

Es van analitzar 24 mostres d'aigües de 3 rius de Catalunya: 19 mostres procedents de 4 punts (Centelles, El Figaró, Aiguafreda i Hostalets de Balenyà) del riu Congost, 3 recollides del riu Llobregat i 2 originàries del riu Noguera Ribagorçana.

2.- MOSTRES D'AIGUA RESIDUAL

Es van analitzar 47 mostres d'aigua residual urbana de l'àrea metropolitana de Barcelona. Les mostres procedien majoritàriament de l'entrada de l'EDAR de Gavà i de l'EDAR de Sant Adrià del Besòs, situada a prop de la desembocadura del riu Besòs.

3.- MOSTRES DE FEMTES HUMANES

L'estudi de les femtes es va realitzar en col·laboració amb la unitat de Gastroenterologia de l'Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona. Es van analitzar un total de 36 mostres fecals procedents de criatures (12 nens i 24 nenes) d'edats compreses entre els 8 mesos i els 15 anys, amb un mitja d'edat de 9,8 anys amb símptomes d'alguna patologia gastrointestinal. Aquestes mostres ja havien estat analitzades al laboratori clínic amb una prova immunoenzimàtica, el test HpSA (*Premier Platinum Helicobacter stool immunoenzymatic antigen test*; Meridian Diagnostics), segons instruccions del fabricant.

Un cop analitzades totes les mostres fecals amb el test HpSA, una porció de cadascuna d'elles es va emmagatzemar en vials de plàstic a -80°C fins al seu processament.

4.- RECOL·LECCIÓ DE LES MOSTRES D'AIGUA.

Totes les mostres d'aigua es van recollir en ampolles de plàstic de 2 litres esterilitzades prèviament, transportades en contenidors isotèrmics fins al laboratori on es van analitzar en un període inferior a 4 hores des del moment de la seva recollida.

4.1.- Determinació dels indicadors fecals a les mostres d'aigua

Abans de la concentració de l'aigua, es van analitzar indicadors de contaminació fecal - coliforms totals, coliforms fecals, *Escherichia coli* i colifags somàtics - per avaluar el nivell de contaminació fecal de cadascuna de les mostres. Es va usar el mètode de filtració per membrana per quantificar els indicadors bacterians segons el protocols descrits en el *Standard Methods for the Examination of Water* (Anònim, 1998). Els coliforms totals es van incubar en medi agar Endo LES (DIFCO), durant 18 h a 37°C ± 1°C. Els coliforms fecals es van quantificar en medi FC agar (DIFCO), incubant-ho durant 18h, a 44°C±1°C. *E. coli* es va quantificar aplicant la prova de l'Indol a coliforms fecals, llegint el resultat a les 18h a una temperatura d'incubació de 37°C±1°C i establint una relació percentual. Els indicadors vírics es van valorar segons la normativa ISO 10705-2:2000, usant medi agar Scholten's modificat, a 37°C± 1°C durant 18h (Anònim, 2000). Es va mesurar la terbolesa i el pH en totes les mostres.

5.- SOQUES DE REFERÈNCIA D' *HELICOBACTER PYLORI*

Durant tot aquest treball experimental, s'han usat com a soques de referència les soques *Helicobacter pylori* 26695 i *Helicobacter pylori* SS1, cedides amablement pel Dr. Julià Gómez, de l' Hospital Clínic i Provincial de

Barcelona i per la Dra. Teresa Alarcón, de l' Hospital Universitari de La Princesa, de Madrid.

6.- ESTUDI D'*HELICOBACTER PYLORI* EN MOSTRES D'AIGUA I FEMTES

6.1.- Selecció dels medis de cultiu d'*Helicobacter pylori*

Cada medi, preparat segons instruccions del fabricant o autor, es va sembrar amb 2 soques de referència d'*H. pylori*, TYGR26695 i SS1, a partir de estocs congelats a -80°C amb l'ajuda d'un hisop (Taula 13). Els estocs congelats, en un inici, eren resuspensions del creixement bacterià de *H. pylori* SS1 i de TIGR 26695 corresponents a ¼ de placa de medi de cultiu sòlid de referència en aquells moments Columbia blood agar base (DIFCO), amb 7% de sang desfibrinada de cavall i Vitox (Oxoid). Les plaques sembrades s'incubaven durant 4-5 dies a 37°C en condicions microaeròbiques generades per un sobre productor d'hidrogen i diòxid de carboni (*Gas Generating Kit, Campylobacter system*, Oxoid). Dins la gerra d'anaerobiosi, es creava una atmosfera amb un 6% d'oxigen i un 10% de diòxid de carboni.

Taula 13. Medis de cultius sòlids usats en el cultiu d'*Helicobacter pylori*

- Agar Columbia (Scharlau) + 7% sang desfibrinada de cavall ± Vitox (Oxoid)
- Agar Columbia+ 4% sèrum fetal boví suplementat amb ferro (Oxoid)
- Agar Columbia + 4% sèrum fetal boví suplementat amb ferro + 7% sang desfibrinada de cavall
- Brain Heart Infusion Agar (BHIA; Sharlau)
- BHIA + 7% sang desfibrinada de cavall (Oxoid)
- BHIA + 4% sèrum fetal boví suplementat amb ferro
- *H. pylori* special peptone agar (HPSPA)*
- HPSPA + 7% sang desfibrinada de cavall
- HPSPA + 4% sèrum fetal boví suplementat amb ferro

* Veure annex per formulació medi. Estevenson i col., 2000

Un cop escollit el medi de cultiu per *Helicobacter pylori*, es va avaluar l'efecte de la concentració de sang desfibrinada de cavall sobre el creixement del microorganisme. Es van provar 3 concentracions de sang: 3,5%, 5% i 7%.

6.2.- Selecció del crioprotector

Es van provar 3 crioprotectors: llet descremada (40% pes/vol), glicerol (20% v/v) i sèrum albúmina bovina (BSA) (10% pes/vol) amb sacarosa (20% pes/vol), amb aigua com a solvent.

Es van preparar cultius per extensió amb nansa de Drigalsky d'una soca de referència d'*H. pylori* en plaques d'agar Columbia amb 5% de sang. Passats 3 dies d'incubació, es preparaven les suspensions bacterianes a congelar, afegint un crioprotector en cada placa amb creixement. Cada crioprotector tenia un procediment de treball diferent.

En el cas de la **llet descremada**, es van afegir directament 4 ml de la suspensió al 40% p/v sobre la placa de Petri amb el creixement bacterià. En el cas del glicerol, primer es van afegir 3,2 ml de PBS 1X estèril (veure annex) sobre la placa d'agar amb el cultiu bacterià. Es va recollir la suspensió bacteriana i després, en el tub de vidre estèril, es van afegir 0,8 ml de glicerol. Es va agitar el tub per a la correcta barreja del contingut. En el cas del **BSA** i la **sacarosa**, primer es va preparar el BSA (10% pes/vol) amb sacarosa (20% pes/vol) en una botella estèril i es va esterilitzar per filtració amb filtres de 0,22µm. Es van afegir 4 ml de PBS 1X al creixement de la placa de Petri. Es van recollir les cèl·lules bacterianes en un tub de vidre i aquesta suspensió bacteriana es va barrejar amb el crioprotector en proporció 1:1 en el tub.

En tots 3 casos, les cèl·lules bacterianes es van desenganxar de l'agar amb l'ajuda d'una nansa de Driglasky i el diluïent-crioprotector corresponent. La suspensió bacteriana es va recollir amb una pipeta automàtica amb puntes amb filtre en un tub de vidre.

De cada suspensió amb el crioprotector a provar, es va agafar una alíquota (100 µl) i es va quantificar (per dilucions decimals amb els crioprotector corresponent com a diluent) el número de cèl·lules cultivables (UFC/ml) en medi sòlid abans de congelar a -80°C. Es tornar a fer una quantificació de cèl·lules passats 2, 7 i 14 dies de congelació.

6.3.- Detecció d'àcids nucleics en mostres de femta i aigua

El procés de detecció i identificació d'àcids nucleics en mostres de l'ambient consta de varis passos:

- Preparació de les mostres a analitzar
- Extracció d'àcids nucleics del concentrat
- Amplificació enzimàtica del gen diana
- Seqüenciació del producte de la PCR semiimbricada
- Anàlisi de les seqüències

6.3.1.- Preparació de les mostres a analitzar

La elevada càrrega bacteriana de les femtes permet obtenir un concentrat bacterià òptim a partir de poc volum de mostra. El mètode de concentració usat en aquest tipus de matriu es basa en la suspensió de mostra fecal en tampó glicina a pH alcalí, en una centrifugació per eliminar la matèria particulada i en una concentració posterior de les bactèries per centrifugació.

A partir de la mostra de femta, tant fresca com congelada a -20°C, es resuspen 1 gr de matèria fecal en 10 ml de tampó Glicina 0,25M pH 10 (annex) amb l'ajuda d'un vòrtex durant uns minuts. La suspensió s'agita durant 1 h a 4°C. Es deixa sedimentar tot el material groller durant 5 min a temperatura ambient. El sobrenedant es centrifuga a 121 xg durant 15 min (Beckman Coulter Allegra X-22R Centrifuge). Les bactèries presents en el sobrenedant es concentren per centrifugació a 7740 xg durant 4 min (Beckman Coulter J2-HS Rotor JA20). Un cop finalitzada la centrifugació, es

descarta el sobrenedant i s'elueix el sediment en 0,5 ml de PBS. El concentrat final bacterià es manté en PBS a -20°C fins el moment de l'extracció dels àcids nucleics.

El volum d'anàlisi de les mostres d'aigua residual i de riu va ser de 100 ml mentre que per les mostres d'aigua de font es va treballar amb 1 L.

El primer pas per a concentrar els 100 ml d'aigua residual o de riu és eliminar la matèria grollera en suspensió per centrifugació a 121 *xg* durant 5 min. El sobrenedant es centrifuga a 7740 *xg* durant 15 min (Beckman Coulter J2-HS Rotor JA10). El pellet s'elueix en 1 ml de PBS i es centrifuga de nou a 10000 *xg* durant 5 min (Eppendorf Centrifuge 5415C). S'elimina el sobrenedant i es resuspen el pellet en 50 µl de PBS. El concentrat final bacterià es guarda a -20°C fins el moment de l'extracció dels àcids nucleics.

El volum de treball d'aigua de font és de 1 L. El procés de concentració varia, afegint un pas més de concentració per centrifugació al tractar-se d'un volum més gran i d'aigua més neta. Es concentren les bactèries de la mostra amb una centrifugació a 7740 *xg* durant 15 min (Beckman Coulter J2-HS Rotor JA10) i el sediment s'elueix en 4 ml de PBS i es torna a centrifugar a 7740 *xg* durant 15 min (Beckman Coulter J2-HS Rotor JA20). Es resuspen el pellet amb 1 ml de PBS i es concentra de nou a 10000 *xg* durant 5 min (Eppendorf Centrifuge 5415C). S'elimina el sobrenedant i es resuspen el sediment en 50 µl de PBS 1. Es guarda a -20°C fins el moment de l'extracció dels àcids nucleics.

6.3.2.- Extracció d'àcids nucleics dels concentrats bacterians d'aigua i de femtes

Per determinar quin era el mètode més apropiat per extreure els àcids nucleics d'*Helicobacter pylori* en mostres d'aigua i de femta, primer es va treballar amb suspensions bacterianes de soques de referència de *H. pylori*, SS1 i TIGR26695. En cada suspensió només s'usava una de les dues soques de referència. Aquesta suspensió es preparava en 4 ml aigua bidestil·lada estèril a partir d'un creixement confluent en placa. Aquesta suspensió es va

rentar centrifugant-la a 7740 xg durant 5 minuts per eliminar les restes de medi i sang. El sediment es va resuspendre en 50 μ l de PBS i, posteriorment, s'hi va aplicar cadascun dels mètodes a avaluar.

Es va estudiar l'eficàcia de 4 mètodes d'extracció d'àcids nucleics bacterians:

□ **Ebullició**

Els 50 μ l de concentrat bacterià es sotmet a lisi tèrmica (100°C durant 10 min) i a continuació es realitza un xoc tèrmic (-20°C durant 5 min). Es centrifuga la suspensió a 16000 xg durant 3 min. El pellet amb els àcids nucleics s'elueix en 50 μ l de PBS.

□ **Kit comercial Instagene 6% (BioRad)**

S'afegeixen 200 μ l de la solució A, 200 μ l de la solució B del kit comercial i 9,6 ml de proteïnasa K (elimina proteïnes acompanyants i purifica més l'extracte d'àcids nucleics) al concentrat bacterià. S'incuba a 55°C durant 1 hora. S'afegeixen 200 μ l d'Instagene 6% (matriu que arrastra possibles proteïnes restants) i es torna a incubar a 55°C durant 15 min més. Per termobloquejar la proteïnasa K, es bull la suspensió durant 10 min. S'eliminen les restes cel·lulars per centrifugació a 16000 xg durant 3 min. El sobrenedant amb els àcid nucleics es congela a -20°C.

□ **Precipitació del material genètic segons protocol descrit per Pitcher i col., 1989**

Aquest mètode es basa en l'ús del tiocianat de guanidina, cloroform i alcohols (2-propanol i etanol 70%). A la suspensió bacteriana concentrada s'afegeixen 500 μ l de tampó d'extracció amb tiocianat de guanidina, EDTA i sarcosil (Veure annex). La suspensió s'homogeneïtza amb un vòrtex durant 2 min. S'afegeixen 250 μ l d'acetat d'amoni 7,5 M i es manté en gel durant 10 min. S'afegeixen 500 μ l d'una solució de cloroform:2-pentanol (24:1) i es centrifuga a 25000 xg durant 10 min. Es recupera el sobrenedant i s'afegeixen 0,54 volums de 2-propanol. S'agita durant 1 min i es precipita l'ADN per centrifugació a 6500 xg durant 20 segons. Es renta el precipitat afegint etanol fred al 70%, centrifugant a 10000 xg durant 15 seg i eliminant

el sobrenedant. Aquesta operació es repeteix 3 cops. El precipitat s'asseca al *speed-vac* durant 20 min. El precipitat es dissol en 100 µl d'aigua bidestil·lada estèril. Es guarda a -20°C.

□ **Precipitació del material genètic segons protocol descrit per Boom i col·laboradors (1990)**

Aquest mètode es caracteritza pel tampó de lisi compost per guanidina, Tris-HCl, EDTA i detergent (Tritó X-100) i per la incorporació de partícules de sílice a la barreja (veure annex). Els àcids nucleics s'adsorbeixen a aquestes partícules permetent l'eliminació de substàncies nocives per a l'ADN i inhibidors de la PCR durant el posterior rentat.

S'afegeixen 50 µl de partícules de sílice i 500 µl de tampó de lisi a la suspensió bacteriana concentrada. S'homogeneïtza amb vòrtex 5 segons i es deixa reposar a temperatura ambient durant 10 min. Es centrifuga a 10000 *xg* durant 5 segons (Eppendorf Centrifuge 5415C). Es descarta el sobrenedant i el pellet es renta amb 1 ml de tampó de rentat (veure annex). Es centrifuga durant 15 segons i s'elimina el sobrenedant. Es fa un segon rentat. Es renta 2 cops amb etanol 70% i un amb acetona. S'elimina la acetona per evaporació en un bany a 56°C (mantenir els tubs *Eppendorf* amb el tap obert per facilitar l'evaporació de la acetona). S'afegeixen 50 µl de tampó d'elució (veure annex) per eluir els àcids nucleics de les partícules de sílice. S'incuba a 55°C durant 10 min més. Es centrifuga a 10000 *xg* durant 2 min per precipitar totes les partícules de sílice lliures d'àcids nucleics. Es recupera el sobrenedant amb els àcids nucleics i es traspassa a tubs nets evitant agafar partícules de sílice perquè inhibeixen el procés d'amplificació del material genètic. Es guarda a -20°C.

En cada ronda de mostres, l'extracció d'àcids nucleics es feia conjuntament amb un control negatiu (aigua bidestil·lada) que es processava de la mateixa manera que la resta de mostres per descartar qualsevol contaminació dels materials i tampons utilitzats durant el procés d'extracció.

Finalment, es va preparar un banc de dilucions decimals amb els àcids nucleics de la soca SS1 extrets amb el mètode de Boom i de Pitcher per

compara i determinar quins dels dos era més eficient i proporcionava una millor senyal d'amplificació.

6.3.3.- Elecció i optimització de la reacció d'amplificació enzimàtica del gen diana ureA

La detecció de la subunitat A de la ureasa de *Helicobacter pylori* en aquest estudi es va realitzar amb una PCR semiimbricada. Aquesta consistia en amplificar la regió compresa entre el nucleòtids 304-714 del gen de la ureasa, tenint com a referència el gen de la ureasa del EMBL amb número d'accés X17079 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/43633>; pàgina web consultada a abril de 2012).

En la primera reacció de PCR, es van usar els iniciadors de la primera PCR usats per Clayton, HPU1 i HPU2 (Clayton i col., 1992), amb una mida de producte resultant de 411pb. En la PCR semiimbricada, es va introduir un iniciador intern a la regió amplificada, el HPUI1, i es va mantenir com a iniciador extern el HPU2. La mida de l'amplicó final és de 155 pb (Taula 14).

Taula 14. Iniciadors usats en la PCR directa (D) i PCR semiimbricada (SI) per a la amplificació del gen *UreA*, orientació dels iniciadors, seqüència i mida de l'amplicó.

Iniciador	Reacció de PCR	Orientació	Seqüència	Mida fragment	
				1a PCR	2a PCR
HPU1	D	Fwd.	5'GCCAATGGTAAATTAGTT3'	411 pb	
HPU2	D, SI	Rev.	5'CTCCTTAATTGTTTTTAC3'		
HPUI1	SI	Fwd.	5'ATTGACATTGGCGGTAAC3'		155 pb

Tot el procés implicava la preparació de dos barreges d'amplificació diferents amb un volum de treball final de 50 µl.

Per a la primera PCR de 30 cicles, es prepara la barreja de reacció n^o1 (Taula 15).

Taula 15. Components de la barreja de reacció de PCR n^o1

Component	Volum (V _{final} 50µl)	[] final
10X PCR Buffer II	5 µl	1X
MgCl ₂ 25 mM	4 µl	2 mM
dNTP's 25 mM	0,5 µl	0,25 mM
Iniciador HPU1 25 µM	1 µl	0,5 µM
Iniciador HPU2 25 µM	1 µl	0,5 µM
AmpliTaQ 5 U ₍₁₎	0,4 µl	2 U
H ₂ O bidestil·lada	fins a 28,1 µl	-
Volum de mostra	10 µl	-

*En vermell, els canvis respecte la barreja inicial.

(1) Applied Biosystems, California.

Un cop finalitzat els primers 30 cicles d'amplificació es prepara la barreja de reacció n^o2 per a la PCR semiimbricada (Taula 16). Aquesta barreja té la mateixa composició que la barreja 1 a excepció de l'iniciador HPU1 que es substitueix per l'iniciador intern (HPUI1) i la quantitat d'aigua, que incrementa perquè es redueix el volum de mostra (1 µl del producte de cada mostra de la primera PCR) . El protocol consta de 35 cicles.

Taula 16. Components de la barreja de reacció de PCR n^o2 per a la PCR semiimbricada

Component	Volum (V _{final} 50µl)	[] final (V _{final} 50µl)
10X PCR Buffer II	5 µl	1X
MgCl ₂ 25 mM	4 µl	2 mM
dNTP's 25 mM	0,5 µl	0,25 mM
Iniciador HPUI1 25 µM	1 µl	0,5 µM
Iniciador HPU2 25 µM	1 µl	0,5 µM
AmpliTaQ 5 U ₍₁₎	0,4 µl	2 U
H ₂ O bidestil·lada	fins a 37,1 µl	-
Producte 1a PCR	1 µl	-

En vermell, els canvis respecte la barreja inicial.

(1) Applied Biosystems, California.

Abans de posar els tubs amb la barreja d'amplificació dins dels termocicladors, es centrifuguen suaument durant uns segons. Les reaccions

d'amplificació tenien lloc en un termociclador programable (*Gene Amp PCR System 2400*, Perkin Elmer).

El procés d'amplificació constava dels següents passos:

- | | | |
|---|---------------------------|--------------|
| ➤ | Desnaturalització inicial | 5 min a 95°C |
| ➤ | Desnaturalització | 1 min a 94°C |
| ➤ | Anellament | 1 min a 45°C |
| ➤ | Elongació | 1 min a 72°C |
| ➤ | Elongació final | 5 min a 72°C |

La fase de desnaturalització, anellament i elongació durant la primera PCR consta de 35 cicles mentre que en la semiimbricada aquestes fases es repeteixen 30 vegades. Un cop finalitzat el procés, el termociclador mantenia les mostres a 4°C.

Cadascuna de les mostres es va analitzar per duplicat. Un volum de 10 µl d'extracte d'àcids nucleics equival a un volum de mostra de 20-200 ml inicials, tenint en compte que partim de 100-1000 ml inicials d'aigua que es concentra en 50 µl. Es va introduir 1 tub com a control positiu d'amplificació amb ADN de soca de referència *H. pylori* 26695, obtingut per ebullició i 1 tub com a control negatiu amb aigua destil·lada. Tant el control positiu com el control negatiu del processos d'extracció i d'amplificació s'introduïen en la bateria de tubs com una mostra més en el procés d'amplificació i per identificar contaminacions creuades.

D'altra banda, l'extracció del ADN, la preparació de la barreja d'amplificació, l'addició del ADN del motlle, l'amplificació i el gel d'electroforesi es van realitzar en habitacions diferents.

6.3.4.- Optimització de la reacció d'amplificació enzimàtica del gen diana 16S rRNA

El gen 16S rRNA també es va detectar per PCR semiimbricada dirigida al fragment del gen 16S rRNA específic del gènere *Helicobacter* segons els iniciadors descrits per Goto i col. (2000) i segons el protocol descrit per Abu Al-Soud i col. (2003), amb algunes modificacions. La seqüència de nucleòtids dels iniciadors i la mida del producte d'amplificació es detallen en la taula 17.

Taula 17. Seqüència de nucleòtids del gen 16S rRNA usats per a la PCR d'identificació de gènere *Helicobacter* (Goto i col., 2000)

Iniciador	Nº pb	Seqüència	Mida fragment	
			1a PCR	2a PCR
16S 1R	18	5'CTCACGACACGAGCTGAC3'	782 pb	433 pb
16S 1F	18	5'CTATGACGGGTATCCGGC3'		
16S 2R	20	5'TCGCCTTCGCAATGAGTATT3'		

En la taula 18, es detallen els reactius utilitzats per preparar la barreja de reacció de la primera PCR amb un volum final de 25 µL, 20 µL de barreja i 5 µL d'ADN motlle.

Taula 18. Reactius utilitzats per a l'amplificació dels gen 16S rRNA en la primera PCR

Component	Volum (Vfinal 25µl)	[] final
"Chelating Buffer" ⁽¹⁾	2,5 µl	1X
MgCl ₂ 25 mM	2,5 µl	2,5 mM
dNTP's 25 mM	1 µl	1 mM
Iniciador 16S 1F 10 µM	1,25 µl	0,5 µM
Iniciador 16S 1R 10 µM	1,25 µl	0,5 µM
rTth 2,5 U/ µl ⁽¹⁾	0,5 µl	1,25 U
BSA 4%	2,5 µl	0,4%
H ₂ O bidestil·lada	8,5 µl	-
Volum de mostra	5 µl	-

(1) Applied Biosystems, California

En la taula 19, es detallen els reactius utilitzats per preparar la barreja de reacció de la PCR semiimbricada per al gen *16S rRNA* amb un volum final de 25 µL. En aquest cas, la mostra procedeix de diluir 25 µl d'amplificat de la primera PCR en 200 µl d'aigua bidestil·lada.

Taula 19. Reactius utilitzats per a l'amplificació dels gen *16S rRNA* en la PCR semiimbricada.

Component	Volum (V _{final} 25µl)	[] final
Buffer II 10 X	2,5 µl	1X
MgCl ₂ 25 mM	2,5 µl	2,5 mM
dNTP's 25 mM	1 µl	1 mM
Iniciador 16S 1F 10 µM	1,25 µl	0,5 µM
Iniciador 16S 2R 10 µM	1,25 µl	0,5 µM
Amplitaq Gold 5 U ⁽¹⁾	0,2 µl	0,04 U
H ₂ O bidestil·lada	11,3 µl	-
Producte 1a PCR	5 µl	-

(1) Applied Biosystems, California

El procés d'amplificació es va realitzar en un termociclador Perkin Elmer model 2400, amb un programa de 30 cicles per la primera PCR i de 35 cicles per la PCR semiimbricada, segons les condicions descrites a continuació.

El procés d'amplificació de la primera PCR per al gen *16S rRNA* per a identificació del gènere *Helicobacter* constava dels següents passos:

- Desnaturalització inicial 2 min a 94°C

- Desnaturalització 30 segons a 94°C
- Anellament "*annealing*" 30 segons a 55°C
- Elongació 30 segons a 72°C

- Elongació final 7 min a 72°C

La fase de desnaturalització, anellament i elongació durant la primera PCR consta de 30 cicles. En la PCR semiimbricada, la fase de desnaturalització

inicial s'allarga fins als 10 minuts a 94°C i tot el procés consta de 35 cicles. Un cop finalitzat el procés, el termociclador mantenia les mostres a 4°C.

La mida de l'amplicó final és de 433 pb.

En cada amplificació es va introduir 1 control negatiu d'extracció de la mostra, un control negatiu de barreja de reactius i 1 control positiu d'ADN de la soca TIGR 26695 d'*Helicobacter pylori*.

6.3.5.- Electroforesi i visualització dels amplicons

Els resultats es van visualitzar per electroforesi en gel d'agarosa al 2% (Ecogen) en TBE 1X. Es va aplicar un camp isoelèctric de 80 V durant 70 minuts. El volum total de càrrega va ser de 10 µl de mostra amb 3 µl de tampó de càrrega. Com a marcador de pes molecular es van usar ØX174 (Sigma) (veure Annex).

La visualització de la banda amplificada es va fer per tinció amb bromur d'etidi (0,5 µg/mL) durant 15 minuts i posterior rentat amb aigua. Les bandes tenyides es van visualitzar i fotografiar en el sistema ImageMaster®UDS (Pharmacia-Biotech).

6.3.6.- Seqüenciació de l'amplicó del gen ureA i del gen 16S rRNA

6.3.6.1.- Purificació de l'amplicó

El procés de seqüenciació constava de la purificació del producte de la PCR semiimbricada, de la PCR de seqüenciació, de la lectura d'aquest producte en un analitzador genètic i, finalment, de l'anàlisi de similitud de les seqüències.

La purificació del fragment del gen *ureA* de 155 pb i del gen *16S rRNA* de 433 pb podia fer-se directament a partir del producte d'amplificació o a partir del fragment de la banda corresponent en el gel d'agarosa.

La **purificació directament a partir del producte d'amplificació** es realitza quan s'obté una sola banda, sense bandes inespecífiques, en el gel d'agarosa. El kit que es va usar per aquesta aplicació és el QIAquick PCR Purification kit de Qiagen. Es barregen 5 volums de tampó PB (150 µl) proporcionat pel kit, en 30 µl de producte de PCR. Es passa la barreja per una columna de purificació en un tub de 2 ml i es centrifuga a 10000 *xg* durant 1 min (Eppendorf Centrifuge 5415C). Es llença el filtrat i la columneta es renta amb 750 µl de tampó PE del kit, centrifugant-la a 10000 *xg* durant 1 min. A continuació, es fa un centrifugació per eliminar restes del tampó. Es col·loca la columneta dins tub de 1,5 ml, s'afegeixen 50 µl de tampó EB (10mM Tris-CL, pH 8.5) per eluir el ADN i s'incuba durant 1 min a temperatura ambient. Per recuperar l'ADN purificat, la columneta es torna a centrifugar a 10000 *xg*. L'ADN purificat es guarda a -20°C.

La **purificació de l'ADN a partir del gel d'agarosa** s'aplica quan en el procés d'amplificació de la mostra es generen seqüències inespecífiques de diferents mides a part de l'esperada. Aquest fenomen és freqüent en mostres ambientals. Es selecciona el fragment d'interès directament en el moment de la visualització dels resultats en el gel d'agarosa, descartant les bandes d'altres mides. Sota la llum ultraviolada d'un transil·luminador i amb l'ajut d'una fulla de bisturí, es retalla el gel d'aquesta banda i el cub d' agarosa amb el ADN es reserva en un tub *Eppendorf* per a la seva purificació.

L'ADN es purifica amb columnes de purificació Ultrafree-DNA (Millipore), segons instruccions del fabricant.

6.3.6.2.- PCR de seqüenciació

Per seqüenciar les dues cadenes complementàries dels productes d'amplificació de les mostres s'usava el kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.0 amb la AmpliTaq ADN polimerasa FS. La quantitat d'ADN purificat que es seqüenciava depenia de la intensitat de la banda obtinguda, que oscil·lava entre els 3 i els 4 µl.

En un tub Eppendorf, es barreja la suspensió de terminadors (Big Dye v1.0, Applied Biosystems), els iniciadors corresponents, l'ADN purificat a seqüenciar i l'aigua destil·lada. S'han de preparar dos barreges de seqüenciació per mostra, una per cada iniciador del gen diana (Taula 20).

Taula 20. Components de la barreja de seqüenciació

Component	Volum
Suspensió de terminadors	4-3 µl
Iniciador (3,2 µM)	0,5 µl
ADN purificat	3-4 µl
H ₂ O	Fins a 10 µl

La barreja de la reacció de seqüenciació es preparava en una vitrina de flux horitzontal, es repartia el volum de barreja corresponent en funció de la quantitat d'ADN en els tubs Eppendorf de 0,2 ml i l'ADN purificat s'afegia en un altre zona del laboratori. Es centrifugava tot suaument durant uns segons i s'incubava en un termociclador programable per la reacció de seqüenciació (Gene Amp PCR System 2400; Perkin Elmer).

El programa de la reacció de seqüenciació és el següent:

- 10 seg a 96°C
- 5 seg a 50°C
- 4 min a 60°C

Aquest passos es repetien durant 25 cicles. Un cop finalitzat el procés, el termociclador mantenia les mostres a 4°C.

L'ADN seqüenciat es neteja de resta de terminadors per precipitació amb diferents concentracions d'etanol, per poder-lo analitzar i llegir posteriorment. S'afegeixen 64 µl d'etanol al 95% fred i 26 µl d'aigua bidestil·lada a 10 µl del producte de la PCR de seqüenciació. Es barreja suaument amb l'ajuda d'un vòrtex durant uns segons. Es manté a temperatura ambient durant 15 min. Es centrifuga a 10000 *xg* durant 20 min

(Eppendorf Centrifugue 5415C). S'elimina el sobrenedant i s'afegeixen 200 µl d'etanol al 70%. Es torna a centrifugar a 10000 *xg* (Eppendorf Centrifugue 5415C) durant 5 min i es descarta el líquid sobrenedant. Es centrifuga de nou a 10000 *xg* durant 2 min i s'asseca l'ADN amb un Speed-Vac durant 10 min. Aquest ADN net es conserva a -20°C.

6.3.6.3.- Lectura i anàlisi de les seqüències

Les seqüències precipitades es van llegir en un seqüenciador automàtic ABI PRISM™ 3700 (Applied Biosystems, USA) en els Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Les seqüències resultants eren comparades amb les dipositades en el GenBank usant el programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). S'obtenia el percentatge d'homologia amb espècies ja emmagatzemades en la base de dades, permeten la identificació de la espècie bacteriana de la mostra.

6.4.- Límit de detecció i especificitat de la reacció de PCR

La sensibilitat de l'assaig de PCR semiimbricada per a la detecció del fragment de la seqüència del gen *ureA* i del gen *16S rRNA* va ser avaluada amplificant l'ADN genòmic de cultius purs d'*H. pylori* SS1 i *H. pylori* 26695 de dilucions decimals seriades, fins a 10⁻⁸, a partir d'una concentració de cèl·lules viables cultivable coneguda. Aquesta concentració es va determinar per densitat òptica a λ de 620 nm i per cultiu en placa a partir del banc de dilucions.

A partir d'una suspensió bacteriana procedent d'un cultiu sòlid es va preparar un banc de dilucions, 10⁻¹ a 10⁻⁸, amb PBS 1X amb un volum final de 1 ml. Les cèl·lules es quantificaven per cultiu en agar Columbia suplementat amb 5% de sang desfibrinada de cavall. En el cas del gen *ureA*, es va usar el mètode de Boom per extreure el ADN de cada dilució. En el cas del gen *16S*

rRNA, el ADN es va extreure de cada dilució per ebullició durant 10 minuts, xoc tèrmic durant 5 minuts i posterior centrifugació a 14000 rpm durant 10 minuts.

Amb aquest material es va avaluar la sensibilitat de detecció de la reacció de PCR semiimbricada amb els iniciadors pel gen *ureA* i del gen *16S rRNA*, determinant quina era la dilució més gran detectable (límit de detecció).

La especificitat dels iniciadors del gen *ureA* d'*H. pylori* es va avaluar intentant amplificar ADN de *Campylobacter jejuni* DSMZ 4688 i d'*Escherichia coli* WG5 ATCC700078.

RESULTATS

1.- ELECCIÓ DEL MEDI DE CULTIU I CRIOPROTECTOR

Helicobacter pylori és un organisme "fastidiós", difícil de fer-lo créixer en el laboratori.

Per tal d'escollir el medi de cultiu sòlid adient es va plantejar una combinació de varis medis de cultiu en placa amb varis suplementes a partir dels ja publicats per altres autors i es va avaluar la seva eficàcia.

Es va observar el grau de creixement de *H. Pylori* 26695 i SS1 sobre cadascun dels medis de cultiu escollits sobre la placa de Petri. Es van sembrar amb nansa per esgotament, per triplicat i tots es varen incubar en les mateixes condicions, durant 4-5 dies a 37°C en condicions microaeròbiques. També es va observar la mida de 10 colònies per determinar l'efecte de la composició del medi de cultiu sobre el creixement de la colònia bacteriana (Taula 21).

Taula 21. Resum de l'anàlisi del creixement de les bactèries *H. pylori* de les soques SS1 i TYGR26695 en els diferents medis de cultiu

Medi de cultiu	Grau de creixement	Mida colònia
• Agar Columbia + 7% sang desfibrinada de cavall + Vitox	++	>1 mm
• Agar Columbia + 7% sang desfibrinada de cavall	++	1 mm
• Agar Columbia + 4% sèrum fetal boví supl. Fe	+	1 mm
• Agar Columbia + 4% sèrum fetal boví supl. Fe + 7% sang desfibrinada de cavall	+	1 mm
• BHIA	+	< 1 mm
• BHIA + 7% sang desfibrinada de cavall	+	1 mm
• BHIA + 4% sèrum fetal boví supl. Fe	+	< 1 mm

Medi de cultiu	Grau de creixement	Mida colònia
• HPSPA	+	< 1 mm
• HPSPA + 7% sang desfibrinada de cavall	+	< 1 mm
• HPSPA + 4% sèrum fetal boví supl. Fe	+ -	< 1 mm

+ - molt poc creixement
 + poc creixement
 ++ bon creixement

Les dues soques de referència creixien amb més o menys èxit en tots els medis provats. Passat el temps d'incubació habitual (4-5 dies), els medis de cultiu més efectius van ser els que tenien com a base l'agar Columbia suplementats només amb sang desfibrinada de cavall o amb sang desfibrinada de cavall i el suplement Vitox. El diàmetre de les colònies va variar en funció de la composició del medi i dels suplementes afegits. Els millors resultats es van obtenir amb el medi Columbia amb els diferents suplementes, amb colònies amb 1 mm de diàmetre. Les colònies més grans van créixer amb el suplement Vitox.

Tal com els resultats mostren, el suplement Vitox és molt efectiu pel creixement del microorganisme ja que incrementava lleugerament la mida de la colònia facilitant el seu comptatge. Però aquest fet no és prou avantatjós per l'increment econòmic que implica i, per tant, es va descartar com a suplement rutinari del medi de cultiu. Per aquesta raó i inicialment, **l'agar Columbia amb 7% de sang desfibrinada** de cavall va ser el medi de cultiu escollit per obtenir un bon creixement d'*H. pylori* i un òptim diàmetre de colònia.

A continuació, es va avaluar si la reducció de la concentració de sang afectava al creixement del microorganisme, provant-se 3 concentracions de sang: 3,5%, 5% i 7%. Es va observar un bon creixement tant en 5% com amb 7% de sang (Taula 22).

Taula 22. Grau de creixement de *H. pylori* en medi Columbia suplementat amb diferents concentracions de sang desfibrinada de cavall

Concentració de sang	Grau de creixement
3,5%	-
5%	++
7%	++

Finalment, el medi de cultiu que es va escollir per usar durant tot el treball experimental va ser **agar Columbia suplementat amb un 5% de sang desfibrinada de cavall**.

