



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**Estudio del papel de las amebas de vida libre
como reservorio de *Helicobacter pylori* y otras
bacterias patógenas en aguas y alimentos
mediante técnicas moleculares**

TESIS DOCTORAL

Doctorado en Biotecnología

Presentada por:

Laura Moreno Mesonero

Dirigida por:

Dra. Yolanda Moreno Trigos

Dra. M^a Antonia Ferrús Pérez

Valencia, septiembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis, M^a Antonia Ferrús y Yolanda Moreno, el haber confiado en mí para llevar a cabo este gran reto. Gracias por guiarme en la realización de este trabajo, por todo vuestro tiempo, esfuerzo, dedicación, y, lo más importante, transmitirme vuestra pasión por la investigación. Creedme que se contagia.

Gracias también al Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente, por acogerme como una más desde el primer día. Siempre me he sentido como en casa, y, así, las cosas son mucho más fáciles. En especial a José Luis y a Inma, que siempre han tenido tiempo para explicarme y ayudarme en cualquier cosa o, simplemente, hablar de la vida. Junto con Yolanda, quiero agradecerlos el haber confiado en mí para participar en los proyectos de investigación. He aprendido muchísimo, siempre de vuestra mano. Muchas gracias también por haberme permitido viajar con vosotros a los diferentes congresos y reuniones de proyectos, ya que así he podido conocer otra parte de la investigación. Sin vuestra predisposición no hubiera sido posible.

También quisiera agradecer a todos los compañeros de laboratorio que me han acompañado durante este camino. Julián, Andrés, Patri, Irene Hortelano, Irene Cañigral, Paula Santiago, Paula Barbarroja, Fidson, Mariela y todos aquellos que habéis pasado por el IIAMA. Sin vosotros esta aventura no hubiera sido igual. En especial a Julián, sabes que me llevo un gran amigo.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia todo el apoyo incondicional que me han dado siempre. En especial a mi madre y a mi hermana, que siempre me han apoyado aunque no entiendan muy bien lo que hago con los bichitos. Y, como no, a Carlos, mi marido, por apoyarme incondicionalmente siempre, por tu paciencia, tus ánimos, por entender mis largos días frente al ordenador, y, sobre todo, por creer en mí. Un trocito de este trabajo es tuyo, lo sabes. Durante la tesis hemos vivido juntos muchos cambios, cambios muy bonitos y muy felices. Y, para que así siga siendo, te la dedico a ti.

RESUMEN

El incremento de la población y la escasez de recursos hídricos naturales debido a la escasa pluviometría irregularmente distribuida en el tiempo, como ocurre en las regiones mediterráneas, hacen necesaria la reutilización de las aguas residuales. Antes de ser tratadas, estas aguas contienen materia orgánica que ofrece un sustrato idóneo para el desarrollo de toda clase de microorganismos, muchos de los cuales son patógenos.

Por otra parte, el agua potable se obtiene a partir de agua natural o cruda captada en ríos, lagunas, pozos, manantiales o pantanos, las cuales también pueden contener microorganismos patógenos. Debido a esto, es de suma importancia realizar un correcto tratamiento de esta agua para evitar la transmisión de enfermedades.

De entre todos los patógenos emergentes en aguas, *H. pylori* es uno de los que mayor interés despierta en estos momentos, ya que su epidemiología aún no está clara.

La infección por *H. pylori* puede conducir al desarrollo de gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico. De hecho, la bacteria está clasificada como agente biológico carcinógeno para el ser humano de categoría 1. Se ha sugerido que *H. pylori* puede ser adquirida mediante diferentes vías de transmisión, entre las que destaca el agua.

Por otra parte, las amebas de vida libre (FLA) son un grupo heterogéneo de protozoos ubicuos que, además de contener especies patógenas, pueden actuar como “Caballos de Troya” para bacterias resistentes a las amebas (ARB). De esta forma, las ARB pasarían desapercibidas frente a la primera línea de defensa de un organismo. La interacción *H. pylori*-FLA ha sido demostrada en dos procesos *in vitro*, aunque la viabilidad de la bacteria no se ha demostrado tras el proceso.

