

LA INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI* Y SU RELEVANCIA PARA LA SALUD PÚBLICA GLOBAL

INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento por Warren y Marshall en 1983, *H. pylori* no ha dejado de sorprender a la ciencia. Su irrupción en el panorama científico rompió uno de los dogmas de la gastroenterología del siglo XX, la presunta esterilidad del estómago debida al bajo pH. Desde entonces se ha convertido en uno de los microorganismos más estudiados por microbiólogos, médicos clínicos, epidemiólogos, biólogos fundamentales y ecólogos.

Sin embargo, cuanto más profundizamos en su conocimiento, con más enigmas tropezamos y más preguntas nuevas surgen. Voy a tratar de presentar de modo somero algunas de ellas. Me he centrado en aquellas cuestiones que se refieren a su relevancia para la Salud Pública:

1. Lo primero que nos llama la atención es que los datos obtenidos a partir de estudios genéticos ofrecen evidencias ciertas de que *H. pylori* es uno de los más antiguos y comunes miembros de nuestra microbiota digestiva: El ser humano fue colonizado hace más de 60.000 años, antes de que el *Homo sapiens* comenzara la gran migración que le llevó “fuera de África”.

A pesar de esta larguísima asociación, los datos epidemiológicos, histológicos, clínicos y experimentales demuestran que *H. pylori* es un microorganismo productor de patologías severas, con una gran influencia en la Salud Pública Global:

La infección por *H. pylori* afecta al 60% de la población mundial, alcanzando el 80% en países poco desarrollados. Transformando estos datos a números, estamos hablando de unos 3.000 millones de habitantes del planeta infectados por la bacteria. La incidencia anual en países desarrollados se estima en el 0.5% de la población y aunque desde hace unos años se observa una disminución importante de la infección en estos países, este descenso se ha ido ralentizando.

Existen evidencias de que la infección se adquiere durante la infancia y, a no ser que se instaure tratamiento erradicador con antibióticos, permanecerá de por vida sin que se produzcan remisiones espontáneas ya que el microorganismo, en su larga co-evolución con el ser humano, ha desarrollado un gran número de estrategias de evasión de nuestro sistema inmune. Por el momento, no existen vacunas eficaces disponibles.

Todas las personas infectadas por *H. pylori* presentan en su mucosa gástrica cambios histológicos indicadores de gastritis crónica superficial antral o tipo B. En la mayoría de los casos, sin embargo, los pacientes se mantendrán asintomáticos durante toda su vida. Sólo en un 15-20% de los infectados, y tras varios años de colonización, la infección por *H. pylori*

originará dispepsia, úlceras pépticas (15%), gastritis atrófica, cánceres duodenales y gástricos (1-3% de los casos), y linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas (linfoma tipo MALT, Mucose Associated Lymphoid Tissue, 0,1% de los pacientes infectados).

H. pylori es uno de los patógenos que más impacto tienen sobre la Salud Pública mundial, y se ha estimado que cada año produce alrededor de un millón de muertes por úlcera, cáncer y otras patologías digestivas. El coste económico de la infección, tanto directo (por el diagnóstico, tratamiento, hospitalización) como indirecto (pérdidas de días trabajados, de años de vida, de calidad de vida, etc.) es altísimo. En Estados Unidos la úlcera péptica ocasiona un millón de hospitalizaciones y 6.500 muertes al año, con un coste estimado de unos 6.000 millones de dólares anuales exclusivamente por esta patología.

En este sentido, me gustaría destacar también que la infección por *H. pylori* es el principal agente causal de cáncer gástrico, quinta causa de cáncer y tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, con más de 700.000 muertes al año. En España, según los últimos datos disponibles, para 2012 se ha calculado una mortalidad bruta de más de 100.000 personas, y una incidencia de 140.000 nuevos casos de cáncer de estómago.

H. pylori es en la actualidad la única bacteria con acción carcinógena demostrada. En 1994 fue clasificado como carcinógeno humano Tipo I por la Organización Mundial de la Salud y el pasado mes de septiembre, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) de la O. M. S. presentó un estudio en el que se señalaba como una prioridad mundial establecer estrategias de prevención del cáncer gástrico mediante la erradicación de *H. pylori*.

También ha aparecido recientemente una nueva hipótesis sobre la relación entre infección en la niñez y el riesgo del cáncer gástrico en adultos, lo que ha llevado a propugnar la necesidad de programas preventivos para reducir la infección en niños y adolescentes.

A pesar de ello, la misma IARC señala que en estos momentos ningún país ha implementado ningún tipo de estrategia de prevención, debido en gran parte al desconocimiento existente sobre su epidemiología, cuestión que comentaré con más detalle posteriormente.

FACTORES DE VIRULENCIA

La infección por *H.pylori* induce una potente respuesta inflamatoria por parte de la mucosa gástrica que, aunque no es suficiente para eliminar el microorganismo, produce una serie de alteraciones celulares secuenciales conocidas como la “cascada de Correa”: gastritis, atrofia, metaplasia intestinal y, eventualmente, displasia y malignización.