Per determinar quin era el crioprotector més efectiu per conservar i emmagatzemar *H. pylori* es van testar 3 crioprotectors (llet descremada, glicerol i BSA), habitualment usats en microbiologia. En la taula 21 es recullen els valors promigs de les cèl·lules bacterianes cultivables de la sòca *H. pylori* SS1 abans i després del procés de congelació.

Taula 23. Valor promig de la recuperació d'*H. pylori* SS1 amb diferents crioprotectors, amb una n=5.

Crioprotector	Abans	Després congelació *		
	congelació *	2 dies	7 dies	14 dies
Llet descremada 40% p/v	$2,78 \cdot 10^8$ ($\pm 3,1 \cdot 10^7$)	$1,88 \cdot 10^7$ ($\pm 1,75 \cdot 10^6$)	$1,49 \cdot 10^8$ ($\pm 9,19 \cdot 10^6$)	$8,90 \cdot 10^7$ ($\pm 4,24 \cdot 10^6$)
Glicerol (20% v/v)	$2,51 \cdot 10^7$ ($\pm 6,93 \cdot 10^6$)	$7,72 \cdot 10^6$ ($\pm 7,35 \cdot 10^5$)	$1,12 \cdot 10^8$	$7,80 \cdot 10^6$ ($\pm 1,7 \cdot 10^6$)
BSA (10% p/v) + Sacarosa (20% p/v)	$1,80 \cdot 10^7$ ($\pm 1,41 \cdot 10^5$)	$1,97 \cdot 10^7$ ($\pm 4,24 \cdot 10^5$)	$2,78 \cdot 10^8$ ($\pm 2,83 \cdot 10^7$)	$6,35 \cdot 10^7$ ($\pm 1,2 \cdot 10^7$)

*Els valors promig s'expressen en unitats formadores de colònia (UFC) x ml⁻¹ ± desviació estàndard

Després d'avaluar el grau de recuperació de *H. pylori* SS1 amb els 3 crioprotectors i tot i que els altres 2 crioprotectors també oferien bons nivells de recuperació, la **llet descremada** es va escollir com a crioprotector rutinari del nostre treball essent determinant la seva facilitat de treball i baix cost econòmic.

2.- ELECCIÓ DELS INICIADORS DE LA PCR

Per analitzar la presència d'*Helicobacter pylori* en les aigües d'aquest estudi per la tècnica de la PCR, es van escollir iniciadors específics per un fragment de la ureasa (*ureA*) per una determinació a nivell d'espècie i del gen *16S rRNA*, a nivell de gènere.

2.1.- Iniciadors pel gen *ureA*

El nostre punt de partida va ser l'estudi que va dur a terme Clayton i el seu equip per a detectar el gen de la ureasa A (Clayton i col., 1992). En aquest estudi, per detectar el gen *ureA* es va utilitzar una PCR a temps final seguida d'una hibridació per Southern a partir del ADN amplificat amb una sonda HPUI1 marcada amb ³²P.

En el nostre estudi, es va adoptar la PCR simple desenvolupada per Clayton amb els iniciadors pel gen *ureA*, HPU1 i HPU2, amb la modificació d'alguns paràmetres. Tot i que amb la tècnica de la hibridació seguida per aquests investigadors s'obtenia una bona sensibilitat de detecció, nosaltres vam decidir substituir aquest mètode per una segona PCR semiimbricada ja que aquesta permetria obtenir resultats més ràpidament.

Per poder introduir la PCR semiimbricada, es va haver de seleccionar quin seria el parell d'iniciadors pel segon pas de la PCR. Com iniciador intern de la PCR semiimbricada es va decidir usar la seqüència de la sonda HPUI1 que Clayton havia emprat per fer la hibridació en el seu treball.

Es va escollir l'iniciador HPU2 com a parella de l'iniciador HPUI1 en la PCR semiimbricada, ja que amplificava el gen de la ureasa en els 2 volums d'extracte d'àcids nucleics usats (Figura 7).



Figura 7. Detecció del gen *ureA* d'*H. pylori* soca SS1 per PCR semiimbricada en gel d'agarosa al 3%.
1: 1 µl amplicó 411 pb amb iniciadors HPU2 i HPUI1;
2: 10 µl amplicó 411 pb amb iniciadors HPU2 i HPUI1;
M: Marcador d pes molecular ØX174.

Amb aquests resultats es va decidir mantenir els iniciadors de la primera PCR, HPU1 i HPU2, publicats per Clayton l'any 1992 i introduir en la PCR semiimbricada un iniciador intern, HPUI1, a la regió ja amplificada i mantenint HPU2 com a extern.

2.2.- Iniciadors pel gen *16S rRNA*

Es van usar els mateixos iniciadors descrits per Goto i col (2000) però introduint una PCR semiimbricada enlloc d'una imbricada. Per a la primera reacció de PCR és van usar l'iniciador *forward* 1F i l'iniciador *reverse* 1R. Per a la segona reacció de PCR és van usar l'iniciador *forward* 1F i un segon iniciador *reverse* 2R.

3.- SELECCIÓ DEL PROTOCOL D'EXTRACCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

Es van provar quatre mètodes d'extracció d'àcids nucleics: mètode descrit per Pitcher (Pitcher i col., 1989), mètode descrit per Boom (Boom i col., 1990), mètode usant Instagene i per ebullició.

L'eficàcia d'extracció de cadascun dels mètodes provats es va avaluar comparant la intensitat de la banda resultant del gen *ureA* de la primera amplificació d'una mida de 411 pb i la banda de la PCR semiimbricada d'una mida de 155 pb (Figura 8).

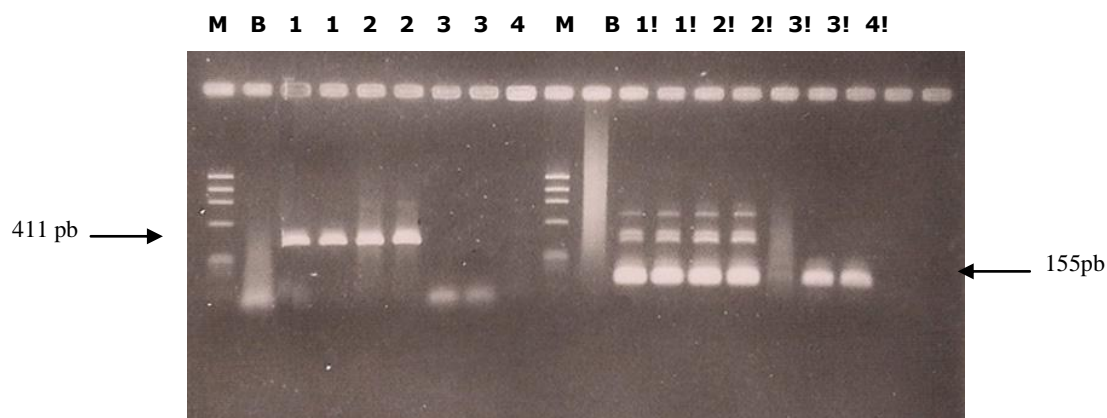


Figura 8. Senyal d'amplificació d'*ureA* d'*H. pylori* SS1 de la PCR simple (1, 2, 3 i 4) i de la PCR semiimbricada (1!, 2!, 3! i 4!) en gel d'agarosa 1,5% a partir de diferents mètodes d'extracció d'àcids nucleics:

M:marcador de pes molecular ØX174.

B: Barreja de reacció sense mostra

1: Extracció pel mètode descrit per Pitcher i col., 1989

2: Extracció pel mètode descrit per Boom i col., 1990

3: Extracció usant kit d'Instagene

4: Extracció per ebullició

Bullir la mostra a 100°C permetia obtenir gran quantitat d'ADN ràpida i fàcilment a partir d'un cultiu pur. Però l'elevada concentració de material genòmic que en resultava inhibia la primera PCR (Figura 8 columna 4). El senyal d'amplificació de l'amplicó millorava en la reacció semiimbricada (Figura 8 columna 4!). Posteriorment, es va comprovar que aquest mètode era poc eficaç quan s'usava en aigua residual. Per tant, l'ebullició només es

va usar en processos on s'usaven soques de referència en cultius purs, lliures de partícules en suspensió i d'inhibidors.

El kit Instagene es va descartar ja que els resultats eren molt similars als de Boom i Pitcher però amb un cost econòmic més elevat (Figura 8 columnes 3 i 3!). .

Els mètodes de Pitcher i Boom van ser els més eficaços alhora d'extreure l'ADN ja que el van purificar suficientment d'inhibidors per a obtenir una bona amplificació. Es van fer dilucions decimals a partir d'una mateixa suspensió bacteriana i es va extreure el ADN usant els dos mètodes. Es va treballar fins a la dilució 1:10⁵. En la primera PCR, el mètode de Pitcher va permetre visualitzar dèbilment fins a la dilució 1:10³ mentre que el de Boom ho feia fins a la 1:10⁵ (Figura 9, A i B).

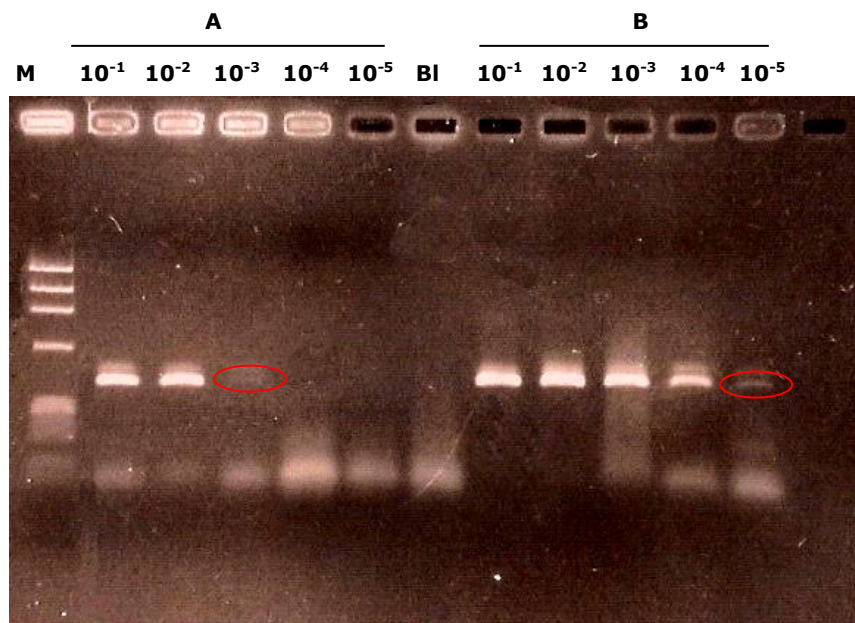


Figura 9. Senyal d'amplificació d'*ureA* d'*H. pylori* de la PCR simple en gel d'agarosa 1,5% de dilucions seriades d'ADN d'*H. pylori* SS1 extret pel mètode de Pitcher (**A**) i pel mètode de Boom (**B**). **M**:marcador de pes molecular ØX174. **BI**: Barreja de reacció sense mostra

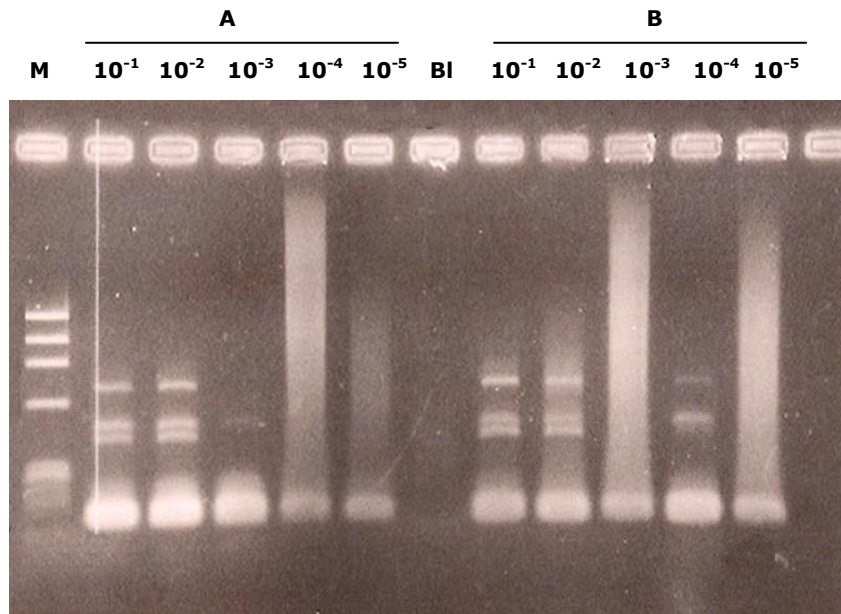


Figura 10. Senyal d'amplificació d'*ureA* d'*H. pylori* de la PCR semiimbricada en gel d'agarosa 1,5% de dilucions seriades d'ADN d'*H. pylori* SS1 extret pel mètode de Pitcher (**A**) i pel mètode de Boom (**B**). **M**:marcador de pes molecular ØX174. **BI**: Barreja de reacció sense mostra

En canvi, els dos protocols mostraven una efectivitat molt similar quan es realitzava la PCR semiimbricada, arribant a la dilució 1:10⁵. Tot i això, la banda corresponent als 155pb era més intensa quan l'ADN s'havia extret pel mètode de Boom (Figura 10).

Tots aquests resultats van condicionar l'elecció del **mètode de Boom** com el protocol d'extracció d'àcids nucleics més adequat al nostre treball. Tot i que totes les proves es va fer amb el gen *ureA*, també es va decidir aplicar aquest mètode en les mostres on es volia detectar el gen *16S rRNA*.

4.- SENSIBILITAT I ESPECIFICITAT DE LA TÈCNICA DE PCR

4.1.-Modificacions dels paràmetres de la barreja d'amplificació pel gen *ureA*

Amb l'objectiu de millorar la qualitat de la amplificació, incrementar la sensibilitat de detecció i optimitzar la quantitat de reactius, es van introduir modificacions en les concentracions dels reactius de la barreja de reacció de la PCR. Tenint com a referència el protocol seguit per Clayton, es va variar la concentració d'iniciadors, de la polimerasa, de MgCl₂ i dels desoxinucleòtids (Taula 22 i 23).

Es va avaluar l'eficàcia de cada modificació realitzant l'amplificació d'ADN procedent de diferents dilucions d'una suspensió d'una de les soques de referència d'*Helicobacter pylori* SS1. Cada barreja de PCR contenia una sola modificació i la duració de l'amplificació de la primera PCR era variable en funció de cada anàlisi mentre que la de la PCR semiimbricada estava fixada a 30 cicles.

Tenint com a punt de referència el treball de Clayton i col·laboradors (1992), es va disminuir la concentració d'iniciadors i de l'enzim polimerasa tant en la primera PCR com en la semiimbricada (Taula 24).

Taula 24. Modificacions en la concentració d'iniciadors i polimerasa en la barreja d'amplificació del gen *ureA* respecte les adoptades per Clayton i col., 1992.

Paràmetres	Cond. referència	Modificació 1	Modificació 2
10X PCR Buffer II	1X	1X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTP's 25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM
HPU1/HPU11 25 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,5 µM
HPU2 25 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,5 µM
AmpliAq 5 U	2 U	2 U	1,25 U
35 cicles			

En aquesta primera prova, es va treballar fins a la dilució 1:10⁶. De la disminució de la concentració de polimerasa va resultar una amplificació final molt menys eficient amb bandes molt dèbils en la dilució 1:10. En canvi, la disminució de la concentració d'iniciadors va millorar la senyal de detecció. Per tant, aquesta modificació en la concentració dels iniciadors (0,25µM) es van mantenir pels següents anàlisis mentre que es va descartar la modificació que implicava un menor número d'unitat de polimerasa (1,25U).

Per tal d'incrementar la senyal que s'havia obtingut amb una menor concentració d'iniciadors, es va disminuir el nombre de cicles de la primera PCR a 30 i també es va incrementar la concentració de MgCl₂ (Taula 25).

Taula 25. Modificacions en la concentració d'iniciadors i del MgCl₂ de la barreja d'amplificació del gen *ureA* respecte les adoptades de Clayton i col., 1992.

Paràmetres	Cond. referència	Modificació 1	Modificació 3
10X PCR Buffer II	1X	1X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	1,5 mM	2 mM
dNTP's 25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM
HPU1/HPU11 25 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,5 µM
HPU2 25 µM	0,5 µM	0,25 µM	0,5 µM
AmpliAq 5 U	2 U	2 U	2 U
30 cicles			

En aquesta ocasió vam obtenir molt bons resultats en la primera PCR quan vam incrementar la concentració de MgCl₂, arribant a amplificar el gen de la ureasa fins a la dilució 1:10⁶ (Figura 11 B) mentre que la barreja de referència només amplificava fins a la dilució 1:10⁵ (Figura 11 C). En la PCR semiimbricada, vam assolir el mateix llinar de detecció (1:10⁵). Com que la banda d'amplificació obtinguda amb una menor concentració d'iniciadors era de baixa intensitat i amb molt "smirring", es va descartar disminuir la concentració dels iniciadors com a modificació (Figura 11 A).

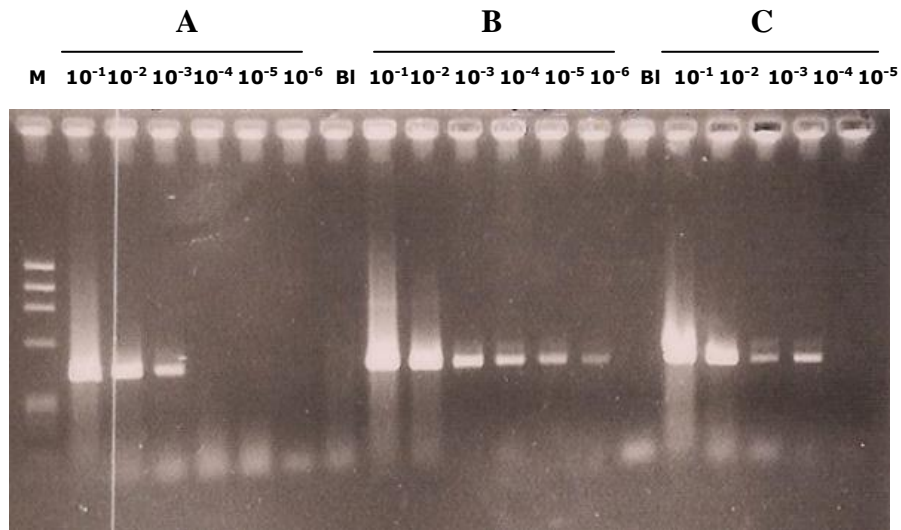


Figura 11. Senyal d'amplificació d'*ureA* d'*H. pylori* SS1 de la PCR simple en gel d'agarosa 1,5%.
A: disminució de la concentració d'iniciadors a 0,25 µM.
B: increment de la concentració del MgCl₂ a 2 mM.
C: manteniment de les condicions inicials.
BI: Barreja de reacció sense mostra.
M: marcador de pes molecular ØX174.

L'increment del nombre de cicles de la primera PCR a 40 amb 2 mM de MgCl₂ va ser el següent pas. En aquesta ocasió, es va fer l'anàlisi sobre un banc de dilucions amb dilució màxima de 1:10⁸, arribant a visualitzar-se banda d'amplificació en aquesta dilució. Tot i que la sensibilitat de detecció va ser molt elevada, en el gel s'apreciava molta quantitat de ADN degradat (Figura 12). Finalment, es va comprovar que es podia assolir la mateixa senyal d'amplificació de l'ADN de *H. pylori* SS1 amb 35 cicles d'amplificació que amb 40 cicles amb 2 mM de MgCl₂ (Figura 13) .

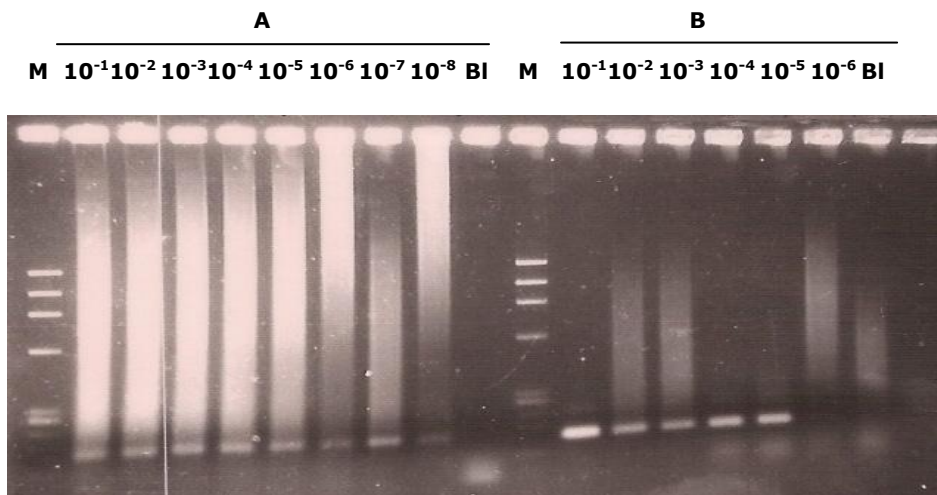


Figura 12. PCR semiimbricada del gen *ureA* d'un banc de dilucions del DNA de la soca de referència *H. pylori* SS1 sota dues barreges d'amplificació diferents: **(A)** amb 2 mM de MgCl₂ i **(B)** en condicions normals. Gel d'agarosa 1,5%, després de 40 cicles en la primera PCR i 30 cicles en la semiimbricada.
BI: Barreja de reacció sense mostra.
M: marcador de pes molecular ØX174.

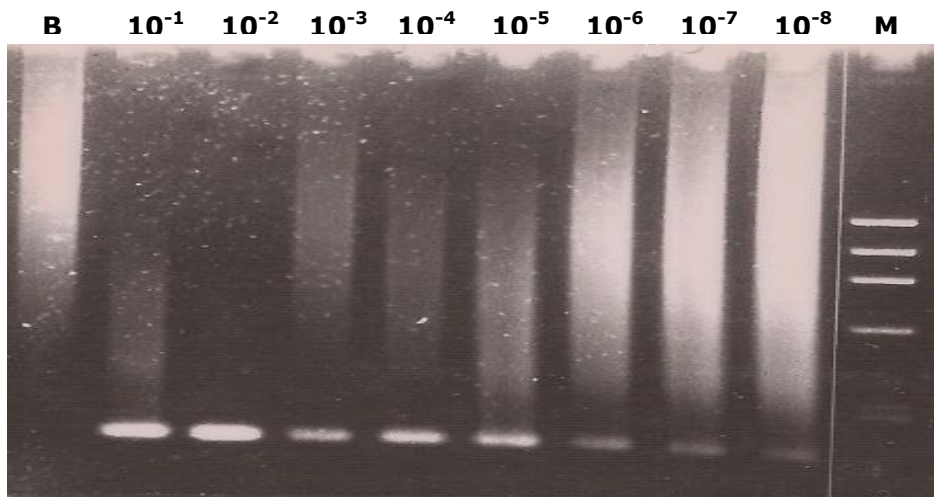


Figura 13. PCR semiimbricada del gen *ureA* d'un banc de dilucions del DNA de la soca de referència *H. pylori* SS1 amb 2 mM de MgCl₂. Gel d'agarosa 1,5%.
B: Barreja de reacció sense mostra.
M: marcador de pes molecular ØX174.

Per tant, les modificacions introduïdes al protocol de referència són tres: increment de la concentració final de MgCl₂ a 2 mM, ampliació a 35 cicles en la primera PCR i introducció d'un segon pas (PCR semiimbricada) de 30 cicles (Taula 26).

Taula 26: Composició final de les barreges de reacció d'amplificació del gen *ureA* d'*H. pylori*.

Component	PCR 1	PCR 2
10X PCR Buffer II	1X	1X
MgCl ₂ 25 mM	2 mM	2 mM
dNTP's 25 mM	0,25 mM	0,25 mM
HPU1/ HPUI1 25 µM	0,5 µM	0,5 µM
HPU2 25 µM	0,5 µM	0,5 µM
AmpliTaq 5 U	2 U	2 U
Nº cicles	30	35

4.2.-Modificacions dels paràmetres de la barreja d'amplificació pel gen *16S rRNA*

Per establir la barreja d'amplificació per a detectar el gen *16S rRNA* en les nostres mostres ambientals es va seguir el protocol descrit per Al-Soud i col. (2003) amb la introducció d'algunes modificacions, descrites a continuació.

En la primera PCR es van mantenir tots els paràmetres de referència a excepció de la concentració dels desoxinucleòtids que es va incrementar a 1 mM (taula 27).

Taula 27. Modificacions en la concentració de dNTPs en la barreja d'amplificació de la primera PCR del gen *16S rRNA* respecte les adoptades per Al-Soud i col., 2003.

Component	Cond. referència	Modificació
Chelating Buffer	1X	1X
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	2,5 mM
dNTP's 25 mM	0,2 mM	1 mM
Iniciador 16S 1F 10 µM	0,5 µM	0,5 µM
Iniciador 16S 1R 10 µM	0,5 µM	0,5 µM
rTth 2,5 U/ µl	1,25 U	1,25 U
BSA 4%	0,4%	0,4%
30 cicles		

En la segona PCR també es va incrementar la concentració dels desoxinuclèotids i es va reduir la concentració de la polimerasa (Amplitaq Gold, Applied Biosystems) ja que es va comprovar que era igualment eficaç amb menys quantitat d'enzim (taula 28).

Taula 28. Modificacions en la concentració de dNTPs i Amplitaq Gold en la barreja d'amplificació de la PCR semiimbricada del gen *16S rRNA* respecte les adoptades per Al-Soud i col., 2003.

Component	Cond. referència	Modificació
Buffer II 10 X	1X	1X
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	2,5 mM
dNTP's 25 mM	0,2 mM	1 mM
Iniciador 16S 1F 10 µM	0,5 µM	0,5 µM
Iniciador 16S 2R 10 µM	0,5 µM	0,5 µM
Amplitaq Gold 5 U	1 U	0,04 U
35 cicles		

4.3.- Límit de detecció pel gen *ureA* i pel gen *16S rRNA*

Aquests canvis en el protocol de PCR per amplificar el fragment del gen de la ureasa van permetre optimitzar la quantitat de reactius, el temps i obtenir un bon límit de detecció. La quantificació en placa de les cèl·lules

viables de la soca SS1 d'*H. pylori* de la suspensió bacteriana i la detecció del seu ADN de cada una de les dilucions va permetre calcular el mínim número de cèl·lules viables d'*Helicobacter pylori* detectables per PCR semiimbricada. Amb aquesta tècnica i pel gen *ureA*, el límit de detecció va ser de 50 UFC/mL, tenint en compte un volum de mostra de 10 µl.

L'estudi de sensibilitat dels iniciadors pel fragment del gen *16S rRNA* sobre les soques de referència TIGR 26695 i SS1 d'*Helicobacter pylori* va mostrar un elevat nivell de sensibilitat. Partint d'una concentració inicial de bactèries viables cultivables de $3 \cdot 10^7$ UFC/ml per la soca SS1 i la soca TIGR26695, es van poder detectar fins a 2-20 UFC/mL, respectivament (Taula 14).

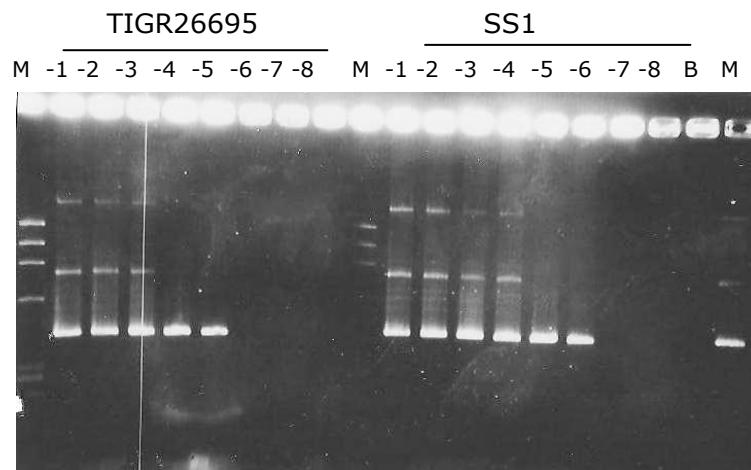


Figura 14. Límit de detecció de la PCR semiimbricada pel gen *16S rRNA* amb les soques TIGR26695 i SS1 d'*Helicobacter pylori*. Gel d'agarosa 2%.

M:marcador de pes molecular ØX174.

B: control negatiu de DNA.

Aquests límits poden resultar afectats si la matriu d'origen on es vol detectar *H. pylori* conté inhibidors de la PCR o molta quantitat de ADN d'altres microorganismes propis de mostres ambientals o de femtes.

4.4.- Especificitat dels iniciadors

4.4.1.- Iniciadors pel gen *ureA*

El resultat de la reacció de PCR semiimbricada pel gen *ureA* amb els àcids nucleics de *Campylobacter jejuni* DSMZ 4688 i d'*Escherichia coli* WG5 ATCC700078 va ser negatiu. Només es va obtenir amplificació quan la mostra era *Helicobacter pylori*.

Aquest resultat positiu es van seqüenciar per confirmar que corresponien al fragment diana del gen *ureA* d'*H. pylori*. L'amplicó de 155 pb resultant es va comparar amb la base de dades del NCBI amb un *BLAST*. Aquest fragment mostrava una homologia d'un 91% amb les 42 soques d'*Helicobacter pylori* emmagatzemades en les bases de dades de NCBI. Per tant, els iniciadors seleccionats per detectar *H. pylori* són força específics per a aquesta espècie.

4.4.2.- Iniciadors pel gen *16S rRNA*

Goto i col·laboradors va definir la especificitat dels iniciadors del *16S rRNA* per al gènere *Helicobacter* (Goto i col., 2000). Al final del nostre estudi i degut als resultats obtinguts, vam comprovar l'especificitat d'aquests iniciadors amb les espècies *Campylobacter jejuni* i *Escherichia coli*. Vàrem veure que apareixien més bandes a part de les que correspondrien a les de *Helicobacter pylori*. Per tant, aquests iniciadors permeten detectar el gen *16S rRNA* de *H. pylori* però també el de *Campylobacter jejuni* i *Escherichia coli* (Figura 15).

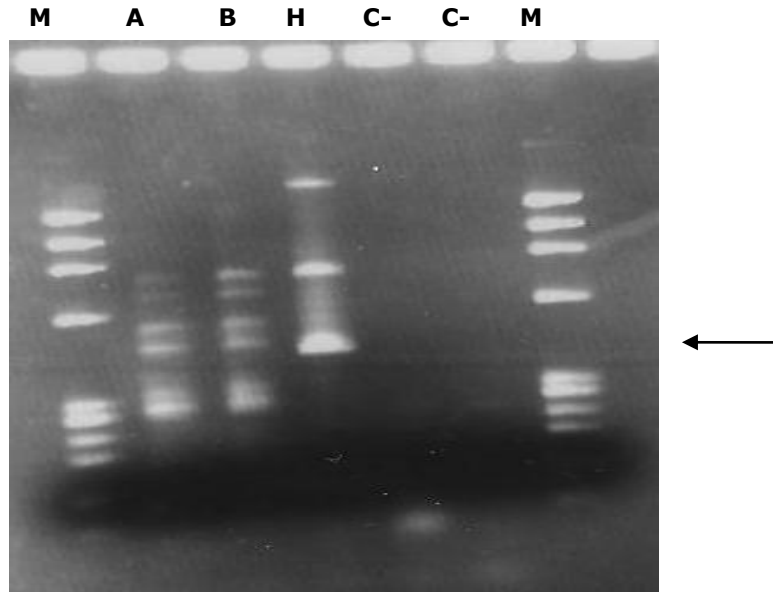


Figura 15. Especificitat dels iniciadors del gen 16S rRNA amb *Campylobacter jejuni* (A), *Escherichia coli* (B) i *Helicobacter pylori* sota TIGR 26695 (H). Gel Agarosa 2%
M:marcador de pes molecular ØX174.

També es va comprovar que els iniciadors per al gen 16S rRNA podien detectar l'espècie *Wolinella succinogenes* (Figura 16).

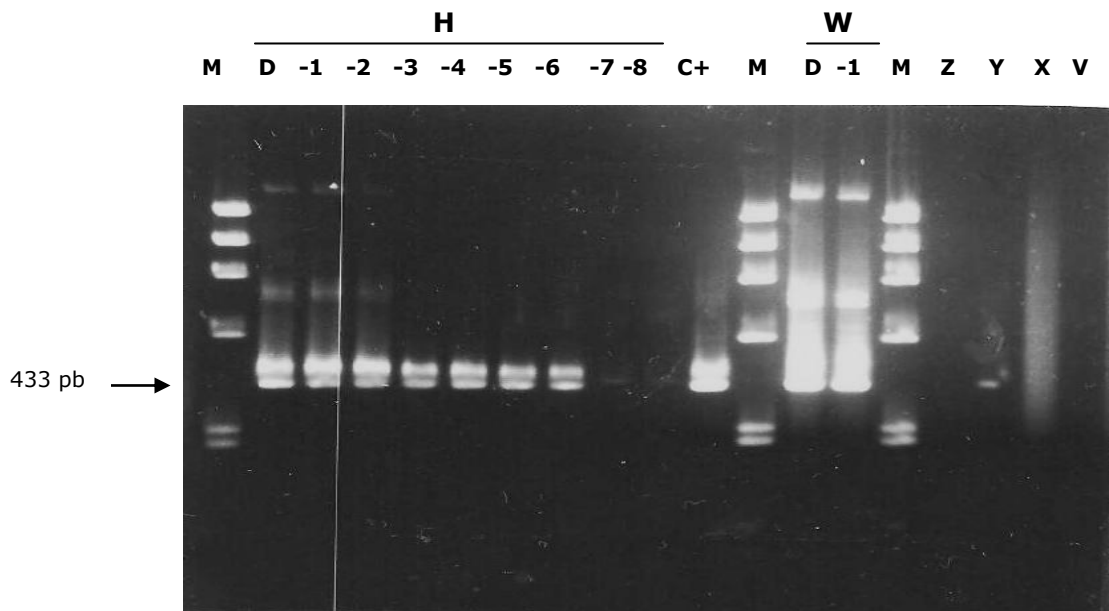


Figura 16. Especificitat dels iniciadors del gen 16S rRNA amb *Helicobacter pylori* sota TIGR 26695 (H) i *Wolinella succinogenes* (W). Agarosa 2%.
C+: control positiu d'amplificació *H. pylori* TIGR 26695
Z: control negatiu 1a PCR no DNA per iniciadors *ureA*
Y: control negatiu 1a PCR no DNA per iniciadors 16S rRNA
X: control negatiu PCR semiimbricada per iniciadors *ureA*
V:control negatiu PCR semiimbricada per iniciadors 16Sr RNA

5.- DETECCIÓ DEL GEN *ureA* D'*HELICOBACTER PYLORI* EN FEMTES HUMANES

Les mostres de femtes humanes procedents de l'hospital de la Vall d'Hebron que ja havien estat analitzades amb el kit HpSA es van tornar a analitzar per PCR en el nostre laboratori. L'objectiu d'aquest doble anàlisi era comparar els resultats de les dues tècniques i la seva equivalència. El test HpSA es basa en la detecció d'antígens bacterians per evidenciar la presència d'*Helicobacter pylori* en la femta mentre que, en el nostre cas, la tècnica de PCR detecta un fragment del gen de la ureasa. Els resultats d'aquest doble anàlisi es mostren en la taula 29.

Taula 29. Doble detecció de *H. pylori* de les 36 mostres de femtes per detecció antigènica de HpSA i per la tècnica de la PCR amb la detecció del gen *ureA*

Fecal sample	F6-9	F14-17	F22-8	M2-4	M6-3	M7-1	M8-6	M8-9	M13-13	M13-14	M14-15	M15-1	M16-3	M19-1	M23-2	M27-8	M27-9	M28-14
HpSA test	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ureA-PCR	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Fecal sample	M29-10	M29-14	A5-6	A18-6	S4-8	S6-8	S7-12	S6-12	S13-11	S21-4	S27-3	S28-2	O1-16	O5-4	O5-5	O8-4	O9-5	O15-9
HpSA test	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
ureA-PCR	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-

De les 36 mostres analitzades, van resultar positives en un 33,3% (12 mostres) per PCR i en un 30,5% (11 mostres) pel test antigènic. Si comparem els resultats, tant positius com negatius de les dues tècniques, s'aprecia una coincidència del 75% dels casos. El 19,4% de les mostres (7 mostres) va resultar positiu en ambdues tècniques i en un 55,5% dels casos (20 mostres) es va obtenir un resultat negatiu en ambdues tècniques. Tenint en compte les dues tècniques, un 44% de les mostres (16) contenien *H. pylori*. Per tal de descartar falsos positius en la PCR, l'anàlisi molecular es va repetir quan el test antigènic resultava negatiu però s'amplificava el gen *ureA*

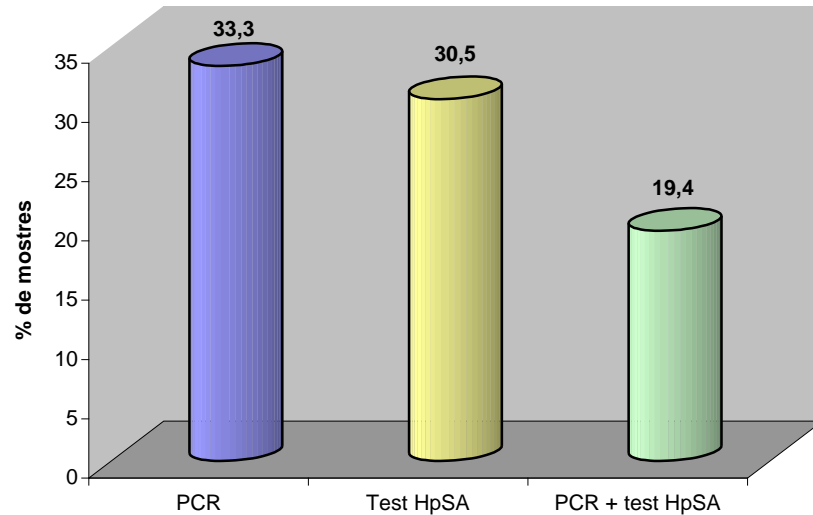


Figura 17. Percentatge de mostres de femta positives segons la tècnica d'estudi (PCR i/o test antigènic HsPA).

