

# Enfoques ambientales en la epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*

# Environmental approaches in the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection

Virginia Montero Campos

Licenciada en Microbiología, PhD Candidate Ciencias Naturales para el Desarrollo. Coordinadora del Área de Microbiología del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos- CEQIATEC. vmontero@itcr.ac.cr

Recibido: 24 abril 2009 Revisado 12 agosto 2009 Aprobado 06 octubre 2009.

## RESUMEN

**Objetivo:** Esta revisión tiene como objetivo mostrar los elementos recientes que apoyan al ambiente como un posible vector o reservorio del *Helicobacter pylori*, bajo un escenario de múltiples rutas muy estrechamente relacionado con el agua de consumo humano.

**Metodología:** El trabajo presenta un análisis de información correspondiendo a una revisión sistemática y evaluativa. El método de búsqueda y localización correspondió al uso de la base de datos automatizada PubMed Central y el sistema de búsqueda Ingenta.

**Resultados:** Se revisó más de 5 800 artículos en los cuales el abstract contiene la palabra *Helicobacter pylori*, en idioma inglés, de los últimos 8 años. De estos artículos solo un 2% cumplió con el nivel de evidencia necesario y poder incorporarlo en la temática permitiendo alcanzar el objetivo de la revisión.

**Conclusión:** Se obtiene que cada vez son más en el mundo, los investigadores que se abren a la idea del papel del ambiente en la epidemiología de la infección de *Helicobacter pylori* y lo único que falta, es la obtención de cepas viables por cultivo, siendo a la fecha solo el empleo de técnicas moleculares las que proporcionan la evidencia de su presencia.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*, cáncer gástrico, epidemiología, agua potable, biofilmes, factores socioeconómicos. (fuente: DeCS/BIREME)

## ABSTRACT

**Objective:** This review aims to show the latest elements that support the environment as a possible vector or reservoir of *Helicobacter pylori*, under a scenario of multiple pathways, and very closely related to drinking water.

**Method:** The paper presents an analysis of information that corresponds to a systematic and evaluative review. The search method and location corresponded to the use of the PubMed Central computerized database as well as the Ingenta search system.

**Results:** More than 5 800 articles containing the word *Helicobacter pylori* in English in the last 8 years were reviewed. From these articles only 2% met evidence standards required to be incorporated in the topic of this review.

**Conclusion:** It can be concluded that an increasing number of researchers worldwide are open to the idea of an environmental role in the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and the only missing element is obtaining cultures of viable strains. Up to now, the only way to provide evidence of the presence of this bacterium is the use of molecular techniques.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, gastric cancer, epidemiology, drinking water, biofilms, socioeconomic factors. (source: MeSH, NLM).

Cuando Barry Marshall y Robin Warren en 1982 aislaron por primera vez el patógeno gástrico *Campylobacter pyloridis*, pocos hubieran pensado que casi 25 años después, esta bacteria ha demostrado ser una de las infecciones bacterianas más comunes y difundidas de los seres humanos, que afecta a todas las edades con una alta prevalencia en los países en vías de desarrollo (1).

Se considera que está presente en la mitad de la población mundial, puede evadir la respuesta inmune que provoca y permanecer en la gran mayoría de los individuos infectados, por largos periodos de tiempo, sin producir enfermedad. La comunidad científica todavía está luchando para comprender la(s) forma(s) en que esta bacteria es transmitida entre la población humana.

Según Martín Blazer, *Helicobacter pylori* ha ido desapareciendo de los países desarrollados a lo largo de los últimos 100 años, merced a una mayor higiene, que dificulta su transmisión, así como al uso generalizado de antibióticos (2). Actualmente se considera que países con la misma prevalencia de infección pueden presentar diferentes condiciones sociales, económicas y ambientales, por esta razón dicha prevalencia se puede considerar "multifactorial",

En circunstancias definidas bajo la relación hospedero-parásito, la naturaleza de la cepa y la susceptibilidad del hospedero, en un bajo porcentaje su presencia en las personas se le asocia con un mayor riesgo de provocar diferentes patologías: gastritis, úlcera gástrica o duodenal, atrofia gástrica, metaplasia intestinal adenocarcinoma gástrico y Linfoma del Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas (MALT, según la sigla inglesa).

Con respecto a la enfermedad ulcero-péptica, la eliminación de la bacteria permite un mejoramiento significativo del epitelio gástrico, sin embargo se puede presentar la re-infección especialmente en los países tropicales.

Esta revisión examina el conocimiento científico actualizado con respecto a los factores que influyen la infección, con implicaciones ambientales actualizadas que pueden incidir en la epidemiología y en el estado de enfermedad.