Por tanto, en esta Tesis se estudia el posible papel de las FLA como reservorio de *H. pylori* y otras bacterias patógenas en aguas y alimentos mediante técnicas moleculares.

En primer lugar se realizó un ensayo de cocultivo entre la bacteria *H. pylori* y la ameba *Acanthamoeba castellanii*. Se comprobó, mediante técnicas moleculares específicas para la detección de células viables, PMA-qPCR y DVC-FISH, que la ameba

es capaz de internalizar a la bacteria y que esta última permanece viable, demostrando que *H. pylori* se comporta como una bacteria ARB.

Seguidamente, se analizaron un total de 120 muestras ambientales, 100 de agua y 20 de vegetales para comprobar la presencia, tanto de FLA como de *H. pylori* internalizado en estas FLA.

En el caso de las muestras de agua, se analizaron 69 muestras de agua residual y 31 de agua potable. Un total de 55 (79,7%) muestras de agua residual y 12 (38,7%) de agua potable resultaron positivas para la presencia de FLA. Mediante la técnica PMA-qPCR se demostró la presencia de *H. pylori* internalizado en las FLA presentes en 28 (50,9%) y 11 (91,7%) de las muestras de agua residual y potable analizadas, respectivamente. Mediante DVC-FISH se demostró que las células de *H. pylori* internalizadas dentro de las FLA presentes en las muestras eran viables en 16 (29,5%) y 5 (41,7%) de las muestras de agua residual y potable analizadas, respectivamente. Además, se consiguió recuperar formas viables cultivables de *H. pylori* procedente del interior de FLA en 10 (18,2%) de las muestras de agua residual analizadas. Las FLA aisladas e identificadas en las aguas residuales pertenecieron a los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vanellidae* y a la familia Vahlkampfiidae. En el caso del agua potable, las FLA aisladas e identificadas pertenecieron a los géneros *Acanthamoeba*, *Echinamoeba* y *Vermamoeba*.

En el caso de las muestras de vegetales, concretamente lechugas, todas ellas resultaron positivas para el aislamiento de FLA (100%). Mediante la técnica PMA-qPCR se demostró la presencia de *H. pylori* internalizado en las FLA en 11 (55,0%) de las muestras y, mediante DVC-FISH, se demostró que las células de *H. pylori* internalizadas dentro de las FLA eran viables en 5 (25,0%) de las muestras. En este caso no se recuperaron formas viables cultivables de la bacteria.

Finalmente, mediante metagenómica de secuenciación dirigida, se analizó el microbioma de las FLA presentes en 20 de las muestras analizadas en esta Tesis (11 de agua residual, 3 de agua potable y 6 de lechugas). Para ello, se eligieron los iniciadores, se evaluaron *in silico* e *in vitro* y, una vez comprobada su idoneidad, se emplearon para la secuenciación de las muestras.

En los tres tipos de muestras, la clase bacteriana más abundante fue la Gammaproteobacteria. Para los tres tipos de muestras, los filos más abundantes de las bacterias del microbioma de las FLA fueron Proteobacteria y Bacteroidetes y, en el caso del agua residual, también lo fue el filo Planctomycetes. *H. pylori* se detectó mediante esta técnica en los tres tipos de muestra. Además, como parte del microbioma de FLA de muestras ambientales, se detectaron otras bacterias de interés para la salud pública, tales como *Aeromonas*, *Legionella*, *Mycobacterium* o *Pseudomonas*.

Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran la presencia de FLA patógenas en las muestras ambientales, así como el hecho de que, en algunos casos, estas son transportadoras de bacterias patógenas.

Este trabajo también confirma que *H. pylori* se comporta como una bacteria ARB y que se encuentra viable en el interior de FLA presentes, tanto en aguas residuales y potables como en vegetales. De esta forma, se postula que un modo de transmisión de esta bacteria podría ser a través de las FLA presentes en agua o vegetales.