6.- DETECCIÓ DEL GEN *ureA* D'*HELICOBACTER PYLORI* I DEL GEN *16S rRNA* EN AIGÜES AMB DIFERENT GRAU DE CONTAMINACIÓ FECAL

Es van analitzar 90 mostres d'aigua procedents de diferents zones geogràfiques i amb diferent grau de contaminació fecal: 47 mostres d'aigües residuals, 24 mostres d'aigües fluvials i 19 mostres d'aigües procedents de fonts. Per detectar el gen *ureA* i el gen *16S rRNA* en aquestes aigües, les mostres es van analitzar un mínim d'un cop (Taula 30).

També es va determinar el grau de contaminació de les mostres d'aigua independentment del seu origen (residual, riu i de font) mitjançant l'anàlisi d'indicadors microbiològics: coliforms totals, coliforms fecals i bacteriòfags somàtics seguint la ISO 10705-2:2000 (Anònim, 2000). Altres paràmetres físico-químics com ara el pH i la terbolesa van ser mesurats. Totes aquestes dades es recullen en les taules A, B i C dels annexos.

Taula 30: Detecció dels gens *ureA* i del gen *16S rRNA* per PCR semiimbricada en aigües amb diferent grau de contaminació fecal (n=90).

	Gen <i>ureA</i>		Gen <i>16S rRNA</i>		Coincidència entre gens
	Resultat +	Resultat -	Resultat +	Resultat -	
Aigües residuals (n=47)	14 (29,79%)	33 (70,21%)	42 (89,36%)	5 (14,89%)	14
Aigües de riu (n=24)	2 (8,34%)	22 (91,66%)	17 (70,8%)	7 (29,16%)	2
Aigües de font (n=19)*	0	19 (100%)	11 (n=17) (64,7%)	0	-

* Només es van analitzar 17 mostres d'aigua de font per al gen *16S rRNA*

Un quasi 30% de les mostres d'aigua residual van resultar positives pel gen *ureA* d'*Helicobacter pylori*. El número de mostres positives s'incrementava fins a 42 (quasi un 90%) quan el gen diana era el gen *16S rRNA*. Aquest tipus d'aigua es caracteritzaven per una terbolesa elevada i un alt índex de contaminació fecal, tal com els seus indicadors microbians indiquen.

En aigües molt més netes, més transparents i amb un pH similar a les residuals com les mostres de riu només es va poder identificar el gen *ureA* en 2 ocasions i en l'aigua del mateix riu (riu Noguera Ribagorçana) i en el mateix punt (a la sortida del pantà de Santa Anna). En cap de les mostres d'aigua de font vam poder identificar *H. pylori*. En canvi, el gen de gènere *16S rRNA* es va detectar en 17 ocasions en aigües de riu i en 11 mostres en aigües de font.

Per confirmar els resultats positius obtinguts en la PCR es van seqüenciar els fragments amplificats per ambdós gens. Les seqüències obtingudes es van comparar amb d'altres seqüències de la base de dades del *GeneBank* amb l'ajut del programa informàtic *BLAST* del NCBI. Es van seqüenciar 12 mostres positives per al gen *ureA* (2 mostres d'aigua de riu i

10 d'aigua residual) i totes mostraven un percentatge de similitud superior al 95% a les seqüències d'*Helicobacter pylori* dipositada en el *GeneBank*, fet que confirmava que el material genètic de les mostres ambientals corresponia a *H. pylori*. En el cas dels resultats obtinguts per al gen *16S rRNA*, les seqüències no corresponien amb les esperades. Malgrat usar iniciadors que segons els seus autors (Goto i col., 2000) només detectarien el gènere *Helicobacter*, ens vam trobar que la majoria de resultats positius corresponien a altres gèneres propers filogenèticament al gènere *Helicobacter* com ara *Wolinella*. Aquests resultats s'exposen a la taula 31, 32 i 33.

Taula 31. Grau d'homologia dels amplicons dels gens *ureA* i *16Sr RNA* de les mostres d'aigua residuals

Data	Mostra	Gen 16S rRNA	% d'homologia amplicó gen 16S rRNA	E-value 16S rRNA	Gen ureA
19/03/2001	M01	+	100% <i>Helicobacter pylori</i>	7,00E-102	+
26/03/2001	M02	+	no llegible		-
02/04/2001	M03	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	3,00E-97	+
09/04/2001	M04	+	no llegible		+
16/04/2001	M05	+	no llegible		+
23/04/2001	M06	+	no llegible		+
30/04/2001	M07	+	100% <i>Helicobacter pylori</i>	3,00E-102	+
25/05/2001	M08	+	100% <i>Helicobacter pylori</i>	3,00E-102	+
12/06/2001	M09	+	96% <i>Wolinella succinogenes</i>	2,00E-92	-
14/06/2001	M10	-	NR		-
20/07/2001	M11	+	95% <i>Helicobacter pylori</i>	2,00E-84	+
26/07/2001	M12	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	2,94E-96	-
02/01/2002	M13	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	4,00E-96	-
18/02/2002	M17	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	1,00E-95	+
18/02/2002	M18	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	3,10E-96	+
04/03/2002	M19	+	95% <i>Wolinella succinogenes</i>	4,00E-95	+
08/04/2002	M20	+	98% <i>Helicobacter rodentium</i>	8,00E-98	-
08/04/2002	M21	+	96% <i>Wolinella succinogenes</i>	8,00E-93	-
25/04/2002	M22	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	6,30E-98	-
28/05/2002	M23	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	1,00E-100	-
25/06/2002	M24	-	NR		-
08/07/2002	M25	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	4,00E-96	+

Capítol 2: Detecció d'*Helicobacter. pylori* en ambients aquàtics i femtes

Data	Mostra	Gen 16S rRNA	% d'homologia amplicó gen 16S rRNA	E-value 16S rRNA	Gen ureA
05/10/2002	M26	+	97% <i>Wolinella succinogenes</i>	6,42E-86	-
15/10/2002	M27	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	9,00E-98	-
16/10/2002	M28	+	97% <i>Wolinella succinogenes</i>	7,30E-85	-
11/11/2002	M29	-	NR		-
25/11/2002	M30	+	no llegible		-
09/12/2002	M31	+	no llegible		-
14/01/2003	M32	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	3,00E-102	-
30/01/2003	M33	+	94% <i>Wolinella succinogenes</i>	5,00E-82	-
05/02/2003	M34	+	100% <i>Helicobacter rodentium</i>	3,00E-102	-
05/02/2003	M35	+	96% <i>Wolinella succinogenes</i>	6,00E-94	-
18/02/2003	M36	+	98% <i>Helicobacter rodentium</i>	8,00E-98	-
19/02/2003	M37	+	99% <i>Wolinella succinogenes</i>	1,00E-100	-
24/02/2003	M38	+	93% <i>Wolinella succinogenes</i>	1,00E-80	-
17/03/2003	M39	+	95% <i>Wolinella succinogenes</i>	6,75E-94	-
17/03/2003	M40	-	NR		-
19/05/2003	M41	+	no llegible		+
22/05/2003	M42	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	1,00E-100	-
22/05/2003	M43	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	2,00E-98	-
26/05/2003	M44	+	99% <i>Wolinella succinogenes</i>	1,00E-100	-
02/06/2003	M45	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	3,00E-102	+
20/06/2003	M46	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	3,00E-102	-
27/06/2003	M47	-	NR		-
08/07/2003	M48	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	3,00E-102	-
09/02/2004	M49	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	3,00E-102	-
09/02/2004	M50	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	3,00E-102	-

NR: comparativa no realitzada

Taula 32: Grau d'homologia dels amplicons dels gens *ureA* i *16S rRNA* de les mostres d'aigua de riu

Data	Mostra	Gen 16S rRNA	% d'homologia amplicó gen 16S rRNA	E-value 16S rRNA	Gen <i>ureA</i>
17/03/2001	MR01	+	100% <i>Helicobacter pylori</i>	7,00E-119	+
16/04/2001	MR02	+	100% <i>Helicobacter anseris</i>	7,00E-119	+
11/06/2001	MR03	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	7,00E-119	-
04/04/2002	MR04	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	7,00E-119	-
22/04/2002	MR05	+	NR		-
22/04/2002	MR07	-	NR		-
13/05/2002	MR08	+	99% <i>Wolinella succinogenes</i>	1,00E-116	-
13/05/2002	MR09	+	100% <i>Helicobacter pylori</i>	7,00E-119	-
13/05/2002	MR10	+	99% <i>Helicobacter pylori</i>	9,00E-118	-
13/06/2002	MR11	-	No llegible		-
03/06/2002	MR12	+	No llegible		-
03/06/2002	MR13	+	No llegible		-
25/06/2002	MR14	-	NR		-
25/06/2002	MR15	-	NR		-
15/07/2002	MR16	-	NR		-
15/07/2002	MR17	+	No llegible		-
15/07/2002	MR18	+	99% <i>Wolinella succinogenes</i>	1,00E-116	-
15/07/2002	MR19	+	No llegible		-
12/05/2003	MR20	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	7,00E-119	-
05/02/2004	MR21	+	99% <i>Helicobacter canadensis</i>	1,00E-115	-
05/02/2004	MR22	+	98% <i>Wolinella succinogenes</i>	9,00E-113	-
24/02/2004	MR23	-	NR		-
24/02/2004	MR24	-	NR		-
24/02/2004	MR25	+	100% <i>Wolinella succinogenes</i>	7,00E-119	-

NR: comparativa no realitzada

Taula 33. Grau d'homologia dels amplicons dels gens *ureA* i *16S rRNA* de les mostres d'aigua de font

Data	Mostra	Gen 16S rRNA	% d'homologia amplicó gen 16S rRNA	E-value 16S rRNA	Gen ureA
29/04/2002	MF02	+	100% <i>Helicobacter pylori</i>	7,00E-119	-
29/04/2002	MF03	-	NR		-
29/04/2002	MF04	-	NR		-
29/04/2002	MF05	+	97% <i>Gen. Fibrobacteres</i>	5,00E-70	-
13/05/2002	MF06	-	NR		-
21/05/2003	MF07	+	98% <i>Helicobacter pylori</i>	1,00E-90	-
21/05/2002	MF08	-	NR		-
21/05/2002	MF09	+	98% <i>Helicobacter pylori</i>	2,00E-95	-
21/05/2002	MF10	+	96% <i>Gen. Fibrobacteres</i>	6,00E-64	-
13/06/2002	MF12	+	96% <i>Helicobacter pylori</i>	6,00E-84	-
13/06/2002	MF13	+	94% <i>Helicobacter pylori</i>	2,00E-79	-
13/06/2002	MF14	+	95% <i>Helicobacter pylori</i>	3,00E-82	-
13/06/2002	MF15	+	NR		-
08/07/2002	MF16	+	NR		-
08/07/2002	MF17	-	NR		-
08/07/2002	MF18	+	NR		-
05/02/2004	MF20	-	NR		-

NR: comparativa no realitzada

DISCUSSIÓ

L'elecció d'uns bons iniciadors és determinant per una bona detecció, ja que les mostres de femta i d'ambient aquàtic tenen una abundant i complexa biota.

Helicobacter pylori ha estat àmpliament estudiat en molts països del món tant en l'àmbit clínic com en el medi ambiental (Van Doorn i col., 1998; Sugimoto i col., 2009). L'estudi de biòpsies gàstriques i de femtes permeten determinar la presència del patogen i s'usa com a mètode de diagnòstic de la infecció. Els estudis amb altres tipus de matrius com ara aigua, llet i vegetals permeten analitzar la incidència del microorganisme en el medi i la seva via de transmissió (Hopkins i col., 1993; Hulten i col., 1996; Dore i col., 1999; Horiuchi i col., 2001).

El nostre estudi es va iniciar amb l'elecció d'un medi de cultiu per al creixement d'*Helicobacter pylori* i d'un crioprotector adient per mantenir les seves soques congelades. En la bibliografia s'han descrit diferents medis de cultiu per a *Helicobacter pylori*, sense posar-se d'acord en quin és el que obté un grau més alt de creixement. Per tant, nosaltres, a partir dels medis ja descrits anteriorment i amb les nostres proves, vam escollir el medi agar Columbia suplementat amb un 5% de sang desfibrinada de cavall com el medi de cultiu que ens ofería un millor creixement bacterià en placa i amb un cost econòmic acceptable. D'altra banda, es va escollir la llet descremada pels bons nivells de recuperació de les bactèries i pel seu baix cost econòmic.

En aquest capítol s'han optimitzat dos mètodes moleculars de detecció d'*Helicobacter pylori* en matrius amb molta càrrega tant bacteriana com de partícules en suspensió. Un d'ells amplifica el gen *ureA*, específic d'*Helicobacter pylori* i un altre gen *16S rRNA*, específic de gènere. La identificació del gen *ureA* propi d'*H. pylori* va millorar amb la introducció d'un tercer iniciador en la segona reacció d'amplificació (PCR semiimbricada) que va permetre incrementar la sensibilitat de la prova, podent detectar fins a 50 UFC/ml en condicions experimentals. Quan la matriu de anàlisi és aigua residual o femtes i degut a la dificultat que presenten aquests tipus de mostres, el llindar de detecció podria ser lleugerament superior (necessitaria un nombre de bactèries més elevat per detectar-les). Tot i això, es va

considerar un bon mètode per determinar la presència d'*Helicobacter pylori* en les nostres aigües. El llindar de detecció dels iniciadors del gen *16S rRNA* per al gènere *Helicobacter* és una mica més baix, ja que ens permet detectar entre 2-20 UFC/ml en condicions experimentals. Tot i aquest bon límit de detecció, no els podem considerar uns bons iniciadors degut a la seva manca d'especificitat.

El nostre mètode va permetre detectar el fragment del genoma d'*Helicobacter pylori* corresponent al gen *ureA* en 12 de les 36 mostres fecals analitzades. El mètode antigènic HpSA, eina de diagnòstic ben acceptada en centres mèdics, va diagnosticar *H. pylori* en 11 pacients. L'estudi comparatiu entre les dues tècniques aplicat a 36 mostres fecals va mostrar un 75% de coincidència en els resultats. Aquesta conclusió coincideix amb la obtinguda per altres autors (Roth i col., 2001; Wisniewsk i col., 2002). La variabilitat en els resultats obtinguts es podria atribuir a una distribució heterogènia de la bactèria en la femta i a la poca quantitat de mostra analitzada. La distribució a l'atzar juga un paper important en el resultat final de l'anàlisi juntament amb la presència d'una elevada quantitat d'inhibidors de la PCR presents en la femta. Però l'aplicació d'un bon mètode d'extracció i purificació dels àcids nucleics va eliminar el problema de les substàncies interferents en la reacció d'amplificació (Boom i col., 1990): La guanidina permet la desnaturalització de proteïnes presents i evita les interferències en la reacció de PCR, el tritó actua com a detergent i les partícules de sílice absorbeixen les partícules inhibidores de la PCR en suspensió en la matriu.

A part de l'amplificació esperada de la regió diana, és possible l'aparició de falsos positius deguts a contaminacions produïdes durant la manipulació del material en el laboratori o per l'elevada homologia filogenètica entre espècies (reaccions creuades) de la regió genòmica a amplificar. Aquest problema es redueix amb una bona elecció dels iniciadors amb la major especificitat possible i la introducció de mesures de control internes (control positiu i control negatiu) per detectar aquests possibles resultats erronis.

A Espanya s'ha estudiat la prevalença del microorganisme entre la població (Macenlle i col., 2006; Sánchez i col., 2007) però, a diferència

d'altres països, s'ha investigat poc sobre la seva presència en el medi ambient (Moreno i col., 2003). El nostre treball ha estat pioner en aquest tipus d'estudis (Queralt i col., 2005). Per primera vegada, es va quantificar la presència d'*Helicobacter pylori* en ambients aquàtics de Catalunya amb diferent grau de contaminació.

Segons la nostra hipòtesi, la identificació del gènere *Helicobacter* tant pel gen *ureA* com pel gen *16S rRNA* hauria de ser similar. Però les dades obtingudes no ens indiquen això. Segons el gen *diana*, el percentatge de detecció varia considerablement. Segons el gen *ureA*, específic per *Helicobacter pylori*, el 30% de les aigües residuals analitzades s'amplificaria aquest gen i tots els amplicons resultants d'aquest gens es van seqüenciar com a *Helicobacter pylori*. En canvi, quan el gen *diana* és el gen específic de gènere *Helicobacter*, el gen *16S rRNA*, el percentatge de detecció incrementa fins al 85% però la identificació per seqüenciació és molt variable, amb espècies del gènere *Helicobacter* i del gènere *Wolinella*. Aquest fenomen es repeteix amb les aigües de riu però no amb les aigües de font, on hi ha elevada correlació entre els resultats positius pel gen *16S rRNA* i la identificació de la seqüència d'aquest amplicó com gènere *Helicobacter*. Tot i obtenir aquest resultat, no es detecta el gen *ureA* en aquest tipus de mostra d'aigua. El gènere *Wolinella* pertany a la família *Helicobacteraceae* i el seu representant, *Wolinella succinogenes*, s'ha aïllat principalment del rumen boví (Wolin i col., 1961) però també d'aigua residual (Yoshinari, 1980; Tanner i col., 1984) i d'humans (Radcliffe i col., 1979). El fet que els iniciadors usats per detectar teòricament el gen *16S rRNA* del gènere *Helicobacter*, també hagin identificat altres generes propers com *Wolinella*, i, pels nostres estudis d'especificitat, *Campylobacter jejuni* i també d'altres més distants com *Escherichia coli*, ens indica que aquests iniciadors no són prou específics per al gènere *Helicobacter* en mostres amb càrrega fecal important.

La comparació de les nostres dades amb les d'altres investigadors d'arreu del món es una tasca difícil degut a la manca d'un sol mètode estandarditzat: cada autor ha usat diferents protocols per detectar la bactèria. A més, la majoria d'aigües estudiades havien estat poc

caracteritzades tant físico-química com microbiològicament (Hulten i col., 1996, 1998; Hegarty i col., 1999; Moreno i col., 2003).

La troballa d'ADN d'*Helicobacter pylori* en femtes humanes i en aigües altament contaminades amb aports fecals recents no significa necessàriament la presència de cèl·lules viables en aquests tipus de matriu però reafirma la hipòtesi que l'aigua pot actuar com a vector de transmissió de la bactèria. Els resultats obtinguts són coherents amb els obtinguts per altres autors que defensen aquesta hipòtesi. Baker i Hegarty (2001) van establir una relació estadística entre el indicador fecal *Escherichia coli* i *H. pylori* en aigües de beguda no tractades contaminades per aigües residuals domèstiques a Pensilvània, EEUU. Altres estudis d'arreu del món com ara el de Klein a Perú, el de Hultén a Suècia i el de Horiuchi al Japó coincidien en considerar l'aigua contaminada fecalment com un factor de risc per adquirir la infecció d'*H. pylori* (Klein i col., 1991; Hultén i col., 1998; Horiuchi i col., 2001). Els nostres resultats ens van mostrar una correlació entre la contaminació fecal present en l'aigua i la detecció del gen de la ureA d'*Helicobacter pylori*. A més a més i tot i l'efectivitat del mètode d'extracció dels àcids nucleics usat, molt possiblement la presència d'*Helicobacter pylori* en aigües residuals hagi estat subestimada. L'elevada presència de substàncies químiques interferents seria la responsable d'aquest fenomen.

No només la contaminació fecal està implicada en la transmissió del patògen sinó que hi ha altres rutes també relacionades amb aquest procés. La via oral-oral i la fecal-oral es consideren les més importants i es veuen afavorides en zones amb una pobra situació socioeconòmica i pocs recursos higiènics (Brown i col., 2002; Graham i Malaty., 2002). L'aigua actuaria com a vector de transmissió sobretot en zones en desenvolupament on la gran majoria de la població beu aigua sense tractar i no disposa ni de sistemes de distribució d'aigua ni de lavabos dins de les cases (Bunn i col., 2002; Nurgalieva i col., 2002). Aquestes situacions afavoreixen que les aigües fecals entrin més fàcilment en contacte amb les aigües que s'usen per beure, cuinar o regar, produint-se la ingestió del microorganisme i la molt probable infecció.

En països com el nostre, amb una bona xarxa de distribució i control de l'aigua i amb infraestructures sanitàries a l'abast de la gran majoria de la població, fa que la transmissió d'*H. pylori* a través de l'aigua sigui un fet minoritari i que es transmeti per altres vies. Tot i això, aquesta bactèria es detecta en aigua i en biofilms de les canonades de xarxes de distribució de zones industrialitzades on circula aigua tractada amb clor (Hulten i col., 1998; Sasaki i col., 1999; Park i col., 2001). Per tant i independentment de la ruta de transmissió del microorganisme, l'aigua és un vector a considerar en la propagació de la infecció d'*Helicobacter pylori* entre humans.

Capítol 3

Supervivència d'Helicobacter pylori en aigua

INTRODUCCIÓ

La importància de la infecció ha implicat que, en els darrers 20 anys, el coneixement d'aspectes tant diversos de la morfologia, bioquímica, fisiologia, genoma, expressió gènica, patogenicitat, diagnòs i tractament d'*Helicobacter pylori* hagi evolucionat de tal manera que hagi permès conèixer i entendre, en profunditat, el seu comportament en l'ésser humà. Tot i això la seva via de transmissió i el seu comportament en l'aigua no estan clars, a diferència del que succeeix amb altres microorganismes patògens humans com ara *Escherichia coli* o *Salmonella enterica*, entre d'altres. Tenint en compte que el seu principal reservori descrit fins ara és l'ésser humà, el medi ambient es considera l'hàbitat on el microorganisme es manté sense multiplicar-se. La controvèrsia sobre l'estat de viabilitat del microorganisme en el medi aquàtic fan necessària la realització de més estudis per conèixer amb més exactitud el seu comportament i activitat metabòlica en aquest hàbitat, fet que permetria la millora i desenvolupament de les condicions sanitàries per controlar més eficaçment el patogen.

Helicobacter pylori segueix dues rutes de transmissió principals: la ruta oral-oral i la fecal-oral. En ambdós casos, l'aigua és el denominador comú. Actua com a vector del microorganismes en la femta, la saliva o el vòmit però és difícil definir la seva importància com a tal. Estudis epidemiològics demostren que *H. pylori* és un patogen que es transmet per l'aigua però es desconeix si és capaç de sobreviure en l'aigua. S'ha pogut demostrar la presència de la bactèria en ambients aquàtics usant tècniques moleculars com la PCR i FISH, i microscòpia (Boulos i col., 1999; Mazari.Hiriart i col., 2001a; Moreno i col., 2003; Queralt i col., 2005). Però aquesta detecció aporta poca informació sobre el seu comportament en el medi aquàtic. Recuperar cèl·lules viables de l'ambient proporcionaria important informació sobre la fisiologia i morfologia del microorganisme en aquest hàbitat. Però fins ara només s'ha pogut aïllar *H. pylori* de l'aigua en una única ocasió, capturant el patogen de l'aigua residual amb boles immunomagnètiques (Lu i col., 2002).

H. pylori és un microorganisme dimòrfic. Al igual que altres gèneres com ara *Shigella*, *Salmonella*, *Legionella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Vibrio*... entra en una fase amb morfologia coccal. Però a diferència d'aquests que entren en un estat dorment, la funció d'aquest canvi morfològic en el gènere *Helicobacter* no està clara.

Helicobacter pylori es caracteritza per perdre ràpidament la seva capacitat de ser cultivat després de romandre un temps en l'aigua. A més a més, pateix un canvi morfològic en medi líquid: es transforma en coc a partir d'un bacil (Shahamat i col., 1989; Wet i col., 1990). La morfologia es relaciona directament amb l'estat fisiològic de la cèl·lula: la forma espiral bacil·lar s'ha associat amb cèl·lules viables cultivables i la forma coccal es relaciona amb un estat viable però no cultivable (VBNC) (West i col., 1990; Enroth i col., 1999; West i col., 1992). La conversió de forma clarament bacil·lar a forma coccal pot ser induïda tant en la natura com en el laboratori per un increment de la concentració d'oxigen (Catrenich i Makin, 1991, per un pH alcalí (Cellini i col., 1994), per increment de la temperatura (Shahamat i col., 1993), per una prolongada incubació amb el corresponent envelliment cel·lular (Reynolds i Penn, 1994) i manca de nutrients o pels tractaments amb antibiòtics com ara l'amoxicil·lina (Bode i col., 1993) o omeprazol (Cellini i col., 1994). Els canvis ultraestructurals que pateix *H. pylori* semblen ser independents del mètode usat per induir la formació de coccoïds (Benaïssa i col., 1998; Kusters i col., 1997).

El procés de transformació s'inicia amb la formació d'una estructura intermèdia transitòria entre el bacil i el coccoïd anomenada forma U o de ferradura. Es caracteritza per un creixement del espai paraplasmaàtic cap dins de la cèl·lula bacteriana en una regió concreta del microorganisme. Amb el microscopi electrònic de transmissió s'observa una acumulació de matèria densa. El següent pas és la conversió en coccoïd de les formes U, incrementant el cilindre protoplasmàtic i mantenint la doble membrana formada. Associada a aquesta hi trobem el complex basal de flagels, intactes i mòbils en coccoïds joves (Andersen i col., 2000; Bode i col., 1993).

La mida dels cocs d' *H. pylori* varia des de 1-2 µm de diàmetre pels que posseeixen cossos densos citoplasmàtics fins als 3-4 µm de diàmetre pels que mostren una baixa densitat citoplasmàtica (Catrenich i Makin., 1991).

Tot i que les dues morfologies s'han pogut detectar en l'estómac i el duodè humans, la seva distribució no és la mateixa. Segons Janas i col·laboradors (1995), les formes helicoïdals es localitzen bàsicament en les zones amb cèl·lules gàstriques no modificades o en cèl·lules de la mucosa gàstrica lleument danyades. Els coccoïds, en canvi, s'uneixen a les cèl·lules epitelials fortament malmeses. Predominen en el marge dels tumors gàstrics i s'identifiquen en un 93% de les biòpsies de pacients amb adenocarcinoma associat a *H. pylori* (Chan i col., 1994).

Però no hi ha un acord amb el significat biològic d'aquesta transformació. Alguns autors defensen la forma cocal com a forma degenerativa, pas previ a la mort cel·lular (Enroth i col., 1999; Kusters i col., 1997). Altres suggereixen que el coc representa simplement un estat dorment de la bactèria, viable però no cultivable, com una forma de resistència en el medi fins trobar unes condicions millors de desenvolupament (Benaïssa i col., 1996; Wang i col., 1997).

Diversos estudis s'han realitzat per determinar el paper del coccoïd en el medi aquàtic però els resultats han creat una gran controvèrsia. De fet, els estudis que s'han realitzat tant directament en medi ambient com en models de laboratori per clarificar aquest punt no han aconseguit donar una resposta clara. Bode va suggerir que la forma cocal d'*H. pylori* jugava un paper crucial en la seva supervivència en el medi ambient (Bode i col., 1993). Altres autors han anat més lluny i defensen els cocs com a responsables de la transmissió i el bacil com el causant de la infecció gàstrica (Hulten i col., 1998).

També s'ha evidenciat que la transformació morfològica, la pèrdua de culturabilitat i el manteniment de la viabilitat cel·lular d'*H. pylori* s'ha produït en les cèl·lules bacterianes després de romandre alguns dies en un microcosmos d'aigua mineral (Shahamat i col., 1989; West i col., 1990). Aquest fet va recolzar-se posteriorment en un estudi on es demostrava

l'activitat metabòlica present en cèl·lules viables no cultivables detectada per autoradiografia (Shahamat i col., 1993). Si es considera que la forma coccal es troba en un estat VBNC, aquesta seria capaç d'infectar un hoste tal com suggereix Cellini (Cellini i col., 1994). Una dada més que recolzaria que els cocs es troben en un estat viable és la detecció dels ARNm de VacA i UreA detectats per RT-PCR en cèl·lules d'*H. pylori* no cultivables (Nilsson i col., 2002). D'altres, com el de Sato (1999) reconeixen un canvi morfològic i una pèrdua de la culturabilitat en medi líquid però no en aigua mineral (Sato i col., 1999). Adams, l'any 2003, es va destacar per varies afirmacions: va demostrar la persistència d'aquest patogen en estat VBNC en model de laboratori i en medi ambient; va relacionar la pèrdua de culturabilitat amb la transformació morfològica en les mostres del model; i va determinar que la pèrdua de capacitat de cultiu era independent de la morfologia de la bactèria ja que tant les formes cocals com bacil·lars eren presents en el medi (Adams i col., 2003).

En aquest treball, per valorar la viabilitat de *Helicobacter pylori* es van usar colorants vitals capaços d'unir-se als àcids nucleics per al recompte de bactèries en sistemes aquàtics (Boulos i col., 1999). En els darrers anys s'està aplicant el kit comercial "LIVE/DEAD *BacLight* bacterial viability" (Molecular Probes, Life Technologies).

Fins al moment d'aquest estudi, cap treball havia combinat en un sol article l'ús de tècniques d'anàlisi genòmic (detecció del gen *ureA* i concentració de DNA bacterià) amb tècniques per determinar la viabilitat cel·lular, la morfologia i la capacitat de poder ser cultivables. Alguns es centaven en la morfologia cel·lular (Benaissa i col., 1996; Kuster i col., 1997; Enroth i col., 1999), altres determinaven la seva capacitat de ser cultivables en funció de la seva capacitat metabòlica (Shahamat i col., 1993).

L'objectiu d'aquest treball fou determinar el comportament i evolució d'*Helicobacter pylori* en un model aquàtic creat en el laboratori, usant simultàniament diferents mètodes d'anàlisi i per entendre la contradicció entre les dades moleculars i les obtingudes de cultius en altres estudis ambientals.

OBJECTIUS

- Estudiar la supervivència d'*Helicobacter pylori* en aigua dolça usant un model de laboratori aplicant diferents tècniques d'anàlisi.
 - Interpretar el canvi de morfologia, la viabilitat i la culturabilitat de la bactèria així com la detecció i quantificació del seu ADN durant un període de temps concret.

MATERIALS I MÈTODES

1.- PREPARACIÓ DE MICROCOSMOS CONTAMINATS ARTIFICIALMENT AMB *HELICOBACTER PYLORI*

Per a estudiar el comportament de les cèl·lules d'*Helicobacter pylori* en l'aigua durant un temps definit, es van preparar microcosmos aquàtics amb aigua mineral estèril (Font Vella, Espanya) en botelles esterilitzades de vidre de 50 ml on es va afegir una concentració coneguda de bacteris de la soca SS1 i 26695 d'*Helicobacter pylori* i de la soca ATCC10536 d'*Escherichia coli*.

Es van preparar suspensions de cada soca d'*H. pylori* en aigua destil·lada estèril a partir de 2 plaques d'agar Columbia suplementat amb un 5% sang desfibrinada de cavall incubades durant 4 dies. Les suspensions van ser centrifugades a 2000 rpm durant 4 minuts per eliminar les restes d'agar o de cèl·lules sanguínies restants en la suspensió. La suspensió d'*E. coli* es va preparar en un tub amb 8 ml d'aigua destil·lada estèril a partir de les bactèries d'una sola placa d'agar MSA després d'un dia d'incubació.

Cada botella amb 46 ml d'aigua mineral estèril es va dopar amb 4 ml de suspensió bacteriana. Cada assaig corresponia a una botella amb una única soca. Es van realitzar varis assaigs amb les diferents soques estudiades. Totes les botelles es van emmagatzemar a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ en la foscor durant més de 21 dies.

2.- COMPORTAMENT DE LES CÈL·LULES BACTERIANES D'*HELICOBACTER PYLORI* EN AIGUA MINERAL

Per tal d'entendre la transmissió d'*Helicobacter pylori* en el medi ambient, es va analitzar el comportament de les cèl·lules bacterianes en aigua estudiant diferents paràmetres que mesuraven i/o ens indicaven diversos aspectes de la fisiologia del patogen.

Tots els anàlisis es van realitzar a diferents moments de l'estudi: temps 0, 1, 3, 7, 14 i 21 dies.

2.1.- Cultiu d'*Helicobacter pylori*

Per determinar el número de cèl·lules bacterianes cultivables es va preparar un banc de dilucions decimals en aigua destil·lada a partir de 100 µl de l'aigua mineral dopada i 100 µl de cada dilució es van sembrar (amb la nansa de Driglaski ja que obtenien una gespa més densa i homogènia) i per duplicat, en plaques de agar Columbia amb un 5% de sang desfibrinada de cavall per *H. pylori* i en plaques d'agar MSA per *E. Coli*.

Després del període d'incubació (3-4 dies per *H. pylori* i 18 hores per *E. coli*), es procedia el recompte del número de colònies crescudes en les plaques. Els resultats es van expressar en UFC/ml.

La variació en el número de cèl·lules cultivables es va valorar comparant el número de colònies crescudes en cada temps respecte les del temps 0. Els resultats s'han expressat com $\log (V_{n+1}/V_t)$, essent V_n el nº total de cèl·lules cultivables en cada temps i V_t , el nº total de cèl·lules cultivables en el temps 0.

2.2.- Quantificació de cèl·lules totals per DAPI

Per quantificar les cèl·lules totals presents en l'aigua dopada es va usar el microscopi de fluorescència. El punt de partida era 1 ml de mostra que es diluïa en un banc de dilucions decimals de 10 ml de volum total. Cada dilució es va tenyir amb 100µl de DAPI 5µg/ml (4'-6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; Sigma-Aldrich) durant 20 minuts a 4°C. Es van usar filtres negres Isopore (Millipore) de 0,2µm de mida de porus i 25 mm de diàmetre per filtrar la mostra tenyida. Els filtres amb les cèl·lules retingudes en la seva superfície es van muntar sobre portaobjectes i per a la seva observació s'hi va afegir una gota d'oli d'immersió no-fluorescent (Nikon) per evitar la autofluorescència. Les bactèries es van comptar a 1000X en un microscopi de epifluorescència Olympus model BX40. Les cèl·lules d'*H. pylori* i d'*E. coli* es van comptar en 25 camps escollits aleatòriament del camp ocular.

Per millorar la visualització de les cèl·lules, el comptatge es va realitzar en les màximes condicions de foscor que la ubicació del microscopi permetia.

2.3.- Viabilitat bacteriana amb el kit LIVE/DEAD BacLight bacterial viability

La viabilitat bacteriana es va determinar centrifugant 10 ml d'aigua dopada amb cada soca a 8000 rpm durant 15 minuts. El precipitat format es va resuspendre en 2 ml d'aigua bidestil·lada estèril. A aquesta suspensió bacteriana se li afegien 3µl d'una barreja 1:1 dels dos colorants fluorescents del kit (Syto 9 i iodur de propidi) i s'incubava durant 15 minuts a temperatura ambient i en la foscor. Passat aquest temps, es col·locava una gota (5µl) de la suspensió tenyida i s'observava la viabilitat de les bactèries en un microscopi de fluorescència Olympus Fluoroview FV300.

2.4.- Microscopia electrònica de rastreig

Per observar els possibles canvis morfològics que les bactèries d'*Helicobacter pylori* i *Escherichia coli* van patir durant l'emmagatzematge en aigua mineral es va usar el microscopi electrònic de transmissió. Es van observar les cèl·lules bacterianes en suspensió líquida (aigua mineral) i en la mateixa colònia sobre agar.

Per visualitzar la morfologia bacteriana i la seva evolució en suspensió líquida es van agafar 2 ml de cada assaig en cada temps a analitzar. Les bactèries de la suspensió es van fixar amb una solució al 1% (pes:vol) de glutaraldehid durant 2 hores a 4°C. Les bactèries fixades es van concentrar per centrifugació a 8000 rpm durant 10minuts i després es van rentar amb tampó fosfat. Un cop rentades, primer es van postfixades amb tetròxid d'osmi al 1% en tampó fosfat 0'1M i en un segon pas, es van deshidratar en acetona i gradient d'etanol. A continuació, les mostres es van assecar per punt crític en acetat d'amil. En aquest punt, les preparacions es van muntar en suports metàl·lics i les mostres es van recobrir amb or.

