

# ***Helicobacter pylori* en Costa Rica, más de una década de investigaciones**

## ***Helicobacter pylori* in Costa Rica, more than a decade of research**

Virginia Montero-Campos<sup>1</sup>

---

Montero-Campos, V. *Helicobacter pylori* en Costa Rica, más de una década de investigaciones. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 94-103.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4636>

<sup>1</sup> Microbióloga. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Correo electrónico: [vmontero@itcr.ac.cr](mailto:vmontero@itcr.ac.cr).  
 <https://orcid.org/0000-0002-2666-5030>



## Palabras clave

*Helicobacter pylori*; agua potable; cáncer gástrico; *glmM*.

## Resumen

En investigaciones realizadas en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) en agua de consumo humano de Costa Rica, se analizó un total de 112 muestras de agua potable de 20 cantones situados en áreas de baja y alta incidencia de cáncer gástrico del país. Se logró el cultivo exitoso y la identificación molecular de la bacteria *Helicobacter pylori* con el marcador *glmM* en el 39% de las muestras de áreas de alta incidencia y en el 7.5% de las muestras de áreas de baja incidencia. Además, se analizaron muestras de agua potable ( $n = 44$ ) de acueductos costarricense con tratamiento de cloración en áreas seleccionadas con alta prevalencia de cáncer gástrico, así como muestras de agua de consumo humano de Panamá ( $n = 44$ ) de acueductos que suministran agua no tratada para consumo humano en la provincia de Chiriquí. En el caso de las muestras de Costa Rica, se determinó que el 79.5% de las muestras fue positivo para *H. pylori*; eliminando valores atípicos, la cuantificación de las bacterias se determinó en  $3,6 \times 10^3$  copias/100 mL de agua. Para Panamá, se determinó que el 86% de las muestras fueron positivas para la presencia de *H. pylori* con un valor de  $3.3 \times 10^2$  copias/100 mL agua. La diferencia en los valores entre los acueductos en ambos países reveló una distribución ambiental de las bacterias de interés epidemiológico en cada caso, que puede explicar la diferencia entre las tasas de cáncer gástrico entre ambos países.

## Keywords

*Helicobacter pylori*; drinking water; gastric cancer; *glmM*.

## Abstract

Research conducted at the Biotechnology Research Center (CIB) in water for human consumption from Costa Rica, a total of 112 drinking water samples from 20 cantons located in areas of low and high incidence of gastric cancer in the country were analyzed; successful culture and molecular identification of *Helicobacter pylori* with the *glmM* marker in 39% of the samples from high incidence areas and in 7.5% of the samples from low incidence areas was achieved. In addition, drinking water samples ( $n = 44$ ) of Costa Rican aqueducts with chlorination treatment in selected areas with high prevalence of gastric cancer were also analyzed, as well as samples of water for human consumption from Panama ( $n = 44$ ) of aqueducts that supply water not treated for human consumption in the province of Chiriquí. In the case of samples from Costa Rica, it was determined that 79.5% of the samples were positive for *H. pylori*; eliminating atypical values, the quantification of the bacteria was determined in  $3.6 \times 10^3$  copies/100 mL of water. It was determined for Panama that 86% of the samples were positive for the presence of *H. pylori* with a value of  $3.3 \times 10^2$  copies/100 mL water. The difference in values between the aqueducts in both countries revealed an environmental distribution of the bacteria of epidemiological interest in each case that can explain the difference between gastric cancer rates between both countries.

## Introducción

La infección con *Helicobacter pylori* está catalogada como un agente carcinogénico tipo I (carcinógeno en humanos) por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por

sus siglas en inglés), esto es: la única bacteria en el mundo capaz de producir cáncer basado en la evidencia científica en seres humanos y/o animales de experimentación [1].

Se considera que la bacteria 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. Sin embargo, no todos los países que poseen alta tasa de incidencia de la bacteria en su población poseen altos índices de cáncer gástrico; factores de patogenicidad de la bacteria, factores ambientales del entorno propio de los países y naturaleza genética poblacional, son factores que se mezclan para producir una patología específica en la población [2].