### Estrategia de búsqueda

La metodología utilizada para realizar la revisión corresponde a la búsqueda por medio del uso de la base de datos PubMed Central y el sistema de búsqueda Ingenta. Se revisó más de 5 800 artículos en los cuales el abstract contiene la palabra *Helicobacter pylori*, en idioma inglés, de los últimos 8 años. El trabajo presenta un análisis de información correspondiendo a una revisión sistemática y evaluativa. De estos artículos solo un 2%, cumplió con el nivel de evidencia necesario y que correspondieran a artículos que trataran sobre epidemiología de la infección y hallazgos ambientales de la bacteria, especialmente en la matriz agua.

### Epidemiología de la infección por *H. pylori*

La infección por *H. pylori* ocurre en todo el mundo, pero se han encontrado diferencias significativas en la prevalencia tanto entre países como dentro de un país (1).

La prevalencia global es superior en los países de las regiones económicamente subdesarrolladas, como África y Asia, que en los países más desarrollados como los del oeste de Europa y América del Norte. En términos generales la prevalencia del *H. pylori* se considera está disminuyendo, como resultado de la mejora de las condiciones sanitarias (3).

Ahora es bien conocido que la infección es adquirida principalmente en la infancia, y que por la edad de 10 años, más del 50% de los niños en todo el mundo llevan el microorganismo (4).

La infección de la bacteria, por lo general, puede pasar inadvertida en toda la vida del hospedero y los primeros síntomas generalmente tardan mucho tiempo en producirse después de una infección (5). Esto implica que los episodios de transmisión, pasan inadvertidos. Otro aspecto que dificulta el seguimiento de la adquisición y su abordaje epidemiológico es que el aislamiento y el cultivo de *H. pylori* es relativamente complicado para aislar comparado con otras bacterias de importancia clínica.

Algunos estudios han sugerido que las infecciones transitorias pueden producirse e incluso ser muy comunes (6,7), pero la importancia de estos

resultados es todavía objeto de controversia debido a la especificidad y sensibilidad de las pruebas utilizadas (8, 9).

Evidencia reciente prueba también que múltiples cepas de *H. pylori* y de otras especies de *Helicobacter* son capaces de infectar simultáneamente el tracto gastrointestinal de un individuo (10-13).

La situación socioeconómica se considera claramente como uno de los factores determinantes más importante para el desarrollo de la infección, este incluye condiciones tales como los niveles de higiene, la densidad de población, saneamiento ambiental y oportunidades educativas, todos los cuales han sido identificados individualmente como marcadores de presencia de la bacteria en una población dada (14).

### Vías de transmisión

Basado en evidencia epidemiológica y microbiológica varias vías de transmisión han sido propuestas. La transmisión de persona a persona de la bacteria es la vía que se ha contemplado como la ruta más probable de infección, principalmente a causa de la deficiencia de aislar la bacteria de otros lugares, como por ejemplo el medio ambiente, que del tracto gastrointestinal de los seres humanos (14).

Numerosos estudios epidemiológicos han identificado al hacinamiento de los miembros de la familia como un factor de riesgo para la transmisión de *H. pylori*; así mismo se ha encontrado entre miembros infectados de la misma familia, una alta homología del genoma bacteriano (15).

Se ha observado diferencias significativas en la incidencia entre niños de una misma familia donde todos sus miembros se encuentran infectados, con respecto a niños cuyos miembros familiares no están infectados (16-19). El riesgo relativo es de aproximadamente ocho veces mayor si la madre está infectada y cuatro veces mayor si es el padre el infectado (19). Aunque estos estudios apoyan la hipótesis de transmisión de persona a persona, la exposición de una familia a una fuente común alternativa sigue siendo una posibilidad.

La mayoría de las vías de transmisión entre personas abarcan la ruta gastro-oral, oral-oral y fecal-oral.

En esta revisión se incluye además, dos posibles vías que han sido sugeridas pueden transmitir la bacteria en forma viable: el agua, y los animales. La mayoría de los autores coinciden en que la importancia relativa de estas rutas en la transmisión de la bacteria varía en importancia entre países desarrollados y en desarrollo (20,21).

### Transmisión gastro-oral.

Se ha sugerido que la exposición a las gotitas microscópicas de jugo gástrico durante la manipulación endoscópica podría explicar una mayor prevalencia de infección gastrointestinal en endoscopistas (22), aunque este hecho probablemente tenga poca relevancia epidemiológica.

Pero la transmisión gastro-oral se postula principalmente para los niños pequeños, entre los cuales el vómito y el reflujo gastro-esofágico son comunes. También se ha visto que episodios de vómitos en personas infectadas son importantes, debido a que podrían causar un aumento del riesgo de la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral, aunque no discrimina si la transmisión es gastro-oral u oral-oral.