Per a observar la morfologia de les bactèries presents en una colònia, es va tallar l'agar amb la colònia i es va posar dins d'un petit contenidor. Aquest petit tros amb la colònia es va sotmetre a vapors d'acroleïna dins del contenidor durant 6-8 dies i, a continuació, es van aplicar vapors d'osmi durant 6 dies més. Tots dos processos es van realitzar a temperatura ambient. Les colònies un cop postfixades es van fracturar amb l'ajut d'un bisturí i després es van muntar sobre suports metàl·lics amb plata col·loïdal i es van recobrir amb or.

Tant les suspensions bacterianes com les colònies es van observar en el microscopi electrònic de rastreig Leica model Stereoscan 360 dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. Les mostres es van visualitzar a diferents augments i es van guardar les imatges fotografiades.

2.5.- ADN genòmic: extracció i quantificació

Una part d'aquest estudi va consistir en analitzar si la quantitat total de ADN es mantenia constant al llarg del temps o es produïa un descens.

Es va agafar 1 ml de suspensió d'aigua mineral dopada amb *H. pylori* o *E. coli* per extreure el ADN genòmic per xoc tèrmic, bullint la mostra durant 10 minuts i posant-la immediatament en gel durant 5 minuts més. Les restes cel·lulars es van separar per centrifugació a 14000 rpm durant 5 minuts (Eppendorf Centrifuge 5415C) quedant concentrades en el pellet mentre que el sobrenedant contenia el ADN genòmic, que es va recollir i es va emmagatzemar a 4°C.

La quantitat d'àcid nucleic i de proteïna extreta de les bactèries de cadascuna de les suspensions es va mesurar per espectrofotometria amb l'espectrofotòmetre Shimadzu UV-265FW del laboratori de microbiologia. Es va mesurar la densitat òptica del ADN a una λ de 260 i la de les proteïnes a una λ de 280 nm. La raó A260/A280 ens indicava el grau de puresa del ADN extret. A més, la absorbància a 260nm ens permetria quantificar el ADN, tenint en compte que 1 unitat a A260 equival a 50 μ g de ADN de doble cadena.

2.6.- Reacció de PCR: gen *ureA*

De cada assaig i en els diferents temps d'anàlisi, es van fer dilucions decimals seriadades per extreure el seu ADN genòmic. Es va seguir el mateix procés descrit en capítol 2.

Un dels nostres objectius era determinar si el gen *ureA* continuava present en el genoma de les cèl·lules bacterianes després d'un temps d'emmagatzematge. Es va aplicar el mètode d'amplificació de *ureA* descrit en el capítol 2. Cada mostra es va analitzar per duplicat amb un volum de mostra de 10µl.

RESULTATS

1.- COMPTATGE I VIABILITAT CELULAR

Per a determinar el número de cèl·lules totals d'*Helicobacter pylori* en les botelles d'aigua dopades es va usar un mètode directe, la tinció amb DAPI, i un mètode indirecte, la quantificació de ADN total per espectrofotometria a partir del valor λ_{260} . Es va treballar amb duplicats. Paral·lelament, es va estudiar el comportament de les bacteries d' *E. Coli* ATCC10536 en les mateixes condicions i amb les mateixes tècniques d'estudi.

Es va partir d'una concentració mitja de cèl·lules bacterianes totals d'*Helicobacter pylori* 26695 de $8,7 \cdot 10^7$ cèl·lules/mL segons valor obtingut per comptatge per tinció amb DAPI, amb un valor mig de $9,55 \cdot 10^9$ genomes/mL. (taula 34). Per *E. coli* ATCC10536, aquests valors van ser $3,7 \cdot 10^8$ cèl·lules/mL i $2,19 \cdot 10^{12}$ genomes/mL, respectivament.

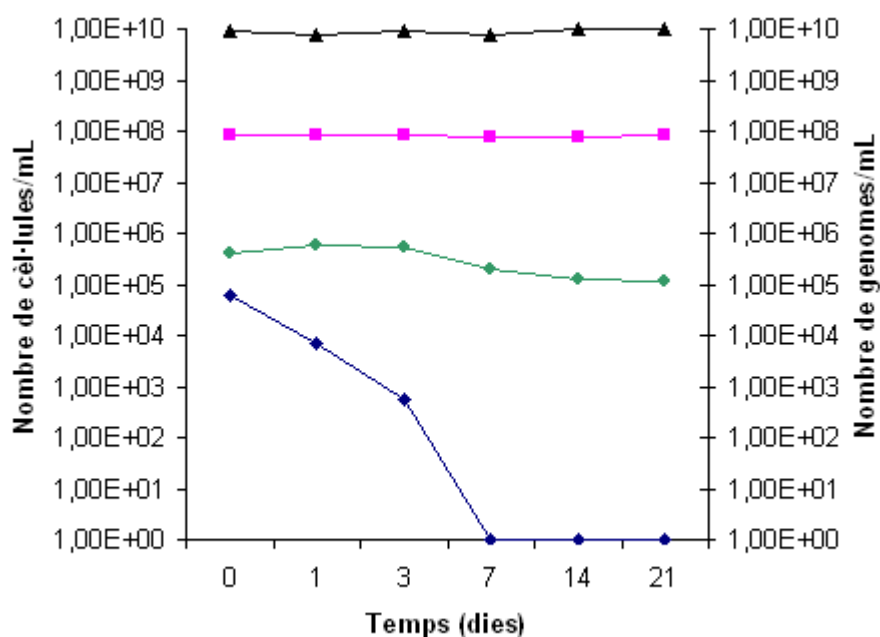


Figura 18. Quantificació de cèl·lules d'*H. pylori* 26695 enmagatzemades en aigua durant 21 dies a 7°C per tinció DAPI (■), contingut de DNA (genomes/mL) per espectrofotometria (▲), cèl·lules viables (CFU/mL) per cultiu (◆) i cèl·lules viables (CFU/mL) per cultiu (◇)

Taula 34. Dades de supervivència de les soques *H. pylori* TIGR 26695 i *E. coli* ATCC10536 durant 21 dies a 4°C.

Bactèria	Botella	Temps	DO620	Comptatge cèls. cultivables (cel/mL)	Comptatge DAPI (Cel/mL)	λ260	λ280	Nº genomes/mL	[proteïnes] [µg/mL]
<i>H. pylori</i>	1	0 dies	0,060	1,17E+04	8,94E+07	0,185	0,158	8,40E+09	156,66
<i>H. pylori</i>	2	0 dies	0,057	1,05E+04	8,48E+07	0,237	0,206	1,07E+10	205,53
<i>E. coli</i>	1	0 dies	0,062	5,90E+08	3,70E+08	1,112	0,753	2,19E+12	448,28
<i>H. pylori</i>	1	1 dia	0,055	5,90E+03	8,74E+07	0,148	0,127	6,64E+09	126,85
<i>H. pylori</i>	2	1 dia	0,054	7,65E+03	8,39E+07	0,189	0,183	8,59E+09	209,15
<i>E. coli</i>	1	1 dia	0,071	1,25E+08	2,57E+08	1,127	0,79	2,22E+12	519,20
<i>H. pylori</i>	1	3 dies	0,059	3,25E+02	8,56E+07	0,21	0,197	9,55E+09	115,50
<i>H. pylori</i>	2	3 dies	0,050	7,95E+02	8,18E+07	0,175	0,155	7,96E+09	158,75
<i>E. coli</i>	1	3 dies	0,082	6,70E+07	1,87E+08	1,114	0,786	2,20E+12	525,56
<i>H. pylori</i>	1	7 dies	0,058	0,00E+00	8,40E+07	0,203	0,201	9,23E+09	235,38
<i>H. pylori</i>	2	7 dies	0,051	0,00E+00	7,51E+07	0,145	0,126	6,59E+09	125,66
<i>E. coli</i>	1	7 dies	0,089	4,27E+07	1,36E+08	1,128	1,05	2,28E+12	1146,30
<i>H. pylori</i>	1	14 dies	0,059	0,00E+00	8,14E+07	0,223	0,194	1,01E+10	193,80
<i>H. pylori</i>	2	14 dies	0,055	0,00E+00	7,30E+07	0,208	0,187	9,46E+09	195,38
<i>E. coli</i>	1	14 dies	0,073	2,17E+07	1,13E+08	1,177	0,818	2,32E+12	525,2
<i>H. pylori</i>	1	21 dies	0,079	0,00E+00	8,08E+07	0,22	0,188	1,00E+10	183,00
<i>H. pylori</i>	2	21 dies	0,066	0,00E+00	9,25E+07	0,203	0,18	9,23E+09	184,60
<i>E. coli</i>	1	21 dies	0,071	2,70E+05	1,16E+08	1,305	0,938	2,57E+12	657,33

No es van apreciar diferències en el recompte de cèl·lules totals ni en el contingut de ADN total d'*H. pylori* i de *E.coli*, mantenint-se constants durant tot el període d'estudi (21 dies) (Figura 18).

El gen *ureA* es va detectar en aigua, inclús passats 3 mesos de l'inici de l'estudi, fet que demostra la integritat de l'ADN del microorganisme (Figura 19).

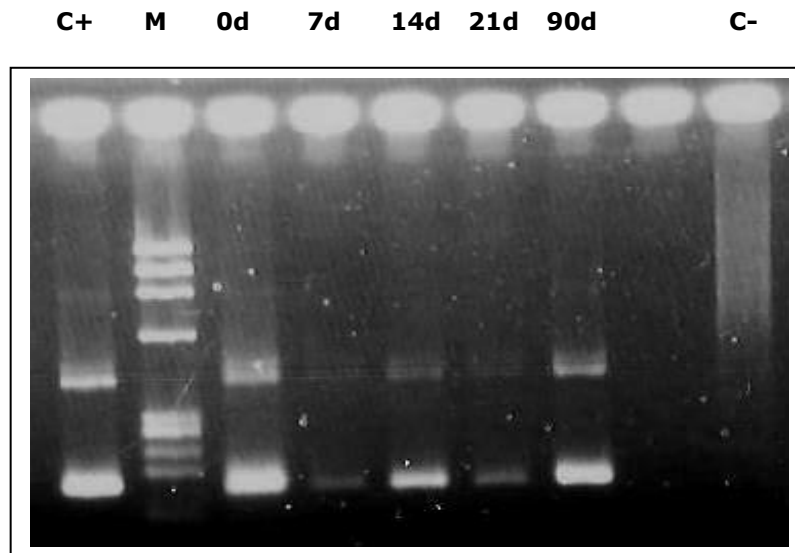


Figura 19. Gel d'agarosa 2% de PCR semiimbricada de supervivència d'*H. pylori* TIGR 26695 passats 0 dies, 3 dies, 7 dies, 14 dies, 21 dies i 90 dies d'emmagatzematge en aigua a 4°C.

M: Marcador de pes molecular ØX174

C+: Control positiu

C-: Control negatiu

Vam apreciar un comportament diferent en la culturabilitat d'*H. pylori*. Els valors del recompte de cèl·lules viables d'*H.pylori* 26695 van experimentar un ràpid descens, essent el dia 3 el darrer dia que es van poder cultivar (taula 34 i figura 20). A partir del dia 7, no es va poder recuperar cap cèl·lula de d'*H.pylori*. Per determinar amb més precisió quin dia perdien la capacitat de ser cultivades, es va repetir l'estudi amb anàlisis diaris (0 fins a 7 dies). Aquest cop es va treballar amb les dues soques d'*H. pylori* de les que disposàvem, la soca TIGR 26695 i la soca SS1. La culturabilitat es va perdre després de 6 dies, essent el 5è dia l'últim en que es va poder cultivar.

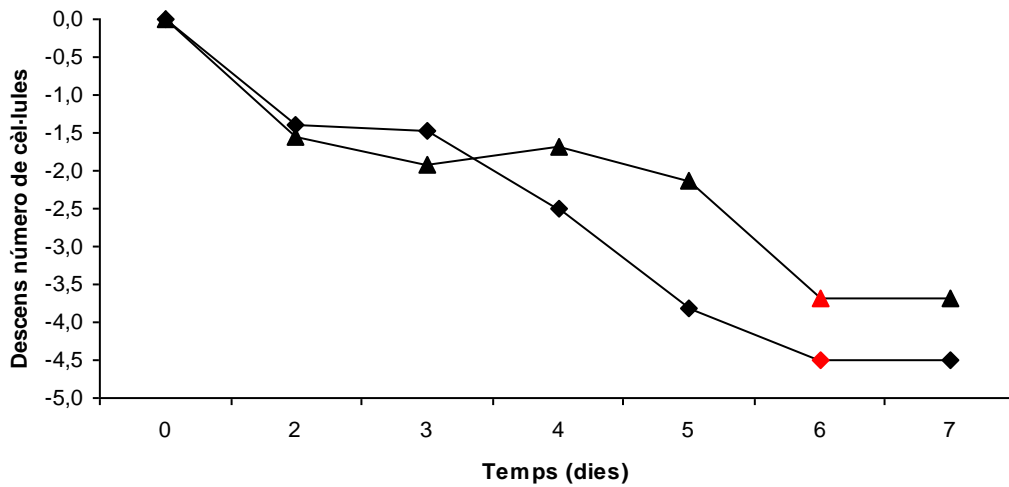


Figura 20. Descens de la capacitat de ser cultivable (Log (Vn/Vt)) de les cèl·lules d'*H. pylori* 26695 (◆) i SS1 (▲) enmagatzemades en aigua mineral durant 7 dies a 7°C. Els símbols vermells indiquen el dia que ja no es van poder cultivar.

En canvi, el número de cultivables de la soca de referència *E.coli* es va mantenir constant durant els 21 dies d'estudi, amb valors al voltant de 10^5 UFC/mL en aquest dia tot i que van experimentar un lleuger descens a partir del dia 3 (Taula 34).

La viabilitat cel·lular determinada usant el kit LIVE/DEAD BacLight també va patir modificacions durant els 21 dies d'estudi. Fins al dia 3, totes les cèl·lules del microorganisme *H. pylori* es tenyien de verd, color que ens indicava l'estat intacte de la membrana bacteriana. Entre els dies 3 i 14, cèl·lules bacterianes sanes/intactes (color verd) coexistien amb cèl·lules amb la membrana alterada (color vermell). A partir del dia 14, la proporció de cèl·lules malmeses eren superior a les cèl·lules intactes. Finalment, després de 21 dies d'emmagatzematge, no s'apreciava cap població de cèl·lules verdes, essent la majoria vermelles i alguna de color groc. No es va aplicar aquesta tècnica a *E.coli*.

2. TRANSFORMACIÓ MORFOLÒGICA PER ULTRAMICROSCOPIA

També es va estudiar la morfologia bacteriana d'*H. pylori* amb microscopia electrònica de rastreig durant tot el temps d'emmagatzematge.

La morfologia predominant en el dia 0 i el dia 1 era la bacil·lar espiral tot i que algun coc es podia observar (Figura 21A). Les cèl·lules s'agrupaven en clústers i flagells polars llargs. En el dia 3, predominava la forma bacil·lar tot i que començaven a escurçar-se i arrodonir-se (Figura 21B). Començava a intuir-se el canvi morfològic. Passats 7 dies, es va visualitzar la forma de U o ferradura i bacils cada cop més curts i irregulars (Figura 21C). El predomini de formes cocals era evident en els dies 14 i 21 tot i que encara es podien observar els flagells sobre dels cocs i els clústers (Figura 21D).

En canvi, la morfologia d'*E.coli* no va variar durant els 21 dies d'estudi, tenint la mateixa forma bacil·lar tant en dia 1 com en el dia 21 (Figura 22).

Finalment i per intentar relacionar l'envelliment de les cèl·lules d'*H. pylori* amb la transformació cocal, es va observar un tall vertical d'una colònia d'*Helicobacter pylori* TIGR 26695 sobre agar Columbia passats 4 dies d'incubació per microscopia electrònica de rastreig. L'observació ultramicroscòpica ens va revelar els canvis morfològics que tenien lloc dins de la colònia. En la zona més superficial, es disposaven les formes bacil·lars mentre que en la base de la colònia, a prop de l'agar, hi trobàvem les formes cocals. En la zona central de la colònia, vam observar una zona de transició amb bacils i cocs (Figura 23). Es va observar la mateixa distribució vertical en la colònia d'*E.coli*, mantenint-se la forma bacil·lar en els diferents estrats del tall vertical.

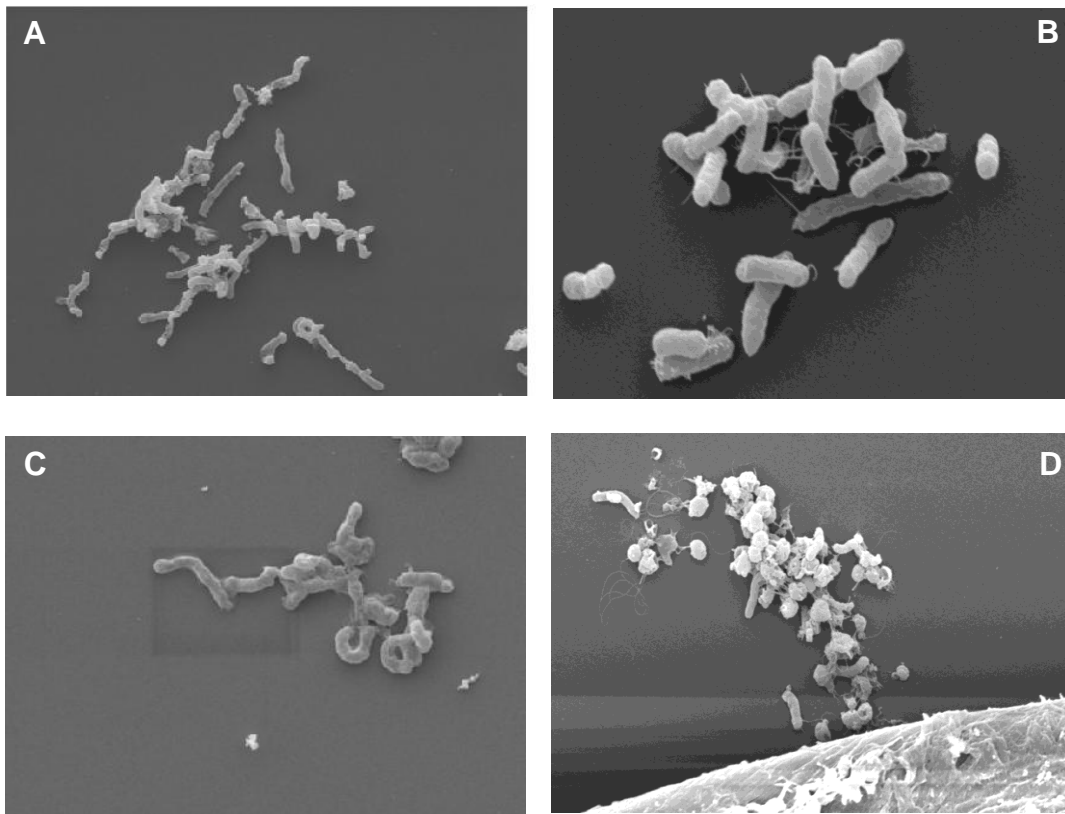


Figura 21. Fotografies electròniques de rastreig d'*H. pylori* TIGR 26695 durant 21 en aigua a 4°C.

- A:** Dia 0: Forma espiral bacilar. X12000
- B:** Dia 3: Forma espiral tot i més curta i arrodonida. X20200
- C:** Dia 7: Forma espiral en forma de U o ferradura. X16000
- D:** Dia 14: Formes coccals amb agrupacions encara bacilars.

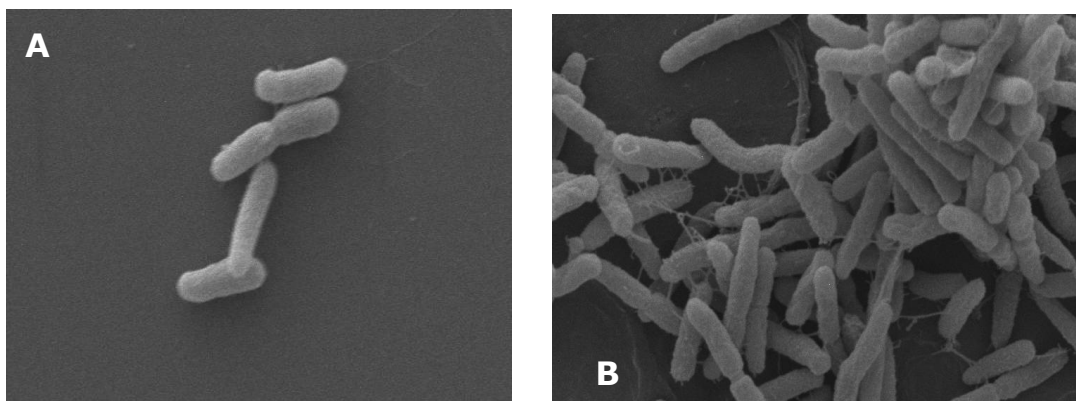
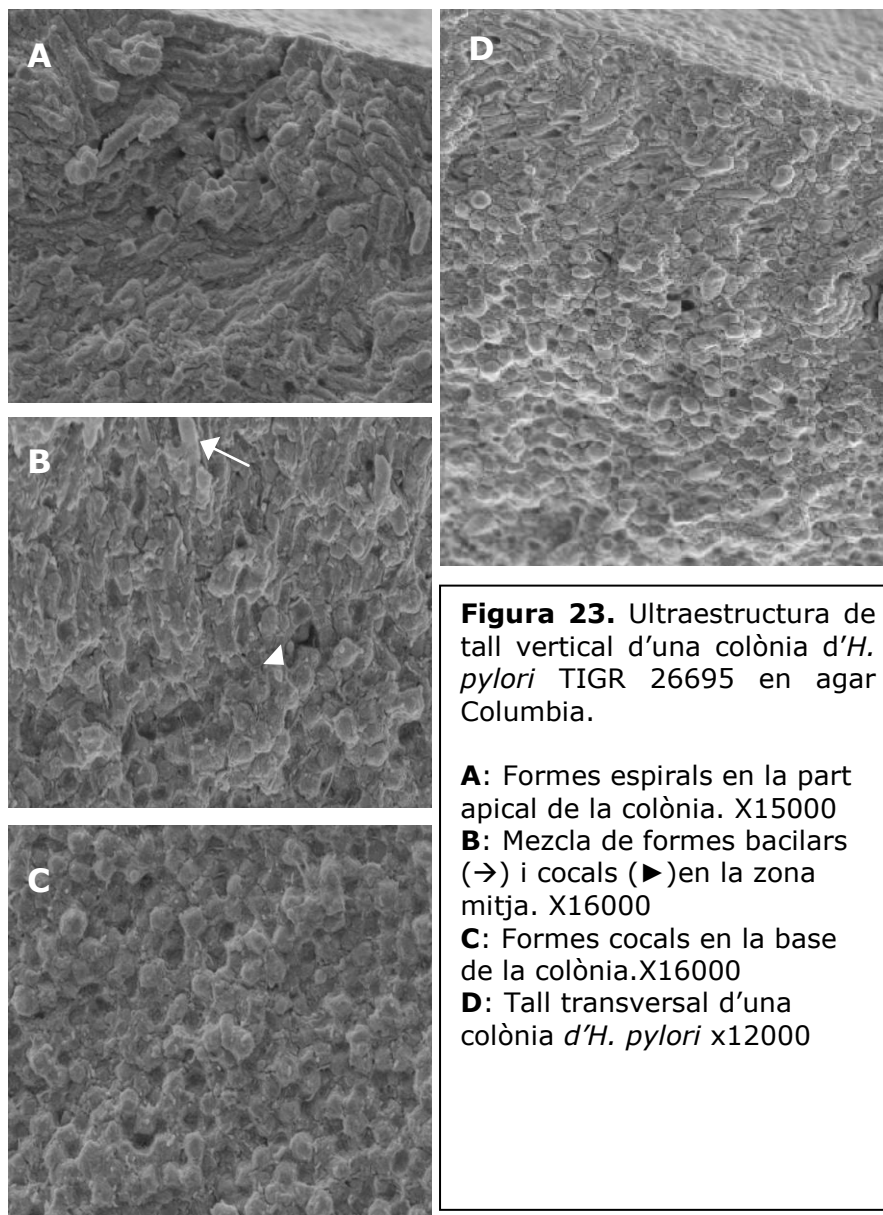


Figura 22. Fotografies electròniques de rastreig d. *E. coli* ATCC10536

- A:** Dia 0: forma bacilar. X10000
- B:** Dia 21: forma bacilar. X10000



DISCUSSIÓ

En el capítol anterior, s'ha comentat que la transmissió d'*Helicobacter pylori* és l'aspecte més incert de la biologia d'aquest patogen. Tot i això, es reconeix que l'aigua té un paper fonamental en la seva propagació tal com demostra el fet que es pot detectar en tot tipus d'aigua, inclús en aquelles on la presència d'altres microorganismes contaminants és molt baixa (Park i col., 2001; Watson i col., 2004).

El comportament d'aquest microorganisme ha sigut l'objectiu de varis estudis (Shahamat i col., 1989; West i col., 1990; Adams i col., 2003). La majoria d'ells s'han centrat en l'estudi d'un aspecte en concret de la biologia d'*Helicobacter pylori* (morfologia, creixement, viabilitat) i realitzant els estudis en aigua de riu o mineral (Sato i col., 1999; Shahamat i col., 2003).

En aquest capítol s'ha estudiat la supervivència de les cèl·lules bacterianes d'*Helicobacter pylori* en aigua mineral analitzant diversos paràmetres tant per mètodes tradicionals com per mètodes moleculars. L'aigua mineral embotellada té una composició i unes característiques fisicoquímiques més constants que l'aigua d'aixeta, fet que facilita el control de l'estudi ja que hi ha menys paràmetres indeterminats i variables que puguin afectar al microorganisme. A més a més, s'ha escollit *Escherichia coli* com a organisme de referència. En el nostre estudi hi ha hagut la voluntat d'oferir una visió global e integradora fins ara no publicada. S'ha analitzat conjuntament la culturabilitat, la viabilitat cel·lular, el canvi morfològic, la quantificació d'àcids nucleics i la detecció gènica de les cèl·lules d'*Helicobacter pylori* en un medi aquàtic controlat fisicoquímicament.

Segons els nostres resultats, les cèl·lules d'*H. pylori* mantenen la capacitat de ser cultivades en medi sòlid després de 5 dies d'emmagatzematge en aigua a baixa temperatura i en la foscor. D'acord amb aquest fet, era esperable que l'anàlisi del genoma indiqués una degeneració del mateix i una impossibilitat de poder detectar el gen *ureA* en mostres de més de 5 dies d'emmagatzematge. Contràriament a l'esperable,

els anàlisis del gen *ureA* per PCR van revelar la presència d'aquest gen més enllà dels 21 dies marcats per cada estudi, arribant a poder visualitzar la banda d'amplificació corresponent passats 90 dies. A més a més, la quantitat de ADN mesurada espectrofotomètricament en tot aquest període també es va mantenir constant. En un intent de clarificar aquesta discrepància entre els resultats obtinguts per cultiu i els obtinguts per PCR, ens vam centrar en la determinació de la viabilitat de les seves cèl·lules. L'estudi amb els colorants fluorescents va mostrar que les bacteries mantenien la integritat de les seves membranes més enllà de la seva capacitat de ser cultivades. La viabilitat cel·lular decreixia lentament fins al dia 14, tot i que la capacitat de creixement només era efectiva fins al dia 5.

D'altra banda, el recompte de cèl·lules totals amb el colorant DAPI ens indicava un manteniment de la concentració de bacteries en l'aigua dopada durant els 21 dies que durava l'estudi. Tot i no disminuir en nombre, les bacteries sí que patien una transformació morfològica en el temps, informació que ens proporcionaven les imatges obtingudes per microscopia electrònica de rastreig. Es produïa una conversió en la morfologia de les cèl·lules bacterianes d'*H. pylori* que passaven de la forma espiral a cocal amb el pas del temps. La presència de poques formes espiril·lades es relacionaria amb una baixa capacitat de cultiu de les mateixes. Aquesta informació coincidia amb la publicada en estudis previs per altres autors (Catrenich i col., 1991; Benaissa i col., 1996; Adams i col., 2003). D'altra banda, la majoria de cocs mantenien la seva integritat i viabilitat durant els primers 14 dies d'estudi tot i no ésser cultivables. Aquesta conclusió era coherent amb la obtinguda prèviament per altres autors (Mai i col., 1990; Adams i col., 2003). Per tant, ens trobem davant de cèl·lules bacterianes que no poden cultivar-se però que són viables i, per tant, molt possiblement actives metabòlicament i patològicament. Aquesta idea es recolzada per dos estudis previs. En el primer estudi realitzat per Cellini, es va demostrar que les bacteries viables no cultivables podien colonitzar l'estomac de ratolins després de la seva ingestió (Cellini i col., 1994). En el segon estudi dut a terme per Gribbon, les formes cocals mantenien el seu metabolisme oxidatiu al mateix nivell que les formes espirals després de varis mesos (Gribbon i col., 1995).

Contràriament a *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* mostrava un comportament constants tant en la culturabilitat com amb morfologia bacteriana al llarg del temps, molt possiblement per una millor adaptació al medi aquàtic i aeròbic.

Tots els estudis relacionats amb la morfologia d'*Helicobacter pylori* en medis aquàtics on s'ha afegit artificialment fan sempre referència a les bactèries en suspensió. Mai s'ha analitzat prèviament l'aspecte d'aquestes bactèries quan es troben en la colònia, abans de ser afegides a l'aigua.

El nostre anàlisi morfològic de les cèl·lules bacterianes presents en la colònia van mostrar que la forma bacil·lar i cocal coexisteixen amb un distribució vertical. La existència de cocs en unacolònia jove recolzaria la teoria que defensa que els cocs no són formes degeneratives de la bactèria. Recentment, s'ha demostrat que *H. pylori* pot sobreviure en biofilms d'aigua potable ja que s'han detectat formes espiral i cocals en aquests biofilms (Azevedo i col., 2003). Per tant, la presència de cocs en colònies no envellides i en biofilms indicaria que aquesta morfologia podria ser una forma de supervivència d'*H. pylori*. A més a més, els estudis de viabilitat aplicats a la colònia van mostrar que els colorants SYTO 9 i IP penetraven simultàniament en les cèl·lules de la colònia. Tenint en compte que les colònies eren joves i estaven en creixement, les bactèries presents en ella no podien ser considerades mortes. Aquest fet ens suggeria que una permeabilitat més elevada del habitual es produïa en les cèl·lules quan es trobaven en una colònia en creixement. El mateix estudi realitzat en colònies d'*E.coli* van mostrar el mateix comportament de manera que ens indicaria que la membrana pot tenir un comportament diferencial en funció del medi de creixement, líquid o sòlid.

Els estudis realitzats en aigua mineral han permès conèixer quin és el comportament d'*H. pylori* en aquest medi. Si s'assumeix que aquest patogen es pot comportar d'una manera molt similar en aigua de riu o residual, la incapacitat dels investigadors d'aïllar *Helicobacter* del medi aquàtic s'explicaria, en part, per la transformació fisiològica a estat viable

no cultivable en matrius líquides i la dilució que reduiria l'efecte de unes aportacions probablement molt baixes. A més, altres paràmetres afectarien a la supervivència del microorganisme en el medi ambient reduint el nombre total de bactèries, com ara l'efecte de la radiació solar, les fluctuacions de temperatura o la depredació. Tot i que aquest factors afecten a la seva capacitat de sobreviure en el medi líquid, *H. pylori* persisteix en l'aigua més o menys actiu i, per aquest motiu, l'aigua es considera un vehicle de transmissió del patogen. D'acord amb les dades obtingudes tant amb el nostre estudi de supervivència com en els publicats anteriorment, les aigües amb una contaminació fecal recent o amb aportes com ara vòmits o saliva transmetrien més eficientment el microorganisme infeccios humans que aquelles aigües amb aportes més vells en el temps. Aquest fet permetria explicar que la única vegada que s'ha aïllat *H. pylori* d'aigua residual, s'hagi aconseguit a partir d'una aigua amb aportacions fecals recents (Lu i col., 2002).

Tal com el nostre estudi ha demostrat, la comprensió del comportament d'*H. pylori* en aigua variarà segons el mètode analític que s'usi i es necessària la integració de les diferents tècniques per tenir una visió global. Després de 3 setmanes de permanència en aigua, les cèl·lules bacterianes mantenen la seva membrana intacte però molt més permeable, conservaven el seu ADN i el número total de cèl·lules presents en el medi però manifestaven un canvi morfològic. A més, perdien la seva capacitat de creixement en medi sòlid després de poc dies d'haver-se incorporat a l'aigua tot i mantenir-se actives durant un període de temps bastant més llarg. Si prenem com a base que la interpretació del comportament d'*H. pylori* en aigua difereix en funció del tipus d'anàlisi que s'usi, el risc d'infecció per aquest patogen podria estar sobreestimat pel mètode de la PCR mentre que estaria subestimat si usem les tècniques de cultiu. No obstant, les dades aquí presentades indiquen que aquesta bactèria es pot considerar un patogen de transmissió aquàtica durant la seva fase activa independentment de la seva forma i capacitat de cultiu.

Capítol 4

Implicació del sistemes dentals en la transmissió d'Helicobacter pylori

INTRODUCCIÓ

H. pylori és responsable de la inflamació de la mucosa gàstrica i s'associa a la gastritis, a la úlcera gàstrica i duodenal. A més a més, la infecció per aquest patògen està fortament relacionada amb l'adenocarcinoma gàstric i el limfoma de MALT (Anònim, 1994; Konurek i col., 2001). La prevalença d'*H. pylori* varia segons la població i les condicions i pràctiques sanitàries. En societats com la nostra on es disposen de sistemes sanitaris efectius i generals, la prevalença està al voltant del 20% mentre que en comunitats en desenvolupament, aquesta xifra s'eleva al 90-100% (Graham col., 1991). El contagi persona-persona és important per a la transmissió del microorganisme però l'aigua té un paper bàsic en la seva transmissió.

En societats desenvolupades com la nostra, el ADN d'*H. pylori* s'ha detectat en ambients aquàtics con ara l'aigua de l'aixeta (Hegarty i col., 1999; Watson i col., 2004). Majoritàriament, aquest tipus d'aigua és la que alimenta el sistema d'aigua de les cadires dentals dels dentistes en Europa. L'estudi d'aquests sistemes ha mostrat que dins els tubs una abundant microbiota, organitzada normalment en biofilm i on inclús s'han trobat alguns microorganismes patògens com *Legionella sp.* Són sistemes que estan altament contaminats per microorganismes patogènics i no patogènics (Walker i col., 2004). La via d'adquisició d'aquests microorganismes és o bé a través de l'aigua d'entrada o bé procedeixen, per retracció, de la boca dels pacients. L'aigua d'entrada a les cadires dentals inclou aigua d'aixeta procedent del sistema de distribució de la població, tant clorada com no clorada, i aigua desionitzada.



Figura 24. Unitat dental amb sistema d'aigua.

En un estudi realitzat a la ciutat de Barcelona, es va comprovar que la meitat de les consultes dentals (escollides a l'atzar) alimentaven les cadires dentals amb aigua de l'aixeta clorada i l'altra meitat treballava amb aigua destil·lada o desionitzada (Araujo i Contreras., 2004) . Aquesta aigua pot entrar a l'aparell directament o passant primer per un dipòsit d'emmagatzematge. Amb el temps, petites quantitats de microorganismes van entrant en el sistema dental i es van multiplicant. A més a més, tot i que els sistemes que estan en contacte amb la boca del pacient disposen de vàlvules antiretracció, el mal funcionament ocasional de les mateixes pot permetre el retorn de fluids orals al sistema i causar infeccions creuades entre pacients o els propis treballadors de les consultes. Entre els microorganismes que es poden transmetre d'aquesta manera es troba *Helicobacter pylori*. La cavitat oral està considerada, per alguns autors, com reservori de l'*H. pylori* gàstric (Karczewska i col., 2002; Dowsett i Kowolik., 2003; Gebara i col., 2004). S'ha detectat en la saliva i en la placa dental (Mapstone i col., 1993; Cellini i col., 1995; Parsonnet i col., 1999; Song i col., 2000; Kabir., 2004). Per tant, l'aigua dels sistemes dentals podria ser considerada aigua de risc per a l'adquisició d'*H. pylori*.

OBJECTIUS

➤ Determinar la presència d'*H.pylori* en l'aigua de les cadires dentals com a possible font d'infeccions d'*H. pylori* per a pacients i personal sanitari de clíniques dentals.

- Detectar la presència de l'ADN d'*H. pylori* en saliva de voluntaris.
- Detectar la presència de l'ADN d'*H. pylori* en aigües dels sistemes dentals.

MATERIAL I MÈTODES

1.- PREPARACIÓ DE MOSTRES D'AIGUA DE XERINGA

En aquest estudi es van analitzar 31 mostres d'aigua de xeringa de les cadires dentals de 16 clíniques dentals de la ciutat de Barcelona de les quals 20 cadires s'alimentaven d'aigua desionitzada i 11 cadires funcionaven amb aigua de l'aixeta de les mateixes consultes. Totes les mostres es van recollir en pots de plàstic de 100 ml estèrils.