RESUM

L'increment de la població i l'escassetat de recursos hídrics naturals a causa de l'escassa pluviometria irregularment distribuïda en el temps, com ocorre en les regions mediterrànies, fan necessària la reutilització de les aigües residuals. Abans de ser tractades, estes aigües contenen matèria orgànica que oferix un substrat idoni per al desenrotllament de qualsevol classe de microorganismes, molts dels quals són patògens.

D'altra banda, l'aigua potable s'obté a partir d'aigua natural o crua captada en rius, llacunes, pous, brolladors o pantans, les quals també poden contindre microorganismes patògens. A causa d'açò, és de la màxima importància realitzar un correcte tractament d'esta aigua per tal d'evitar la transmissió de malalties.

D'entre tots els patògens emergents en aigües, *H. pylori* és un de què major interés desperta en estos moments, ja que la seua epidemiologia encara no està clara.

La infecció per *H. pylori* pot conduir al desenrotllament de gastritis crònica, úlcera pèptica i càncer gàstric. De fet, el bacteri està classificada com a agent biològic carcinogen per al ser humà de categoria 1. S'ha suggerit que *H. pylori* pot ser adquirit per diferents vies de transmissió, entre les que destaca l'aigua.

Per altra banda, les amebes de vida lliure (FLA) són un grup heterogeni de protozous ubics que, a més de contindre espècies patògenes, poden actuar com "Cavalls de Troia" per a bacteris resistents a les amebes (ARB). D'esta manera, les ARB passarien desapercebudes enfront de la primera línia de defensa d'un organisme. La interacció *H. pylori*-FLA ha sigut demostrada en dos processos *in vitro*, encara que la viabilitat del bacteri no s'ha demostrat després del procés.

Per tant, en esta Tesi s'estudia el possible paper de les FLA com a reservori de *H. pylori* i altres bacteris patògens en aigües i aliments per mitjà de tècniques moleculars.

En primer lloc es va realitzar un assaig de cocultiu entre el bacteri *H. pylori* i l'ameba *Acanthamoeba castellanii*. Es va comprovar per mitjà de tècniques moleculars específiques per a la detecció de cèl·lules viables, PMA-qPCR i DVC-FISH, que l'ameba és capaç d'internalitzar al bacteri i que esta última roman viable, demostrant que *H. pylori* es comporta com un bacteri ARB.

A continuació, es van analitzar un total de 120 mostres ambientals, 100 d'aigua i 20 de vegetals per a comprovar la presència tant de FLA com de *H. pylori* internalitzat en estes FLA.

En el cas de les mostres d'aigua, es van analitzar 69 mostres d'aigua residual i 31 d'aigua potable. Un total de 55 (79,7%) mostres d'aigua residual i 12 (38,7%) d'aigua potable van resultar positives per a la presència de FLA. Per mitjà de la tècnica PMA-qPCR es va demostrar la presència d'*H. pylori* internalitzat en les FLA presents en 28 (50,9%) i 11 (91,7%) de les mostres d'aigua residual i potable analitzades, respectivament. Per mitjà de DVC-FISH es va demostrar que les cèl·lules d'*H. pylori* internalitzades dins les FLA presents en les mostres eren viables en 16 (29,5%) i 5 (41,7%) de les mostres d'aigua residual i potable analitzades, respectivament. A més, es va aconseguir recuperar formes viables cultivables d'*H. pylori* procedent de l'interior de FLA en 10 (18,2%) de les mostres d'aigua residual analitzades. Les FLA aïllades i identificades en les aigües residuals van pertànyer als gèneres *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vanellidae* i a la família Vahlkampfiidae. En el cas de l'aigua potable, les FLA aïllades i identificades van pertànyer als gèneres *Acanthamoeba*, *Echinamoeba* i *Vermamoeba*.