En investigaciones realizadas en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), se ha trabajado desde el año 2007 con esta bacteria. En el presente artículo, se resume que, a partir de estas investigaciones, se logró el cultivo e identificación molecular de la bacteria, reconociendo que del agua se puede aislar de forma viable y cultivable, lo cual a la fecha muy pocos investigadores han logrado en el mundo; posteriormente se cuantificó el número de copias de bacterias del agua de consumo comparándose entre calidades de agua de Costa Rica y Panamá.

## Infeción de la bacteria

En circunstancias definidas bajo la relación hospedero-parásito, la presencia de *H. pylori* 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 [2].

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. Esto implica que los episodios de transmisión pueden pasar inadvertidos dificultando el seguimiento de la adquisición y su abordaje epidemiológico. Siendo que el cultivo y el aislamiento de *H. pylori* son relativamente difíciles comparados con otras bacterias de importancia clínica, su identificación solo puede ser molecular dada su relativa facilidad para confundirse con otros microorganismos tanto de la microbiota (en biopsias gástricas) como del ambiente (en muestras de agua) [3].

De acuerdo con lo que presenta la literatura y la relación de la bacteria con cáncer gástrico, se presenta que en gastritis predominante antral, la producción de ácido gástrico se incrementa (hiperclorhidria), y se asocia con un alto riesgo de desarrollar úlcera duodenal, pero de protección contra el desarrollo de cáncer gástrico. Por el contrario, la gastritis predominante en el cuerpo del estómago conduce a una menor producción de ácido gástrico (hipoclorhidria) y puede conducir a una gastritis atrófica, una afección que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer gástrico y la condición hipoclorhídrica crea un entorno adecuado para otros microorganismos que puedan entrar y colonizar el estómago. Algunas de estas bacterias son reductoras de nitrógeno, capaces de producir compuestos N-nitrosos cancerígenos a través de la conversión de nitratos o nitritos de la saliva [4].

En un estudio basado en enfoques moleculares, *H. pylori* se detectó en sujetos que se consideraron negativos basados en métodos de cultivo o serológicos tradicionales. La baja abundancia de *H. pylori* está en concordancia con lo que se ha informado anteriormente de acuerdo a la hipoclorhidria del estómago de algunos pacientes [5].

Avances en tecnologías de secuenciación de ADN han descrito comunidades complejas de bacterias no cultivables en el estómago humano. La interacción entre estos habitantes, conocidos colectivamente como la microbiota gástrica y *Helicobacter pylori*, impacta la inmunobiología gástrica y posiblemente el progreso al estado de enfermedad de los pacientes; por lo tanto, la caracterización de la microbiota gástrica en sujetos con y sin infección por *H. pylori* podría proporcionar una nueva perspectiva de la homeostasis gástrica y la patogénesis de la enfermedad asociada a *H. pylori*, incluido el cáncer gástrico [6]. No obstante, ambos roles aún no están claramente establecidos [4].

Con respecto a su comportamiento en el agua, es bien reconocida su habilidad para formar biofilmes o biopelículas, 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 la bacteria retiene su morfología espiralar [7]. Lo anterior es importante por cuanto se podría considerar reservorio en sistemas de distribución de agua potable.

Por algún tiempo se consideró que muchos de los problemas que se han encontrado en la recuperación de formas viables de la bacteria en el agua, se debía a que estas pasan a formas cocoides o viables pero no cultivables (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 [8], [9].

Se presenta evidencia sobre la mayor resistencia de *H. pylori* con respecto a *Escherichia coli* al cloro, a las cloraminas y al ozono [10], considerándose esta bacteria capaz de tolerar desinfección en sistemas de distribución de agua y ser un problema en la salud pública [11]. Dado lo anterior las condiciones de saneamiento poblacional se consideran un determinante en la adquisición de la infección [12].