Per a l'extracció d'àcids nucleics, es van usar dos tipus de procediments diferents, en funció del tipus de mostra.

L'aigua es va concentrar per centrifugació. 100 ml de cada mostra es van centrifugar a 7740x *g* durant 15 minuts a 4°C. El pellet es va resuspendre en 1 mL de PBS i es va tornar a centrifugar a 10000x *g* durant 5 minuts. Finalment, es va afegir 50 µL de PBS al pellet resultant i es va mantenir a -20°C. L'extracció dels àcids nucleics totals es va realitzar amb tiocianat de guanidina i partícules de sílice (veure apartat 6.3.2). El material genètic resultant es va guardar a -20°C fins al moment de la seva amplificació per PCR.

2. - PREPARACIÓ DE MOSTRES DE SALIVA

En aquest estudi també es van recollir i analitzar 31 mostres de saliva de pacients voluntaris. Les mostres es van recollir en pots de plàstic estèrils.

El volum de partida de la saliva fou de 1mL. Es va concentrar per centrifugació a 10000x *g* durant 10 minuts i el pellet resultant es va resuspendre en 50 µL de PBS. Aquest volum es va dividir en dos alíquotes de 10 µL i 40 µL per extreure posteriorment els àcids nucleics. A cada mostra concentrada es va afegir 100 µL de tampó d'extracció, es va agitar durant 1 minut en un vòrtex i es va deixar reposar durant 15 minuts. Es va aplicar xoc tèrmic per ebullició durant 10 minuts i després es va refredar

ràpidament en gel durant 2 minuts. L'eliminació de substàncies degradadores de l'ADN i inhibidors de la PCR es va aconseguir afegint 10% de resina AG501-X8 (Biorad). Es va agitar durant 30 segons i es van centrifugar a 10000x *g* durant 10 minuts. El sobrenedant es va conservar a -20°C.

3.- DETECCIÓ DEL GEN *ureA* I DEL GEN *16S rRNA*

3.1.- Amplificació del gen *ureA* i del gen *16S rRNA*

El gen *ureA* i del gen *16S rRNA* es va detectar per PCR semiimbricada segons protocol descrit en apartat 6.3.3 i 6.3.4 del capítol 3, amb un amplicó final de 155 i 433 pb, respectivament.

En cada amplificació es va introduir 1 control negatiu d'extracció de la mostra, un control negatiu de barreja de reactius i 1 control positiu d'ADN de la soca TIGR 26695 d'*Helicobacter pylori*.

La detecció del gen *ureA* i del gen *16S rRNA* es va realitzar en cadascuna de les mostres d'aigua i saliva.

3.2.- Electroforesi i visualització

Els productes amplificats del gen *ureA* i del gen *16S rRNA* van ser analitzats per electroforesi en gel d'agarosa (Ecogen) al 2% en tampó TBE 1X. Les condicions electroforètiques van ser 80 V durant 70 minuts. El volum total de càrrega va ser de 10 µl d'amplificat amb 3 µl de tampó de càrrega. Com a marcador de pes molecular es va usar ØX174 (Sigma).

La visualització de la banda amplificada es va fer per tinció amb bromur d'etidi (0,5 µg/mL) durant 15 minuts i posterior rentat amb aigua. Les bandes tenyides es van visualitzar i fotografiar en el sistema ImageMaster®UDS (Pharmacia-Biotech).

3.3.- Seqüenciació

Els amplicons resultants de 155 pb pel gen *ureA* i de 433 pb pel gen *16S rRNA* van ser purificats per amb columna de purificació UltraFree DNA (Millipore) i es va seqüenciar amb l'aparell AB 3700 genetic analyzer (Applied Biosystems) segons el protocol de l'apartat 6.3.4.2 del capítol 3. El grau de similitud es va determinar comparant les seqüències obtingudes amb les seqüències del ADN del les soques de referència publicades amb l'ajut del programa informàtica *BLAST* i les bases de dades del *GeneBank* (<http://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTATS

1.- DETECCIÓ I SEQÜENCIACIÓ DE LES MOSTRES

Van usar-se dos conjunts d'iniciadors, un per al gen *ureA* i l'altre per al gen *16S rRNA*, per detectar l'ADN d'*Helicobacter pylori*.

1.1.- Mostres de saliva

Van ser estudiades 31 mostres de saliva d'individus sans (Taula 35).

Taula 35. Resultats de la PCR semiimbricada i la seqüenciació per les mostres de saliva.

		PCR positiva		Alineament seqüència	
		Gen	Gen	Gen	Gen
		<i>16S rRNA</i>	<i>ureA</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>ureA</i>
Saliva	n=31	19/31	3/20	2 <i>H. pylori</i> 1 <i>C. Concisus</i> 3 gen. <i>Wolinella</i>	3 <i>H. pylori</i>

En primer lloc, es va determinar la presència del gen *16S rRNA* en les 31 mostres (Taula 37). Es va obtenir senyal d'amplificació per aquest gen en 19 casos, que representen un 61,3% del total d'aquest tipus mostres. D'aquestes 19 mostres positives, es van poder seqüenciar 7 mostres (Taula 36).

Taula 36. Seqüències de les mostres de saliva positives pel gen *16S rRNA* que es van poder seqüenciar.

Mostra S1

```
GGNACCANGCCCCNGGTTTTTGAGGGNGNACACGGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATATTNCTCAATGGGGGAAACCCNGAAGCAGCAACGCC
GCGTGGAGGATGAAGGNTTTAGGATTGTAACTCCTTTTGATTAGAGAAG
ATAATGACGGNCATCTAACGGAATAANCNCCGGCGTAACNT
```

Mostra S16

CTTATTGGGTGACCGCGTCACATTGGGACTGAGAACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCTCAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
GCGACGCCGCGTGGAGGATGACACTTTTCGGAGCGTAAACTCCTTTTGT
AGGGAAGAATAATGACGGTACCTAACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTACTCGGAATCACTGG
GCGTAAAGGACGCGTAGGCGGATTATCAAGTCTCTTGTGAAATCCTATGG
CTTAACCATAGA ACTGCTTGGGAAACTGATAATCTAGAGTGAGGGAGAGG
CAGAT

Mostra S17

TGAACGGACACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGTA
GCAGTAGGGAATATTGCTCAATGGGGGAAACCCTGAAGCAGCAACGCCGC
GTGGAGGATGAAGTTTTAGGATTGTA AACTCCTTTTGTAGAGAAGATAA
TGACGGTATCTAACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAGCG
CGTAGGCGGGATAGTCAGTCAGGTGTGAAATCCTATGGCTTAACCATAGA
ACTGCATTTGAAACTACTATTCTAGAGTGTGGGAGAGGTAGGTGGAATT

Mostra S22

GATCGGACACACTGGA ACTGTAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATATTGCTCAATGGGGGAAACCCTGAAGCAGCAACGCCGC
GTGGAGGATGAAGTCTTCGGATTGTA AACTCCTTTTCTAAGAGAAGATTA
TGACGGTATCTTAGGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAGCA
CGTAGGCGGCCTTACAAGTCAGATGTGAAATCTAACGGCTTAACCGTTAAA
CTGCATTTGAAACTGTAGGGCTAGAGTATGGGAGAGGTAGGTGGAATTCT
CGGTGTAGGGGTAAAATCC

Mostra S24

TGNTCGGCCACACTGGA ACTGAGAACGGTCCACCACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATATTGCTCAATGGGGGAAACCCTGAAGCAGCAACGCCGC
GTGGAGGATGAAGTCTTCGGATTGTA AACTCCTTTTCTAAGAGAAGATTA
TGACGGTATCTTAGGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG

GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTCTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAGCA
 CGTAGGCGGCCTTACAAGTCAGATGTGAAATCTAACGGCTTAACCGTTAAA
 CTGCATTTGAAACTGTAGGGCTAGAGTATGGGAGAGGTAGGTGGAATTCT
 CGGTGTA

Mostra S26

GNTAACANCACTCGGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTAGGGAATATTGCTCAATGGGGGAAACCCTGAAGCAGCAACGCC
 GCGTGGAGGATGAAGGTCTTCGGATTGTAACTCCTTTTCTAAGAGAAGAT
 TATGACGGTATCTTAGGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTCTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAG
 CACGTAGGCGGCCTTACAAGTCAGATGTGAAATCTAACGGCTTAACCGTTA
 AACTGCAATTGAAACTGTAGGGCTAGAGTATGGGAGAGGTAGGTGGAATT
 CTCTNTGTNCNNCTAAAAT

Dues mostres, la S1 i la S17, es confirmaven per seqüenciació com *Helicobacter pylori* mostrant una elevada homologia amb soques de referència *H. pylori* del Gene Bank. Una altra mostra, S16, es va identificar com *Campylobacter concisus* i les altres 3 (S22, S24 i S26) tenien un percentatge d'homologia amb el gènere *Wolinella* superior al 95% (taula 37). Les altres 12 mostres positives per a aquest gen no es van poder seqüenciar.

Posteriorment, es va realitzar la PCR d'amplificació de gen *ureA* en 20 mostres de saliva, de les quals només un 15% van ser positives (mostres S1, S17 i S29) (Taula 37).

Taula 37. Resultats de la PCR per detectar el gen *16S rRNA* i el gen *ureA* en mostres de saliva i seqüenciació de 7 mostres positives pel gen *16S rRNA*. n=31

Mostra	Data recollida	Edat	PCR gen <i>16S rRNA</i>	Espècie identificada amb gen <i>16S rRNA</i>	%Identitat; e-value	PCR gen <i>ureA</i>
S1	10/06/2003	26	+	<i>Helicobacter pylori</i>	94%; $2e^{-59}$	+
S2	10/06/2003	27	-			-

Mostra	Data recollida	Edat	PCR gen 16S rRNA	Espècie identificada amb gen 16S rRNA	%Identitat; e-value	PCR gen ureA
S3	16/06/2003	26	+			-
S4	16/06/2033	66	-			
S5	08/07/2003	46	+			-
S6	08/07/2003	6	-			
S7	08/07/2003	10	-			
S8	08/07/2003	75	+			-
S9	08/07/2003	70	+			-
S10	29/06/2003	26	+			-
S11	08/07/2003	7	+			-
S12	08/07/2003	10	-			
S13	08/07/2003	10	-			
S14	08/07/2003	9	+			-
S15	08/07/2003	10	+			-
S16	08/07/2003	10	+	<i>Campylobacter concisus</i>	97%; $8e^{-161}$	-
S17	08/07/2003	10	+	<i>Helicobacter pylori</i>	99%; 0.0	+
S18	08/07/2003	39	-			
S19	08/07/2003	36	+			-
S20	08/07/2003	40	-			
S21	08/07/2003	36	-			
S22	08/07/2003	22	+	<i>Candidatus Wolinella africanus</i>	99%;0.0	-
S23	08/07/2003	42	-			
S24	08/07/2003	39	+	<i>Candidatus Wolinella africanus</i>	99%; $3e^{-179}$	-
S25	08/07/2003	24	-			
S26	08/07/2003	21	+	<i>Candidatus Wolinella africanus</i>	99%; $3e^{-175}$	-
S27	08/07/2003	27	+			-

Mostra	Data recollida	Edat	PCR		%Identitat; e-value	PCR gen <i>ureA</i>
			gen 16S <i>rRNA</i>	Espècie identificada amb gen 16S <i>rRNA</i>		
S28	08/07/2003	43	+			-
S29	17/07/2003	25	+	<i>Helicobacter pylori</i>	95%; 2e ⁻⁶⁵	+
S30	17/07/2003	28	+			-
S31	17/07/2003	27	-			

1.2.- Mostres d'aigües de xeringa dels sistemes dentals

Es va estudiar 31 mostres d'aigua procedent de les xeringues de les corresponents cadires dentals ubicades en 16 consultes dentals (Taula 38).

Taula 38. PCR semiimbricada de mostres d'aigües de xeringa

	n	PCR positiva		Alineament seqüència	
		Gen	Gen	Gen	Gen
		16S <i>rRNA</i>	<i>ureA</i>	16S <i>rRNA</i>	<i>ureA</i>
Aigües xeringues	n=31	4/31	0/31	4 <i>Campylobacter jejuni</i>	-

Aquest treball es va fer en paral·lel amb l'estudi de la presència d'altres microorganismes (TVC, gènere *Streptococcus*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella*, *Mycobacterium* i *Candida*) presents en les aigües de xeringa de les cadires dentals (dades cedides per la Dra. Núria Contreras) (taula 39). En totes les mostres es va trobar la presència de bacteris entre 1-2560 UFC/mL i en algunes mostres es van identificar microorganismes patògens.

En aquestes mostres d'aigua de xeringa, es va observar el producte d'amplificació del gen 16S *rRNA* en 4 casos, dels quals 2 casos corresponien a xeringues alimentades amb aigua desionitzada i 2 de xeringues alimentades amb aigua de l'aixeta, d'un total de 31 mostres analitzades. Tot i aquests resultats, la seqüenciació d'aquest fragments va demostrar que el ADN detectat no pertanyia al gènere *Helicobacter* sinó que corresponia a l'espècie *Campylobacter jejuni*, amb un percentatge de identificació amb les

bases de dades superiors al 98%. En cap de les mostres es va poder amplificar el fragment del gen *ureA*.

Taula 39. Característiques microbiològiques de les aigües de xeringues de es cadires dentals (n=31).

Mostra Nº	Tipus d'aigua	<i>H. pylori</i> PCR Gen 16S rRNA	TVC (UFC/mL)	<i>Streptococcus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Legionella</i> sp	<i>Mycobacterium</i>	Candida
1,1	Desionitzada	-	118						
2,1	Desionitzada	+	7						
2,2	Desionitzada	+	6						
4,1	Aigua aixeta	+	1				+		
5,1	Aigua aixeta	+	71						
5,2	Aigua aixeta	-	46,5						
5,3	Aigua aixeta	-	2,5						
6,1	Desionitzada	-	290		+				
6,2	Desionitzada	-	190		+				
7,1	Aigua aixeta	-	20	+				+	
7,2	Aigua aixeta	-	154					+	
8,1	Aigua aixeta	-	1						
8,2	Aigua aixeta	-	130					+	
9,1	Desionitzada	-	2						
9,2	Desionitzada	-	5						
10,1	Desionitzada	-	130					+	
10,2	Desionitzada	-	1,1						
11,1	Desionitzada	-	1						
12,1	Aigua aixeta	-	9					+	
13,1	Desionitzada	-	5						
13,2	Aigua aixeta	-	1,67			+			
14,1	Desionitzada	-	195						
14,2	Desionitzada	-	420						
15,1	Desionitzada	-	62			+			
15,2	Aigua aixeta	-	8,5						
16,1	Desionitzada	-	670						
16,2	Desionitzada	-	2560						
16,3	Desionitzada	-	93,5						
16,4	Desionitzada	-	172						

DISCUSSIÓ

L'aigua de les cadires dentals pot allotjar un elevat nombre de microorganismes on podem incloure patògens (Atlas, 1995; Walker i col., 2004). L'origen d'aquests microorganismes és principalment l'aigua que alimenta aquests sistemes però no es pot descartar la microbiota que tenen els pacients en la seva boca, malgrat la presència d'una vàlvula antiretorn en aquests sistemes.

Aquest ha estat el primer estudi on s'ha analitzat la possible implicació de l'aigua de les cadires dentals en la transmissió d'*Helicobacter pylori*. Aquest tipus d'aigua és el punt d'unió de 2 possibles orígens de contaminació d'*H. pylori*: l'aigua de l'aixeta i la cavitat bucal dels pacients. La presència d'altres patògens oportunistes com ara *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella sp*, *Mycobacterium* o *Candida* en les aigües de les cadires dentals no descartava la presència d'*Helicobacter pylori* que tot i no ser un microorganisme aquàtic pròpiament dit, podria arribar a aquest tipus d'ambient a través de l'aigua en una concentració molt baixa o per contaminació creuada.

La cavitat oral és un habitat amb elevat número de microorganismes, on alguns d'ells habiten permanentment i altres de manera transitòria. Tot i que fa més de 20 anys que *H. pylori* es va aïllar per primera vegada de la cavitat oral (Krajden i col., 1989), no està clar si aquest patogen es localitza transitòriament en la boca abans de passar a l'estómac (Rossi-Aguar i col., 2009) o si la cavitat oral és un reservori real, on es multiplica abans d'arribar-hi per infectar-lo (Song i col., 2009). Els nostres resultats són coherents amb aquesta variabilitat d'espècies presents en la boca ja que tot i treballar amb iniciadors del 16S rRNA per *Helicobacter pylori* i identificar una mostra com a *H. pylori*, també van permetre identificar *Campylobacter concisus* i *Wolinella succinogenes* amb una homologia superior al 95%. Se'ns evidencia que els iniciadors escollits per al gen 16S rRNA no són prou específics per diferenciar *Helicobacter pylori* d'altres microorganismes propers filogenèticament, en mostres ambientals com ara saliva. La baixa freqüència de detecció de *Helicobacter pylori* amb els iniciadors per *ureA* en saliva són comparables amb els obtinguts per autors

com Sugimoto i Rossi-Aguiar (Sugimoto i col., 2009; Rossi-Aguiar i col., 2009). A més a més, cal destacar que els 2 *Helicobacter pylori* identificats corresponen a 2 mostres diferents.

En les últimes dècades, l'ADN d'*Helicobacter pylori* s'ha detectat en aigües de beguda de països tant diversos com Anglaterra, Japó, Mèxic o Perú (Hulten i col., 1996; Mazari-Hiriart i col., 2001; Sasaki i col., 1999 i Wlaker i col., 2004). En la majoria de casos, s'ha detectat el gen *16S rRNA* amb un major èxit que el gen *ureA*, *cag A* o el gen de l'adhesina. Aquest comportament es repeteix en el nostre estudi, on només s'han obtingut mostres positives pel gen *16S rRNA* en els dos tipus d'aigües estudiades, aixeta i desionitzada, i impossible amb el gen *ureA*. Les 4 mostres positives pel gen *16S rRNA* d'*H.pylori* d'aigua de xeringa van resultar ser *Campylobacter jejuni* quan es va estudiar la seva seqüència. Aquests resultat entren en contradicció amb els obtingut per Goto i col·laboradors (2000). Aquest autor va escriure l'especificitat d'aquests iniciadors pel gènere *Helicobacter* i per diferents espècies d'*Helicobacter* pròpies de rosegadors però no va descartar la seva afinitat per altres espècies i gèneres propers. Una possible explicació a aquest comportament podria ser la tendència dels iniciadors usats als falsos positius, degut a la capacitat d'unió d'aquest grup d'iniciadors pel gen *16S rRNA* al ADN de gèneres propers filogenèticament a *H. pylori*, en especial en mostres ambientals (Sugimoto i col., 2009).

Akamatsu i col·laboradors (1996) va descriure la iatrogènia a través d'endoscopis, pinces de biòpsia... com a possibles font d'infecció del personal d'endoscòpia, sobretot en aquells que treballen sense guants. Segons el nostre estudi, la no detecció d'*H. pylori* en l'aigua de les xeringues de les cadires dental indicaria que no suposen un risc iatrogènic real per a l'adquisició del microorganisme, ni per part dels pacients ni per personal sanitari.

Aquest és un estudi preliminar que ens dóna una primera resposta. Per poder-la confirmar, s'hauria de realitzar un estudi més ampli, amb un

nombre més elevat de mostres, treballar amb uns iniciadors totalment específics per *Helicobacter pylori* i realitzar un control més exhaustiu dels pacients que tenen contacte amb les cadires dentals, ja que les implicacions sanitàries així ho requeririen.

CONCLUSIONS FINALS

- *Helicobacter pylori* és un microorganisme difícil per créixer al laboratori i per aquest raó i en primer lloc es van posar a punt tècniques de cultiu i conservació. Com a medi de cultiu, es va escollir el medi agar Columbia suplementat amb un 5% de sang desfibrinada de cavall perquè és el medi de cultiu on s'ha determinat un millor creixement cel·lular amb un cost econòmic acceptable. I Per mantenir les soques congelades a -80°C es va escollit llet descremada al 40% com a crioprotector pels bons nivells de recuperació cel·lular.
- S'han posat a punt dos PCRs semiimbricades per determinar la presència de *H. pylori* al medi ambient. Una dissenyada per determinar la presència del gènere *Helicobacter* al medi i que amplifica un fragment del gen *16S rRNA*; l'altra per determinar l'ADN de l'espècie *Helicobacter pylori* que amplifica un gen estructural (*ureA*) del gen de la ureasa. Prèviament es va determinar el mètode d'extracció de ADN més eficaç que va ser el mètode de Boom (Boom i col., 1990). En ambdós PCRs es van implementar les condicions de la reacció de PCR optimitzades en l'estudi. L'amplificació d'ADN extret aplicant els iniciadors del gen *16S rRNA* va mostrar que la tècnica té un límit de detecció entre 2-20 còpies genòmiques/ml, però no va resultar específica per al gènere *Helicobacter* ja que també detectava generes afins com *Campylobacter* i *Wolinella*. Per aquest motiu, es va fer afegir la seqüenciació dels amplicons. L'amplificació del gen de la Ureasa A va presentar un límit de detecció de 50 còpies genòmiques/ml i es va provar que és específica per a l'espècie *Helicobacter pylori*. L'aplicació d'aquestes PCR semiimbricades va ser adequada per determinar la presència de *H.pylori* a les diferents matrius analitzades tant d'origen humà com d'ambients aquàtics.
- Vam determinar la presència de *H. pylori* en mostres fecals de pacients amb símptomes de gastritis crònica aplicant dos mètodes: mètode antigènic HpSA i l'amplificació del gen *ureA*. Amb el mètode molecular es va detectar la presència de ADN de *H. pylori* en 12 mostres i va mostrar un 75% de coincidència amb els resultats obtinguts amb el mètode antigènic HpSA.

- Vam determinar la presència de *H. pylori* a aigües amb diferent de nivell de contaminació fecal. Es va amplificar ADN d'aquesta espècie en un 30% de les mostres d'aigua residual, un 8,34% de les mostres d'aigua de riu de Catalunya i no es va detectar en aigua de font. La presència de *H. pylori* a l'aigua confirma que aquest medi pot ser un vehicle de transmissió d'aquest patogen. A més, la major detecció de *H. pylori* a l'aigua residual i la seva presència a les femtes humanes indica que l'origen de la presència d'aquest patogen a l'aigua ve determinat per aportacions fecals.
- La supervivència de *H. pylori* a l'aigua en la foscor i a 7°C es va demostrar aplicant diferents tipus d'anàlisis microbiològics. El recompte de bacteris realitzat amb tinció DAPI i el número de genomes es manté constant durant tot el període d'estudi, 21 dies. La detecció per PCR també va ser positiva i constant durant tot el període d'estudi i inclús 3 mesos més tard. No obstant això, les cèl·lules només es van mantenir cultivables fins al sisè dia d'emmagatzematge i d'acord amb la tinció de Live/Dead (Molecular Probes, Life Technologies) el bacteri presenta una pèrdua progressiva de viabilitat cel·lular fins el dia 14, a partir del qual la proporció de bactèries amb la membrana alterada és predominant. El mateix anàlisi fet amb *E.coli* va demostrar que aquest bacteri manté la culturabilitat i viabilitat després de 21 dies d'emmagatzematge en aigua.
- L'emmagatzematge en aigua també va afectar la morfologia cel·lular de *H. pylori*. Per microscòpia electrònica, es va observar una conversió morfològica de les cèl·lules bacterianes passant de la forma espiral a coccal amb el pas del temps. La presència de poques formes espiralades es relacionaria amb una baixa capacitat de cultiu de les mateixes. *E.coli* va mantenir la seva forma bacil·lar durant tot el període d'estudi.
- L'estudi de la morfologia cel·lular en un tall vertical d'una colònia d'*H. pylori* de 4 dies va mostrar la coexistència de cèl·lules amb morfologia bacil·lar i coccal, amb el domini de cèl·lules cocals a la base i espiralades a la superfície de la colònia. En aquest cas, *E. coli* va mostrar la mateixa distribució morfològica en la colònia, mantenint-se la forma bacil·lar en els diferents estrats del tall vertical.

- La ràpida pèrdua de culturabilitat conjuntament amb la possible baixa excreció d'*Helicobacter pylori* en femta explicarien el fet que el bacteri difícilment es detecta amb medi aquàtic amb els medis de cultiu coneguts i sí es detecta aplicant mètodes moleculars. Així doncs, possiblement el risc d'infecció per aquest patogen a través de l'aigua podria estar sobreestimat si es detecta amb el mètode de la PCR mentre que estaria subestimat quan s'usen les tècniques de cultiu tradicionals.
- L'anàlisi de la saliva de 31 persones sanes de diferent edat i sexe va evidenciar la presència d'aquest bacteri en la boca de 6% de la població analitzada. La anàlisi feta amb la PCR semiimbricada per al gen *16S rRNA* va identificar la presència d'aquest gen en 19 persones però la seqüenciació dels amplicons només va confirmar la presència de *H. pylori* en tres mostres, d'acord amb la determinació feta amb el gen de la Ureasa, específic per aquesta espècie bacteriana.
- La presència de *H. pylori* a la boca de algunes persones indica la possibilitat de contaminació creuada a través de l'aigua de les cadires dentals. No obstant, l'anàlisi de 31 mostres d'aigua procedents de les corresponents cadires no va mostra la presència del patogen, malgrat que en algunes de ells s'havien identificat la presència d'altres patògens.

BIBLIOGRAFIA

-A-

- **Abu Al-Soud, W., M. Bennedsen, S. On, L. Ouis, P. Vandamme, H. Nilsson, A. Ljungh i T. Wadström.** 2003. Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence. *J. Medical. Microbiol.* **52**:765-771.

- **Achtman, M., T. Azuma, D. E. Berg, Y. Ito, G. Morelli, Z. J. Pan, S. Suerbaum, S. A. Thompson, A. van der Ende i L. J. van Doorn.** 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* **32**:459-70.

- **Adams, B. L., T. C. Bates i J. D. Oliver.** 2003. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7462-6.

- **Akamatsu, T., K. Tabata, M. Hirong, H. Kawakami i M. Uyeda.** 1996. Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am. J. Infect. Control* **24**:396-401.

- **Albenque, M., F. Tall, F. Dabis i F. Mégraud.** 1990. Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa. *Enferm. Digest.* **78**:48.

- **Alm, R. A., L. L. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, Q. Jiang, P. C Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, D. Merges, S. D. Mills, D. E. Taylor, G. F. Vovis i T. J. Trust.** 1999. Genomic sequence

comparison of two unrelated isolates of human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature **397**:186-190.

- **Andersen, L. P., A. Dorland, H. Karacan, H. Colding, H-O. Nilsson, T. Wadström i J. Blom.** 2000. Possible clinical importance of the transformation of *Helicobacter pylori* into coccoid forms. Scand. J. Gastroenterol. **35**:897-903.
- **Anònim.** 1993. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. Lancet **341**:1359-62.
- **Anònim.** 1994. Live flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Riskc to Humans, Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. **61**:1-241.
- **Araujo, R i N. Contreras.** 2004. Microbiological contamination of dental unit water systems in general practices from Barcelona (Spain). Water Sci. Technol. vol4-2 pag 1-5
- **Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Jr. Peek, M. K. Tummuru, M. J. Blaser i T. L. Cover.** 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J. Biol. Chem. **270**:17771-17777.
- **Atlas, R. M., J. F. Williams i M. K. Huntington.** 1995. Legionella contamination of dental-unit waters. Appl Environ Microbiol. **61**(4):1208-13.

-B-

- **Baker, K. H., J. P. Hegarty, B. Redmond, N. A. Reed i D. S. Herson.** 2002. Effect of oxidizing disinfectants (chlorine,

- monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*. Appl. Environ. Microbiol. **68**:981-984.
- **Bamford, K. B., J. Bickley, J. S. Collins, B. T. Johnston, S. Potts, V. Boston, R. J. Owen i J. M. Sloan.** 1993. *Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection. Gut. 34(10):1348-50.
 - **Batchelder, M., J. G. Fox, T. Monath, L. Yan, L. Attardo, K. Georgakopoulos, X. Li, R. Marini, Z. Shen, J. Pappo i C. Lee.** 1996. Oral vaccination with recombinant urease reduces gastric *Helicobacter pylori* colonization in the cat. Gastroenterology **110**:A58.
 - **Beji, A., F. Megraud, P. Vincent, F. Gavini, D. Izard i H. Leclerc.** 1988. GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belonging or related to the genus *Campylobacter*. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. **139**:527-534.
 - **Benaïssa, M.P., P. Babon, N. Quellard, L. Pezennec, Y. Cenatiempo i J. L. Fauchere.** 1996. Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the vacillary to the coccoid form. Infect. Immun. **64**:2331-2335.
 - **Bizzero, G.** 1893. Ueber die schlauchformigen drusen des magendarmkanals und die beziehungungen ihres epithels zu dem oberflachenepithel del schleimhaut. Arch. Mikr Anat. **42**:82.
 - **Blaser, M. J.** 1998. Helicobacters are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era. Gut **43**:721-7.

- **Blaser, M. J.** 1999. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J Infect Dis.* **179**:1523-30.
- **Blazer, M. J.** 1992. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* **102**:720-727.
- **Bode, G., F. Mauch i P. Malfertheiner.** 1993. The coccoids forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* **111**:483-90.
- **Bonamico, M., P. M. Strappini, E. Bonci, M. Ferri, M. Crisogianni, M. Guido, E. Thanasi, R. Nenna, S. Macchia, I. Luzzi, F. M. Magliocca i P. Mastromarino.** 2004. Evaluation of stool antigen test, PCR on ORAL samples and serology for the noninvasive detection of *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter* **9(1)**:69-76.
- **Boom R., C. J. Sol., M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen i J. van der Noordaa.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleis acids. *J Clin Microbiol.* **28(3)**:495-503.
- **Boulos, L., M. Prevost, B. Barbeau, Coallier, J i R. Desjardins.** 1999. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods.* **37**:77-86.

-
- **Braden, B., H. G. Posselt, P. Ahrens, R. Kitz, C. F. Dietrich i W. F. Caspary.** 2000. New immunoassay in stool provides an accurate noninvasive diagnostic method for *Helicobacter pylori* screening in children. *Pediatrics* **106**:115-117.
 - **Bravos, E. D., i R. H. Gilman.** 2000. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Other tests. *Gastroenterol Clin North Am* **29**:925-9, xii review.

-C-

- **Carta, M., M. P. Dore, M. Idda i col.** 2000. Effect of cure rate on reinfection with *H. pylori*: a three-year, follow-up study. *Am. J. Gastroenterol.* **95**:3324-5.
- **Catrenich, C.E., i K. M. Makin.** 1991. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. *Scand. J. Gastroenterol Suppl.* **181**:58-64.
- **Cellini, L., N. Allocati, E. Di Campi i B. Dainelli.** 1994. *Helicobacter pylori*: a fickle germ. *Microbiol. Immunol.* **38**:25-30.
- **Cellini, L., N. Allocati, A. Piattelli, I. Petrelli, P. Fanci i B. Dainelli.** 1995. Microbiological evidence of *Helicobacter pylori* from dental plaque in dyspeptic patients. *New Microbiol.* **18**:187-192.
- **Coelho L.G., L. D. Moretzsohn, W. L. Vieira, M. A. Gallo, M. C. Passos, J. M. Cindr, M. C. Cerqueira, L. Vitiello, M. L. Ribeiro, S. Mendonça, J. Pedrazzoli-Júnior i L. P. Castro.** 2005. New once-daily, highly effective rescue triple therapy after multiple *Helicobacter pylori* treatment failures: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* Mar **15**;21(6):783-7.

- **Cohen, H., B. Retama, C. Jonson, S. Rose, A. Pronovost i L. Laine.** 1996. Evaluation of a rapid test to detect IgG antibodies to *Helicobacter pylori* using fingerstick whole blood samples. *Gastroenterology* **110**:A83.

- **Cohen, L. F., M. Sayeeduddin, C. Phillips i I. Shahab.** 1997. A new staining method for identification of *Helicobacter pylori* and simultaneous visualization of gastric morphologic features. *Mod. Pathol.* **10(11)**:1160-3.

- **Costa, K., G. Bacher, G. Allmaier, M. G. Dominguez-Bello, L. Engstrand, P. Falk, M. A. de Pedro i P. F. Garcia del Portillo.** 1999. The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall. *J. Bacteriol.* **181**:3710-3715.

- **Covacci, A., S. Falkow, D. E. Berg i R. Rappuoli.** 1993. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*?. *Trends microbiol.* **5**:205-208.

- **Cover, T. L., P. Cao, U. K. Murthy, M. S. Sipple, i M. J. Blaser.** 1992. Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Hum. Pathol.* **23**:1004-1010.

- **Chan, W. Y., P. K. Hui, K. M. Leung, J. Chow, F. Kwok i C. S. Ng.** 1994. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am. J. Clin. Pathol.* **102**:503-7.

- **Chen, M., A. Lee i S. Hazell.** 1995. Immunisation against gastric *Helicobacter* infection in a mouse/*Helicobacter felis* model. *Lancet* **339**:1120-1121.

-
- **Chow, T. K, J. R. Lambert, M. L. Wahlqvist i B. H. Hsu-Hage.** 1995. *Helicobacter pylori* in Melbourne Chinese immigrants: evidence for oral-oral transmission via chopsticks. J. Gastroenterol. Hepatol. **10(5):**562-9.

-D-

- **Doenges, J. L.** 1939. Spirochetes in the gastric glands of *macacus rhesus* and of man without related diseases. Arch. Pathol. **27:**469-477.
- **Dore, M. P, M. Bilotta, D. Vaira, A. Manca, G. Massarelli, G. Leandro, A. Arzei, G. Oisanu, D. Y. Graham i G. Realdi.** 1999. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. Dig. Dis. Sci. **44:**1161-1164.
- **Dore, M. P., A. R. Sepulveda, M. S. Osato, G. Realdi i Graham, D.Y.** 1999. *Helicobacter pylori* in sheep milk. Lancet. **354:**132.
- **Dowsett, S. A., i M. J. Kowolik.** 2003. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it?. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. **14:**226-233.
- **Dowsett, S. A., L. Archila, V. A. Segreto, C. R. Gonzalez, A. Silva, K. A. Vastola, R. D. Bartizek i M. J. Kowolik.** 1999. *Helicobacter pylori* infection in indigenous families of Central America: serostatus and oral fingernail carriage. J. Clin. Microbiol. **37:**2456-2460.
- **Drumm, B. P., P. G. Perez, M. J. Blaser i P. M. Sherman.** 1990. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. N. Engl. J. Med. **322:**359-363.

- **Dunn, B. E., H. Cohen i M. J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori*. Clin. Microbiol. Rev. **10**(4):720-41.

-E-

- **Eaton, K. A., D. R. Morgan i S. Krakowka.** 1989. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. Infect. Immun. **57**:1119-1125.
- **el-Zimaity, H. M., M. T. al-Assi, M. Genta i D. Y. Graham.** 1995. Confirmation of successful therapy of *Helicobacter pylori* infection: number and site of biopsies or a rapid urease test. Am. J. Gastroenterol. **90**:1962-1964.
- **Enroth, H., i L. Engstrand.** 1995. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. J Clin Microbiol **33**:2162-5.
- **Enroth, H., K. Wreiber, R. Rigo, D. Risberg, A. Uribe i L. Engstrand.** 1999. In vitro aging of *Helicobacter pylori*: Changes in morphology, intracelular composition and surface properties. Helicobacter **4**:7-16.

-F-

- **Feachem, R. G.** 1983. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: supplementary feeding programmes. Bull. World Health Organ. **61**(6):967-79.
- **Ferguson, D. A., L. Chuanfu, R. Patel, W. R. Mayberry, D. S. Chi i E. Thomas.** 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. J. Clin. Microbiol. **31**:2802-2804.
- **Figura, N., C. Vindigni, A. Covacci, L. Presenti, D. Burrioni, R. Vernillor, T. Banducci, F. Roviello, D. Marrelli, M. Biscontri, S. Kristodhullu, C. Gennari i D. Vaira.** 1998. cagA positive and

negative *Helicobacter pylori* strains are simultaneously present in the stomach of most patients with non-ulcer dyspepsia: relevance to histological damage. **Gut** 42:772-8.

- **Freedberg, A. S. i L. E Baron.** 1940. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am. J. dig. Is.* **7**:443-445.