En un estudio realizado por Parsonnet (23), el vómito de sujetos infectados y el aire de sus alrededores fueron incluidos en un muestreo para la detección *H. pylori*. Todas las muestras de vómito fueron positivas (incluso la recuperación de la bacteria en grandes cantidades) e incluso el aire rodeando los pacientes fue positivo en las pruebas en un 37,5 % de los casos (24).

Por otro lado, el descubrimiento de especies enterohepáticas de *Helicobacter* podría desafiar la importancia de una ruta gastro-oral. Como el nombre lo sugiere, estas bacterias han sido identificadas en el intestino y/o el hígado de los seres humanos, otros mamíferos y aves (25).

### Transmisión oral- oral

La cavidad oral se ha considerado por mucho tiempo como un reservorio adecuado para la subsistencia de *H. pylori* y la transmisión oral-oral ocurre, por lo tanto, por medio de besos u otro tipo de contacto con saliva infectada. El papel de la cavidad oral ha sido ampliamente revisada

por varios autores (26-28). Cepas idénticas de la bacteria se han detectado por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR según las siglas en inglés), en la boca y el estómago de individuos infectados sintomáticos (29) y en estos pacientes, la detección en la cavidad oral parece ser, muy común (27).

Sin embargo, otros estudios utilizando técnicas similares han indicado que la cavidad oral no favorece una prolongada colonización de *H. pylori* en poblaciones con alta prevalencia de infección cuando los individuos son asintomáticos, y se postula que la colonización de la cavidad oral es sólo transitoria y se produce después de vómitos (27,30).

### Transmisión fecal-oral

Se ha sugerido que la ruta de transmisión fecal-oral de *H. pylori*, es muy poco probable debido a que la bacteria es muy sensible al contacto con la bilis, durante el paso a través del intestino (23,31,32).

Sin embargo, el hecho de que *H. pylori* es capaz de colonizar el duodeno en áreas de metaplasia gástrica parece ser una contradicción, lo cual implica una duda razonable del verdadero efecto de la bilis sobre el microorganismo por su paso a través del intestino (33).

Esta visión es apoyada por un estudio de Parsonnet, quien demostró que aunque *H. pylori* no se podía cultivar de las heces, en ocho de 16 pacientes positivos adultos el cultivo de heces resultó positivo, si a éstos se les suministraba medicamentos para inducir diarrea (23,34).

Sin embargo faltan estudios probablemente con un mayor número de pacientes sintomáticos, para dilucidar el peso de esta vía en la epidemiología global.

### Transmisión zoonótica

La interacción zoonótica representa una de las mayores causas de morbilidad y muerte en el mundo. Algunos estudios parecen apoyar el papel de animales en la transmisión de *H. pylori*, pero se considera que este alcance depende del tipo de los animales en estudio. Los considerados a la fecha como vectores incluyen bovinos (35), ovinos (36) y mascotas como gatos y perros (37),

además de vectores como las cucarachas (38) y las moscas (39).

En los dos primeros casos, la sospecha de la vía de transmisión es principalmente por la ingestión de leche cruda contaminada. La leche podría contaminarse cuando la ubre de una oveja o vaca está en contacto con las heces en el suelo. Datos epidemiológicos han demostrado mayor prevalencia en los pastores y sus familias con respecto a la población en general (40,41).

Estudios epidemiológicos muestran resultados controversiales en lo que respecta al riesgo de la presencia de animales domésticos en el hogar (42,43). A la fecha, *H. pylori* no se ha encontrado en perros y muy raramente en estómagos de gatos (44,45), y se ha sugerido que la presencia en los animales es de origen humano (44,46). Trabajos recientes han identificado *H. pylori* por PCR en la bilis de gatos, lo que aumenta la posibilidad de este animal como un reservorio (37).

### El papel del agua de consumo humano en la transmisión de *H. pylori*.

Una variedad de métodos moleculares y ensayos con anticuerpos han sido utilizados para detectar la presencia de la bacteria en pozos, ríos, en agua de consumo humano, en biofilmes asociados tanques de almacenamiento de agua y en tuberías de redes de distribución (47-50).

Se ha evaluado la sensibilidad y el grado de recuperación de *H. pylori* en matriz de agua potable sugiriéndose que esta matriz no presenta interferencia real (51, 52), además se ha demostrado su sobrevivencia a la cloración sin encontrarse correlación con niveles de cloro en agua tratada con respecto a la prevalencia de la infección en población de riesgo (53).

No obstante, se ha determinado que el *H. pylori* suspendido en el agua tiene muy bajo poder de cultivo comparado con otros patógenos de origen acuático (14).