En el cas de les mostres de vegetals, concretament encisams, totes elles van resultar positives per a l'aïllament de FLA (100%). Per mitjà de la tècnica PMA-qPCR es va demostrar la presència d'*H. pylori* internalitzat en les FLA en 11 (55,0%) de les mostres i, per mitjà de DVC-FISH, es va demostrar que les cèl·lules d'*H. pylori* internalitzades dins les FLA eren viables en 5 (25,0%) de les mostres. En este cas no es van recuperar formes viables cultivables del bacteri.

Finalment, per mitjà de metagenòmica de seqüenciació dirigida, es va analitzar el microbioma de les FLA presents en 20 de les mostres analitzades en esta Tesi (11 d'aigua residual, 3 d'aigua potable i 6 d'encisams). Per tal de fer això, es van triar els iniciadors, es van avaluar *in silico* i *in vitro* i, una vegada comprovada la seua idoneïtat, es van emprar per a la seqüenciació de les mostres.

En els tres tipus de mostres, la classe bacteriana més abundant va ser la Gammaproteobacteria. Per als tres tipus de mostres, els filos més abundants dels bacteris del microbioma de les FLA van ser Proteobacteria i Bacteroidetes i, en el cas

de l'aigua residual, també ho va ser el filo Planctomycetes. *H. pylori* es va detectar per mitjà d'esta tècnica en els tres tipus de mostra. A més, com a part del microbioma de FLA de mostres ambientals, es van detectar altres bacteris d'interés per a la salut pública, com ara *Aeromonas*, *Legionella*, *Mycobacterium* o *Pseudomonas*.

Els resultats obtinguts en esta Tesi demostren la presència de FLA patògenes en les mostres ambientals, així com el fet de que, en alguns casos, estes són transportadores de bacteris patògens.

Este treball també confirma que *H. pylori* es comporta com un bacteri ARB i que es troba viable en l'interior de FLA presents, tant en aigües residuals i potables com en vegetals. D'esta manera, es postula que una manera de transmissió d'este bacteri podria ser a través de les FLA presents en aigua o vegetals.

ABSTRACT

The population increase along with the shortage of natural water resources due to the scanty precipitations irregularly distributed along the time, as it happens in Mediterranean regions, make the reutilization of wastewater necessary. Before being treated, these waters contain organic matter that offers a suitable substratum for the development of all kinds of microorganisms, many of which are pathogenic.

On the other hand, drinking water is obtained from natural or raw water taken from rivers, lagoons, wells, springs or marshes, which can also contain pathogenic microorganisms. Due to this, it is of the utmost importance to carry out a correct treatment of this water to avoid diseases transmission.

Among all emergent pathogens in waters, *H. pylori* is one of the bacteria which arouses great interest at the moment, since its epidemiology is not clear yet.

The infection caused by *H. pylori* can drive to the development of chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. In fact, the bacterium is classified as a category 1 biological carcinogen agent for human beings. It has been suggested that *H. pylori* can be acquired through different transmission routes, among which water stands out.

Moreover, free-living amoebae (FLA) are a heterogeneous group of ubiquitous protozoans that, apart from containing pathogenic species, they can act as "Trojan Horses" for amoeba-resistant amoeba (ARB). This way, ARB would be unnoticed on the first line of defense of an organism. The interaction *H. pylori*-FLA has been proved in two *in vitro* assays, although bacteria viability has never been proved after these assays.

Therefore, in this Thesis, the possible role of FLA is studied as a reservoir of *H. pylori* and other pathogenic bacteria in waters and food by means of molecular techniques.

Firstly, a coculture assay between the bacterium *H. pylori* and the amoeba *Acanthamoeba castellanii* was carried out. It was verified by means of molecular techniques specific for the detection of viable cells, PMA-qPCR and DVC-FISH, that the

amoeba is capable of internalizing the bacterium and that the latter remains viable, demonstrating that *H. pylori* behaves as an ARB bacterium.

Afterwards, a total of 120 environmental samples, 100 of water and 20 of vegetables, were analyzed to verify the presence FLA as well as internalized *H. pylori* into these FLA.