-G-

- **Gebara, E. C., C. Pannuti, C. M. Faria, L. Chehter, M. P. Mayer i L. A. Lima.** 2004. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *Oral. Microbiol. Immunol.* **19**:277-280.
- **Genta, R. M., G. O. Robason i D. Y. Graham.** 1994. Simultaneous visualization of *Helicobacter pylori* and gastric morphology: a new stain. *Hum. Pathol.* **25**:221-6.
- **Georgopoulos, S. D., A. F. Mentis, C. A. Spiliadis, L. S. Tzouvelekis, E. Tzelepi, A. Moshopoulos i N. Skandalis.** 1996. *Helicobacter pylori* infection in spouses of patients with duodenal ulcers and comparison of ribosomal RNA gene patterns. *Gut.* **39(5)**:634-8.
- **Gisbert J. P., J. M. Pajares, R. García-Valriberas, V. Abaira, D. Boixeda R. García-Grávalos, C. Martín-de-Argila i A. García-Plaza.** 1998. Recurrence of *Helicobacter pylori* infection after eradication: incidence and variables influencing it. *Scand. J. Gastroenterol.*; **33(11)**:1144-51.
- **Go, M. F., V. Kapur, D. Y. Graham i J. M. Musser.** 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J. Bacterial.* **178**:3934-3938.

- **Gómez Rodríguez B. J., M. Rojas Fera, M. J. García Montes, R. Romero Castro, P. Hergueta Delgado, F. J. Pellicer Bautista i J. M. Herrerías Gutiérrez.** 2004 Incidence and factors influencing on *Helicobacter pylori* infection recurrence. Rev. Esp. Enferm. Dig.;**96**(9):620-3; 424-7.

- **Goodman , K. J. i P. Correa.** 2000. Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. Lancet. **355**:358-362.

- **Goodman, K. J., P. Correa., H. J. T. Aux, H. Ramirez, J. P. Delany, O. G. Pepinosa, M. L. Quinoes i T. C. Parra.** 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes – a population-based study of transmission pathways. Am. J. Epidemiol. **144**:290-299.

- **Goodwin, C. S. i J. A. Armstrong.** 1990. Microbial aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). Eur. J. Clin. Microbiol. **9**:1-13.

- **Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Perters, D. Collins, L. Sly, W. McConnell i W. S. Harper.** 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov and *Helicobacter mustelae* comb. nov, respectively. Int. J. Syst. Bacteriol. **4**:397-405.

- **Graham, D. Y., E. Adam, G. T. Reddy, J. P. Agarwal, R. Agarwal, D. J. Evans, H. M. Malaty i D. G. Evans.** 1991. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries. Dig. Dis. Sci. **36**:1084-1088.

-
- **Granstrom, M., Y. Tindberg i M. Blennow.** 1997. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J. Clin. Microbiol.* **35**:468-470.

 - **Grubel., P., J. S. Hoffman, F. K. Chong, N. A. Burstein, C. Mepani i D. R. Cave.** 1998. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in house flies (*Musca domestica*) on three continents. *Lancet.* **352**:788-789.

-H-

- **Handt, L. K., J. G. Fox, F. E. Dedwhirst, G. J. Fraser, B. J. Paster, L. L. Yan, H. Rozmiarek, R. Rufo i I. H. Stalis.** 1994. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect. Immun.* **62**:2367-2374.

- **Handt, L. K., J. G. Fox, F. E. Dewhirst, G. J. Fraser, B. J. Paster, L. L. Yan, H. Rozmiarek, R. Rufo i I. H. Stalis.** 1994. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect. Immun.* **62**:2367-74.

- **Harris, R. A., D. K. Owens, H. Witherell i J. Parsonnet.** 1999. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: what are the benefits of screening only for the CagA phenotype of *H. pylori*?. *Helicobacter* **4**, 69-76

- **Harris, A. G., S. L. Hazell i A. G. Netting.** 2000. Use of digoxigenin-labelled ampicillin in the identification of penicillin-binding proteins in *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:591-598.

- **Hegarty, J. P., M. T. Dowd i K. H. Baker.** 1999. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. J. Appl. Microbiol. **87**:697-701.
- **Hopkins, R. J., P. A. Vial, C. Ferreccio, J. Ovalle, P. Prado, V. Sotomayor, R. G. Russell, S. S. Wasserman i J. G. Jr. Morris.** 1993. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. J. Infect. Dis. **168**:222-6.
- **Horiuchi, T., T. Ohkusa, M. Watanabe, D. Kobayashi, H. Miwa i Y. Eishi.** 2001. *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. Microbiol. Immunol. **45**:515-519.
- **Howden, C.W.** 1996. Clinical expressions of *Helicobacter pylori* infection. Am J Med. **100**:27S-32S; discussion 32S-34S.
- **Hueneaua, P, i S. Loiseaux-De Goër.** 2002. *Helicobacter*: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus. Infect. Genet. Evol. **1**, 215-223.
- **Hulten, K., S. W. Han, H. Enroth, P. D. Klein, A. R. Opekun, R. H. Gilman, D. G. Evans, L. Engstrand, D. Y. Graham i F. A. El-zaatari.** 1996. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. Gastroenterology **110**:1031-1035.
- **Hulten. K., H. Enroth, T. Nyström i L. Engstrand.** 1998. Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. J. Appl. Microbiol. **85**:282-6.
- **International Agency for Research of Cancer.** 1994. Infection with *Helicobacter pylori*, p. 177-240. In IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France.

-I-

- **Isaacson, P.G.** 1992. Extranodal lymphomas: the MALT concept. *Vert. Dtsch. Ges. Pathol.* **76**:14-23.
- **Ito, S.** 1967. Anatomic structure of the gastric mucosa, p. 705-741. In C. F. Code (ed), *Alimentary Canal*. American Physiological Society, Washington, D.C.

-J-

- **Janas, B., E. Czkwianianc, L. Bak-Romaniszyn, H. Bartel, D. Tosik i I. Planeta-Malecka.** 1995. Electron microscopic study of association between coccoid forms of *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells. *Am. J. Gastroenterol.* **90(10)**:1829-1833.
- **Jones, B. D. i H. L. T. Mobley.** 1989. *Proteus mirabilis* urease: nucleotide sequence determination and comparison with jack bean urease. *J. Bacteriol.* **171**:6141-6422.

-K-

- **Kabir, S.** 2004. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter* **9**:115-23.
- **Kang, J. Y., H. H. Tay, I. Yap, R. Guan, K. P. Lim i M. V. Math.** 1993. Low frequency of endoscopic esophagitis in Asian patients. *J. Clin. Gastroenterol.* **16**:70-3.
- **Karczewska, E., J. E. Konturek, P. C. Konturek, M. Czesnikiewicz, E. Sito, W. Bielanski, N. Kwiecien, W. Obtulowicz, W. Ziemniak, J. Majka, E. G. Hahn i S. J. Konturek.** 2002. Oral cavity as potential source of gastric reinfection by *Helicobacter pylori*. *Dig. Dis. Sci.* **47**:978-986.

- **Kelly, S. M., M. C. Pitcher, S. M. Farmery i G. R. Gibson.** 1994. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* **107**:1671-4.
- **Kersulyte, D., H. Chalkauskas i D. E. Berg.** 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol. Microbiol.* **31**:31-43.
- **Kleanthous, H., C. I. Clayton i S. Tabaqchali.** 1991. Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**:2377-2389.
- **Klein, P. D., D. Y. Graham, A. Gaillour, A. R. Opekun i E. O. Smith.** 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet* **337**:1503-1506.
- **Klein, P. D., R. H. Gilman, R. Leonbarua, F. Diaz, E. O. Smith i D. Y. Grahama** 1994. The epidemiology of *Helicobacter pylori* in Peruvian children between 6 and 30 months of age. *AM. J. Gastroenterol.* **89**:2196-2200.
- **Konturek, P. C., S. J. Konturek, T. Starzyska, K. Marlicz, W. Bielanski, P. Pierzchalski, E. Karczewska, A. Hartwich, K. Rembiasz, M. Lawniczak, W. Ziemniak i E. C. Hahn.** 2001. *Helicobacter pylori*-gastrin link in MALT lymphoma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**:727-729.
- **Krajden, S., M. Fuksa, J. Anderson, J. Kempston, A. Boccia, C. Petrea, C. Babida, M. Karmali i J. L. Penner.** 1989. Examination

- of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. Clin. Microbiol. **27(6)**:1397-8.
- **Krakovka, S., K. A. Eaton i D. M. Rings** 1995. Occurrence of gastric ulcers in gnotobiotics piglets colonized by *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. **63**:2352-2355.
 - **Krishnamurthy, P., M. Parlow, J. B. Zitzer, N. B. Vakil, H. L. T. Mobley, M. Levy, S. H. Phadnis i B. E. Dunn** 1998. *Helicobacter pylori* containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. Infect. Immun. **66**:5060-5066.
 - **Kuo, C. H., S. K. Poon, Y. C. Su, R. Su, C. S. Chang i W. C. Wang**. 1999. Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from H. pylori-infected couples in Taiwan. J. Infect. Dis. **180(6)**:2064-8.
 - **Kusters, J. G., M. M. Gerrits, J. Vanstrijp i C. Vandenbrouckegrauls**. 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. Infect. Immun. **65**:3672-3679.
- L-
- **Labigne, A., V. Cussac i P. Courcoux**, 1991. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. J. Bacteriol. **173**:1920-1931.
 - **Leal-Herrera. Y., J. Torres, T. Monath, I. Ramos, A. Gomez, I. Madrazo-de la Garza, M. Dehesa-Violante i O. Muñoz**. 2003. High rates of recurrence and of transient reinfections of *Helicobacter pylori* in a population with high prevalence of infection. Am. J. Gastroenterol. **98**:2395-402.

- **Lee, A., S. L. Hazell, J. O'Rourke i S. Kouprach.** 1988. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect. Immun.* **56**:2843-2850.

- **Lee, C.K., K. Soike, J. Hill, K. Georgakopoulos, T. Tibbitts, J. Ingrassia, H. Gray, J. Boden, H. Kleanthous, P. Giannasca, T. Eremark, R. Weltzin, J. Blanchard i T. P. Monath.** 1999. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease decreases colonization levels following experimental infection of rhesus monkeys. *Vaccine.* **17**:1493-1505.

- **Lee, Y. C., J. T. Lin, T. H. Chen i M. S. Wu** 2008. Is eradication of *Helicobacter pylori* the feasible way to prevent gastric cancer? New evidence and progress, but still a long way to go. *J. Formos Med. Assoc.* **107**:591-9 Review.

- **Leung, W. K., J. J. Sung, T. K. Ling, K. L. Siu i A. F. Cheng.**1999. Use of chopsticks for eating and *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis. Sci.* **44(6)**:1173-1176.

- **Leung, W. K., K. L. K. Siu, C. K. L. Kwok, S. Y. Chan, R. Sung i J. J. Y. Sung.** 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *Am. J. Gastroenterol.* **94**:2881-2884.

- **Li, C., T. Ha, D. A. Ferguson, D. S. Chi, R. Zhao, N. Patel, G. Krishnaswamy i E. Thomas.** 1996. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig. Dis Sci.* **41**:2142-9.

-
- **Lin, S. K., J. R. Lamber, M. A. Schembri, L. Nicholson i M.G. Korman.** 1994. *Helicobacter pylori* prevalence in endoscopy and medical staff. J. Gastroenterol. Hepatol. **9**:319-324.

 - **Lin, S. K., J. R. Lamber, M. A. Schembri, L. Nicholson i I. H. Johnson.** 1998. The prevalence of *Helicobacter pylori* in practising dental staff and dental students. Aus. Dent. J. **43**:35-39.

 - **Lingwood, C.A., G.Wasfy, H. Han i M. Huesca.** 1993. Receptor affinity purification of a lipid-binding adhesin from *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. **61**:2474-2478.

 - **Linz, B., F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H. Liu, P. Roumagnac, D. Falush, C. Stamer, F. Prugnolle, S. W. van der Merwe, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, E. Perez-Trallero, T. Wadstrom, S. Suerbaum i M. Achtman.** 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. Nature **445**:915-8.

 - **Logan, R. P., M. M. Walker, J. J. Misiewicz, P. A. Gummett, Q. N. Karim, i J. H. Baron.** Changes in the intragastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole. 1995. Gut **36**:12-16.

 - **Lu, Y., T. E. Redlinger, R. Avitia, A. Galindo i K. Goodman.** 2002. Isolation and Genotyping of *Helicobacter pylori* from Untreated Municipal Wastewater. Appl.Environ.Microbiol **68**: 1436-9.

-M-

- **Magistà, A. M., E. Ierardi, S. Castellaneta, V. L. Miniello, E. Lionetti, A. Francavilla, P. Ros, N. Rigillo, A. Di Leo i R. Francavilla.** 2005. *Helicobacter pylori* status and symptom

- assessment two years after eradication in pediatric patients from a high prevalence area. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **40**:312-8.
- **Maier, R. J., C. Fu, J. Gilbert, F. Moshiri, J. Olson i A. G. Plaut.** 1996. Hydrogen uptake hydrogenase in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**:71-76.
 - **Malaty, H. M., D. Y. Graham, I. Isaksson , L. Engstrand i N. L. Pedersen.** 1998. Co-twin study of the effect of environment and dietary elements on acquisition of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Epidemiol.* **148**:793-797.
 - **Malaty, H. M., i D. Y. Graham DY.** 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* **35**:742-5.
 - **Malaty, H. M., L. Engstrand, N. L. Pedersen i D. Y. Graham.** 1994. *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann. Intern. Med.* **120**:982-6.
 - **Malaty, H. M., T. Kumagai, E. Tanaka, H. Ota, K. Kiyosawa, K., D. Graham i T. Katsuyama.** 2000. Evidence from a nine-year birth cohort study in Japan of transmission pathways of *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1971-1973.
 - **Manes, G., A. Balzano, P. Marone, M. Lioniello i S. Mosca** 2002. Appropriateness and diagnostic yield of upper gastrointestinal endoscopy in an open-access endoscopy system: a prospective observational study based on the Maastricht guidelines. *Aliment Pharmacol. Ther.* **16**:105-10.

-
- **Mapstone, N. P., D. A. F. Lynch, F. A. Lewis, A. T. R. Axon, D. S. Tompkins, M. F. Dixon i P. Querke.** 1993. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomach of patients with gastritis using PCR. *J. Clin. Pathol.* **46**:540-543.

 - **Mapstone, N. P., D. A. Lynch, F. A. Lewis, A. T. Axon, D. S. Tompkins, M. F. Dixon i P. Quirke.** 1993. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet* **341**:447

 - **Mapstone, N. P., F. A. Lewis, D. S. Tompkins, D.A. F. Lynch, A. T. R. Axon, M. F. Dixon i P. Quirke.** 1993. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet* **341**:447.

 - **Marshall, B. J., H. Royce, D. I. Annear, C. S. Goodwin, J. W. Pearman, J. R Warren i J. A. Armstrong.** 1984. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Lett.* **25**:83-88.

 - **Marshall, B. J., D. B. McGeehie, P. A. Rogers i R. J. Glancy.** 1985. Pyloric *Campylobater* infection and gastroduodenal disease. *Med. J. Austr.* **142**:439-444.

 - **Marshall, B. M., J. A. Armstrong, D. B. McGechie i R. J. Glancy.** 1985. Attemp to fulfil Koch's postulates for pyloric campylobacter. *Med. J. Aust.* **142**:436-439.

 - **Marshall, B. J. i C. S. Goodwin.** 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:68.

 - **Mazari-Hiriart, M., Y. Lopez-Vidal i J. J. Calva.** 2001. *Helicobacter pylori* in water systems for human use in Mexico City. *Water. Sci. Technol.* **43**: 93-98.

- **Mazari-Hiriart, M., Y. López-Vidal, G. Castillo-Rojas, S. Ponce de León i A. Cravioto.** 2001a. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. Arch. Med. Res. **32**:458-67.

- **McCallion, W. A., LL. J. Murray, A. G. Bailie, A. M. Dalzell, D. P. O'Reilly i K. B. Bamford.** 1996. *Helicobacter pylori* infection in children: relation with current household living conditions. Gut. **39**:18-21.

- **McGee, D. J., C. A. May, R. M. Garner, J. M. Himpfl i H. L. Monbley.** 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. J. Bacteriol. **181**:2477-84.

- **McNulty, C. A. M., i D. M. Watson.** 1984. Spiral bacteria of the gastric antrum. Lancet **12**;1:1068-1069.

- **Mégraud F.** 1995. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. Aliment. Pharmacol. Ther. **9 Suppl 2**:85-91.

- **Mendall, M. A., P. M. Goggin, N. Molineaus, J. Levy, T. Toosy, D. Strachan, A. J. Camm i T. C. Northfield.** 1994. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. Br. Heart **71**:437-9.

- **Mendz, G. L. i S. L. Hazell.** 1993. Fumarate catabolism in *Helicobacter pylori*. Biochem. Mol. Biol. Int. **31**:325-332.

- **Mendz, G. L., i S. L. Hazell.** 1995. Amino acid utilization by *Helicobacter pylori*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. **27**:1085-1093.

- **Mithchell, H. M., Y. Li, P. J. Hu, Q. Liu, M. Chen, G. G. Du, Z. J. Wang, A. Lee i S. L. Hazell.** 1992. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Southern China-identification of early childhood as the critical period for acquisition. J. Infect. Dis. **166**:149-153.

- **Mobley, H. L. T., R. E. Garner i P. Bauerfeind.** 1995. *Helicobacter pylori* nickel transport gene *nixA*: synthesis of catalytically active urease in *E. coli* independent of growth conditions. Mol. Microbiol. **16**:97-109.

- **Mobley, H., G. Mendz i S. Hazell.** 2001. *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. American Society for Microbiology, Washington.

- **Montebugnoli, L i G. Dolci.** 2002. A new chemical formulation for control of dental unit water line contamination: An "in vitro" and clinical study. BMD Oral Health. **2**:1

- **Moreno, Y., M. A. Ferrús, J. L. Alonso, A. Jiménez i J. Hernández.** 2003. Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. Water Res. **37**:2251-6.

- **Mukhopadhyay, A. K., D. Kersulyte, J. Y. Jeong, S. Datta, Y. Ito, A. Chowdhury, S. Chowdhury, A. Santra, S. K. Bhattacharya, T. Azuma, G. B. Nair i D. E. Berg.** 2000. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. J. Bacteriol **182**:3219-27.

- **Nagata, K., S. Tsukita, T. Tamura i N. Sone.** 1996. A *cb*-type cytochrome-*c* oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. Microbiology (U.K) **142**:1757-1769.

- **Namavar, F., R. Roosendaal, E. J. Kuipers, P. de Groot, M. W. van der Bijl, A. S. Peña i J. de Graaff.** 1995. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, aesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. Eur J Clin Microbiol. Infect. Dis. **14**:234-7.

- **Ni, Y. H., J. T. Lin, F. Huang, J. C. Yang i M. H. Chang** 2000. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by stool antigen test and 6 other currently available tests in children J. Pediatr. **136**:823-827.

- **Nichols, L., M. Sughayer, P. C. DeGirolami, K. Baloch, D. Pleskow, K. Eichelberger i M. Santos.** 1991. Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter pylori* gastritis. Am. J. Pathol. **95**:769-773.

- **Nilsson, H. O., J. Blom, W. Abu-Al-Soud, A. A. Ljungh, L. P. Andersen i T. Wadström.** 2002. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. Appl. Environ. Microbiol. **68**:11-9.

- **Nilsson, H. O., P. Aleljung, I. Nilsson, T. Tyszkiewica i T. Wadstrom.** 1996. Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in human stools. Journal of Microbiological Methods. **27**:73-79.

- **Notarnicola, M., F. Russo, A. Cavallini, M. Bianco, E. Jirillo, S. Pece, C. Leoci i G. di Matteo.** 1996. PCR identification of *Helicobacter pylori* DNA in faeces from patients with gastroduodenal pathology. Medical Science Research **24**: 785–787.

-O-

- **Olmos, J. A., H. Ríos i R. Higa.** 2000. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Argentina: results of a nationwide epidemiologic study. Argentinean Hp Epidemiologic Study Group. J. Clin. Gastroenterol. **31**:33-7.

-P-

- **Palmer, E. D.** 1954. Investigation of gastric mucosa spirochetes of the human. Gastroenterology **27**:218-220.
- **Park, S.R., W. G. Mackay i D. C. Reid.** 2001. *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. Water. Res. **35**:1624-1626.
- **Parkin, D.M., E. Läärä i C. S. Muir.** 1988. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. Int. J. Cancer. **41**:184-97.
- **Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodrigues, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelmann i G. D. Friedman.** 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N. Engl. J. Med. **330**:1267-71.
- **Parsonnet, J.** Incidence of *H. pylori* infection. 1995. Aliment. Pharmacol. Ther. **9**:45-51.
- **Parsonnet, J. H., H. Shmueli i T. Haggerty.** 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. JAMA **282**:2240-2245.

- **Parsonnet, J.** 2003. What is the *Helicobacter pylori* global reinfection rate?. Can J. Gastroenterol.; **17** Suppl B:46B-48B. Review.
- **Patel, P., M. A. Mendall, S. Khulusi, T. C. Northfield i D. P. Strachan.** 1994. *Helicobacter pylori* infection in childhood: risk factors and effect on growth. **BMJ** 309:1119-23.
- **Peek, R. M. Jr., M. J. Blaser, D. J. Mays, M. H. Forsyth, T. L. Cover, S. Y. Song, U. Krishna i J. A. Pietenpol.** 1999. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. Cancer Res. **59**:6124-6131.
- **Pérez-Pérez, G. I., N. Bhat, J. Gaensbauer, A. Fraser, D. N. Taylor, E. J. Kuipers, L. Zhang, W. C. You, i M. J. Blaser.** 1997. Country-specific constancy by age in cagA+ proportion of *Helicobacter pylori* infections. Int J Cancer **72**:453-6.
- **Pitcher, D. G., N. A. Saunders i R. J. Owen.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett Appl Microbiol **8**: 151-156.

-Q-

- **Queralt, N., R. Bartolome i R. Araujo.** 2005. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. J. Appl. Microbiol. **98**:889-895.

-R-

- **Ramos, M., H. Pallarés i M. Garrido.** 1997. Eficacia, grado de cicatrización resistencia *in Vitro* y tasa de reinfección anual después del tratamiento erradicador del *Helicobacter pylori* en nuestra área. Rev. Esp. Enferm. Dig. **89** (supl.1):77.

- **Recavarren-Arce, S., R. León-Barúa, J. Cok, R. Berendson, R. H. Gilman, A. Ramírez-Ramos, C. Rodríguez i W. M. Spira.** 1991. *Helicobacter pylori* and progressive gastric pathology that predisposes to gastric cancer. Scand. J. Gastroenterol. Suppl **181**:51-7.

- **Redlinger, T. K., K. O'Rourke i K. J. Goodman.** 1999. Age distribution of *Helicobacter pylori* seroprevalence among young children in a United States/Mexico border community: evidence for transitory infection. Am. J. Epidemiol. **150**:225-230.

- **Reynolds, D. J., i C. W. Penn.** 1994. Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. Microbiology. **140**:2649-56.

- **Riddles, P. W., V. Whan, R. L. Blakeley i B. Zerner.** 1991. Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. Gene **108**:265-267.

- **Roma-Giannikou, E., A. Karameris, B. Balatsos, J. Panayiotou, Z. Manika, C. Van-Vliet, T. Rokkas, N. Skandalis i C. Kattamis.** 2003. Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori*: a genetic analysis. Helicobacter. **8(1)**:15-20.

- **Rothenbacher D., M. Winkler, T. Gonsler, G. Adler i H. Brenner.** 2002. Role of infected parents in transmission of *Helicobacter pylori* to their children. Pediatr. Infect. Dis. J. **21(7)**:674-9.

- **Ruckwell, A. i P. A. Chalk.** 1993. Factors affecting the survival of liquid cultures of *Helicobacter pylori* in air. Acta Gastro-Enterol. Belg. **56S**:101.

-S-

- **Salomon, H.** 1896. Ueber das spirillum saugetiarmagens und sien verhalten zu den belegzellen (abstract 1). Zentralbl. Bakteriol. **19**:433-442.
- **Sasaki K, Y. Tajiri, M. Sata, Y. Fujii, F. Matsubara, M. Zhao, S. Shimizu, A. Toyonaga i K. Tanikawa.** 1999. *Helicobacter pylori* in the natural environment. Scand. J. Infect. Dis.;**31**(3):275-9.
- **Sato, F., N. Saito, E. Shouji, A. Rani, H. Takeda, T. Sugiyama i M. Asaka.** 1999. The maintance of viability and spiral morphology of *Helicobacter pylori* in mineral water. J. Med. Microbiol. **48**:971.
- **Scott, D. R., D. Weeks, C. Hong, S. Postius, K. Melchers I G. Sachs.** 1998. The role of internal urease in acid resistance and *Helicobacter pylori*. Gastroenterology **114**:58-70.
- **Schröder, G., i E. Lanka.** 2005. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. Plasmid **54**:1-25.
- **Shahamat, M., C. Paszko-Kolva, H. Yamamoto i R. Colwell.** 1989. Ecological studies of *Campylobacter pylori*. Klin. Wochenschr. **67**(Supl. XVII):62-63.
- **Shahamat, M., U. Mai, C. Paszko-Kolva, M. Kessel i R. R. Colwell.** 1993. use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. Appl. Environ. Microbiol. **59**:1231-5.
- **Silva Rossi-Aguiar, V. P., T. Navarro-Rodriguez, R. Mattar, M. P. Siqueira de Melo Peres, R. Correa Barbuti, F. M. Silva, F. J.**

- Carrilho i J. N. Eisig.** 2009. Oral cavity is not a reservoir for *Helicobacter pylori* in infected patients with functional dyspepsia. *Oral. Microbiol. Immunol.* **24(3)**:255-9.
- **Sobala, G. M., C. J. Schorah, S. Shires, D. A. Lynch, B. Gallacher, M. F. Dixon i A. T. Axon.** 1993. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* **34**:1038-41.
- **Song, O., T. Lange, A. Spahr, G. Adler i G. Bode.** 2000. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaques and saliva detected with nested PCR. *J. Med. Microbiol.* **49**:349-353.
- **Song, Q., A. Spahr, R. M. Schmid, G. Adler i G. Bode.** 2000. *Helicobacter pylori* in the oral cavity: high prevalence and great DNA diversity. *Dig. Dis. Sci.* **45(11)**:2162-7.
- **Sonnenberg, A., i W. F. Townsend.** 1991. Testing for *Helicobacter pylori* in the diagnosis of Zollinger-Ellison syndrome. *Am J. Gastroenterol* **86**:606-8.
- **Sterr, H. W., i D. G. Colin-Jones.** 1975. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. *Gut* **16**:590-597.
- **Stevenson, T. H., A. Castillo, L. M. Lucia i G. R. Acuff.** 2000. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Lett. Appl. Microbiol.* **30(3)**:192-6.
- **Suerbaum, S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N. H. Smith, E. Kunstmann, I. Dyrek i M. Achtman.** 1998. Free recombination

within *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**:12619-12624.

- **Sugimoto, M., J. Y. Wu, S. Abudayyeh, J. Hoffman, H. Brahem, K. Al-Khatib, Y. Yamaoka i D. Y. Graham.** 2009. Unreliability of results of PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical or environmental samples. J. Clin. Microbiol. **47**(3):738-42.

- **Suzuki, J., H. Muraoka. I. Kobayasi, T. Fujita i T. Mine.** 1999. Rare incidence of interspousal transmission of *Helicobacter pylori* in asymptomatic individuals in Japan. J. Clin. Microbiol. **37**(12):4174-6.

-T-

- **Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei i S. Kumar.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. **28**: 2731-2739.

- **Taylor, D. E., M. Eaton, N. Chang i S. M. Salama.** 1992. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. J. Bacteriol. **174**:6800-6.

-

- **Thomas, J. E., G. R. Gibson, M. K. Darboe, A. Dale i L. T. Weaver.** 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet **340**:1194-5.

- **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzegerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M.**

- Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser i J. C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-47.
- **Tytgat, G. N.** 1995. Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Oharmacol. Ther.* **9**(Suppl. 2):105-10.
- V-
- **Van Doorn, L.J., C. Figueirido, R. Samnna, A. Plaisier, P. Schneeberger, W. de Boer i W. Quint.** 1998. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**:58-66.
- **Vanzanten, A. A., J. C. Thijs, A. M. D. Koolstrasmid, J. Schirm i J. A. M. Snijder.** 1994. Use of PCR with faeces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1346-1348.
- **Vargas, J., i G. Skromne.** 2001 Experiencia en el uso de una vacuna contra *Helicobacter pylori*. *Rev. Imagen Med.* <http://www.imagenmedica.com.mx/>.
- **Varoli O, M. P. Landini, M. LaPlaca, A. Tucci, R. Corinaldesi, G. F. Paparo, V. Stanghellini i L. Barbara** 1991. Presence of *Helicobacter pylori* in gastric juice. *Am. J. Gastroenterol.* **86**(2):249.
- **Velázquez, M i J. M. Feirtag.** 1999. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of

transmission implicating food and water. *Int. J. Food. Microbiol.* **53** (2-3):95-104.

-W-

- **Walker, J. T., D. J. Bradshaw, M. Finney, M. R. Fulford, E. Frandsen, E. OStergaard, J. M. Ten Cate, W. R. Moorer, A. J. Schel, A. Mavridou, J. J. Kamma , G. Mandilara, L. Stosser, S. Kneist, R. Araujo, N. Contreras, P. Goroncy-Bermes , D. O'Mullane, F. Burke, A. Forde, M. O'Sullivan i P. D. Marsh.** 2004. Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in Europe. *Eur. J. Oral. Sci.* **112**:412-418.
- **Wang, X., E. Sturegard, R. Rugar, H-O, Nilsson, P.A. Aleljung, B. Carlen, R. Willen i T. Wadstrom.** 1997. Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **46**:657-63.
- **Warren, J. R., i B. Marshall.** 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **I**:1273-1275.
- **Watanabe, T., S. Tomita, M. Kudo, M. Kurokawa, A. Orino, A. Todo i T. Chiba.** 1998. Detection of *Helicobacter pylori* gene by means of immunomagnetic separation-based polymerase chain reaction in feces. *Scand J. Gastroenterol.* **33**:1140-3.
- **Watson, C. L., R. J. Owen, B. Said, S. Lai, J. V. Lee, S. Surman-Lee i G. Nichols.** 2004. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *J. Appl. Microbiol.* **97**:690-698.
- **Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R Scott i G. Sachs.** 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**:482-485.

- **West, A. P., M. R. Millar i D. S. Tompkins.** 1990. Survival of *Helicobacter pylori* in water and saline. J. Clin. Pathol. **43**:609.

- **Wirth, H. P., M. Q. Yang, R. M. Peek, K. T. Tham, i M. J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori* Lewis expression is related to the host Lewis phenotype, abstra.3 p.A-1. In Abstracts of the American Gastroenterological Association Annual Meeting.

- **Witherell, H. L., S. Hansen, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelmann i J. Parsonnet.** 1997. Risk for gastric lymphoma in persons with CagA+ and CagA- *Helicobacter pylori* infection. Gut **40**:297-301.

- **Woodward, M. C., C. Morrison i K. McColl.** 2000. An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection. J. Clin. Epidemiol. **53**:175-181.

-Y-

- **Yáñez, M. A, V. M. Barberá, E. Soria i V. Catalán.** 2009. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the cag pathogenicity island gene, cagE. J. Appl. Microbiol. **107(2)**:416-24.

ANEXOS

Taula A: Paràmetres fisicoquímics i microbiològics de les aigües residuals. n=47

Data recollida	Mostra	Procedència	pH	Terbolesa	Coliform totals (CFU/100mL)	Coliform fecals (CFU/100mL)	Colifags somàtics (PFU/100mL)	<i>E.coli</i> (CFU/100mL)
19/03/2001	M01	Residual Gavà	8	296	9,90E+05	2,03E+06	6,80E+06	NR
26/03/2001	M02	Residual Gavà	7,41	700	6,40E+06	1,18E+06	2,66E+06	NR
02/04/2001	M03	Residual Gavà	7,89	163	6,55E+06	2,11E+06	3,75E+06	NR
09/04/2001	M04	Residual Gavà	7,77	242	1,12E+07	2,70E+06	2,09E+06	NR
16/04/2001	M05	Residual Gavà	7,82	185	8,27E+06	1,18E+06	1,69E+06	NR
23/04/2001	M06	Residual Gavà	7,72	79	1,99E+07	2,50E+05	3,09E+06	NR
30/04/2001	M07	Residual Gavà	7,68	233	1,75E+07	5,13E+05	6,65E+06	NR
25/05/2001	M08	Residual Gavà	7,86	243	1,20E+07	2,65E+06	3,65E+06	NR
12/06/2001	M09	Residual Gavà	8,46	243	4,20E+06	3,50E+05	4,73E+06	NR
14/06/2001	M10	Residual Sant Adrià	7,43	252	1,63E+07	3,20E+05	2,89E+06	NR
20/07/2001	M11	Residual Gavà	7,92	229	1,22E+07	1,02E+06	2,04E+06	NR
26/07/2001	M12	Residual Sant Adrià	8,3	220	1,13E+06	4,00E+05	5,70E+06	NR
02/01/2002	M13	Residual Gavà	7,2	114	8,90E+06	2,20E+06	1,23E+06	NR
18/02/2002	M17	Residual Gavà	7,69	160	9,20E+06	7,60E+07	2,00E+07	NR
18/02/2002	M18	Residual Taradell	8,13	104	9,90E+07	1,27E+07	6,40E+06	NR
04/03/2002	M19	Residual Gavà	7,71	150	7,23E+06	2,00E+07	8,78E+06	NR
08/04/2002	M20	Residual Taradell	8,06	121	1,12E+08	7,48E+07	2,80E+07	NR
08/04/2002	M21	Residual Gavà	7,42	190	8,80E+06	3,00E+07	7,42E+06	NR
25/04/2002	M22	Residual Gavà	8,47	53,3	6,65E+07	1,63E+07	7,70E+05	6,45E+06
28/05/2002	M23	Residual Gavà	7,5	115,5	6,65E+07	2,35E+07	6,00E+05	1,25E+07
25/06/2002	M24	Residual Gavà	8,17	87,2	7,85E+07	2,48E+07	5,20E+06	1,68E+07
08/07/2002	M25	Residual Gavà	7,7	118,5	5,75E+07	2,18E+07	9,60E+06	1,18E+07
15/10/2002	M26	Residual Sant Adrià	7,36	91,4	3,10E+07	1,91E+07	1,11E+06	1,10E+07
15/10/2002	M27	Residual Gavà	7,65	49,4	5,68E+07	2,40E+07	9,27E+05	1,85E+07
16/10/2002	M28	Residual Gavà	7,83	172	3,54E+06	1,36E+06	3,10E+06	NR
11/11/2002	M29	Residual Gavà	7,79	180	4,11E+07	1,51E+07	2,10E+06	5,00E+06
25/11/2002	M30	Residual Centelles	8,55	60,3	1,70E+07	8,20E+06	1,11E+06	1,10E+06
09/12/2002	M31	Residual Centelles	8,35	85,7	6,44E+07	2,21E+07	3,20E+06	1,47E+06
14/01/2003	M32	Residual Sant Adrià	8,25	113	3,05E+07	1,31E+07	6,50E+06	6,00E+06
30/01/2003	M33	Residual Centelles	8,3	87	4,90E+06	1,41E+06	1,10E+07	7,05E+05
05/02/2003	M34	Residual Sant Adrià	8,43	130	3,55E+07	1,10E+07	4,30E+06	8,80E+06
05/02/2003	M35	Residual Gavà	8,59	109	5,45E+07	1,55E+07	2,90E+06	4,65E+06
18/02/2003	M36	Residual Gavà	8,47	98	4,58E+07	1,28E+07	4,80E+06	2,40E+06
19/02/2003	M37	Residual Gavà	8,6	187	9,60E+07	3,42E+07	1,26E+06	3,45E+06
24/02/2003	M38	Residual Gavà	8,07	36,8	1,54E+07	6,80E+06	1,25E+06	3,40E+06
17/03/2003	M39	Residual Gavà	8,72	193	4,85E+07	2,85E+07	1,28E+07	3,40E+06
17/03/2003	M40	Residual Taradell	8,06	110	1,09E+08	1,84E+07	1,45E+06	1,38E+07
19/05/2003	M41	Residual Gavà	7,96	90,37	8,50E+05	2,50E+07	1,81E+07	1,66E+07
22/05/2003	M42	Residual Sant Adrià	7,46	103	6,50E+07	2,45E+07	4,80E+06	1,14E+07
22/05/2003	M43	Residual Mataró	7,52	92	1,39E+08	2,65E+07	5,85E+06	1,47E+07
26/05/2003	M44	Residual Gavà	7,85	123	1,67E+07	9,80E+06	8,70E+07	7,00E+06
02/06/2003	M45	Residual Gavà	7,92	118	6,00E+07	2,40E+07	6,85E+06	2,00E+07
20/06/2003	M46	Residual Gavà	7,87	130	7,60E+07	2,50E+07	7,00E+06	1,10E+07
27/06/2003	M47	Residual Montcada	7,14	60	NR	NR	NR	NR
08/07/2003	M48	Residual Gavà	7,87	119	5,45E+07	1,87E+07	8,00E+06	1,20E+07
09/02/2004	M49	Residual Mataró	8,43	99	6,84E+08	5,58E+08	6,30E+06	4,10E+08
09/02/2004	M50	Residual Sant Adrià	8,13	53	6,42E+08	5,70E+08	4,60E+06	4,50E+08