Algunos estudios muestran la capacidad de cultivo de al menos 10 horas de *H. pylori* a temperaturas mayores de 20 °C en los cuales se puede comparar con la capacidad de cultivo de más de 40 días para *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* a la misma temperatura (54-56).

Mientras algunos autores han mencionado que la capacidad de cultivo de *H. pylori* generalmente termina algún tiempo después de su inoculación en el agua (57), Oliver demostró la viabilidad y la capacidad de cultivo de *H. pylori* en agua hasta por 75 horas a 10 °C (58). Así mismo Shahamat (56) determinó que el total de células no disminuía por períodos mucho más largos (2 años a 4 °C).

Esto plantea interrogantes sobre el estado fisiológico de la bacteria en el agua y la evaluación de los métodos que podrían ser más apropiados para la detección de la bacteria. Por ejemplo, el efecto de choque por nutrientes también fue observado en la recuperación de bacterias bajo estrés en esta matriz mostrando un cierto nivel de *H. pylori* de adaptación a este entorno (55).

En términos generales la adherencia de los microorganismos a las superficies es un importante factor de sobrevivencia que puede influir en la patogenicidad de cepas específicas, y esto es crucial en su epidemiología (57,59-61). El incremento en la capacidad de la adherencia depende en gran medida de la superficie de contacto y del ambiente que le rodea, especialmente si presenta alta humedad. Aquellas cepas que modulan su habilidad para adherirse a diversas células in vitro también manipulan su habilidad para causar infección in vivo en modelos animales, mediante diversas matrices y adhesinas bacterianas (62).

Por ejemplo, los organismos de biofilmes o biopelículas aumentan su capacidad para soportar y neutralizar monocloraminas, estimular la producción de catalasa, o inducir la expresión de betalactamasas cromosómicas (63). De esta forma se defienden del medio ambiente que les rodea, pueden activar genes de respuesta a estrés y cambiar entonces a fenotipos de estrés ambiental. Con un mismo genotipo, la bacteria expresa un distinto patrón de genes y presenta un distinto fenotipo, como por ejemplo alteraciones en el patrón nutricional, densidad celular, temperatura, pH o la osmolaridad. La inanición prolongada induce a la pérdida de capacidad de cultivo en condiciones normales, en estos casos las células permanecerían metabólicamente activas y estructuralmente intactas (64).

En estos biofilmes dependiendo de las condiciones

ambientales, una misma bacteria puede crecer, sétil adherida a la superficie, o desarrollarse de forma planctónica nadando libremente en el medio líquido. En los biofilmes planctónicos las bacterias se encuentran en estado reversible de “viables pero no cultivables” (VPNC) y se considera la principal razón de la baja tasa de detección de microorganismos en biopelículas por métodos rutinarios de cultivo (64).

Se ha estudiado la adhesión de *H. pylori* en tanques de almacenamiento de agua de acero inoxidable y de polipropileno, encontrándose que en estas superficies retiene su morfología espiralar (59). Esto es importante por cuanto se podría considerar reservorio en sistemas de distribución de agua.

Por mucho tiempo se consideró que muchos de los problemas que se han encontrado en la recuperación de formas viables de *H. pylori* en el agua, se debe a que estas pasan a formas cocoides o VPNC. Desde un punto de vista más amplio, ahora se acepta que lo que ocurre es que estas bacterias no se logran cultivar bajo métodos rutinarios y convencionales de laboratorio. Más aún, se ha demostrado que formas cocoides de *H. pylori* son capaces de colonizar la mucosa gástrica y causar gastritis en ratones (65,66).

Actualmente se presenta evidencia sobre la mayor resistencia de *H. pylori* con respecto a *E. coli*, al cloro y al ozono, por lo que, este microorganismo es capaz de tolerar desinfección en sistemas de distribución de agua (67). Esto contrasta con lo publicado por Johnson y colaboradores en 1997 (68), quienes reportaban inactivación de la bacteria, pero en tubos de ensayo de laboratorio por contacto directo; lo cual en el medio ambiente no corresponde a un comportamiento real. También se ha reportado de la resistencia de *H. pylori* al glutaraldehído, desinfectante comúnmente usado en la desinfección de equipo médico (69).

Actualmente se cuenta con evidencia para el reconocimiento del agua de consumo humano en el rol epidemiológico (70-72), advirtiéndose directamente que el consumo del agua no tratada debería considerarse un factor de riesgo para la infección en una población dada (71,73-76). Se ha mencionado incluso que en Japón la mayor parte de los casos de transmisión de *H. pylori* es de

origen hídrico y que la transmisión está fuertemente asociada con la duración de la ingesta, en la vida de las personas, con respecto al consumo de agua de pozo (77).