## Investigaciones en el Centro de Investigación en Biotecnología

En una investigación en agua de consumo humano en Costa Rica [3], se analizaron muestras de agua potable de 20 cantones del país ubicados en áreas de baja y alta incidencia de cáncer gástrico, se utilizó el marcador glmM, y la proteína inductora del factor de necrosis tumoral alfa (T $\alpha$  TNF- $\alpha$ ) como marcador de patogenicidad de las cepas encontradas. Se recopiló información sobre la gestión del agua por los entes operadores de acueductos para establecer relaciones estadísticas. Se analizaron un total de 112 muestras de agua y se logró identificar la bacteria en el 39% de las muestras de agua de áreas de alta incidencia y en el 7.5% de las muestras de áreas de baja incidencia. Se secuenciaron dos productos de PCR del *gen glmM*, confirmándose como verdaderos positivos. La tasa de prevalencia más alta de *Helicobacter pylori* se encontró en el agua de áreas con una alta incidencia de cáncer gástrico.

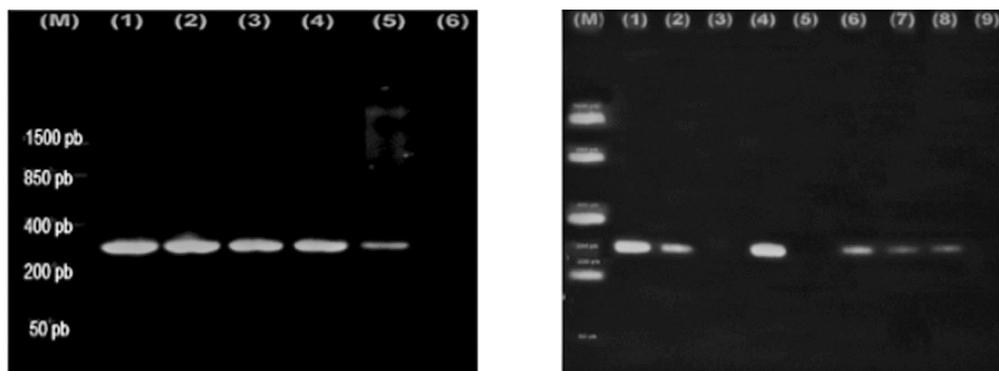
Se establecieron correlaciones estadísticas significativas entre las condiciones ambientales, el manejo del agua potable y la incidencia de cáncer gástrico. Uno de los hallazgos tuvo que ver con las diferencias de altitud (msnm) y la tasa de incidencia de la enfermedad en Costa Rica.

Estas diferencias fueron importantes con un coeficiente de correlación = 0,86. Luego se realizaron comparaciones entre la tasa de incidencia de cáncer gástrico en los cantones estudiados y la altitud, la temperatura ambiental, la fuente de agua y el operador del acueducto que suministra agua a la población. Todas las variables se analizaron estadísticamente utilizando SPSS 16.0 y se establecieron correlaciones significativas e importantes utilizando análisis de correlación de Pearson, obteniéndose que para Costa Rica la tasa de prevalencia de cáncer gástrico se relaciona con la altura y la temperatura ambiental, esto es a mayor altura y menor temperatura ambiental mayor tasa de prevalencia de la enfermedad ( $r = 0,867$  y  $r = -0,853$

respectivamente); además se logró establecer que entre la temperatura ambiental baja y la tasa de prevalencia de cáncer gástrico hay una relación de interdependencia de variables o sea que una variable explica a la otra, esto es a menor temperatura mayor tasa de la enfermedad (coeficiente de regresión lineal de  $r^2 = 0.728$ ).

Se estableció también la relación de la enfermedad con el uso de fuentes de agua como naciente entre las poblaciones de alta y baja incidencia de cáncer gástrico del país ( $r = 0.651$ ), relacionándose directamente con el operador del acueducto mediante una prueba exacta de Fisher estableciéndose que esta relación no es casual.