NR: prova no realitzada

Taula B: Paràmetres fisicoquímics i microbiològics de les aigües de riu estudiades. n=24

Data recollida	Mostra	Procedència	pH	Turbidesa	Coliform totals (CFU/100mL)	Coliform fecals (CFU/100mL)	Colifags somàtics (PFU/100mL)	<i>E.coli</i> (CFU/100mL)
17/03/2001	MR01	Riu Nog. Ribagorçana	7,38	0,68	1,98E+02	2,50E+01	5,40E+01	NR
16/04/2001	MR02	Riu Nog. Ribagorçana	7,33	0,985	4,93E+03	6,00E+02	3,08E+02	NR
11/06/2001	MR03	Riu Llobregat (Abrera)	7,7	51,7	1,00E+04	1,95E+05	6,15E+04	nR
04/04/2002	MR04	Riu Llobregat (Abrera)	8,1	20,13	NR	NR	NR	NR
22/04/2002	MR05	Riu Congost Font de St. Miquel	7,11	0,934	3,75E+00	3,20E+00	1,40E+01	2,20E+00
22/04/2002	MR07	Riu congost Can Puigoriguer	8,23	2,36	2,66E+05	5,54E+04	2,16E+04	6,55E+04
13/05/2002	MR08	Riu Congost Font de St. Miquel	8,61	2,53	2,68E+02	2,17E+02	1,68E+01	1,80E+02
13/05/2002	MR09	Riu Congost Pont de l'Ajuda	8,43	4,08	6,02E+03	3,63E+03	6,60E+02	1,90E+03
13/05/2002	MR10	Riu congost Can Puigoriguer	8,59	3,43	4,94E+04	2,10E+04	5,32E+03	8,50E+03
13/06/2002	MR11	Riu Congost Font de St. Miquel	8,07	0,76	3,83E+03	6,33E+02	9,80E+00	6,00E+02
03/06/2002	MR12	Riu Congost Pont de l'Ajuda	7,85	2,06	4,55E+02	4,05E+02	2,20E+01	3,00E+02
03/06/2002	MR13	Riu congost Can Puigoriguer	7,99	2,6	4,94E+04	1,40E+04	6,20E+04	6,40E+03
25/06/2002	MR14	Riu Congost Pont de l'Ajuda	7,24	2,2	2,18E+04	1,05E+03	4,50E+02	8,50E+02
25/06/2002	MR15	Riu congost Can Puigoriguer	7,84	1,01	4,88E+04	1,63E+04	8,20E+03	9,25E+03
15/07/2002	MR16	Riu Congost Font de St. Miquel	7,96	0,754	9,55E+03	2,08E+03	1,00E+01	1,33E+03
15/07/2002	MR17	Riu Congost Pont de l'Ajuda	7,32	0,743	3,23E+04	1,65E+03	6,50E+02	6,67E+02
15/07/2002	MR18	Riu congost Can Puigoriguer	7,94	0,948	1,03E+05	3,30E+04	2,17E+04	1,13E+04
15/07/2002	MR19	Riu Congost abans depuradora	7,85	1,228	8,23E+04	3,95E+04	1,00E+04	1,43E+04
12/05/2003	MR20	Riu Llobregat (Abrera)	8,15	16,23	1,22E+04	2,00E+03	4,40E+02	7,68E+02
05/02/2004	MR21	Riu Congost El Figaró	8,48	1,23	1,23E+05	1,11E+05	2,56E+04	7,70E+04
05/02/2004	MR22	Riu Congost Abrera	8,59	1,93	1,48E+05	2,53E+04	1,34E+04	1,77E+04
24/02/2004	MR23	Riu Congost El Figaró	8,33	2,52	1,20E+05	1,05E+05	1,32E+04	9,24E+04
24/02/2004	MR24	Riu Congost Hostalets de Balenyà	8,17	1397	1,85E+05	1,38E+05	1,50E+02	2,76E+04
24/02/2004	MR25	Riu Congost Aiguafreda	8,27	14,3	5,95E+04	3,15E+04	1,02E+04	6,30E+03

NR: prova no realitzada

Taula C: Paràmetres fisicoquímics i microbiològics de les aigües de font estudiades. n=19

Data recollida	Mostra	Procedència	pH	Terbolesa	Coliform totals (CFU/100mL)	Coliform fecals (CFU/100mL)	Colifags somàtics (PFU/100mL)	<i>E.coli</i> (CFU/100mL)
22/04/2002	MF01	Font del Regàs	7,1	0,8	6,00E-01	6,00E-01	5,00E+00	6,00E-01
29/04/2002	MF02	Font Terrades	7,9	0,155	2,70E+01	6,20E+00	2,90E+01	1,20E+00
29/04/2002	MF03	Font de l'Estrada	7,9	0,183	1,00E+02	2,87E+00	1,45E+02	0,00E+00
29/04/2002	MF05	Font Grossa	7,6	0,56	2,35E+01	2,20E+01	5,00E+00	1,53E+00
13/05/2002	MF06	Font del Regàs	7,4	0,754	1,10E+02	1,00E+00	1,40E+01	4,00E-01
21/05/2003	MF07	Font Calenta	6,9	0,165	2,81E+02	1,03E+01	<0,1	6,00E+00
21/05/2002	MF08	Font de Sant Martí de Centelles	6,7	0,189	5,75E+01	1,05E+01	1,15E+01	1,03E+01
21/05/2002	MF09	Font de Sant Pau	6,7	0,215	0,00E+00	0,00E+00	<0,1	0,00E+00
21/05/2002	MF10	Font dels Enamorats	7,4	0,12	8,00E+00	2,05E+01	<0,1	1,00E-01
03/06/2002	MF11	Font del Regàs	6,8	0,319	3,30E+01	0,00E+00	<0,1	0,00E+00
13/06/2002	MF12	Font de Sant Martí de Centelles	7,3	0,146	5,62E+02	1,10E+01	8,40E+00	8,75E+00
13/06/2002	MF13	Font Calenta	7,4	0,741	1,70E+02	1,20E+01	<0,1	5,50E+00
13/06/2002	MF14	Font de l'Estrada	7,7	0,203	2,41E+02	8,50E+01	5,00E-01	5,55E+00
13/06/2002	MF15	Font dels Enamorats	7,4	0,13	1,15E+02	0,00E+00	<0,1	0,00E+00
08/07/2002	MF16	Font de Sant Pau	6,7	0,394	0,00E+00	0,00E+00	<0,1	0,00E+00
08/07/2002	MF17	Font de Sant Martí de Centelles	6,8	0,88	1,41E+01	0,00E+00	<0,1	0,00E+00
08/07/2002	MF18	Font Calenta	7	0,65	4,96E+01	5,25E+00	2,00E-01	4,10E+00
08/07/2002	MF19	Font de l'Estrada	7,2	0,135	5,35E+02	2,50E+02	1,10E+00	1,30E+01

❖ **MEDI *HELICOBACTER PYLORI* SPECIAL PEPTONE AGAR (HPSPA)**

- Peptona especial (Oxoid)	10 g/L
- Agar granulat	15 g/L
- Clorur de sodi	5g/L
- Extracte de llevat	5g/L
- Extracte de carn	5g/L
- Àcid pirúvic, salt de sodi	0,5g/L

Dissoldre tots els components excepte l'àcid pirúvic en 1 L d'aigua destil·lada. Esterilitzar en autoclau a 121°C durant 15 min. Temperar a 50°C i afegir asèpticament 10 mL de la suspensió d'àcid pirúvic 50g/L esterilitzat per filtració, per tenir una concentració final de 0,5g/L.

❖ **PBS**

- NaCl	8g/L
- KCl	0,2g/L
- Na ₂ HPO ₄	1,44g/L
- H ₂ PO ₄	0,24g/L
- Aigua destil·lada	1L
- Autoclavar a 121°C durant 20 minuts.	

❖ **TBE (TRIS BORAT EDTA) 10X**

- Tris Base : Tris (hidroximetil)-aminometà	108g
- EDTA:Tritiplex III	9,3g
- Àcid bòric	55g
- Aigua destil·lada	1L
- Autoclavar a 121°C durant 20 minuts.	

S'utilitza la sol·lució TBE 1X, preparant-se amb 100 mL de TBE 10X i 900 mL d'aigua destil·lada.

❖ **TE (TRIS-EDTA)**

- Tris	10 mM
- EDTA	0,1mM

❖ **TAMPÓ D'EXTRACCIÓ DEL METODE DE PITCHER I COL., 1989**

- Tiocinat de guanidina	5M
- EDTA	100mM
- Sarkosyl	0.5%

❖ **TAMPÓ DE LISI DEL MÈTODE DE BOOM I COL., 1990**

- Tiocianat de guanidina (GuSCN, Fluka)	120 g
- Tris Hidroclorit 0.1M pH 6.4	100mL
- EDTA 0.2M	22 mL
Ajustar amb NaOH a pH 8.0	
- Tritó X-100	2.36 g

❖ **PARTÍCUL·LES DE SILICE, SEGONS BOOM I COL., 1990**

- Diòxid de sílice	60 g
- Aigua desmineralitzada	fins 500mL

Es barreja en un tub cilíndric de vidre i es deixa sedimentar 24h a temperatura ambient.

Es retiren per succió 430 ml del sobrenedant. Es torna a afegir aigua desmineralitzada al peller fins a un volum de 500ml i s'agita vigorosament.

Es deix sedimentar 5 h a temperatura ambient i es retiren 440 ml del sobrenedant.

S'afegeixen 600 µl de HCL (32, pes/vol) fins pH 2.

Es reparteixen 4 ml en tubs de vidre i s'autoclava a 121°C durant 20 minuts.

La barreja és estable durant 6 mesos a temperatura ambient i fosc.

❖ **TAMPÓ DE RENTAT DEL MÈTODE DE BOOM I COL., 1990**

- Tiocianat de guanidina (GuSCN, Fluka) 120 g
- Tris Hidroclorit 0.1M pH 6.4 100mL

❖ **TAMPÓ D'EL·LUCIÓ (TE) DEL MÈTODE DE BOOM I COL., 1990**

- Tris Hidroclorit 10mM
- EDTA pH 8.0 1 mM

S'autoclava a 121°C durant 20 minuts.

❖ **MARCADOR DE PER MOL·LECULAR I TAMPÓ DE CÀRREGA**

- El marcador és el ØX174DNA (Sigma)
- El tampó de càrrega és el *Blue/Orange 6x Loading Dye*, de Promega.

Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain

N. Queralt¹, R. Bartolomé² and R. Araujo¹

¹Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, and ²Servei de Microbiologia, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

2004/0267: received 9 March 2004, revised and accepted 7 October 2004

ABSTRACT

N. QUERALT, R. BARTOLOMÉ AND R. ARAUJO. 2005.

Aims: To assess the role of water in the faecal transmission of *Helicobacter pylori* by detecting the DNA of this pathogen in human faecal samples and environmental water samples with a range of faecal pollution from the north-east of Spain.

Methods and Results: Semi-nested PCR was used to detect *H. pylori* in stools and water, both matrices with a complex biota. DNA was detected using highly specific primers of an *ureA* gene fragment. In addition, antigens were used to detect the bacteria in stools. *Helicobacter pylori* was detected in 33% of 36 human faecal samples and in 66% of wastewater samples, and 11% of river samples, but in none of the spring waters samples. Faecal pollution of the aquatic environment was tested analysing the presence of microbial indicators.

Conclusions: We report the presence of *H. pylori* DNA in stools and in aquatic environments with different levels of faecal pollution, from the north-east of Spain. In this study a higher number of positive results were obtained in the more faecally polluted waters.

Significance and Impact of the Study: These data indicate that water may be a vector of *H. pylori* in its faecal–oral route.

Keywords: environment, *Escherichia coli*, faecal indicators, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter pylori* stool antigen test, human stools, PCR, river water, sewage water, spring water.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori causes a chronic infection in humans that is usually acquired during childhood. The transmission route of the bacterium is unclear, although epidemiological and microbiological data suggest two routes, oral–oral (Brenner *et al.* 2001) and faecal–oral (Lu *et al.* 2002), both of which may participate in transmission. The *H. pylori* reservoir is found in the human gut but the bacterium may pass through the gastrointestinal tract (Wisniewska *et al.* 2002) to the oral cavity or to the stools. Gastro–oral

transmission via saliva, dental plaque or vomitus (Leung *et al.* 1999) has been proposed as a mode of transmission especially among infected children of a family or a community (Hultén *et al.* 1996; Mazari-Hiriart *et al.* 2001a). In addition, faecal–oral transmission via faecal polluted water and bad hygiene have been proposed.

Until the 1990s the faecal–oral transmission of *Helicobacter* was demonstrated on the basis of epidemiological data (Klein *et al.* 1991) because it could not be cultured from environmental samples, but only from stomach biopsies. *Helicobacter* is a fastidious micro-organism of culturing, especially when it is not isolated from the gut. In other environments the bacterium transforms from the characteristic bacillar form into the coccial form, which is viable but

Correspondence to: R. Araujo, Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, Barcelona, Spain (e-mail: raraujo@ub.edu).

not cultivable. The organism has rarely been cultured from human faeces (Thomas *et al.* 1992; Kelly *et al.* 1994; Parsonnet *et al.* 1999; Dore *et al.* 2000) and only two times from water (Lu *et al.* 2002; Flanigan and Rodgers 2003).

The role of water as a vector is one of the focus points of the current research (Engstrand 2001). However, this transmission mode is not easy to demonstrate because *H. pylori* is difficult to recover from aquatic environments. Environmental research of this bacterium was not performed until the development of molecular techniques, such as PCR (Alarcón *et al.* 1998), immunomagnetic separation (Nilsson *et al.* 1996), hybridization (Clayton *et al.* 1992), monoclonal antibodies (Hegarty *et al.* 1999) or fluorescent *in situ* hybridization (FISH) (Moreno *et al.* 2003). These techniques, first designed as diagnostic tools, have facilitated the detection of *H. pylori* DNA and antigens from environment and stool samples. The application of PCR using distinct primers has improved the detection of this bacterium (Clayton *et al.* 1992; Mapstone *et al.* 1993; Lage *et al.* 1995; Notarnicola *et al.* 1996; Lu *et al.* 2002). It has been found in Peruvian, Mexican, Swedish and Japanese aquatic environments (Hulten *et al.* 1996, 1998; Hegarty *et al.* 1999; Sasaki *et al.* 1999; Mazari-Hiriart *et al.* 2001b).

The overall prevalence of *H. pylori* infections in Spain is estimated to be ca 46% (Martín de Argila *et al.* 1996; Navarro *et al.* 1999), but being much lower in children and infants (<15%). However, little is known about its presence in aquatic environments in Spain (Moreno *et al.* 2003). Moreno and co-workers using molecular methods analysed 25 water samples. They detected *H. pylori* in two river water samples by FISH and only one sewage sample was positive by PCR.

Here we attempt to detect *H. pylori* in stools and water with different levels of faecal pollution to assess the role of water in faecal transmission. A highly specific and sensitive PCR method was implemented. We chose a set of primers which amplified a fragment of the *ureA* gene. These primers were designed by Clayton *et al.* (1992) to analyse clinical samples because they were species specific, in those experiments 60 strains of different species were tested and only *H. pylori* DNA was amplified. Specificity is crucial for the detection of the bacterium in faeces and aquatic environmental samples, both types of sample having an abundant and complex biota. However, the sensitivity shown by this technique was too low to be applied to environmental samples. Therefore we used a semi-nested PCR to increase sensitivity to detect a *ureA* gene fragment. Samples of human faecal samples, wastewater samples, river water samples and spring water samples were analysed. Stools were analysed in parallel with the immunoenzymatic Premier Platinum *Helicobacter pylori* stool antigen test (HpSA).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Helicobacter pylori 26695 and *H. pylori* SS1 were kindly provided by Dr Julià Gómez and Dr Alarcón respectively.

Helicobacter pylori strains were stored at -80°C in 40% (w/v) skimmed milk (Scharlau, Barcelona, Spain). *Helicobacter pylori* was cultured on Columbia agar (Scharlau, Spain) plates supplemented with 5% (v/v) defibrinated horse blood (Oxoid, Madrid, Spain) at 37°C for 4–5 days under microaerobic conditions with a gas generating (Gas Generating kit, Campylobacter system; Oxoid) envelope in a jar.

Water samples

Wastewater samples were collected from inflowing raw urban sewage waters of two sewage treatment plants in the city of Barcelona: 12 in Gavà and three in Sant Adrià. As both plants are located very near the urban inputs, the faecal pollution of these waters is very recent. Nineteen river samples were collected from four sites along the Congost River, two from the Noguera Ribagorçana River and two from the Llobregat River near Barcelona. Nineteen spring water samples were collected from nine fountains around the village of Centelles. All sampling sites were located in Catalonia, in the north-east area of Spain. Samples were collected in sterile plastic bottles, transported to the laboratory in isothermic containers and analysed within 4 h of sampling.

Water samples were analysed for faecal indicators: total coliforms (TC), faecal coliforms (FC), *Escherichia coli* (EC) and somatic coliphages (SC). The membrane filtration procedure (Anon. 1998) was used to quantify bacteria and bacteriophages were analysed according with ISO 10705-2:2000 (Anon. 2000). Culture media and incubation conditions were: TC, membrane Endo agar LES (Difco), incubated at $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 18 h; FC, membrane FC agar (Difco) incubated at $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 18 h, EC were quantified using the indol test; SC, modified Scholtens' agar, incubated at $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 18 h and EC at $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 18 h. Turbidimetry and pH were measured in all samples.

Faecal samples

Thirty-six children (12 males and 24 females from 8 months to 15 years old, mean age 9.8 years) attending the gastroenterology unit at Vall d'Hebron Hospital in Barcelona and with symptoms of gastroenteritis participated in the study. We analysed the faeces from a group of children because in this clinical laboratory the antigen test was applied only to paediatric patients. One fresh faecal

sample was obtained from each patient. All samples were tested using the HpSA (Premier Platinum *Helicobacter pylori* stool immunoenzymatic antigen test; Meridian Diagnostics Inc., Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. Other stool samples were stored in vials at -80°C until PCR analysis.

DNA extraction from faecal samples

Faecal samples (1 g) were suspended in 10 ml of 0.25 mol l^{-1} glycine buffer (pH 10). They were shaken for 1 h at 4°C and the left to settle for 5 min at room temperature. The supernatant was centrifuged at $121 \times g$ for 15 min and the supernatant obtained was concentrated at $7740 \times g$ for 4 min. The resultant pellet was resuspended in 0.5 ml phosphate-buffered saline (PBS) and stored at -20°C .

DNA extraction from water samples

Samples of 100 ml of sewage, river and spring water were processed to remove organic matter by centrifugation at $121 \times g$ for 5 min. The supernatant was concentrated by centrifugation at $7740 \times g$ for 15 min, the resultant pellet was resuspended in 1 ml of PBS, followed by centrifugation at $10\,000 \times g$ for 5 min. Finally, 50 μl of PBS was added to the pellet and stored at -20°C .

Total DNA from the concentrated samples (water and faeces) for PCR of the *ureA* gene was purified using guanidinium thiocyanate and adsorption of nucleic acids to silica particles (Boom *et al.* 1990), thereby allowing the removal of DNA-damaging substances and PCR inhibitors present in samples. DNA was stored at -20°C .

ureA-PCR

Subunit A *H. pylori* urease gene (*ureA*) was amplified by two step semi-nested PCR; the first with two external primers (HPU1: 5'GCCAATGGTAAATTAGTT3' and HPU2: 5'CTCCTTAATTGTTTTTAC3') (Clayton *et al.* 1992) and the second using HPU2 and one internal primer (HPUI1: 5'ATTGACATTGGCGGTAAC3') (Clayton *et al.* 1992) for amplification of a 155 bp fragment of the urease gene.

For a typical one-step reaction, 10 μl of purified DNA was used for *H. pylori* detection. Amplification was carried out in a 50 μl of reaction mixture containing 1X PCR buffer II (10 mmol l^{-1} Tris-HCl, pH 8.3; 50 mmol l^{-1} KCl), 2 mmol l^{-1} MgCl_2 , $250\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ concentration of each deoxynucleotide triphosphate, $0.5\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ of each *H. pylori* primer, and 2 U of Ampli Taq polymerase (Applied Biosystems, Roche, Madrid, Spain). Thermal cycling of the amplification mixture was performed in a programmable thermal cycler (Gene Amp PCR System 2400; Perkin Elmer,

Madrid, Spain) with an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, annealing at 45°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. An additional extension step at 72°C for 5 min completed the PCR and the amplicons were stored at 4°C . The external primers (HPU1-HPU2) were used in the first 35 cycles. Next, 1 μl of the first amplification product was added to a new batch of 50 μl of PCR mixture containing $0.5\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ each semi-nested primer (HPUI1-HPUI2) in a new 30-cycle amplification. A negative control with sterile distilled water and a positive control with *H. pylori* 26695 DNA were included. The results were analysed by gel electrophoresis on a 2% agarose gel (Ecogen, Barcelona, Spain) that was stained with ethidium bromide ($0.5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$). Fragment of 411 bp in size were excised. The DNA was then purified from the gel using Ultrafree-DA columns (Millipore, Madrid, Spain). Both strands of the purified DNA were sequenced with ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing kit 2.0 (Applied Biosystems, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions and the ABI Prism 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems). DNA sequences were assessed for their similarity to published DNA sequences using the BLAST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.* 1997).

Sensitivity of PCR

Serial dilutions in PBS of two references strains (*H. pylori* 26695 and *H. pylori* SS1) were prepared from plate agar culture. Viable cells number were quantified by plate counting. *Helicobacter pylori* cultures were performed using Columbia agar with 5% horse defibrinated blood. The cultures were incubated for 4–5 days at 37°C in a micro-aerobic atmosphere. DNA extraction for each dilution was performed following Boom's method, using silica particles and guanidinium thiocyanate as described above. DNA was stored at -20°C . To evaluate the sensitivity of this method, *H. pylori* DNA corresponding to each dilution was amplified as described above.

RESULTS

Sensitivity and specificity of the PCR assay

The sensitivity of the PCR assay for the detection of *H. pylori ureA* sequence was tested by PCR amplification of serial dilutions of genomic DNA of *H. pylori* SS1 and *H. pylori* 26695. The cells were quantified by viable count. To increase sensitivity, some parameters were changed from the technique described by Clayton. DNA was extracted with guanidinium and silica particles. This method removes PCR inhibitors more efficiently than boiling. Ca^{++} was increased to 2 mM, and a second amplification of an internal fragment

Table 1 Detection of specific *Helicobacter pylori* antigens by immunoenzymatic test (HpSA) and *ureA* gene DNA by semi-nested PCR in human faecal samples

Faecal sample	F6-9	F14-17	F22-8	M2-4	M6-3	M7-1	M8-6	M8-9	M13-13	M13-14	M14-15	M15-1	M16-3	M19-1	M23-2	M27-8	M27-9	M28-14
HpSA test	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ureA-PCR	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Faecal sample	M29-10	M29-14	A5-6	A18-6	S4-8	S6-8	S7-12	S6-12	S13-11	S21-4	S27-3	S28-2	O1-16	O5-4	O5-5	O8-4	O9-5	O15-9
HpSA test	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
ureA-PCR	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-

of the amplicon was performed to increase sensitivity. The sensitivity in these conditions of the semi-nested PCR was 50 CFU ml⁻¹; this sensitivity may be reduced when applied to more complex matrix with PCR inhibitors and DNA of others sources such environmental samples.

The specificity of the used primers were checked with *H. pylori* SS1 and 26695, *Campylobacter jejuni* DSMZ 4688 and EC WG5 ATCC700078. The results were consistent with those obtained by Clayton *et al.* (1992). Only *H. pylori* DNA was amplified. Moreover, the amplicon obtained from the semi-nested PCR was tested by comparing the 156 bp of *H. pylori* 26695 and SS1 with the BLAST database. The amplicon showed homology of over 91% and an *E*-value of 1e-52 with the stored sequences of 42 strains of the *H. pylori*. We conclude the technique is highly specific.

Helicobacter pylori detection in faecal samples using two methods

Thirty-six faecal samples from 36 patients were analysed by antigenic detection with the HpSA test and by semi-nested PCR (Table 1). Twelve samples were positive by PCR and 11 were positive by HpSA. There were 75% of agreement between the methods: seven samples (19.4%) were positive with the two methods and 20 samples (55.5%) were negative by both. In those faecal samples that were negative for the antigen test but positive for the *ureA* gene amplification, the PCR analysis was repeated. Considering both methods 16 of the 36 analysed samples were positive (44%) for *H. pylori* in patients with gastric symptomatology.

Table 2 Physicochemical and microbiological parameters from sewage water samples. *Helicobacter pylori ureA* gene was detected in 66% of the samples

Statistics	pH	Turbidity	TC (CFU 100 ml ⁻¹)	FC (CFU 100 ml ⁻¹)	SC (PFU 100 ml ⁻¹)	EC (CFU 100 ml ⁻¹)
Geometric mean	7.92	175.51	1.2 × 10 ⁷	2.3 × 10 ⁶	3.2 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁷
Maximum	8.47	700	8.5 × 10 ⁷	2.5 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁷	1.7 × 10 ⁷
Minimum	7.41	53.3	9.9 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁵	6.0 × 10 ⁵	6.5 × 10 ⁶
Number	13	13	12	12	12	3

Number refers to the results of the analysed parameters.

Detection in water samples with distinct levels of faecal pollution

Total coliforms, FC and somatic bacteriophages were measured. The pH and turbidity were also measured. The data for both parameters were consistent with the type of water analysed: the lowest pH (6.65) was recorded in water from a fountain and the highest (8.61) in river water. Both values are within the expected range for fresh water between 6.5 and 8.7 (Margalef 1977). The data on suspended solids (turbidity) depended on the type of water. All fountain samples were under 1 nephelometric turbidity units (NTU). Most of the river samples were under 4 NTU, with one exception: these values are within the expected range for small rivers in the Mediterranean area. Much higher turbidity values, between 53 and 700 NTU, were recorded in the sewage samples.

Fifteen samples of sewage water were analysed for TC, FC and SC as shown in Table 2. All the samples with recent faecal inputs showed very high numbers of faecal indicators as expected in urban sewage water. The *ureA* gene was detected by the semi-nested PCR in 10 samples, 66% of the total analysed.

Some of the sequences amplified from sewage water were sequenced and the results were compared with GeneBank data. The blast indicated a similarity of >95%, thereby confirming that the DNA isolated from the environmental waters belonged to *H. pylori*.

Table 3 shows the results of faecal indicators and *H. pylori* present in the river water. The faecal indicators numbers

Table 3 Physicochemical and microbiological parameters from river water samples ($n = 19$)

Date	River water*	pH	Turbidity	TC (CFU 100 ml ⁻¹)	FC (CFU 100 ml ⁻¹)	SC (PFU 100 ml ⁻¹)	EC (CFU 100 ml ⁻¹)	<i>ureA</i> gene PCR detection
22 April 2002	Congost I	7.11	0.93	3.7×10^0	3.2×10^0	1.4×10^1	2.2×10^0	–
22 April 2002	Congost II	8.25	2.34	2.2×10^4	4.0×10^3	1.6×10^3	2.3×10^3	–
22 April 2002	Congost III	8.23	2.36	2.6×10^5	5.5×10^4	2.1×10^4	6.5×10^4	–
13 May 2002	Congost I	8.61	2.53	2.6×10^2	2.1×10^2	1.6×10^1	1.8×10^2	–
13 May 2002	Congost II	8.43	4.08	6.0×10^3	3.6×10^3	6.6×10^2	1.9×10^3	–
13 May 2002	Congost III	8.59	3.43	4.9×10^4	2.1×10^4	5.3×10^3	8.5×10^3	–
03 June 2002	Congost III	8.07	0.76	3.8×10^3	6.3×10^2	9.8×10^0	6.0×10^2	–
03 June 2002	Congost II	7.85	2.06	4.5×10^2	4.0×10^2	2.2×10^1	3.0×10^2	–
03 June 2002	Congost III	7.99	2.60	4.9×10^4	1.4×10^4	6.2×10^4	6.4×10^3	–
25 June 2002	Congost II	7.24	2.20	2.1×10^4	1.0×10^3	4.5×10^2	8.5×10^2	–
25 June 2002	Congost III	7.84	1.01	4.8×10^4	1.6×10^4	8.2×10^3	9.2×10^3	–
15 July 2002	Congost I	7.96	0.75	9.5×10^3	2.0×10^3	1.0×10^1	1.3×10^3	–
15 July 2002	Congost II	7.32	0.74	3.2×10^4	1.6×10^3	6.5×10^2	6.6×10^2	–
15 July 2002	Congost III	7.94	0.94	1.0×10^5	3.3×10^4	2.1×10^4	1.1×10^4	–
15 July 2002	Congost IV	7.85	1.22	8.2×10^4	3.9×10^4	1.0×10^4	1.4×10^4	–
17 March 2001	Noguera R.	7.38	0.68	1.9×10^2	2.5×10^1	5.4×10^1	ND	+
16 April 2001	Noguera R.	7.33	0.98	4.9×10^3	6.0×10^2	3.0×10^2	ND	+
11 June 2001	Llobregat	7.70	51.70	1.0×10^4	ND	ND	ND	–
12 May 2003	Llobregat	8.15	16.23	1.2×10^4	2.0×10^3	4.4×10^2	7.6×10^2	–

*I, II, III, and IV are different sites in the Congost River.

ND, not defined.

show that the analysed river waters, which flow through populated areas are moderately polluted, *H. pylori* was detected in two of these samples.

Helicobacter pylori was not detected in any of the 19 spring waters analysed (Table 4). Most of the samples had very low levels of faecal pollution, which may come from

Table 4 Physicochemical and microbiological parameters from fountain water samples ($n = 19$)

Date	Fountain water	pH	Turbidity	TC (CFU/100 ml)	FC (CFU/100 ml)	SC (PFU/100 ml)	EC (CFU/100 ml)	<i>ureA</i> gene PCR detection
22 April 2002	Regàs	7.07	0.80	0.6×10^0	0.6×10^0	5.0×10^0	0.6×10^0	–
13 May 2002	Regàs	7.40	0.75	1.1×10^2	1.0×10^0	1.4×10^1	0.4×10^0	–
03 June 2002	Regàs	6.82	0.31	3.3×10^1	<0.1	<0.1	<0.1	–
29 April 2002	Estrada	7.89	0.18	7.0×10^2	2.8×10^0	1.4×10^2	<0.1	–
13 June 2002	Estrada	7.68	0.20	2.4×10^2	8.5×10^1	0.5×10^0	5.5×10^0	–
08 July 2002	Estrada	7.21	0.14	5.4×10^2	2.5×10^2	1.1×10^0	1.3×10^1	–
21 May 2002	Calenta	6.86	0.16	2.8×10^2	1.0×10^1	<0.1	6.0×10^0	–
13 June 2002	Calenta	7.44	0.74	1.7×10^2	1.2×10^1	<0.1	5.5×10^0	–
08 July 2002	Calenta	6.95	0.65	4.9×10^1	5.2×10^0	0.2×10^0	4.1×10^0	–
21 May 2002	Sant Martí	6.74	0.18	5.7×10^1	1.0×10^1	1.1×10^1	1.0×10^1	–
13 June 2002	Sant Martí	7.30	0.14	5.6×10^2	1.1×10^1	8.4×10^0	8.7×10^0	–
08 July 2002	Sant Martí	6.79	0.88	1.4×10^1	<0.1	<0.1	<0.1	–
21 May 2002	Enamorats	7.38	0.12	8.0×10^0	2.0×10^1	<0.1	0.1×10^0	–
13 June 2002	Enamorats	7.43	0.13	1.1×10^2	<0.1	<0.1	<0.1	–
08 July 2002	Enamorats	6.70	0.15	4.9×10^1	5.2×10^0	0.1×10^0	4.0×10^0	–
21 May 2002	Sant Pau	6.65	0.21	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	–
08 July 2002	Sant Pau	7.43	0.39	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	–
29 April 2002	Terrades	7.88	0.15	2.7×10^1	6.2×10^0	2.9×10^1	1.2×10^0	–
29 April 2002	Grossa	7.63	0.56	2.3×10^1	2.2×10^1	5.0×10^0	1.5×10^0	–

the animal farms located in the area with low human inputs.

DISCUSSION

In order to determine the incidence of *H. pylori* in aquatic environments we applied a semi-nested PCR, highly specific and sensitive for *H. pylori*. The introduction of a third primer increased the sensitivity of the test up to 50 cells per reaction in the experimental conditions described. Using this technique we detected *H. pylori* in human faeces and in water samples with different levels of faecal pollution.

Helicobacter pylori was detected in 16 of the 36 stools analysed by semi-nested PCR and by the HpSA method, currently a well accepted clinical tool to detect the bacterium in faeces from gastric patients. A comparative study of these two methods indicated a 75% agreement of results. These data are consistent with those obtained by other authors (Roth *et al.* 2001; Wisniewska *et al.* 2002). The heterogeneity of the results from the two methods is the result of the patchy distribution of the bacteria in faeces, the small amounts analysed for any of the two techniques in which the random distribution plays an important factor and the high amounts of PCR inhibitors that faecal material contains. To overcome the latter, we reduced inhibitors by using silica particles as an extraction method (Boom *et al.* 1990).

Our study is the first to show the presence of *H. pylori* DNA in the aquatic environments of north-east of Spain. It was detected in 10 urban sewage samples (66%) and in two samples from a moderately faecal polluted river (11%), but in none of the spring waters. The presence of *H. pylori* in sewage water may have been underestimated because of inhibitors. It is difficult to compare our data with those published, because each author has used distinct methods to detect the bacterium and the most of waters had a low physicochemical and microbial characterization (Hulten *et al.* 1996, 1998; Hegarty *et al.* 1999; Moreno *et al.* 2003). The presence of *H. pylori* DNA in human stools and in those waters highly polluted with recent faecal pollution inputs strongly supports that water may be one vector of this bacterium. These results are consistent with previous reports. Baker and Hegarty (2001) found a statistical relation between the presence of a faecal indicator, EC, and *H. pylori* in drinking water contaminated by domestic waste. A similar conclusion was reached by Horiuchi *et al.* (2001) in an study made in Japan. It has been proposed that *H. pylori* infection is through oral–oral and faecal–oral transmission routes. One of these routes may be favoured because of the socioeconomic and health status of the area (Brown *et al.* 2002; Graham and Malaty 2002). Water may be a vector in the faecal–oral route and its importance as such is greater in developing countries. In those areas, people drink untreated water and rarely have water taps

or toilets inside their homes, which clearly hinders good hygiene such as handwashing or dish washing (Bunn *et al.* 2002; Nurgalieva *et al.* 2002), increasing the faecal infection of *H. pylori*. Although *H. pylori* is mainly transmitted via other routes in developed countries, it can also be detected in water (Hulten *et al.* 1998; Sasaki *et al.* 1999). This is demonstrated by the fact that *H. pylori* has been isolated from biofilms in municipal water pipelines treated with chlorine (Park *et al.* 2001). Therefore, independent of the route of transmission, water has a key role in the transmission of *H. pylori* infection in humans.

Our results demonstrate the presence of *H. pylori* in stools and faecally polluted water and so the presence of this pathogen should be controlled in the aquatic environments to prevent the spread of the infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grant 2001 SGR00099 from the Generalitat de Catalunya and CeRBa (Centre de referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya). Núria Queralt is the recipient of fellowship from the Universitat de Barcelona.

We thank Dr Julià Gómez from the 'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona' and Dr Teresa Alarcón from 'Hospital Universitario de La Princesa de Madrid' for kindly providing us with bacterial strains.