Las lesiones histopatológicas que se observan en todas las personas infectadas son el fruto de la interacción, sinergia y, en ocasiones, acción antagónica, de una gran cantidad de factores de virulencia y patogenicidad. Es muy interesante que ninguno de todos ellos, por

separado, puede explicar el amplio espectro de enfermedades que produce y, a pesar del empeño puesto en ello, en la actualidad no disponemos de ningún factor de virulencia que pueda ser utilizado en la práctica clínica como marcador del progreso o el pronóstico de la enfermedad.

Algunos, como su movilidad en forma de sacacorchos debido a la presencia de flagelos, le permiten colonizar la mucosa gástrica y establecerse en ella.

La producción de ureasa es un factor clave en este proceso: Esta enzima hidroliza la urea produciendo amoníaco y posee acción mucolítica directa. De esta forma, favorece la desestructuración del moco, rompiendo la barrera mucosa gástrica y creando un microambiente alcalino que neutraliza el ácido y le permite sobrevivir en este ambiente tan hostil. Se sabe además que actúa como factor quimiotáctico para los leucocitos, favoreciendo los fenómenos inflamatorios.

Una vez colonizado el estómago, *H. pylori* se adhiere a la mucosa mediante la expresión de proteínas de membrana externa o adhesinas. Esta adhesión le va a permitir escapar de los mecanismos de defensa innata y adquirida del hospedador.

H. pylori produce otras enzimas que favorecen la virulencia de la bacteria, como catalasas, proteasas, oxidasas, dismutasas, que protegen a la bacteria de metabolitos tóxicos secundarios a procesos oxidativos, fosfolipasas o hemoaglutininas.

Otro factor de virulencia es el lipopolisacárido (LPS), cuyo antígeno "O" es muy similar a los antígenos de los grupos sanguíneos de Lewis, lo que parece que permite a la bacteria evadir la respuesta inmune durante la colonización del epitelio gástrico, favoreciendo su persistencia. A diferencia de otras bacterias gram negativas, los LPS de *H. pylori* tienen una actividad inmunogénica débil.

Citotoxina vacuolizante VacA. Todas las cepas de *H. pylori* tienen un gen que codifica para un toxina conocida como citotoxina vacuolizante VacA.

La toxina VacA se adhiere a la membrana celular del epitelio, induce la pérdida de las uniones epiteliales y ocasiona la formación de canales iónicos de membrana, que conducen a la vacuolización y necrosis celular. Dentro del citoplasma, su acción destructiva de la membrana de la mitocondria acarrea la apoptosis celular. También parece ayudar a la persistencia de *H. pylori* mediante supresión inmunológica específica, inhibiendo la proliferación y activación de los linfocitos T y B, y controlando así la respuesta inmune.

Citotoxina CagA. Uno de los principales factores de virulencia de *H. pylori* es la citotoxina CagA, codificada por el gen *cagA*. Este gen forma parte de un fragmento cromosómico conocido como Isla de Patogenicidad CagA (CagPAI) que se encuentra sólo en el 60 % de las cepas. La presencia en el genoma de *H. pylori* de esta isla (cepas CagA+) aumenta hasta 2,5 veces el riesgo de aparición de gastritis, enfermedad ulcerosa y neoplasias gástricas en los infectados.

La isla de patogenicidad CagPAI tiene varios genes que codifican los componentes de un sistema secretor del tipo IV (T4SS) que actúa “inyectando” la toxina en la célula epitelial. Ya dentro del citoplasma celular, la proteína CagA interactúa con múltiples proteínas de la célula, modificando un enorme y diverso grupo de rutas de señalización intracelular, lo que ocasiona disrupción de las uniones intercelulares, alteración de la polaridad celular e inducción de una potente respuesta pro-inflamatoria y mitogénica. Además, la presencia de la proteína CagA se asocia a una serie de cambios epigenéticos de las células gástricas que impiden la correcta reparación de las lesiones del DNA, favoreciendo el crecimiento celular descontrolado y la malignización.

ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *H. PYLORI*

Sería extremadamente largo hacer un repaso de todas las patologías gástricas que produce la bacteria. Me gustaría, sin embargo, comentar brevemente algunas de las enfermedades producidas por *H. pylori*, puesto que aún desconocemos muchos aspectos de su etiopatogenia, y de lo que vayamos conociendo en el futuro pueden derivarse nuevos enfoques para patologías ya conocidas:

***H. pylori* y cáncer gástrico.** La infección por *H. pylori* parece ser un mecanismo fundamental en el inicio del adenocarcinoma gástrico, aunque no tanto en su evolución: Se ha demostrado que la erradicación de la bacteria disminuye el riesgo de malignización de lesiones pre-cancerosas. Sin embargo, a partir de un determinado “punto de no retorno”, la progresión de la neoplasia será independiente de la presencia o no de la bacteria. De hecho, en la mayoría de los casos, la gastritis crónica atrófica previa a la aparición de cáncer suele llevar aparejada la desaparición del microorganismo de la mucosa.