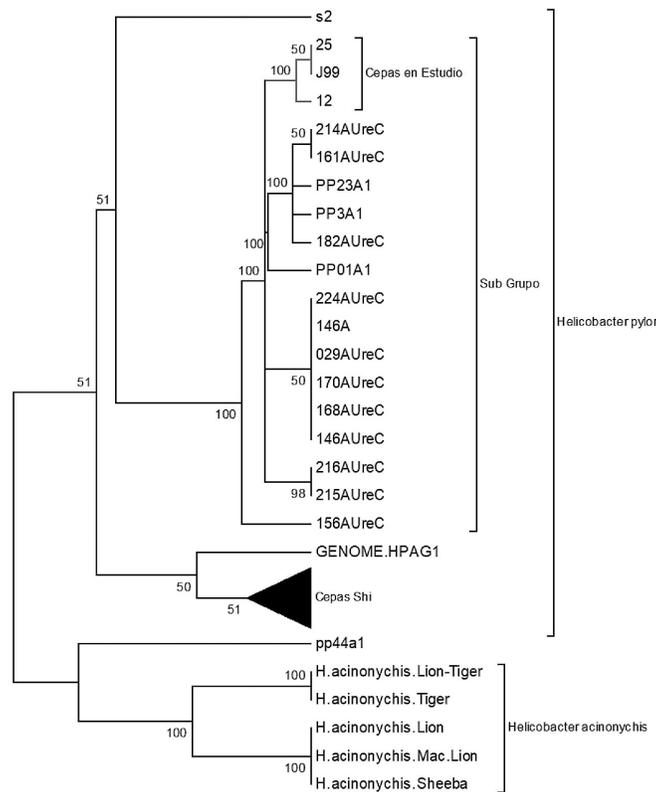
En el año 2014 la investigación titulada: “Culture and Molecular Identification of *Helicobacter pylori* in Drinking Water from Areas of High and Low Incidence of Gastric Cancer in Costa Rica” [13], demostró la capacidad de cultivo de la bacteria en agua para consumo humano. La muestra de agua fue concentrada (1 L) y posteriormente el filtro de nitrocelulosa fue cultivado a 35 °C por 72 horas en medio líquido con antibióticos en microaerofilia, el filtro fue cultivado en forma de curva tratando de retener las bacterias adheridas al mismo. Posterior a esto el crecimiento fue extraído de la zona cercana al filtro y se extrajo el ADN del medio, se evaluaron entonces los marcadores *glmM* y las muestras positivas para dicho marcador se les determinó el marcador TNF- $\alpha$  (figura 1).



**Figura 1.** Visualización de productos de PCR para *glmM* (294 pb). Izquierda: (M) Fast Ruler Low Rangemarker; (1) cepa Hp 12455; (2) cepa J99; (3) *H. p* ATCC 51932; (4) *H. pylori* ATCC 700392; (5) muestra +; (6) Control: agua. Derecha: (1) *H. pylori* ATCC 700392; (2) *H. pylori* ATCC 51932; (3) *E. coli*; de la (4) a la (8) muestras +; (9) Control: agua.

Dos muestras positivas fueron escogidas para enviarlas a secuenciación molecular a Macrogen Corporation, Rockville, Maryland, USA confirmándose que las cepas eran verdaderos aislamientos de *Helicobacter pylori*. La figura 2 explica las relaciones filogenéticas de las cepas secuenciadas en un árbol de máxima parsimonia (35:209); este árbol filogenético fue construido utilizando sitios informativos. Los números utilizados se refieren a porcentajes y la longitud de la línea indica distancias y diferencias en el ADN, estableciéndose la cercanía genética entre cepas de bacteria reportadas en el banco de cepas en Estados Unidos, dicho dendrograma se aprecia bajo la figura 2.

Una observación importante a esta bacteria es que, a pesar de que puede ser transmitida por agua, es incapaz de crecer en cultivo líquido como cualquier otra bacteria, por esto es que sólo se pudo obtener cultivos positivos si la bacteria estaba adherida al papel de filtro; ya fue discutido anteriormente la imperiosa necesidad de crecer como biofilme.