In case of water samples, 69 samples of wastewater and 31 samples of drinking water were analyzed. A total of 55 (79,7 %) wastewater and 12 (38,7 %) of drinking water samples turned out to be positive for FLA's presence. By means of PMA-qPCR technique, the presence of FLA-internalized *H. pylori* was demonstrated in 28 (50,9 %) and 11 (91,7 %) of the wastewater and drinking water samples analyzed, respectively. By means of DVC-FISH it was demonstrated that the FLA-internalized *H. pylori* cells were viable in 16 (29,5 %) and 5 (41,7 %) of the wastewater and drinking water samples analyzed, respectively. In addition, viable cultivable forms of *H. pylori* coming from the inside of FLA were recovered from 10 (18,2 %) of the analyzed wastewater samples. The isolated and identified FLA from wastewater samples belonged to the genus *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vanellidae* and to the family Vahlkampfiidae. In the case of drinking water, the isolated and identified FLA belonged to the genus *Acanthamoeba*, *Echinamoeba* and *Vermamoeba*.

In the case of the vegetable samples, specifically lettuces, all of them turned out to be positive for FLA's isolation (100 %). By means of the PMA-qPCR technique, the presence of FLA-internalized *H. pylori* was demonstrated in 11 (55,0 %) of the samples and, by means of DVC-FISH, it was demonstrated that FLA-internalized *H. pylori* cells were viable in 5 (25,0 %) of the samples. In this case, viable cultivable forms of the bacterium could not be recovered.

Finally, by means of amplicon-based metagenomics, the FLA microbiome of 20 previously analyzed samples in this Thesis (11 wastewater, 3 drinking water and 6 lettuce samples) was analyzed. To do so, a pair of primers were selected and evaluated *in silico* and *in vitro* and, once checked its suitability, they were used to perform the samples' sequencing.

In the three types of samples, the most abundant bacterial class was the Gammaproteobacteria. For the three types of samples, the most abundant bacterial phylum of the FLA microbiome were Proteobacteria and Bacteroidetes and, in case of the wastewater, it was also the phylum Planctomycetes. *H. pylori* was detected by means of this technology in the three types of samples. In addition, as part of FLA's microbiome of environmental samples, other bacteria of public health interest were detected, such as *Aeromonas*, *Legionella*, *Mycobacterium* or *Pseudomonas*.

The results obtained in this Thesis demonstrate the presence of pathogenic FLA in the environmental samples, as well as the fact that, in some cases, these they are carriers of pathogenic bacteria.

This work also confirms that *H. pylori* behaves as an ARB bacterium and that it is viable inside the present FLA in wastewater as well as in drinking water and in vegetables. This way, it is postulated that a way of transmission of this bacterium might be through the FLA present in water or vegetables.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES.....	1
2. EL AGUA RESIDUAL COMO VEHÍCULO DE TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS	3
2.1. ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDAR)	5
3. AGUAS Y SALUD PÚBLICA	8
4. <i>Helicobacter pylori</i>	10
4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	10
4.2. SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL	11
4.3. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>Helicobacter</i>	13
4.4. ETIOPATOGENIA	15
4.5. EPIDEMIOLOGÍA.....	18
4.6. MODO DE TRANSMISIÓN.....	20
4.7. ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE (VBNC).....	25
5. AMEBAS DE VIDA LIBRE (FLA)	28
5.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	29
5.2. DISTRIBUCIÓN.....	31
5.3. CICLO DE VIDA	31
5.4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS FLA PATÓGENAS.....	35
5.5. PATOGENICIDAD	35
5.5.1. PATOGENICIDAD DE <i>Acanthamoeba</i> spp.....	37
5.5.2. PATOGENICIDAD DE <i>Naegleria fowleri</i>	40
5.5.3. PATOGENICIDAD DE <i>Balamuthia mandrillaris</i>	41
5.5.4. PATOGENICIDAD DE <i>Sappinia</i>	43
6. LAS AMEBAS COMO “CABALLO DE TROYA”	43
7. MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	48
7.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR).....	49
7.2. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH) Y FISH COMBINADO CON DIRECT VIABLE COUNT (DVC-FISH)	55