En estos momentos se admite que la aparición del cáncer tras la infección por *H. pylori* viene mediada por mecanismos dependientes de fenómenos inflamatorios crónicos más que por la acción directa del microorganismo. Ha sido precisamente el estudio de la etiopatogenia del cáncer en la infección por *H. pylori* lo que ha llevado a los científicos empezar a ser conscientes de la relevancia de la inflamación crónica como desencadenante de neoplasias, y nos ha llevado a preguntarnos si otros agentes infecciosos podrían estar detrás de patologías crónicas (enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, enfermedades autoinmunes, etc.) que comparten con el cáncer el fenómeno subyacente de la inflamación.

Influencia de *H. pylori* en la aparición de enfermedades extragástricas. *H. pylori* se ha relacionado con un aumento en el riesgo de padecer múltiples enfermedades extragástricas, tales como Diabetes Mellitus, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, adenoma y adenocarcinoma de colon, enfermedades oculares como la retinopatía serosa central idiopática y enfermedades autoinmunes como tiroiditis, Síndrome de Sjogren o urticaria crónica. Incluso se ha postulado un aumento de riesgo de abortos espontáneos e

hiperemesis gravídica en pacientes infectadas por cepas CagA+. Muchos de estos estudios epidemiológicos son contradictorios, y en otras ocasiones la asociación estadística es demasiado débil para ser considerada probada.

Las relaciones más sólidamente fundamentadas se encuentran entre la infección por cepas CagA+ y el aumento de riesgo de parecer enfermedad coronaria, la producción de Trombocitopenia Primaria Idiopática (en la que la erradicación de *H. pylori* es un tratamiento de rutina, que consigue la mejoría clínica en el 60% de los casos y la remisión total durante periodos superiores a 7 años hasta en el 25%) de anemia ferropénica y de avitaminosis B12.

Todo lo que conocemos hasta el momento sobre los mecanismos de patogenicidad del microorganismo nos lleva a pensar que probablemente su intervención en estas enfermedades sea indirecta, mediante el desencadenamiento de fenómenos inflamatorios sistémicos. Sin embargo, aún estamos lejos de conocer exactamente con qué enfermedades se relaciona, por qué mecanismos interviene en su producción y qué nivel de riesgo aporta la infección.

2. Este repaso a los principales factores de virulencia de *H. pylori* nos lleva a la segunda de las cuestiones que más nos intrigan. Si la incidencia de la infección por *H. pylori* es tan alta, y el microorganismo posee un arsenal tan sofisticado de factores de virulencia, por qué no en todas las personas se produce la enfermedad?

Podemos atribuir este hecho a dos grupos de causas:

1. La mayoría de enfermedades relacionadas con *H. pylori*, dependen también de otros factores de riesgo, muchos de ellos no totalmente caracterizados

Especialmente en el caso del cáncer gástrico, como ya se ha comentado, sólo alrededor del 1% de las personas que portan *H. pylori* en su mucosa desarrollarán malignización. La predisposición genética del hospedador y estilos de vida poco saludables intervienen de forma directa en el mayor riesgo de aparición del cáncer y, así, hoy se conocen genotipos humanos que aumentan el riesgo. Determinados polimorfismos en el cluster de genes que codifican para la Interleukina IL-1 β y para el Factor α de Necrosis Tumoral (TNF- α) se consideran marcadores de riesgo para el cáncer gástrico en pacientes colonizados por *H. pylori*. Otros factores del hospedador importantes podrían ser aquellos que participasen en la distribución de los microorganismos dentro del estómago o el nivel de producción de ácido.

La probabilidad de padecer cáncer gástrico entre los pacientes infectados por *H. pylori* es más de 20 veces mayor que entre los no infectados. Además, tanto los estudios epidemiológicos como múltiples ensayos clínicos han demostrado que cuando se erradica la bacteria, el riesgo de desarrollar cáncer en pacientes con lesiones pre-malignas disminuye en un 30-40%. Sin embargo, existen otros factores como la obesidad, una dieta pobre en hierro o rica en nitrosaminas, elevadas ingestas de sal, consumo de alcohol o el tabaquismo

que favorecen su aparición. Todos estos factores, por otra parte, magnifican los efectos carcinógenos de la inflamación crónica producida por la bacteria, en una asociación sinérgica en la que resulta difícil establecer la influencia directa de cada uno de estos factores sobre el riesgo total de la enfermedad.

2. La bacteria presenta una enorme diversidad genética intra-especie

H. pylori es una bacteria que se caracteriza por su enorme diversidad genética. En la mayoría de los aproximadamente 1550 genes de su cromosoma, las secuencias de los nucleótidos muestran una variación del 3% al 5%. Esta variabilidad genética es una característica única en comparación con otras bacterias gram negativas.

H. pylori presenta una alta tasa de mutaciones puntuales y reestructuraciones genéticas. Por otra parte, la bacteria es altamente competente para captar y donar material genético de otros microorganismos vecinos, mediante recombinación.