**Figura 2.** Árbol de máxima parsimonia que muestra la relación filogenética de las cepas secuenciadas en estudio (rojo), por el gen *glmM*.

Otro proyecto ejecutado en el CIB [14], tuvo como objetivo cuantificar las copias de la bacteria en muestras de agua de Costa Rica y Panamá. Se trabajó con muestras de Costa Rica tratadas con cloro ( $n = 44$ ) de áreas seleccionadas con alta prevalencia de cáncer gástrico, que correspondían a los cantones de: Central, Oreamuno y Paraíso de Cartago. También se analizaron muestras de agua de consumo humano de Panamá ( $n = 44$ ) de acueductos que suministran agua sin cloración de la provincia de Chiriquí. Se buscó el marcador molecular de *H. pylori*, *glmM* utilizando el equipo LightCycler® 480 II (LC480II) de Roche Diagnostics GmbH, así como el Análisis de Cuantificación Absoluta por medio del Método de la Segunda Derivada Máxima.

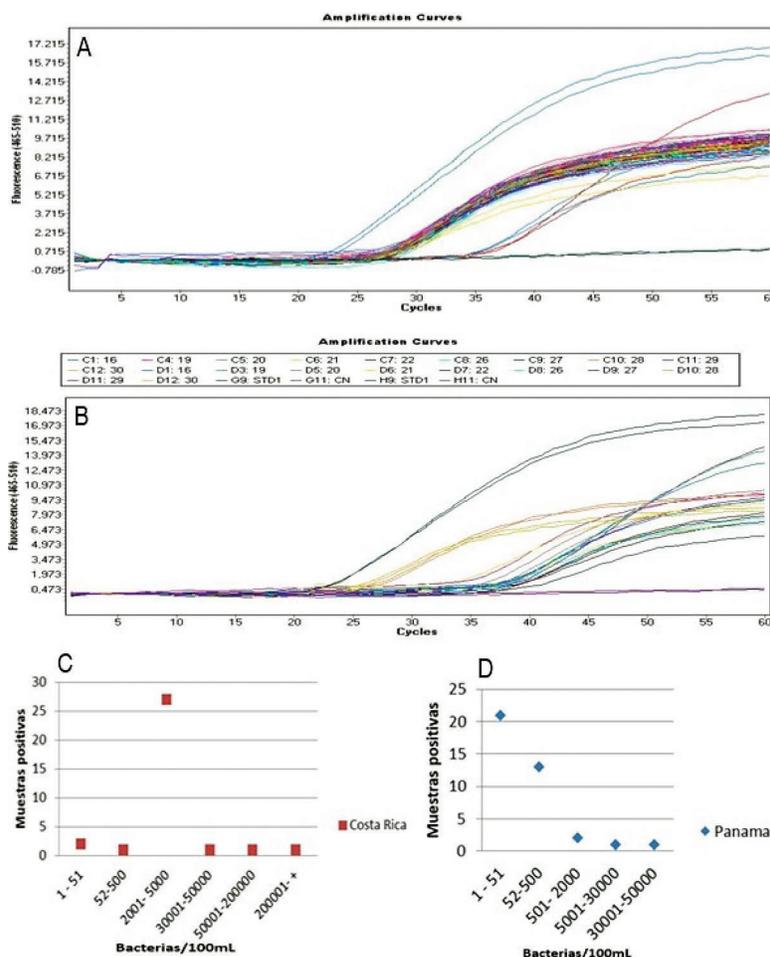
En las muestras de Costa Rica, se determinó que el 79.5% estaban positivas con el marcador *glmM* para *H. pylori*; eliminando valores que distorsionaban el promedio de cuantificación de la bacteria (por ser extraordinariamente altos), se determinó que la misma tenía como promedio  $3,6 \times 10^3$  copias/100 mL; mientras que en el caso de las muestras procedentes de Panamá se determinó que el 86% fueron positivas para la presencia de la bacteria, eliminando valores atípicos se determinó un promedio de  $3,3 \times 10^2$  copias/100 mL; siendo que la diferencia en los valores entre acueductos en ambos países reveló una distribución ambiental de las bacterias de interés epidemiológico en cada caso.