7.3. METAGENÓMICA DE SECUENCIACIÓN DIRIGIDA	58
OBJETIVO.....	67
CAPÍTULO I	71
I.1.OBJETIVO	73
I.2.MATERIAL Y MÉTODOS.....	74
I.2.1. MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	74
I.2.2. CULTIVO DE <i>H. pylori</i>	74
I.2.3. TINCIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE SYTO9-PI	75
I.2.4. CULTIVO DE <i>A. castellanii</i>	75
I.2.5. COCULTIVO DE <i>A. castellanii</i> Y <i>H. pylori</i>	75
I.2.6. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE FISH.....	78
I.2.6.1. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH)	78
I.2.7. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE DVC-FISH	80
I.2.7.1. INCUBACIÓN EN DVC	80
I.2.8. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR).....	81
I.2.8.1. EXTRACCIÓN DE DNA	81
I.2.8.2. qPCR ESPECÍFICA DE <i>H. pylori</i>	81
I.2.8.3. ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO DE qPCR... 82	
I.2.9. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> VIABLE MEDIANTE PMA-qPCR 82	
I.2.9.1. TRATAMIENTO CON PMA	83
I.2.10. AISLAMIENTO DE <i>H. pylori</i> EN PLACA TRAS EL TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN	83
I.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
I.4.DIFUSIÓN DE RESULTADOS	95

CAPÍTULO II	98
II.1.OBJETIVO.....	99
II.2.MATERIAL Y MÉTODOS.....	100
II.2.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE AGUA	100
II.2.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE AGUA.....	101
II.2.3. IDENTIFICACIÓN DE AMEBAS DE VIDA LIBRE (FLA)	103
II.2.3.1. PCR MÚLTIPLE	103
II.2.3.2. FLA-PCR	105
II.2.3.3. ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA FLA-PCR Y LA PCR MÚLTIPLE	106
II.2.3.4. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	106
II.2.4. DETECCIÓN DE <i>H. pylori</i> EN FLA AISLADAS.....	106
II.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	108
II.3.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE (FLA).....	108
II.3.2. DETECCIÓN DE <i>H. pylori</i> EN FLA AISLADAS.....	119
II.4.DIFUSIÓN DE RESULTADOS	127
 CAPÍTULO III	 129
III.1.OBJETIVO.....	131
III.2.MATERIAL Y MÉTODOS.....	132
III.2.1. ORIGEN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE ALIMENTOS.....	132
III.2.2. DETECCIÓN DE <i>H. pylori</i> EN FLA AISLADAS.....	134
III.2.3. IDENTIFICACIÓN DE <i>Acanthamoeba</i> spp. Y <i>Vermamoeba vermiformis</i>	135
III.2.3.1.IDENTIFICACIÓN DE <i>Acanthamoeba</i> spp. MEDIANTE qPCR.....	135
III.2.3.2.IDENTIFICACIÓN DE <i>V. vermiformis</i> MEDIANTE qPCR.....	138
III.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	141
III.3.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE (FLA).....	141
III.3.2. IDENTIFICACIÓN DE <i>Acanthamoeba</i> spp. Y <i>V. vermiformis</i>	143
III.3.3. DETECCIÓN DE <i>H. pylori</i> EN FLA AISLADAS.....	145
III.4.DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	148

CAPÍTULO IV.....	149
IV.1.OBJETIVO	151
IV.2.MATERIAL Y MÉTODOS	152
IV.2.1. EVALUACIÓN DE INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A FLA	152
IV.2.1.1. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	153
IV.2.2. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A FLA EN MUESTRAS AMBIENTALES	154
IV.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	156
IV.3.1. EVALUACIÓN DE INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A FLA	156
IV.3.2. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A FLA EN MUESTRAS AMBIENTALES	160
IV.4.DIFUSIÓN DE RESULTADOS	188
CONCLUSIONES.....	189
BIBLIOGRAFÍA.....	193
ANEXOS.....	239