Debido a esta capacidad para modificar su genoma en función de la presión ambiental, la selección natural ha propiciado la aparición de múltiples variantes genéticas dentro de esta especie, hasta el punto de que en un mismo individuo pueden coexistir diferentes cepas, estrechamente relacionadas, con virulencia diferente y con diferente sensibilidad a los antibióticos de uso habitual.

Por otra parte, muchos de sus genes presentan polimorfismos que se manifiestan en la diferente expresión de sus factores de virulencia:

Como ya se ha comentado, sólo un 60% de las cepas presentan los genes *cagA*. Esta incidencia es muy heterogénea a nivel mundial y se ha postulado como la mejor explicación a las llamadas “Paradojas Asiática y Africana”: La tasa de infección por *H. pylori* es muy alta en África, Asia del este, y Asia del Sur; sin embargo, la incidencia del cáncer gástrico es alta en Asia del este pero no en Asia del Sur o África. Se ha comprobado que en países como Japón o Corea más del 90% de las cepas son portadoras del gen, mientras que en el Sur de Asia o África sólo el 40-60% de las cepas son CagA+. Además, la isla de patogenicidad CagPAI presenta diferentes variantes estructurales en unas secuencias determinantes para la interacción con las células del hospedador. La incidencia de cada una de estas variantes a nivel mundial se correlaciona de forma precisa con la mayor o menor incidencia de cáncer en las diferentes regiones.

Por otra parte, el gen *vacA*, presente en todas las cepas de *H. pylori*, es muy heterogéneo entre poblaciones. Existen dos tipos de regiones “señal” en la región N-terminal, s1 y s2, y otros dos tipos de regiones “medias”, m1 y m2. La estructura de este gen en estas regiones es determinante: los genotipos *vacA* s1/m1 produce toxina vacuolizante, mientras que s2/m1 y s2/m2 produce poco o nada de toxina. En los pacientes infectados, el genotipo s1/m1 se asocia a un riesgo 3,5 veces mayor de desarrollar cáncer a partir de lesiones pre-malignas de la mucosa gástrica.

Actualmente se considera que la búsqueda de estos marcadores de virulencia es una de las mejores estrategias para el estudio epidemiológico del microorganismo. Sin embargo, no existen evidencias de que puedan ser útiles para caracterizar a un paciente concreto como de “alto riesgo” de enfermedad.

Esta misma variabilidad genética como respuesta a la presión ambiental explica la frecuencia con la que se presentan resistencias a la claritromicina (10-30%), metronidazol (15-40% de resistencias), o quinolonas, y que van en aumento en todos los países del mundo. La resistencia a los antibióticos fue descrita muy poco después de su descubrimiento por Warren y Marshall, y es indudable que al principio fue totalmente subestimada. En estos momentos es el primer motivo de fallo en el tratamiento erradicador de esta infección. El pasado mes de julio de 2014, la Food and Drug Administration de Estados Unidos (USFDA) incluyó a *H. pylori* en su lista de patógenos que suponen una amenaza grave para la Salud Pública, debido al drástico incremento en las resistencias a antibióticos que se observan a nivel global. Un estudio en España ha revelado, además, que la resistencia a la claritromicina es mayor en pacientes pediátricos que en adultos.

Aunque existen numerosas pautas terapéuticas, el tratamiento estándar de la infección consiste en una triple terapia con claritromicina y amoxicilina o metronidazol, asociados a un inhibidor de la bomba de protones (IBP). Ante los fallos de esta terapia se ha propuesto una “terapia secuencial”, consistente en un régimen de un IBP con amoxicilina durante 5 días, seguido de otros 5 días en los que el IBP se administra junto con metronidazol y claritromicina. Aun así, no siempre el tratamiento es efectivo y cada vez encontramos más cepas multirresistentes, hasta el punto de que algunos autores hablan ya de *H. pylori* como un auténtico “supermicrobio”.

3. Existe una tercera cuestión que cada vez interesa más a los epidemiólogos, clínicos y microbiólogos: La infección por *H. pylori* parece conferir protección frente a algunas patologías.

Diversos meta-análisis de la bibliografía publicada han mostrado una asociación entre las cepas de *H. pylori* CagA+ y un menor riesgo de aparición de algunas enfermedades:

- Estimula la producción de interferones activos frente a *M. tuberculosis*, protegiendo de la infección
- Disminuye el riesgo de atopia, asma y otras manifestaciones alérgicas
- Protege frente al cáncer esofágico

De hecho, estamos asistiendo en los últimos años a un incremento muy significativo de la incidencia del adenocarcinoma esofágico en adultos jóvenes en países desarrollados. Las curvas de erradicación de *H. pylori* y de aumento de la frecuencia de este cáncer (que ya supone el 50% de todos los cánceres esofágicos) se correlacionan estadísticamente sin lugar a dudas.

La hipótesis más aceptada sobre la causa de este incremento sería que la acción ureasa de *H. pylori* reduce el pH en la zona del cardias, disminuyendo la acción caustica y la inflamación, principal factor de riesgo para la malignización en la unión gastro-esofágica. A pesar de ello, no se ha encontrado relación con la protección frente al reflujo gastro-esofágico, y la influencia de otros factores (tabaquismo, alcohol, dieta, etc) en la aparición de la enfermedad es muy difícil de valorar de forma independiente.