La propuesta de modelos a través de su tolerancia en el agua, le confiere características importantes en el ciclo de transmisión, siendo trascendental para una población dada, pues tiene fuertes implicaciones en la salud pública.

## CONCLUSIÓN

En el escenario de múltiples rutas de transmisión (14), se considera que el mayor contribuyente a la prevalencia es probablemente la transmisión gastro-oral, como vómito y aire circundante, pues se considera han sido las únicas matrices en las que la bacteria ha sido capaz de ser constantemente cultivada y aislada. En cualquier caso, existe de hecho poca diferencia entre las rutas fecal-oral y oral-oral, ambas también contribuyen a la infección por *H. pylori*. Por otra parte, la lactancia materna parece tener sólo contribuciones marginales a la prevalencia.

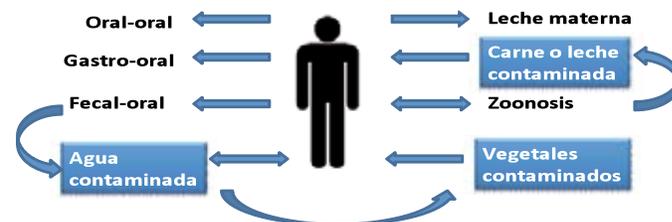
Con el creciente control de parámetros del agua y la calidad de los alimentos, observados principalmente en los países desarrollados, la hipótesis de la transmisión hídrica podría explicar la disminución de la colonización de las personas por *H. pylori* en estos países.

En este escenario de múltiples rutas, se considera, que los seres humanos son capaces de luchar contra varios intentos de *H. pylori* del ambiente por colonizar el tracto gastrointestinal, reconociendo que se pueden conjugar tres factores: bajo número de la bacteria y baja actividad fisiológica, y posiblemente reacción y resistencia humana a la mayoría de las cepas. De forma contraria, el éxito de la bacteria en la colonización y la infección de un individuo corresponderían a la susceptibilidad natural del hospedero con cepas que co-expresan factores de virulencia.

En la figura 1, se esquematizan las vías sugeridas de transmisión de *H. pylori* (2). Cuatro de las vías propuestas son representativas de la transmisión por contacto directo de persona a persona (la lactancia materna, oral-oral, gastro-oral y fecal-oral), mientras que las cuatro restantes exigen

un reservorio en el medio ambiente. Posibles reservorios fuera del huésped humano están marcados en azul.

Figura 1. Vías de transmisión propuestas para *H. pylori*.



Reconociendo la posibilidad de que *H. pylori* pueda ser transmitido por el agua de consumo a la población, toma especial importancia la cobertura de agua potable en Costa Rica, la cual si bien es cierto ha ido en franca mejora con los últimos años, para el 2002 un 29,5 % de la población costarricense consume agua no clorada, constituyéndose esto como un riesgo potencial (78).

Dada la asociación entre *H. pylori* y úlcera gástrica o duodenal, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, cáncer gástrico, linfoma MALT de células B, y otras patologías extra gástricas relacionadas (79-81), hay una necesidad urgente para desarrollar estrategias que prevengan la contaminación con esta bacteria.

Aunque el perfeccionamiento de una vacuna está en progreso, lo más probable es que la misma no se encuentre disponible en el corto plazo. La aparición de cepas resistentes a las terapias antimicrobianas actualmente usadas contra *H. pylori* y el alto costo de los tratamientos que conlleva su erradicación, es por lo que se hace necesario el abordaje integral del problema.

En muchas otras enfermedades con etiología infecciosa, las medidas en salud pública y saneamiento ambiental basadas en datos epidemiológicos, han sido muy útiles en la prevención de la extensión de la infección. Sin embargo antes de que estas medidas puedan ser verdaderamente de utilidad, es esencial clarificar las rutas de transmisión en la población costarricense, su relación en el medio ambiente y la correlación estadística con que todas estas

variables pueden influir en nuestra situación particular.

### Agradecimiento

Al Dr Fernando García de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica por sus aportes y la revisión del manuscrito.

Al Dr Sergio A. Con del Centro Digestivo Doctores Con-Mediplaza, San José, Costa Rica por la revisión del manuscrito.