Según los resultados de esta investigación, aunque el agua en zonas de alta incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica es dispensada a la población por los municipios o ASADAS (Asociaciones Administradoras de los Sistemas de Acueductos y Alcantarillados Comunes) y es considerada de muy buena calidad basado en la presencia o ausencia de coliformes fecales, se pudo determinar que en algunos casos aunque el Ente Operador cloraba continuamente en el sitio del tratamiento, en algunos lugares distantes este cloro residual no llegaba al agua de

consumo de la población, determinándose en muchos casos que los tratamientos de cloración aplicados demostraban ser insuficientes y con concentraciones importantes de bacterias viables de *H. pylori* que aún permanecían en el agua.

Aunado a lo anterior, en esos muestreos puntuales en algunos casos se determinó una turbidez aparente superior a 5 NTU (unidades nefelométricas de turbiedad), que es el máximo permitido por el Reglamento de Calidad del Agua en Costa Rica [15]. Los sólidos en suspensión, como las partículas del suelo, pueden servir para ocultar las bacterias. El actual Reglamento de calidad del agua propone tratar el agua con cloro residual de 0.1 mg/L a 0.3 mg/L; sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, esta concentración es totalmente insuficiente para erradicar por completo a *H. pylori*.

Panamá presenta proporcionalmente mucho menores tasas de cáncer gástrico que Costa Rica a la fecha del artículo original [14], que son 10 casos por 100.000 habitantes, contrastado con Costa Rica para la fecha de ese artículo con respecto a datos estadísticos disponibles de 2003 para hombres de 31.87 casos por 100,000 habitantes y 17.42 casos por 100,000 habitantes para mujeres en el mismo año (figura 3).



**Figura 3.** A- Superior: Gráficas del equipo para muestras positivas de Costa Rica, curvas superiores control positivo, líneas inferiores controles negativos; B- Gráficas del equipo para muestras positivas Panamá, curvas superiores control positivo, líneas inferiores controles negativos; C y D Cantidad de bacterias de manera comparativa para muestras positivas de Costa Rica y Panamá.

En un trabajo presentado en el VI Simposio Internacional de *Helicobacter pylori*, San José, Costa Rica en el año 2014, llevada a cabo sobre Prevalencia de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas de pacientes dispépticos de zonas de alta y baja incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica [16], se analizó 135 biopsias de pacientes dispépticos de los cantones de Abangares de Guanacaste y Paraíso de Cartago, como zonas de baja y alta incidencia respectivamente. Las biopsias fueron tomadas de antro y cuerpo gástricos, se procedió al cultivo para la posterior identificación molecular de *Helicobacter pylori* con el marcador glmM y como marcador de patogenicidad de las cepas encontradas se utilizó la proteína inductora del factor de necrosis tumoral alfa (Tipalpha FNT- $\alpha$ ), y el marcador *cag A* (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Tamaños de los productos y secuencias de los marcadores glmM, *cag A*, TNF- $\alpha$ .

Región a amplificar	Tamaño del producto de PCR (pb)	Secuencias de los iniciadores 5' – 3'
glmM	294	AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC
<i>cagA</i>	128	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA AGAAACAAAAGCAATACGATCATT
Tipalpha (TNF- $\alpha$ )	273	sFd 5'CACGCAAGGGGTGGATAGC 3'

Se pudo observar que, en los cultivos bifásicos iniciales de la biopsia, se pudo obtener otros crecimientos diferentes a *Helicobacter pylori*, notándose que la bacteria se coloca debajo de la flora acompañante, en la parte inclinada del agar probablemente evitando el acceso de oxígeno.