Este conjunto de hechos ha llevado a algunos autores a postular que *H. pylori* es un miembro constitutivo de nuestro microbioma. Que no sólo la bacteria está perfectamente adaptada al ambiente gástrico, sino que también nosotros nos hemos adaptado a su presencia, co-evolucionando con él hacia un estado cuasi-simbiótico, de forma que su eliminación de la población en general conllevaría un desequilibrio ecológico que debe ser muy bien evaluado y cuyas consecuencias probablemente no somos capaces de determinar.

En la IV Conferencia de Consenso de Maastricht/Florenca, celebrada en 2012, expertos de 24 países ratificaron la recomendación de tratar sólo la infección si aparecen manifestaciones clínicas, mientras que en pacientes asintomáticos debería evitarse el tratamiento erradicador. Respecto a la prevención del cáncer gástrico, las medidas de despistaje y tratamiento masivo o los programas de vacunación de la población deben evitarse, mientras que debería valorarse cuidadosamente su puesta en marcha para los grupos considerados de alto riesgo.

EPIDEMIOLOGÍA DE *H. PYLORI*.

4. La cuarta de las cuestiones abiertas, y a mi modo de ver una de las más llamativas es el hecho de que, a pesar de su enorme relevancia en Salud Pública, aún se desconoce el modo exacto de adquisición de *H. pylori*.

Sabemos que se transmite persona-persona, pero esta única ruta no puede explicar, por sí sola, la alta incidencia ni la facilidad de adquisición.

El riesgo de infección por *H. pylori* se asocia de forma clara a un bajo nivel socio-económico, y es mucho mayor en poblaciones con peor nivel higiénico-sanitario. Desde hace ya varias décadas se conoce que el patrón epidemiológico de expansión de la enfermedad se ajusta perfectamente al de un microorganismo transmitido por la ruta fecal-oral, probablemente a través de agua contaminada. Numerosos estudios epidemiológicos lo confirman y la Organización Mundial de la Salud lo incluye en su lista de potenciales microorganismos patógenos emergentes cuya transmisión por el agua es plausible aunque aún no haya sido confirmada.

H. pylori posee la capacidad de crear biopelículas, lo que le confiere protección frente a condiciones ambientales hostiles y facilita la diseminación del patógeno. Experimentalmente

se ha demostrado, además, que en este ambiente su tasa de transferencia de genes codificadores de resistencias aumenta. También se sospecha que, al igual que *Legionella*, *Campylobacter*, *Salmonella* y otros patógenos de transmisión fecal, *H. pylori* podría sobrevivir en el interior de las amebas de vida libre presentes en el agua, lo que lo protegería frente a los distintos tratamientos de desinfección.

¿Por qué, entonces, aún no podemos considerar plenamente probado que la bacteria se transmite a través del agua por la ruta fecal? Este hecho es fundamental para establecer políticas de promoción de la salud y prevención de la enfermedad a nivel mundial.

El motivo es que, desde que, desde que el Dr. Robert Koch estableciera sus conocidos postulados sobre la atribución etiológica de una patología infecciosa, el cultivo a partir de un paciente o de una fuente de infección es lo que demuestra que la bacteria está viva, puede reproducirse y por tanto es infectiva.

Pues bien, desgraciadamente, *H. pylori* es extremadamente difícil de cultivar, debido a sus exigentes requerimientos nutricionales y su lento crecimiento. Incluso en muestras de biopsia, donde se encuentra en altas concentraciones y no existe biota competitiva, la tasa de éxito varía enormemente dependiendo del procesamiento de la muestra o el tipo de medio de cultivo utilizado, situándose entre un 40 y un 85%.

La carga microbiana de las muestras ambientales y de heces es elevadísima, por lo que el éxito del cultivo es mucho menor, y existen muy pocos estudios fiables en los que se haya aislado de estas muestras. Este es el principal escollo para poder asegurar de forma fehaciente que *H. pylori* se transmite a partir de agua y alimentos.

Pero, además, y al igual que muchos otros géneros bacterianos, en condiciones ambientales hostiles *H. pylori* entra en una fase viable, y por tanto potencialmente infectiva, pero no recuperable por cultivo (Viable But Not Culturable, VBNC), lo que podría explicar el fallo de las técnicas de cultivo a la hora de aislarlo del ambiente y ser el mecanismo por el que esta bacteria podría transmitirse a amplios segmentos de la población. La única forma de detectar estas formas VBNC es mediante métodos moleculares.

Detección de *H. pylori* por métodos moleculares. Dada la dificultad para cultivar *H. pylori*, los métodos moleculares, que detectan la presencia de los ácidos nucleicos de la bacteria sin necesidad de cultivarla, son utilizados habitualmente como herramienta de diagnóstico en muestras ambientales. La técnica de la PCR es mucho más rápida y de menor coste que el cultivo. A esta ventaja se le añade la posibilidad de determinar si la cepa detectada presenta genes que le confieran resistencias a antibióticos o una especial virulencia, realizando una tipificación simultánea. La PCR Cuantitativa a Tiempo Real presenta todas las ventajas de PCR y además, realiza la cuantificación del DNA presente en la muestra, lo que permite conocer el grado de contaminación de la misma.