### Referencia

- Mitchell, H. *Epidemiology of infection. Helicobacter pylori: physiology and genetics*. NCBI. Bookshelf 2001. Online.
- Blazer M. *Helicobacter pylori*. Investigación y Ciencia 2005; 6: 13-22.
- Rehnberg L, Rautelin L, Koskela H, Sarna P, Pukkala S, Aromaa S, et al. Decreasing prevalence of *Helicobacter* antibodies in Finland, with reference to the decreasing incidence of gastric cancer. *Epidemiology and Infection* 2001; 126:37–42.
- Pounder R, Ng D. The Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Different Countries. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 1995; 9:33–39.
- Brown L. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev* 2000; 22(2):283–297.
- Goodman K, O'Rourke K, Day R, Wang C, Nurgalieva Z, Phillips CV, et al. Dynamics of *Helicobacter pylori* infection in a US–Mexico cohort during the first two years of life. *Int J Epidemiol* 2005; 34(6):1348–1355.
- Haggerty TD, Perry S, Sanchez L, Perez-Perez G, Parsonnet J. Significance of transiently positive enzyme-linked immunosorbent assay results in detection of *Helicobacter pylori* in stool samples from children. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(5):2220–2223.
- Perry S, Parsonnet J. Commentary: *H. pylori* infection in early life and the problem of imperfect tests. *Int. J. Epidemiol*, 2005; 34(6):1356–1358.
- Nugalieva Z, Opekun A, Graham D. Problem of distinguishing false–positive tests from acute or transient *Helicobacter pylori* infections. *Helicobacter*, 2006;11(2):69–74.
- Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, Driesseu A, Debongnie J C, Burette A, et al. Identification of non–*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(5): 2256–2260.
- Fritz E L, Slavik T, Delpont W, Olivier B, Van der Merwe SW. Incidence of *Helicobacter felis* and the effect of coinfection with *Helicobacter pylori* on the gastric mucosa in the African population. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44(5):1692–1696.
- Ghose C, Perez-Perez G I, Van Doorn L J, Dominguez-Bello MG, Blaser M J. High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(6): 2635–2641.
- Blaser M, Atherton J. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 113(3): 321–333.
- Azevedo N F, Guimaraes N, Figueiredo C, Keevil C W, Vieira MJ. A New Model for the Transmission of *Helicobacter pylori*: Role of Environmental Reservoirs as Gene Pools to Increase Strain Diversity. *Critical Reviews in Microbiology* 2007; 33: 157-169.
- Ma J L, You W C, Gail M H, Zhang L, Blot W J, et al. *Helicobacter pylori* infection and mode of transmission in a population at high risk of stomach cancer. *Int. J. Epidemiol* 1998; 27(4): 570–573.
- Drumm B, Perez P G, Blaser M, Sherman P. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med* 1990; 322: 359-363.
- Mitchell H, Bohane T, Hawkes R, Lee A. *Helicobacter pylori* infection within families. *Zentralbl. Bakteriol. Int. J. Med. Microbiol* 1993; 280:128-136.
- Miyaji H, Azuma T, Ito S, Abe Y, Gejyo F, Hashimoto N; et al. *Helicobacter pylori* infection occurs via close contact with infected individuals in early childhood. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000;15:257-262.
- Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Knayer U, Gonser T, Adler G, et al. *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. *J. Infect. Dis* 1999;179:398-402.
- Perez P G, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2004; 9(Suppl 1):1–6.
- Megraud F. When and how does *Helicobacter pylori* infection occur? *Gastroenterologie Clinique Et Biologique* 2003; 27(3):374–379.
- Hildebrand P, Meyer W B, Mossi S, Beglinger C. Risk among gastroenterologists of acquiring *Helicobacter pylori* infection: case control study. *British Medical Journal* 2000; 321(7254):149–153.
- Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *Journal of the American Medical*