Se pudo obtener que algunas de estas otras colonias en crecimiento en las biopsias algunos aislamientos son ureasa positiva y oxidasa positiva, por lo que la identificación de las colonias aisladas solamente debe darse a través de pruebas moleculares.

Para dicha investigación se obtuvo que la bacteria por análisis moleculares solamente fue encontrada entre el 40% y el 56% de pacientes dispépticos de zonas de baja y alta incidencia de cáncer gástrico respectivamente. No se encontró diferencia de patogenicidad en las cepas entre ambos lugares.

## Conclusiones

Al reconocer que el medio ambiente juega un rol preponderante en la adquisición de la bacteria y la asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* de forma crónica y el riesgo elevado de desarrollar diversas patologías gástricas incluido cáncer gástrico si no se atiende la infección a tiempo; toman entonces especial importancia las condiciones de saneamiento ambiental y el nivel socioeconómico general, tales como acceso al agua potable adecuadamente tratada, educación de la población en hábitos saludables, y conocimiento y prevención del riesgo de patologías gástricas típicas de poblaciones específicas.

Aunado a lo anterior, la población costarricense cuenta con una susceptibilidad genética o polimorfismos proinflamatorios de interleucinas donde la respuesta inflamatoria contribuye a la patogénesis del problema gástrico, dentro del grupo de personas infectadas por *H. pylori*, específicamente las que presentan determinados polimorfismos del gen IL-1 $\beta$  +3954 [17]. El



antígeno Lewis b, que es un fucosil, es el receptor de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica. En un estudio de hace algunos años de León y colaboradores [18], se encontró que el factor de Lewis b, está presente en un 72.4% de la población costarricense; lo que significa que la bacteria puede sentirse mucho “más cómoda” en los estómagos de los costarricenses y con esto promover infecciones crónicas o de largo plazo.

Se comprobó la no correlación entre presencia de *H. pylori* y contaminación fecal en las aguas que abastecen los cantones de las zonas de alta incidencia.

Se describieron por primera vez relaciones geográficas importantes y significativas entre prevalencia de cáncer gástrico y altura, temperatura, origen del agua como naciente y Ente Operador del Acueducto, lo que propone relacionar de forma diferenciada, presencia de *H. pylori* de origen ambiental y alta prevalencia de cáncer gástrico para los cantones de la provincia de Cartago investigados con respecto a los cantones de Guanacaste de muy baja prevalencia.

## Agradecimientos

Un especial agradecimiento a mis compañeros investigadores que a lo largo de estos años han contribuido con su trabajo y su experiencia a este tema tan importante para la población costarricense: MSc. Alejandro Hernández, Ph.D, MD Sergio Con Chin, Dr Jorge Camacho, Dr Federico Masís, Ph.D Fernando García, MSc Benedicto Valdes, MSc Monserrat Jarquín. A mis asistentes en ese momento estudiantes, hoy Ingenieros en Biotecnología: Ing Milena González, Ing, José Pablo Cerdas, Ing Shirley Arias, Ing Gustavo López, Ing Karina Barboza, Ing Jimena Orozco.