Por otra parte, la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes específicas dirigidas hacia el rRNA (FISH) se ha utilizado para la detección e identificación de *H. pylori* en

diversos ecosistemas, como aguas residuales, algunos tipos de alimentos y sistemas de distribución de agua potable.

Mediante estos métodos moleculares, se ha detectado DNA de *H. pylori* en agua residual, agua de bebida y otras muestras ambientales por todo el mundo y se ha demostrado su capacidad de supervivencia en agua, incluso clorada. Recientemente dos equipos iraníes ha detectado *H. pylori* en el 9-14% de más de 800 vegetales y ensaladas listas para su consumo. También se ha detectado ocasionalmente en leche. Por otra parte, se ha detectado en biopelículas de la red de distribución de agua potable. Estos hallazgos indican que el agua contaminada y los alimentos podrían jugar un papel vital en la supervivencia y diseminación de *H. pylori* en el ambiente y su transmisión al hombre.

Nuestro equipo de investigación lleva más de 15 años investigando la presencia de *H. pylori* en agua y alimentos. Mediante métodos moleculares hemos detectado DNA o rRNA de *H. pylori* en el 46% de más de 100 aguas residuales, 40% de muestras de agua de río analizadas y, lo que a nuestro entender es más llamativo, un 66% de 24 aguas de fuentes públicas de nuestra área geográfica.

Detección de células viables. Sin embargo, seguimos teniendo muchas dudas sobre el significado real que para la Salud Pública supone detectar el microorganismo por los métodos moleculares disponibles actualmente, puesto que, como ya he señalado, el hecho de detectar genes en una muestra no se considera prueba fehaciente de la infectividad del organismo detectado. Por ello, hace ya varios años, en nuestro equipo nos centramos en desarrollar algún método molecular que permitiera detectar únicamente las células de *H. pylori* que fueran viables, es decir, que mantuvieran la integridad de membrana y las capacidades metabólicas suficientes como para poder considerarlas, al menos teóricamente, potencialmente infectivas.

Para ello aplicamos una técnica ya conocida, el Recuento Directo de Viables (DVC). El método DVC se basa en la incubación de las muestras en presencia de un agente antimicrobiano inhibidor del de la DNA-girasa, que inhibe la síntesis del DNA y evita la división de célula sin afectar otras actividades metabólicas. Las células viables continúan metabolizando los nutrientes y su tamaño aumenta desmesuradamente, por lo que se pueden entonces discriminar fácilmente de las células no viables, debido a las diferencias en sus tamaños respectivos. Combinado con la FISH, para detectar únicamente el rRNA específico de *H. pylori*, este método permite la detección e identificación específica de las células viables del patógeno concreto en muestras ambientales.

La aplicación de esta metodología nos permitió demostrar por primera vez la presencia de células indudablemente viables en aguas residuales (18% de las muestras analizadas), agua de río (27%) y de aguas de distribución de la red (25%).

También mediante este método, nuestro equipo de investigación ha demostrado recientemente, y también por primera vez, que *H. pylori* puede ser fagocitado *in vitro* por

amebas de vida libre en el agua, permaneciendo viable dentro de ellas durante hasta 24 horas, y sobreviviendo al tratamiento con cloro. Creemos que este trabajo ayudará a determinar si los procesos de depuración y potabilización habituales son suficientes para eliminar el microorganismo del agua potable y nos permitirá profundizar en el entendimiento de cómo puede sobrevivir y llegar a representar un riesgo para la salud humana.

Cultivo de *H. pylori* de muestras ambientales. Pero, como ya he señalado, hasta que no se logre cultivar *H. pylori*, la posible transmisión por agua y alimentos seguirá siendo objeto de controversia. Es necesario cultivarlo del ambiente, sin ninguna duda ni ambigüedad.

Ese ha sido nuestro objetivo durante varios años, en los que trabajamos desde numerosos abordajes para conseguir el éxito. Tengo que reconocer que los logros fueron escasos y si, como dice el aforismo “*en investigación los resultados negativos también son resultados*”, nosotros hemos acumulado archivos y archivos llenos de resultados.

Nuestro problema era que, incluso de haberlo cultivado, no podíamos obtener cultivos puros, ya que la microbiota acompañante impedía su aislamiento. Hasta que se nos ocurrió aplicar un abordaje alternativo:

Tras aplicar un paso previo de filtración reducíamos considerablemente el crecimiento sobre las placas, de forma que se podían observar colonias características en 6 aguas residuales y un agua procedente de una fuente pública. Aun así, no podíamos obtener cultivos aislados, ya que la microbiota competitiva cubría toda la placa. Por tanto, recogimos el cultivo mixto en el que estaban incluidas nuestras “presuntas” colonias de *H. pylori* y lo sometimos a ensayos de PCR, amplificando los genes *vacA* y 16S rDNA. A partir de este último DNA amplificado realizamos una secuenciación completa del fragmento obtenido. Cuando cotejamos la secuencia presente en nuestras colonias con las secuencias de *H. pylori* contenidas en las bases de datos el grado de similitud fue del 99%-100%. Este nivel de homología permite asegurar que la cepa del que procede el DNA pertenece a dicha especie.