- Association 1999; 282(23): 2240–2245.
24. Leung W K, Siu L K, Kwok K L, Chan S Y, Sung R, Sung J Y. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro–oral transmission. *American Journal of Gastroenterology* 1999; 94(10):2881–2884.
  25. Solnick J, Schauer D. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 2001;14(1): 59–97.
  26. Megraud F. Transmission of *Helicobacter pylori* Fecal-Oral Versus Oral-Oral Route. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 1995; 9:85–9.
  - 27- Dowsett S, Kowolik M. Oral *Helicobacter pylori*: Can we stomach it? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2003; 14(3):226–233.
  28. Luman, W. *Helicobacter pylori* transmission: is it due to kissing? *J.R. Coll. Physicians. Edinb* 2002; 32:275–279.
  29. Khandaker K. DNA Fingerprints of *Helicobacter pylori* from Mouth and Antrum of Patients with Chronic Ulcer Dyspepsia. *Lancet* 1993; 342(8873):751–751.
  30. Olivier B J, Bond R P, Van Zyl W B, Delpont M, Slavik T, Ziady C, et al. Absence of *Helicobacter pylori* within the oral cavities of members of a healthy South African community. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44(2):635–636.
  31. Hanninen M. Sensitivity of *Helicobacter pylori* to Different Bile-Salts. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1991;10(6):515-518.
  32. Mitchell H M, Li Y Y, Hu P J, Hazell S L, Du G G, Byrne D J, et al. The Susceptibility of *Helicobacter-Pylori* to Bile May Be an Obstacle to Fecal Transmission. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 1992; 4:S79–S83.
  33. Han S W, Evans D G, El Zaatari F A, Go M F, Graham D. The interaction of pH, bile, and *Helicobacter pylori* may explain duodenal ulcer. *American Journal of Gastroenterology* 1996; 91(6): 1135–1137.
  34. Raedsch, R. The growth of *Helicobacter pylori* is inhibited by intragastric bile acids. *Gastrointestinal Pathology* 1989; 409–412.
  35. Fujimura S, Kawamura T, Kato S, Tateno H, Watanabe A. Detection of *Helicobacter pylori* in cow's milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002; 35(6):504–507.
  36. Dore M P, Sepulveda A R, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato M S, Mototsugu K, et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep. Implications for transmission to humans. *American Journal of Gastroenterology* 2001; 96(5):1396–1401.
  37. Boomkens S Y, Kusters J G, Hoffmann G, Pot R G, Spee B, Penning L C. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in bile of cats. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 2004; 42(3): 307–311.
  38. Imamura S, Kita M, Yamaoka Y, Yamamoto T, Ishimaru A, Konishi H, et al. Vector potential of cockroaches for *Helicobacter pylori* infection. *American Journal of Gastroenterology* 2003; 98(7):1500–1503.
  39. Osato M S, Ayub K, Le H H, Reddy R, Graham D Y. Houseflies are an unlikely reservoir or vector for *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(9):2786–2788.
  40. Dore M. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. *Digestive Diseases and Sciences* 1999; 44(6):1161–1164.
  41. Plonka M, Bielanski W, Konturek S J, Targosz A, Sliwowski Z, Dobrzanska M, et al. *Helicobacter pylori* infection and serum gastrin, ghrelin and leptin in children of Polish shepherds. *Digestive and Liver Disease* 2006; 38(2):91– 97.
  42. Bode G, Rothenbacher D, Brenner H, Adler G. Pets are not a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in young children: results of a population–based study in Southern Germany. *Pediatric Infectious Disease Journal* 1998; 17(10):909–912.
  43. Kearney D, Crump C. Domestic cats and dogs and home drinking water source as risk factors for *Helicobacter pylori* infection in the United States. *Gut* 2002; 51:A31–A32.
  44. ElZaatari F A, Woo J S, Badr A, Osato M S, Serna H, Lichtenberger L M, et al. Failure to isolate *Helicobacter pylori* from stray cats indicates that *H-pylori* in cats may be an anthroponosis— An animal infection with a human pathogen. *Journal of Medical Microbiology* 1997; 46(5):372–376.
  45. Neiger R, Simpson K. *Helicobacter* infection in dogs and cats: Facts and fiction. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2000; 14(2): 125–133.
  46. Cittelly D M, Dore M P, Bravo M M, Monsalve H, Botero, R., Ricaurte, O, et al. *Helicobacter pylori* in animals is of human origin: studies in monkey's, sheep, and cats. *Gut* 2002; 51: A31–A31.
  47. Bragança S, Azebedo NF, Simoes L, Viera M, Kevill, C. Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms formed in a real drinking water distribution system using peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization. *Biofilms: Persistence and Ubiquity*, edited by A. McBain, D. Allison, J. Pratten, D. Spratt, M. Upton and J. Manchester. 2005. *Biofilm Club*:231-