REFERENCES

- Alarcón, T., Domingo, D., Sanz, J.C., Martínez, M.J. and López-Brea, M. (1998) Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **16**, 395–399.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W and Lipman, DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programmes. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Anon. (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edn. Washington, DC: American Public Health Association.
- Anon. (2000) *ISO 10705-2: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages*. Geneva, Switzerland: International Standardisation Organisation.
- Baker, K.H. and Hegarty, J.P. (2001) Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water is associated with clinical infection. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **33**, 744–746.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E. and Van Der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 495–503.
- Brenner, H., Rothenbacher, D., Bode, G., Dieudonné, P. and Adler, G. (2001) Active infection with *Helicobacter pylori* in healthy couples. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 80S–84S.
- Brown, L.M., Thomas, T.L., Ma, J.L., Chang, Y.S., You, W.C., Liu, W.D., Zhang, L., Pee, D. *et al.* (2002) *Helicobacter pylori* infection in

- rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *International Journal of Epidemiology* **31**, 638–645.
- Bunn, J.E.G., MacKay, W.G., Thomas, J.E., Reid, D.C. and Weaver, L.T. (2002) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Letters in Applied Microbiology* **34**, 450–454.
- Clayton, C.L., Kleanthous, H., Coates, P.J., Morgan, D.D. and Tabaqchali, S. (1992) Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 192–200.
- Dore, M.P., Osato, M.S., Malaty, H.M. and Graham, D.Y. (2000) Characterization of a culture method to recover *Helicobacter pylori* from the feces of infected patients. *Helicobacter* **5**, 165–168.
- Engstrand, L. (2001) *Helicobacter* in water and waterborne routes of transmission. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 80S–84S.
- Flanigan, D. and Rodgers, M. (2003) A method to detect viable *Helicobacter pylori* bacteria in groundwater. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* **31**, 45–48.
- Graham, D.Y. and Malaty, H.M. (2002) Commentary: what remains to be done regarding transmission of *Helicobacter pylori*. *International Journal of Epidemiology* **31**, 646–647.
- Hegarty, J.P., Dowd, M.T. and Baker, K.H. (1999) Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 697–701.
- Horiuchi, T., Ohkusa, T., Watanabe, M., Kobayashi, D., Miwa, H. and Eishi, Y. (2001) *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiology and Immunology* **45**, 515–519.
- Hulten, K., Han, S.W., Enroth, H., Klein, P.D., Opekun, A.R., Gilman, R.H., Engstrand, L., Graham, D.Y. *et al.* (1996) *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* **110**, 1031–1035.
- Hulten, K., Enroth, H., Nystrom, T. and Engstrand, L. (1998) Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 282–286.
- Kelly, S.M., Pitcher, M.C.L., Farmery, S.M. and Gibson, G.R. (1994) Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* **107**, 1671–1674.
- Klein, P.D., Graham, D.Y., Gaillour, A., Opekun, A.R. and Smith, E.O. (1991) Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *The Lancet* **337**, 1503–1506.
- Lage, A.P., Godfroid, E., Fauconnier, A., Burette, A., Butzler, J.P., Bollen, A. and Glupczynski, Y. (1995) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2752–2756.
- Leung, W.K., Siu, K.L.K., Kwok, C.K.L., Chan, S.Y., Sung, R. and Sung, J.J.Y. (1999) Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *The American Journal of Gastroenterology* **94**, 2881–2884.
- Lu, Y., Redlinger, T.E., Avitia, R., Galindo, A. and Goodman, K. (2002) Isolation and Genotyping of *Helicobacter pylori* from Untreated Municipal Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1436–1439.
- Mapstone, N.P., Lewis, F.A., Tompkins, D.S., Lynch, D.A.F., Axon, A.T.R., Dixon, M.F. and Quirke, P. (1993) PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *The Lancet* **341**, 447.
- Margalef, R. (1977) *Ecología*. pp. 50–51. Barcelona: Omega.
- Martin de Argila, C., Boixeda, D., Canton, R., Mir, N., de Rafael, L., Gisbert, J., Arocena, C. and Garcia, A. (1996) *Helicobacter pylori* infection in a healthy population in Spain. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **8**, 1165–1168.
- Mazari-Hiriart, M., Lopez-Vidal, Y. and Calva, J.J. (2001a) *Helicobacter pylori* in water systems for human use in Mexico City. *Water Science Technology* **43**, 93–98.
- Mazari-Hiriart, M., Lopez-Vidal, Y., Castillo-Rojas, G., Ponce de Leon, S. and Cravioto, A. (2001b) *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria freshwater environments in Mexico City. *Archives of Medical Research* **32**, 458–467.
- Moreno, Y., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Jiménez, A. and Hernández, J. (2003) Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Research* **37**, 2251–2256.
- Navarro, M., Calvet, X., Font, B., Sanfeliu, I. and Segura, F. (1999) Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the Vallès Occidental, Catalonia. *Clinical Microbiology and Infections* **5**, 704–706.
- Nilsson, H.O., Aleljung, P., Nilsson, I., Tyszkiewicz, T. and Wadstrom, T. (1996) Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in human stools. *Journal of Microbiological Methods* **27**, 73–79.
- Notarnicola, M., Russo, F., Cavallini, A., Bianco, M., Jirillo, E., Pece, S., Leoci, C., di Matteo, G. *et al.* (1996) PCR identification of *Helicobacter pylori* DNA in faeces from patients with gastroduodenal pathology. *Medical Science Research* **24**, 785–787.
- Nurgalieva, Z.Z., Malaty, H.M., Graham, D.Y., Almuchambetova, R., Machmudova, A., Kapsultanova, D., Osato, M.S., Hollinger, F.B. *et al.* (2002) *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **67**, 201–206.
- Park, S.R., Mackay, W.G. and Reid, D.C. (2001) *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Research* **35**, 1624–1626.
- Parsonnet, J., Shmueli, H. and Haggerty, T. (1999) Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA* **282**, 2240–2245.
- Roth, D.E., Taylor, D.N., Gilman, R.H., Meza, R., Katz, U., Bautista, C., Cabrera, L., Velapattino, B. *et al.* (2001) Post-treatment follow-up of *Helicobacter pylori* infection using a stool antigen immunoassay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **8**, 718–723.
- Sasaki, K., Tajiri, Y., Sata, M., Fujii, Y., Matsubara, F., Zhao, M., Shimizu, S., Toyonaga, A. *et al.* (1999) *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **31**, 275–279.
- Thomas, J.E., Gibson, G.R., Darboe, M.K., Dale, A. and Weaver, L.T. (1992) Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *The Lancet* **340**, 1194–1195.
- Wisniewska, M., Nilsson, H.-O., Bak-Romaniszyn, L., Bak-Romaniszyn, L., Rechcinski, T., Bielanski, W., Planeta-Malecka, I., Plonka, M. *et al.* (2002) Detection of specific *Helicobacter pylori* DNA and antigens in stool samples in dyspeptic patients and healthy subjects. *Microbiology and Immunology* **46**, 657–665.

Analysis of the Survival of *H. pylori* Within a Laboratory-based Aquatic Model System Using Molecular and Classical Techniques

Núria Queralt and Rosa Araujo

Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received: 23 February 2007 / Accepted: 25 February 2007 / Online publication: 1 April 2007

Abstract

Despite the significance of *Helicobacter pylori* infection for man, its transmission is not clearly known. The human stomach is considered the reservoir of this pathogen, and one of the accepted routes is fecal–oral, in which water acts as a vector. However, although *H. pylori* epidemiology associates its transmission with water, only molecular and not cultural analysis detects the bacteria in water. This study was carried out to understand these data through studying the survival of *H. pylori* in a laboratory water model using cultural, morphological, and molecular methods. A mineral water system spiked with *H. pylori* and stored at $7 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark was analyzed by different methods over a period of 3 weeks. The total number of cells observed by DAPI staining and their DNA content remained constant over this study period. In contrast, cells could no longer be cultured after 5 days. Cell viability, which was determined via the LIVE/DEAD BacLight kit, decreased up to day 14, and at day 21 all cell membranes were damaged. In addition, a gradual conversion from spiral to coccal morphology occurred from day 3 onward. However, polymerase chain reaction (PCR) technique detected *H. pylori* DNA at day 21 and 3 months later. A study of the cell morphology of a young colony demonstrated the coexistence of bacilli and cocci. The results of this study show that *H. pylori* survives in water but loses its culturability and bacillar morphology rapidly, although it remains viable for longer periods and its DNA is still detectable much later. Thus, interpreting *H. pylori*'s behavior in water differs according to the type of analysis. Consequently, we suggest that the presence of *H. pylori* infective cells is overestimated by PCR, whereas, in contrast, culture techniques underestimate it. Nevertheless, *H. pylori* should be considered a waterborne

pathogen during its viable period, independently of its shape and culturability, as its presence in water may be risky for human health.

Introduction

The presence of *Helicobacter pylori* in the stomach of humans is recognized as one of the more extended infections in the world. It causes chronic gastritis type B, which can frequently lead to peptic ulcer or, less frequently, to gastric cancer [1, 2]. Despite the significance of *H. pylori* infection, its mode of transmission remains unclear. There are considered two principal routes: the oral–oral and the fecal–oral. In both cases, water should act as a vector if cells of *H. pylori* get in through fecal, saliva, or vomit inputs.

However, the importance of water as a transmission vector of *H. pylori* is difficult to evaluate. Epidemiological data show that *H. pylori* can be considered a waterborne pathogen [13], but only once it has been isolated from water [15], and this is an argument against its aquatic transmission. It is mainly isolated from gastric biopsies by using different growth media. However, it can be differentiated from other waterborne pathogens, such as *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, or *Escherichia coli*, which are easily isolated from aquatic systems when the appropriate medium is used. Currently, the presence of this bacterium in water is studied by applying molecular techniques, in particular polymerase chain reaction (PCR), which show the presence of its DNA within the environment [4, 5].

To understand the behavior of *H. pylori* in aquatic systems, several studies have been undertaken using laboratory models. Their results show not only that the bacterium rapidly loses its culturability during water storage [25, 28], but also that cells undergo morphological transformation from the bacillary to the coccal form.

Correspondence to: Rosa Araujo; E-mail: raraujo@ub.edu

Such changes can be caused by several factors, including nutrient deprivation [28], aging [10], and pH adjustment [6, 11, 27]. Indeed, *H. pylori* morphology has been linked to the physiological state of the cell; spiral bacilli have been associated with a viable-culturable state and cocci with a viable but nonculturable (VBNC) state.

The role of coccoid forms in an aquatic environment remains controversial. Although some authors contend that the coccoid shape is a degenerative form [3, 14], others suggest that cocci are VBNC forms [4, 12] that play a role in the environmental survival of this pathogen [25]. This hypothesis is supported by some studies, which, in applying other parameters such as metabolic activity, indicate that even VBNC cocci are active cells and possibly infectious [4].

However, none of the published studies, whether involving a laboratory model or the natural environment, has applied environmental genetic analysis. Thus, it remains difficult to compare current environmental data with the published models. The focus of our work was to determine the fate of *H. pylori* in a laboratory water model using different analytical methods simultaneously to understand the apparent contradiction between molecular and culture data obtained from environmental studies.

Methods

Bacterial Strains and Culture Conditions. *Helicobacter pylori* TIGR26695 and *H. pylori* SS1 (kindly provided by Dr. Julià Gómez and Dra. Alarcón) and *E. coli* ATCC10536 strains were used throughout this study.

Helicobacter pylori strains were stored at -80°C in 40% (*w/v*) skimmed milk (Scharlau, Spain) and *E. coli* in MSB (Modified Scholtens' Broth) with 20% (*v/v*) glycerol. *H. pylori* was cultured on Columbia agar (Scharlau, Spain) plates supplemented with 5% (*v/v*) defibrinated horse blood (Oxoid, England) at 37°C for 4–5 days under microaerobic conditions with a gas-generating envelope (Gas Generating kit, Campylobacter system; Oxoid) in a jar. The *E. coli* strain was cultured on MSA (Modified Scholtens' Agar) and incubated under aerobic conditions at 37°C for 24 h.

Spiked Water. Bottled mineral water (Font Vella, Spain) (135 mg/mL bicarbonates, 11.6 mg/mL sulphates, 6.9 mg/mL chloride, 33.5 mg/mL calcium, 6.6 mg/mL magnesium, 12.2 mg/mL sodium) was spiked with *H. pylori* and *E. coli*. The carbon content was 0.4 ppm and was analyzed with Toc-Toc 5000 (Shimadzu Corp., Japan).

Helicobacter pylori were harvested from two agar plates after 4 days of culture and then suspended in 8 mL of sterile mineral water. The suspensions were centrifuged at $121\times g$ for 5 min to remove agar or blood cellular debris. *E. coli* were removed from one agar plate

after 1 day of culture and added to a tube containing 8 mL of sterile mineral water.

Four milliliters of each suspension were used to seed 46 mL of commercial mineral water (Font Vella, Spain) contained in a 50-mL glass bottle. Each assay (one bottle spiked with a single strain) was performed in duplicate. All bottles were stored at $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in darkness for up to 21 days.

Culturability of Cells. The number of culturable bacteria in the spiked water was determined by plating 100 μL of the appropriate tenfold dilution in duplicate on Columbia agar plates containing 5% defibrinated horse blood for *H. pylori* and on MSA agar plates for *E. coli*. Plates were incubated under microaerobic and aerobic conditions for *H. pylori* and *E. coli*, respectively. The results are expressed as CFU per milliliter.

Decreased culturability was analyzed by comparing the number of culturable cells at a given time with the total number of cells. The results are expressed as $\text{Log}(V_n/V_t)$, V_n being the total cell number at each time point and V_t the total cell number at day 0.

Total Cell Counts. Epifluorescence microscopy was used to perform total cell counts. First, 1 mL of spiked water was diluted in distilled water. Serial dilutions of 10 mL were stained with 100 μL of 5 $\mu\text{g/mL}$ 4'-6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma-Aldrich), for 20 min at 4°C . The stained samples were then filtered through black-stained Isopore membrane filters (0.2- μm pore size, 25-mm diameter; Millipore). The filters were mounted on microscope slides with nonfluorescent oil (Nikon) and observed immediately at $\times 1000$ by epifluorescence microscopy (Olympus BX40). *H. pylori* cells were counted in 25 randomly chosen fields [21].

Bacterial Viability. Nucleic-acid-specific dyes for enumerating bacteria in aquatic systems have been developed [5]. The LIVE/DEAD BacLight kit (Molecular Probes, The Netherlands) stain mixture distinguishes the bacterial cells' viability on the basis of membrane integrity. The kit consists of two nucleic acid stains: SYTO 9, which penetrates most membranes freely, and propidium iodide, which is highly charged and normally does not permeate cells, but which does penetrate damaged membranes. Simultaneous application of both dyes therefore results in green fluorescence of viable cells with an intact membrane, whereas dead cells, because of a compromised membrane, exhibit an intense red fluorescence.

To determine bacterial viability, 10 mL of spiked bottled water was centrifuged at $7740\times g$ for 15 min. The pellet was resuspended in 2-mL filter-sterilized dH_2O . Bacteria were subsequently incubated with fluorescent stain (SYTO-9 and propidium iodide) from the LIVE/

DEAD BacLight kit (Molecular Probes, The Netherlands) for 15 min in the dark. The cells were observed under a fluorescence microscope (Olympus Fluoroview FV300).

Scanning Electron Microscopy. Samples of spiked water (2 mL) were fixed in a solution containing 1% (*w/v*) glutaraldehyde for 2 h at 4°C. They were then centrifuged at 7740×*g* for 10 min and the pellets were washed once in a phosphate buffer. The preparations were postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer and dehydrated in acetone and a graded ethanol series. Subsequently, the samples were critical point-dried in amyl acetate. The preparations were then mounted on metal stubs and coated with gold for SEM.

Colony samples were cut and removed from the agar plaque. The little piece of agar containing the colony was placed inside a small container. These sample containers were subjected to acrolein vapors inside a box for 6–8 days; after this, osmium vapors were applied for an additional 6 days. All processes were carried out at room temperature.

The samples were then taken out of the container and fractured with a scalpel. The preparations were mounted on metal stubs with colloidal silver and then coated with gold for SEM.

All samples (bacterial suspension samples and colonies) were observed under a scanning electron microscope (Stereoscan 360, Leica) at different magnifications and photographed. In 12 sessions 250 photographs were taken.

Estimation of Genomic DNA and Protein Levels. Genomic DNA from 1 mL of spiked suspensions was extracted by boiling it for 10 min, placing it on ice for 5 min, and then pelleting it by centrifugation at 10,000×*g* for 5 min. The supernatant containing the DNA was collected and stored at 4°C.

The relative amounts of nucleic acid and protein extracted from *H. pylori* and *E. coli* cells were measured by spectrophotometrical determination (Shimadzu UV-265FW) of the optical density at 260 and 280 nm, respectively. The purity of the DNA extract was estimated based on the A260/A280 ratio. One OD260 unit was considered equal to 50 µg of double-stranded DNA [24].

Polymerase Chain Reaction (PCR). Genomic DNA was extracted from each tenfold serial dilution of spiked mineral water as described above.

The 50-µl reaction mixture contained 1× PCR Buffer II (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, deoxynucleotide triphosphates (250 µM each), *H. pylori* primers (0.5 µM each), 2 U of AmpliTaq polymerase (Applied Biosystems, Roche), and 10 µl of purified target DNA. PCR was performed using an

automated thermal cycler (Gene Amp PCR System 2400; PerkinElmer) with an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 45°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. An additional extension step at 72°C for 5 min completed the PCR, and the amplicons were stored at 4°C. An external primer pair (HPU1 and HPU2, described by Clayton in 1992) was used to amplify a 411-bp sequence of the urease A (*ureA*) gene for the first 35 cycles [9]. The oligonucleotides subsequently used for semi-nested PCR amplification were HPU11 (5'ATTGACATTGGCGGTAAC3') and HPU2, which together amplified a 155-bp fragment of the *ureA* gene. One microliter of the first amplification product was added to a new 50-µl batch of PCR mixture containing these primers in a fresh 30-cycle amplification. *H. pylori* 26695 DNA was used as a positive control, whereas sterile double-distilled water was used as a negative control. The PCR products were analyzed by electrophoresing a 10-µl aliquot through a 2% agarose gel stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide. Several precautions were used to minimize the risk of PCR cross-contamination. Positive (*H. pylori* genome DNA) and negative (double-distilled water) controls were included in each amplification to exclude cross-over contamination. DNA extraction, PCR-mixture preparation, template addition, amplification, and gel electrophoresis were performed in different rooms.

Results

The survival of *H. pylori* in water was studied by analyzing cells stored in water over 21 days. Simultaneously, the same experiments were done with *E. coli*.

Cells Counts and Deoxyribonucleic acid (DNA) Content. Total cell numbers were established directly with DAPI staining and indirectly by spectrophotometric quantification of total DNA content (Fig. 1). The total

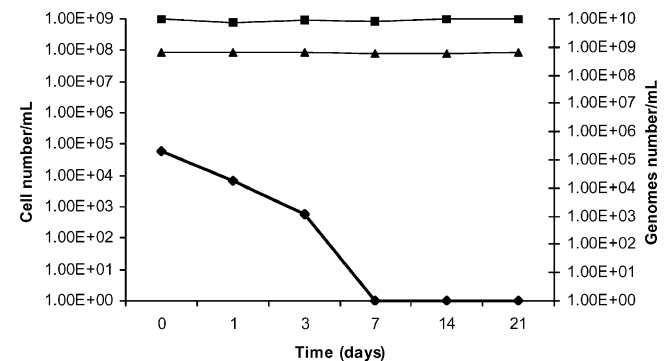


Figure 1. Quantification of *H. pylori* 26695 cells (cells/mL) stored in water at 7±1°C by DAPI staining (▲), nucleic acid content by spectrophotometry (genomes/mL) (■), and viable cells by culture (CFU/mL) (◆).

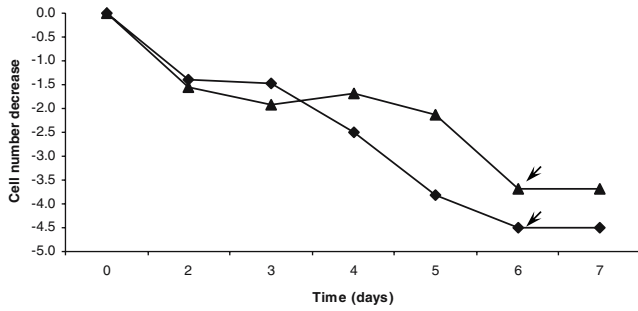


Figure 2. Decreased culturability (Log (Vn/Vt)) of *H. pylori* 26695 (◆) and SS1 (▲) cells stored in mineral water at $7 \pm 1^\circ\text{C}$ for 7 days. The arrows indicate the day that no bacterial cells were recovered by culture.

number of *H. pylori* 26695 cells remained constant (around 10^8 cells/mL) over the course of the 3-week study period. Values for *E. coli*, used as a reference strain, also remained constant. No differences were observed between the behavior of *H. pylori* and *E. coli* in total cells. Similarly, the DNA content remained constant throughout the experiment. The presence of *H. pylori* cells was also detected in water by PCR. Throughout the 21-day study period, a fragment of the *ureA* gene specific for this species could be amplified, as was also the case after 3 months. In contrast, culturability varied as a function of time.

Culturability and Cell Viability. Culturability was evaluated at 0, 1, 3, 7, 14, and 21 days (Fig. 1). *H. pylori*

cells were not recovered after 7 days, although in contrast, the culturability of *E. coli* only began to decrease slowly at day 3 and it was still possible to culture it at day 21. The experiment was repeated to determine the exact day when cells lost their culturability. Thus, analyses were done daily at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days (Fig. 2), with the cells of both *H. pylori* strains losing their culturability after 5 days (Fig. 2).

Cell viability was determined using the LIVE/DEAD BacLight kit. Up to day 3, all *H. pylori* cells exhibited a green staining, indicating the presence of an intact bacterial membrane. Between days 3 and 14, staining with SYTO-9 and IP revealed the coexistence of healthy bacterial cells (green) alongside cells with altered membranes (red). After day 14, the proportion of bacteria with altered membranes increased and a new population of red cells with damaged membranes appeared. After day 21, no cells with intact membranes were observed, the majority appearing red and some yellow.

Ultramicroscopic Morphology. Cell morphology as observed by scanning electron microscopy is shown in Fig. 3. At days 0 and 1, most of the cells were spiral bacilli, although the sporadic presence of cocci was also observed (Fig. 3A). Clusters were also seen, consistent with the presence of long, polar flagella, which favor the cluster formations. Over time, the increased occurrence of coccoid morphology was apparent. At day 3, although the bacillar form was still predominant, the cells appeared

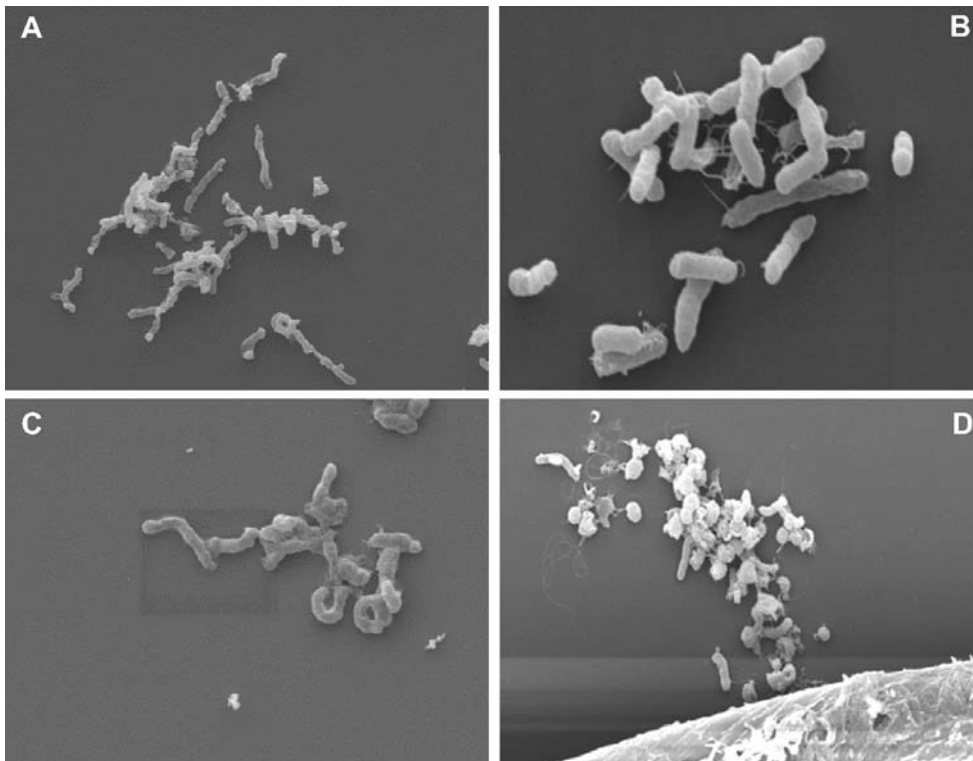


Figure 3. Scanning electron micrographs of *H. pylori* in mineral water after different periods of starvation. (A) *H. pylori* at day 0; spiral form; original magnification $\times 12,000$. (B) Day 3; spiral forms still with polar flagella; original magnification $\times 20,200$. (C) Day 7; U shape; original magnification $\times 16,000$. (D) Day 14; coccoid forms, some with a bacillar shape forming clusters; original magnification, $\times 10,000$.

shorter and more rounded than at day 0 (Fig. 3B). After 1 week of starvation, it was possible to see U shapes and even shorter bacilli with an increased number of coccal forms. At days 14 and 21, most cells were cocci, many displaying an irregular surface (Fig. 3C). Nevertheless, it was still possible to detect flagella among cocci, as well as cluster formations (Fig. 3D).

Microscopic analysis of a vertical break in an *H. pylori* colony revealed that morphological changes had occurred therein, from the spiral bacillar form located at the top of the colony to a coccal cell shape in the lower area, nearest the agar (Fig. 4).

Discussion

Helicobacter pylori has been detected by molecular analysis techniques in a range of aquatic systems: well water [13], river water [18], and sewage water [20]. However, it has only once been isolated by culture techniques, although several media and methodologies have been attempted.

To examine this apparent contradiction, we analyzed the survival of *H. pylori* cells in mineral water at 7°C using both classical and molecular methods. Our study showed that total DNA levels were maintained throughout the 3 weeks of the experimental period. Likewise,

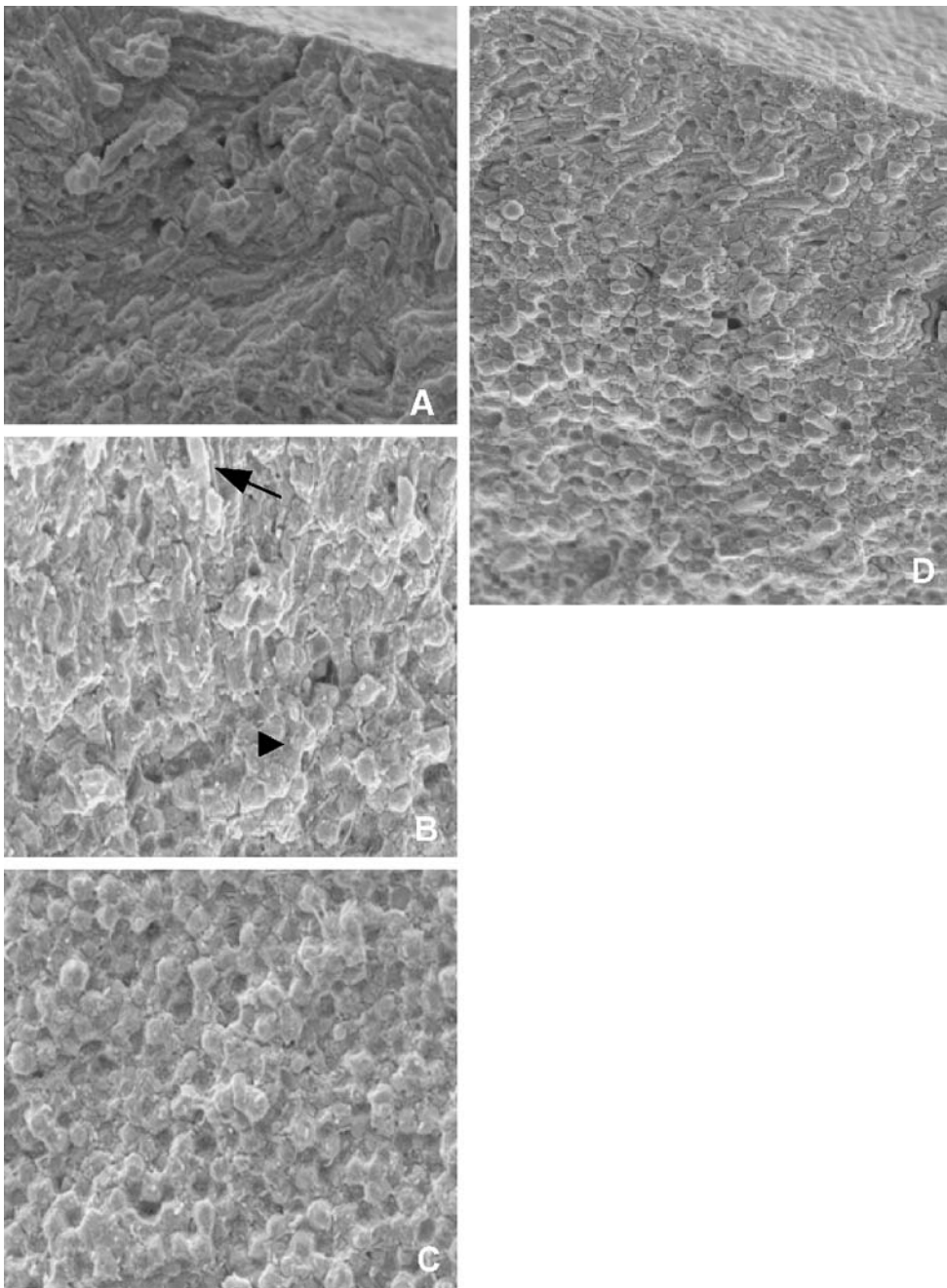


Figure 4. Ultrastructure of a vertical break of *H. pylori* colony growth onto Columbia blood agar. (A) Spiral forms in the apical part of the colony surface; original magnification $\times 15,000$. (B) Mixture of bacillar (\rightarrow) and coccal forms (\blacktriangleright) in the middle of the colony; original magnification $\times 16,000$. (C) Coccoids in the basal part of the colony; original magnification $\times 16,000$. (D) General view of transverse break of *H. pylori* colony observed by scanning electron microscopy (SEM); original magnification $\times 12,000$.

PCR analysis revealed the presence of the *ureA* gene throughout all the 21 days, as well as after 3 months of storage. In contrast, *H. pylori* cells could be cultured for no longer than 5 days, which is double the time period reported by Adams, who performed the analysis in natural conditions. However, this difference is not surprising because in the present study cells were stored under more stable conditions, i.e., within bottled mineral water, at 7°C and in the dark.

We attempted to clarify the disparity between the results obtained with culture and PCR by applying other techniques. BacLight staining showed a gradual decrease in cellular activity until day 14, indicating that the bacteria were viable although they had lost their growth capacity. Adams [1] reported similar results when *pylori* cells were incubated either in liquid culture or in a natural freshwater stream. DAPI staining and scanning electron microscopy showed that while cell numbers did not diminish, their morphology changed from spiral to cocal during the experiment. Our data on the relationship between *H. pylori* morphological conversion and culturability, in which the presence of fewer spiral bacilli was associated with lower cell recovery, are consistent with other laboratory studies [13, 19, 23]. However, in contrast to the conclusions presented by Adams *et al.* about the behavior of *H. pylori* under natural conditions, the cells in our study showed morphological conversion even after entering the VBNC state. Moreover, most of the cocal forms maintained their viability and integrity during the first 14 days, as reported by other authors [1, 16].

The analysis of cell morphology carried out within a young colony of *H. pylori* showed that cocci and spiral bacilli coexist within a vertical distribution. The existence of cocal morphologies on the agar surface, at the point where most nutrients are found, supports the fact that cocci are not degenerative forms of the bacteria. Moreover, recent studies of *H. pylori* survival in potable water biofilms using peptide nucleic acid molecular probes detected spiral and cocal cell morphologies in the biofilm [2]. The presence of cocci within young colonies and biofilms upholds the theory that this morphology could represent a surviving form of *H. pylori* rather than a degenerative one. It also concurs with other authors (such as Cellini and collaborators [1994]) who demonstrated not only that VBNC of coccoid shape can colonize a mouse stomach, but also that cocal forms can maintain an oxidative metabolism for several months at the same level as that of the spiral form [7, 17, 26].

Based on our data and those previously published, we contend that the inability to isolate *Helicobacter* from aquatic environments, despite its detection via molecular techniques, may be explained by two groups of factors. The first group includes parameters such as: the quantity of the bacterium inputs, the dilution of these inputs, the

effect of the sun and temperature fluctuations, which can significantly reduce the numbers of alloctonous bacteria numbers in water [8, 22]. A second, but no less important, group of factors induces the physiological transformation of this bacterium into a VBNC state in liquid matrices. The low numbers of bacteria and their rapid transformation to an unculturable state favor the use of molecular techniques over culture methods for detecting the presence of this pathogen in aquatic systems.

Thus, only when waters are polluted by recent inputs of fecal or nonfecal (e.g., saliva, vomits) material containing *H. pylori* should growth media be used to isolate this bacterium. This is consistent with the fact that the only instances in which *H. pylori* was successfully recovered from water, the sample was obtained from raw municipal wastewater in which fecal inputs were abundant and possibly recent [15].

In conclusion, *H. pylori* should be considered as a waterborne pathogen throughout its viable period, independent of its shape and culturability. It is possible that the presence of *H. pylori* infective cells is overestimated when molecular techniques such as PCR are applied. In contrast, however, culture techniques underestimate their presence. Nevertheless, the presence of *H. pylori* in water may be controlled because it poses a serious risk to human health.

Acknowledgments

This study was supported by grant 2001SGR00099 from the Generalitat de Catalunya and CeRba (Centre de referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya). Núria Queralt is the recipient of a fellowship from the Universitat de Barcelona.

References

1. Adams, BL, Bates, TC, Oliver, JD (2003) Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Appl Environ Microbiol* 69: 7462–7466
2. Azevedo, NF, Vieira, MJ, Keevil, CW (2003) Establishment of a continuous model to study *Helicobacter pylori* survival in potable water biofilms. *Water Sci Technol* 47: 155–160
3. Benaissa, M, Babin, P, Quellard, N, Pezennec, L, Cenatiempo, Y, Fauchere, JL (1996) Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect Immun* 64: 2331–2335
4. Bode, G, Mauch, F, Malferttheiner, P (1993) The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect* 111: 483–490
5. Boullos, L, Prevost, M, Barbeau, B, Coallier, J, Desjardins, R (1999) LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37: 77–86
6. Catrenich, CE, Makin, KM (1991) Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. *Scand J Gastroenterol* 26: 58–64

7. Cellini, L, Allocati, N, Di-Campoli, E, Danielli, B (1994) *Helicobacter pylori*: a fickle germ. *Microbiol Immunol* 38: 25–30
8. Chamberlain, CE, Mitchell, R (1978) A decay model for enteric bacteria in natural waters. In: Mitchell, R (Ed.) *Water Pollution Microbiology*, Wiley, New York, pp 325–368
9. Clayton, CL, Kleanthous, H, Coates, PJ, Morgan, DD, Tabaqchali, S (1992) Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 192–200
10. Enroth, H, Wreiber, K, Rigo, R, Risberg, D, Uribe, A, Engstrand, L (1999) *In vitro* aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter* 4: 7–16
11. Gribbon, LT, Barer, MR (1995) Oxidative metabolism in non-culturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* cells studied by substrate-enhanced tetrazolium reduction and digital image processing. *Appl Environ Microbiol* 61: 3379–3384
12. Hulten, K, Enroth, H, Nystrom, T, Engstrand, L (1998) Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *J Appl Microbiol* 85: 282–286
13. Hulten, K, Han, SW, Enroth, H, Klein, PD, Opekun, AR, Gilman, RH, Engstrand, L, Graham, DY, El-Zaatari, FAK (1996) *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterol* 110: 1031–1035
14. Kusters, JG, Gerrits, MM, Vans Strijp, JAG, Vandenbroucke-Grauls, CMJE (1997) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun* 65: 3072–3679
15. Lu, Y, Redlinger, TE, Avitia, R, Galindo, A, Goodman, K (2002) Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl Environ Microbiol* 68: 1436–1439
16. Mai UEH, Shahamat M, Colwell RR (1990) Survival of *Helicobacter pylori* in the aquatic environment. In: Menge H, Gregor M, Tytgat GNJ, Marshall BJ (Eds.) *Helicobacter Pylori*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 91–96
17. Marshall, BJ, Warren, JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311–1314
18. Moreno, Y, Ferrús, MA, Alonso, JL, Jiménez, A, Hernández, J (2003) Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Res* 37: 2251–2256
19. Parsonnet, J, Friedman, GD, Vandersteen, DP, Chang, Y, Vogelmann, JH, Orentreich, N, Sibley, RK (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325: 1127–1131
20. Queralt, N, Bartolomé, R, Araujo, R (2005) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J Appl Microbiol* 98: 889–895
21. Raymond, L, Kepner, JR, Pratt, JR (1994) Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev* 58: 603–615
22. Rollins, DM, Colwell, RR (1986) Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* 52: 531–538
23. Sato, F, Saito, N, Shouji, E, Rani, A, Takeda, H, Sugiyama, T, Asaka, M (1999) The maintenance of viability and spiral morphology of *Helicobacter pylori* in mineral water. *J Med Microbiol* 48: 971
24. Sambrook, J, Russell, DW (2003) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
25. Sambrook, J, Russell, DW (2003) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
25. Shahamat, M, Paszko-Kolva, C, Yamamoto, H, Colwell, R (1989) Ecological studies of *Campylobacter pylori*. *Klin Wochenschr* 67(Suppl. XVII): 62–63
26. Wang, X, Sturegard, E, Rupa, R, Nilsson, H-O, Aleljung, PA, Carlen, B, Willen, R, Wadstrom, T (1997) Infection of BALB/c mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 46: 657–663
27. West, AP, Millar, MR, Tompkins DS (1992) Effect of physical environment on survival of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 45: 228–231
28. West, AP, Millar, MR, Tompkins, DS (1990) Survival of *Helicobacter pylori* in water and saline. *J Clin Pathol* 43: 609