De esta forma, sin necesidad de aislarlo, hemos conseguido demostrar lo que buscábamos desde hacía más de 10 años: Que *H. pylori* está presente en el agua en forma cultivable, que puede crecer en los medios de cultivo cuando inoculamos esa agua y, por tanto, es indudablemente infeccioso. Creemos que estos trabajos demuestran, de forma irrefutable, la transmisión de la bacteria a través del agua.

No nos conformamos con esto. Vamos a continuar investigando para desarrollar métodos que nos permitan aislar la bacteria: necesitamos tener cultivos puros obtenidos a partir del ambiente para poder determinar su resistencia a los antibióticos, su tasa de virulencia, si genéticamente son similares o no a las cepas aisladas de pacientes....Nos queda mucho por recorrer, pero estamos en el buen camino.

CUESTIONES POR RESOLVER:

En estos momentos, 30 años después de su descripción y presentación a la comunidad científica, aún quedan cuestiones muy importantes por resolver sobre este microorganismo y su relevancia para la salud Pública. Todas estas cuestiones están relacionadas entre sí y la respuesta que demos a una condicionará nuestra actitud ante el resto. Responder a ellas es imperativo para establecer políticas preventivas de Salud Pública a nivel global:

Podemos considerar a *H. pylori* un patógeno *sensu strictu*?

La bacteria lleva con nosotros desde el principio de la humanidad. Está tan adaptado al hombre que somos su único hospedador y ha establecido con nosotros un equilibrio ecológico muy preciso y sofisticado. Como ya se ha comentado, sólo produce patología en un porcentaje muy pequeño de los casos e incluso parece protegernos frente a la aparición de algunas enfermedades

Por lo que sabemos, *H. pylori* se sitúa en una zona indeterminada del continuo patógeno-simbionte, sin que por el momento hayamos podido situarlo exactamente en un punto concreto. Las controversias sobre este tema, en ocasiones, están cargadas de pasión.

Las investigaciones actuales van cada vez más enfocadas a desentrañar el complejo sistema de interacciones entre esta bacteria y la mucosa gástrica, así como con el resto del microbioma gastro-intestinal. No cabe duda de que este enfoque va a permitirnos expandir enormemente nuestro conocimiento en los próximos años.

Debemos erradicarlo de la población mundial?

La erradicación de *H. pylori* sería una medida muy eficaz para la prevención del cáncer y la úlcera gástricas, y así lo ha reconocido la Organización Mundial de la Salud. Sin embargo, teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto sobre la probable influencia de *H. pylori* en nuestro microbioma, la protección que parece conferir frente a algunas enfermedades así como la rápida emergencia de resistencias que estamos observando, debemos seguir por el camino de administrar antibióticos, con tratamientos cada vez más agresivos, para eliminarlo de la población? Sería útil disponer de una vacuna aplicable a escala global? Debemos eliminar sólo las cepas patógenas? Y, si es así, cómo conseguirlo?

Dada la altísima tasa de diversificación genética de la bacteria, y lo habituada que está a adaptarse a condiciones ambientales hostiles, es muy probable que cualquier acción por nuestra parte lleve asociada una “reacción” del microorganismo.

Si consideramos lo reciente de su descubrimiento, *H. pylori* es uno de los microorganismos más estudiados de la historia de la Microbiología y, sin embargo, los enigmas que lo rodean están lejos de haberse esclarecido. Me atrevo a pronosticar que todavía nos quedan algunas décadas por delante para investigar, asombrarnos y aprender de este fascinante compañero de viaje de la humanidad.

BIBLIOGRAFÍA:

Abadi, A. 2014. *Helicobacter pylori*: a beneficial gastric pathogen? Front Med Gastroenterol, 1. doi: 10.3389/fmed.2014.00026.

Abadi, A. 2014. *Helicobacter pylori*: emergence of a Superbug. Front Med Gastroenterol, 1. doi: 10.3389/fmed.2014.00034.

Agudo, S. et al. 2010. High Prevalence of Clarithromycin-Resistant *H. pylori* Strains and Risk Factors Associated with Resistance in Madrid, Spain. J Clin Microbiol 48, p. 3703–3707.

Amsterdam, K. et al. 2006. Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. FEMS Microbiol Rev, 30: 131–156.

Axon, A. 2014. *Helicobacter pylori* and Public Health. Helicobacter 19 (S1): 68–73.

Cellini, L. et al. 2014. *Helicobacter pylori*: A chameleon-like approach to life. World J Gastroenterol ; 20(19): 5575-5582.

Chiurillo M.A. et al. 2013. Genotyping of *H. pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. Intl J Infect Dis, 17: 750–756.