239

48. Piqueres P. A combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability. *Res Microbiol* 2006; 157(4): 345–349.
49. Fujimura S, Kato S, Kawamura T. *Helicobacter pylori* in Japanese river water and its prevalence in Japanese children. *Lett. Appl. Microbiol* 2004; 38(6):517–521.
50. Adams B, Bates T, Oliver J. Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69(12):7462–7466.
51. McDaniels A, Wymer L, Rankin C, Haugland R. Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water. *Water Res.* 2005; 39(19):4808-4816.
52. Benson J, Fode-Vaughan K, Collins, M. Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. *Letters in Applied Microbiology* 2004; 39 (3): 221–225.
53. Ramírez RA, Chinga AE, Mendoza R D. Variation of *Helicobacter pylori* prevalence and its relation with the level of chlorine in the water at the “Atarjea” plant, Lima, Peru. Period 1985-2002. *Rev Gastroenterol Peru* 2004; 24(3):223-9.
54. Adams B L, Bates T C, Oliver J D. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69(12):7462–7466.
55. Azevedo N F, Pacheco A P, Vieira MJ, Keevil, C W. Nutrient shock and incubation atmosphere influence recovery of culturable *Helicobacter pylori* from water. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70(1): 490–493.
56. Shahamat M, Mai U, PaszkoKolva C, Kessel M, Colwell R R. Use of Autoradiography to Assess Viability of *Helicobacter Pylori* in Water. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; 59(4):1231–1235.
57. Azevedo N, Pacheco A, Keevil C, Vieira M. Adhesion of water stressed *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces. *Journal of Applied Microbiology* 2006; 101(3):718–724.
58. Oliver, J. 2005. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology.* 43(S):93-100.
59. Azevedo N F, Pinto A R, Reis N M, Vieira M J, Keevil C W. Shear stress, temperature, and inoculation concentration influence the adhesion of water–stressed *Helicobacter pylori* to stainless steel 304 and polypropylene. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; 72(4): 2936–2941.
60. Azevedo N F, Vieira M J, Keevil C W. Establishment of a continuous model system to study *Helicobacter pylori* survival in potable water biofilms. *Water science & technology* 2003; 47(5):155–160.
61. Simoes L. C, Azebedo N, Pacheco A, Keevil C. W, Vieira M. J. Drinking water biofilm assessment of total and culturable bacteria under different operating conditions. *Biofouling* 2006; 22 (1-2):91-99.
62. Pardi G. Determinantes de Patogenicidad de *Candida Albicans*. *Acta Odontológica Venezolana* 2002; 40(2):185-192.
63. Boaretti M, Del Mar M, Bonato B, Signoretto C, Canepari P. Involvement of rpoS in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state, *Environ. Microbiol* 2003; 5: 986–996.
64. Fux C, Costerton J, Stewart P, Stoodley, P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005; 13(1):34-40.
65. Touati E, Michel V, Thiberge J, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* 2003; 124 (5):1408 – 1419.
66. She F F, Lin J Y, Liu J Y, Huang C, Su D H. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World Journal of Gastroenterology* 2003; 9 (3):516-520.
67. Baker K, Hegarty J, Redmond B, Reed N, Herson D. Effect of Oxidizing Disinfectants (Chlorine, Monochloramine, and Ozone) on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68(2):981-984.
68. Johnson, C; Rice, E; Reasoner, D. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63(12):4969-4970.
69. Chiu H, Lin H, Wang J. Identification and Characterization of an Organic Solvent Tolerance Gene in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2007; 12(1):74-81.
70. Mazari M, López Y, Castillo G, Ponce S, Cravioto A. *Helicobacter pylori* and Other Enteric Bacteria in Freshwater Environments in Mexico City. *Water Sci Technol* 2001; 32(5):458-476.
71. Kowolick M, Dowsett S, Archila L, Solorzano A, López, B, Mendoza C. Water and biofilm transmission of *Helicobacter pylori* in rural guatemalan households. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2005; 41(4):554-555.
72. Ulrike E, Rolle-K F, Ulrike D, Lehmann I, Richter M, Herbarth O. Well water – one source of *Helicobacter*

- pylori colonization. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2004; 207 (4):363-368.
73. Reavis C. Rural Health Alert: *Helicobacter pylori* in Well Water. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioner* 2005; 17 (7):283 – 289.
74. Bragança, S, Azevedo N F, Simões, L C, Keevil C, Vieira M. Use of fluorescent in situ hybridisation for the visualisation of *Helicobacter pylori* in real drinking water biofilms. *Water Science & Technology* 2007; 55 (8-9): 387-393.
75. Baker, K; Hegarty, J. Presence of *Helicobacter pylori* in Drinking Water is Associated with Clinical Infection. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2001. 33(10):744-746(3)
76. Gião M. Survival of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori* in drinking water after chlorination. *International Symposium on Microbial Ecology* 2006, 11, Vienna, Austria.
77. Karita M, Teramukai S, Matsumoto S. Risk of *Helicobacter pylori* Transmission from Drinking Well Water Is Higher Than That from Infected Intrafamilial Members in Japan. *Digestive and Disease Sciences* 2003; 48(6):1062-1067.
78. Organización Panamericana de la Salud. *Calidad del agua potable en Costa Rica: Situación actual y perspectivas*, 2004.
79. Mendall M, Goggin P, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D. *Helicobacter pylori* Seroprevalence in Patients with Coronary Artery Disease. *Digestive Diseases and Sciences* 2005; 50(11): 2071-2074.
80. Kür ad K, Cengiz B, U ur A, Türker Ç, Ferit A, Gül en, M, et al. *Helicobacter pylori*—Is It a Novel Causative Agent in Vitamin B12 Deficiency? *Arch Intern Med*. 2000. 160:1349-1353.
81. Tsang K, Lam S. *Helicobacter pylori* and extra-digestive diseases *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1999; 14(9):844- 850.