## Referencias

- [1] IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. International Agency for Research on Cancer. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> Consultado 15 de marzo de 2019.
- [2] V. Montero. “Enfoques ambientales en la epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*”. *Rev Costarr Salud Pública*; vol 18, pp 84-93. Noviembre 2009.
- [3] V.Montero, A. Hernández, F. Masís, Camacho, J; García, F; Barboza, et al. “Hallazgo de la bacteria *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano y su relación con la incidencia de cáncer gástrico en Costa Rica”. *Tecnología en Marcha*, vol. 24 (3), pp 3-14. Octubre 2011
- [4] J. Dicksved , M. Lindberg, M. Rosenquist, H. Enroth, J.K. Jansson, L. Engstrand. “Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls”. *Journal of Medical Microbiology*, vol 58, pp 509–516. April 2009. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.007302->
- [5] E. Bik, P. Eckburg, S. Gill, S. Nelson, E. Purdom, F. Francois, et al. “Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach” .*Proc Natl Acad Sci U S A*, vol 103, pp 732–737. Jan 2006.
- [6] K. Brawner, C. Morrow, P. Smith. “Gastric Microbiome and Gastric Cancer”. *Cancer Journal*, vol 20, pp 211-216. May 2014 <http://dx.doi.org/10.1097/PPO.0000000000000043>
- [7] N. Azevedo, A. Pinto, N. Reis, M. Vieira, J. Keevil . “Shear stress, temperature, and inoculation concentration influence the adhesion of water–stressed *Helicobacter pylori* to stainless steel 304 and polypropylene”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 72(4), pp 2936-2941. April 2006.
- [8] E. Touati, V. Michel, J. Thiberge, N. Wuscher, M. Huerre, A. Labigne A. “Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice”. *Gastroenterology* .,vol 124 (5) pp 1408 – 1419, May 2003.
- [9] F. She, J. Y.Lin, J.Y. Liu, C. Huang, D.H. Su. “Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice”. *World Journal of Gastroenterology*; vol 9 (3), pp 516-520, Mar 2003
- [10] K. Baker, J. Hegarty, B. Redmond, N. Reed, D. Herson. “Effect of Oxidizing Disinfectants (Chlorine, Monochloramine, and Ozone) on *Helicobacter pylori*”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 68(2), pp 981-984, Feb 2002.

- [11] P. Krumbiegel, I. Lehmann, A. Alfreide, G. Fritz, D. Boeckler D, U. Rolle-Kampczyk "Helicobacter pylori determination in non-municipal drinking water and epidemiological findings". *Isotopes Environ Health Stud*, vol 40(1), pp 75-80, Mar 2004.
- [12] N. Azevedo, N. Guimaraes, C. Figueiredo, C. Keevil, M.J. Vieira. "A New Model for the Transmission of Helicobacter pylori: Role of Environmental Reservoirs as Gene Pools to Increase Strain Diversity". *Critical Reviews in Microbiology*, vol 33, pp157-169, (2007).
- [13] V. Montero, A. Hernández, J. Camacho. "Culture and Molecular Identification of Helicobacter pylori in Drinking Water from Areas of High and Low Incidence of Gastric Cancer in Costa Rica". *Open Journal of Medical Microbiology*, vol 4, pp 261-269. Dec 2014. <http://dx.doi.org/10.4236/ojmm.2014.44030>
- [14] V. Montero, S. Arias, B. Valdés, M. Jarquín. "Quantitative Detection of Helicobacter pylori by Real Time PCR in Drinking Water—Environmental and Public Health Risk Significance". *Open Journal of Medical Microbiology*, vol 5, pp 118-127. Oct 2015. <http://dx.doi.org/10.4236/ojmm.2015.53015>
- [15] Reglamento para la calidad del Agua Potable. Decreto Ejecutivo 38924. Sistema costarricense de información jurídica. 12/01/2015. Disponible en <http://www.pgrweb.go.cr>
- [16] V. Montero, S. Con Wong, M. González, A. Hernández. "Prevalence of H. pylori in gastric biopsies of dyspeptic patients in areas of high and low incidence of gastric cancer in Costa Rica". VI Simposio Internacional de Helicobacter pylori, San José, Costa Rica. INISA, Universidad de Costa Rica. 2014.
- [17] S. Con, H. Takeuchi, G Con-Chin, V. Con-Chin, N. Yasuda, and R. Con-Wong. "Role of bacterial and genetic factors in gastric cancer in Costa Rica". *World J Gastroenterol*. 15(2): 211–218. Jan 2009. doi: 10.3748/wjg.15.211
- [18] R. León R, R. Marín R, A. Morales. Inmunohematología Avanzada. Distribución de fenotipos y genotipos del sistema de Lewis en Costa Rica 1999. Universidad de Costa Rica.