De Falco, M. et al. 2015. Molecular mechanisms of *Helicobacter pylori* pathogenesis. J Cell Physiol. doi 10.1002/jcp.24933.

Dorer, M. S. et al. 2009. *Helicobacter pylori* 's Unconventional Role in Health and Disease. PLoS Pathogens, 5 (10): e1000544. doi:10.1371/journal.ppat.1000544.

Eusebi, L. H. et al. 2014. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter, 19 (S1): 1–5.

Ferlay J. et al. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. European J Cancer, 49: 1374-1403.

Ferreira, R. M. et al. 2014. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in gastric carcinoma. Best Practice Res Clin Gastroenterol, 28: 1003-1015.

Food and Drug Administration (FDA). 2014.. Establishing a List of Qualifying Pathogens Under the Food and Drug. Act Federal Register / Vol. 79, No. 108. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2014-06-05/pdf/2014-13023.pdf>

García, A. et al. 2014. Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. World J Gastroenterol, 20: 5632-5638.

Gazia, S. et al. 2013. Real-Time PCR detection and quantitation of *Helicobacter pylori* clarithromycin-resistant strains in archival material and correlation with Sydney classification. Annals Gastroenterol. 26, 226-232.

Hatakeyama, M. 2010. Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. Cancer Sci, 102: 36–43.

Hrušková L. et al. 2013. Multiplex polymerase chain reaction using ethidium monoazide and propidium monoazide for distinguishing viable and dead cells of arcobacters in biofilm. Can J Microbiol. 59:797-802.

IARC *Helicobacter pylori* Working Group (2014). *Helicobacter pylori* Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer. ARC Working Group Reports, No. 8. Available from: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wrk/wrk8/index.php>

Iwanczak, B. and Francavailla R. 2014. *Helicobacter pylori* Infection in Pediatrics. Helicobacter 19 (S1): 46–51.

Lamb, A. and Chen, L. F. 2013. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. J Cell Biochem, 114(3): 491–497.

Lin, D. and Koskella, B. 2015. Friend and foe: factors influencing the movement of the bacterium *Helicobacter pylori* along the parasitism–mutualism continuum. Evolutionary Applications, 8: 9–22.

- Llorca, L. *et al.* 2014. *Helicobacter pylori*: The balance between a role as colonizer and pathogen. *Best Practice Res Clin Gastroenterol*, 28: 1017-1029.
- Megraud, F. *et al.* 2014. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 19: 6–10
- Moreno, Y. *et al.* 2003. Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Research*, 37 (9): 2251-2256.
- Moreno, Y. *et al.* 2007. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Research* 41: 3490-3496.
- Nayak, A. K. and Rose J.B. 2007. Detection of *Helicobacter pylori* in sewage and water using a new quantitative PCR method with SYBR_ green. *J Appl Microbiol* 103, 1931–1941.
- Ng, C.G. *et al.* 2014. *Helicobacter pylori* biofilm- the probable mode and source of transmission? *Helicobacter*, 19 (S1): 104.
- O'Connor, A. *et al.* 2014. Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2014. *Helicobacter*, 19 (S1): 38-45.
- Olbermann, P. *et al.* 2010. A Global Overview of the Genetic and Functional Diversity in the *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island. *PLoS Genetics*, 6: e1001069. doi:10.1371/journal.pgen.1001069.
- Papagiannakis, P. *et al.* 2013. The role of *Helicobacter pylori* infection in hematological disorders. *Eur J Intern Med*, 24: 685–690.
- Pereira, M. I. and Medeiros, J. A. 2014. Role of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World Gastroenterol*, 20(3): 684-98.
- Piqueres, P. *et al.* 2004. FISH detection of clarythromycin-resistant cells in clinical and wastewater samples. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 10 (S3): 279.
- Ramamurthy T. *et al.* 2014. Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front Public Health* 31:103.
- Ricci, V. *et al.* 2011. Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. *World J Gastroenterol*, 17(11): 1383-1399.
- Rubenstein, J. H. *et al.* 2014. Association between *Helicobacter pylori* and Barrett's Esophagus, Erosive Esophagitis, and Gastroesophageal Reflux Symptoms. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 12(2): 239–245.
- Sheh, A. and Fox, J. G. 2013. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut Microbes*, 4(6): 505-31.
- Smith, C. D. and Ashbolt, N. J. 2012. The fate of *Helicobacter pylori* phagocytized by *Acanthamoeba polyphaga* demonstrated by fluorescent in situ hybridization and quantitative polymerization chain reaction tests. *Curr Microbiol*. 65 (6):805-12.
- Wang, F. *et al.* 2014. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Letters* 345 (2014) 196–202.
- Yahaghi, E. *et al.* 2014. *Helicobacter pylori* in Vegetables and Salads: Genotyping and Antimicrobial Resistance Properties. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/757941>
- Yakoob, J. *et al.* 2012. Prevalence of non *Helicobacter pylori* species in patients presenting with dyspepsia. *BMC Gastroenterology*, 12:3.
- Yamaoka, Y. 2010. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol*, 7: 629-641.