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía del género <i>Helicobacter</i>	12
Tabla 2: Especies gástricas del género <i>Helicobacter</i>	12
Tabla 3: Especies intestinales del género <i>Helicobacter</i>	13
Tabla 4: Selección de bacterias que interactúan con FLA	46
Tabla 5: Condiciones de qPCR para la identificación de <i>H. pylori</i>	82
Tabla 6: Condiciones de la PCR múltiple para la identificación de amebas de vida libre (FLA)	104
Tabla 7: Condiciones de la FLA-PCR para la identificación de amebas de vida libre..	105
Tabla 8: Número y porcentaje de muestras de agua residual y potable con presencia de FLA.....	108
Tabla 9: Detección de <i>H. pylori</i> en el interior de FLA en aguas residuales y potables mediante PMA-qPCR.....	120
Tabla 10: Detección de <i>H. pylori</i> viable en el interior de FLA en aguas residuales y potables mediante DVC-FISH	122
Tabla 11: Cultivo de <i>H. pylori</i> del interior de FLA en aguas residuales y potables.....	124
Tabla 12: Condiciones de qPCR para la identificación de <i>Acanthamoeba</i> spp.	136
Tabla 13: Cálculo de la concentración de DNA del fragmento sintético de <i>A. castellanii</i> para la curva patrón de la qPCR de <i>Acanthamoeba</i> spp.	137
Tabla 14: Condiciones de qPCR para la identificación de <i>V. vermiformis</i>	139
Tabla 15: Cálculo de la concentración de DNA del fragmento amplificado de <i>V. vermiformis</i> para la curva patrón de su qPCR.....	140
Tabla 16: Número y porcentaje de muestras de lechuga con presencia de FLA	141
Tabla 17: Detección de <i>Acanthamoeba</i> spp. y <i>V. vermiformis</i> en lechugas mediante qPCRs específicas	143
Tabla 18: Detección de <i>H. pylori</i> en el interior de FLA mediante técnicas moleculares y de cultivo.....	145
Tabla 19: Secuencias de los iniciadores 341F y 802R	152
Tabla 20: Bacterias incluidas en la comunidad artificial.....	152
Tabla 21: Cobertura de los iniciadores 341F y 802R para distintas bacterias.....	157
Tabla 22: Relación de muestras de agua secuenciadas y resultados para la identificación de <i>H. pylori</i> del interior de FLA (Capítulo II).....	161
Tabla 23: Distribución del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua residual .	163

Tabla 24: Distribución de los géneros del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua residual (%).....	169
Tabla 25: Distribución de las especies del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua residual.....	170
Tabla 26: Abundancia relativa de bacterias de interés para la salud pública presentes en las muestras de agua residual.....	171
Tabla 27: Distribución del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua potable .	173
Tabla 28: Distribución de los géneros del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua potable (%)	177
Tabla 29: Abundancia relativa de bacterias de interés para la salud pública presentes en las muestras de agua potable	179
Tabla 30: Relación de muestras de lechuga secuenciadas y resultados para la identificación de <i>H. pylori</i> del interior de FLA (Capítulo III).....	180
Tabla 31: Abundancia relativa de bacterias de interés para la salud pública presentes en las muestras de lechugas	186

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Índices de riesgo de la calidad del agua durante el periodo 2000-2005 en comparación con el año 2050.....	2
Figura 2: Diagrama de bloques del proceso de depuración de una EDAR	7
Figura 3: Micrografía electrónica de <i>Helicobacter pylori</i>	14
Figura 4: Enfermedades asociadas con <i>H. pylori</i>	16
Figura 5: Prevalencia mundial de <i>H. pylori</i>	18
Figura 6: Prevalencia de <i>H. pylori</i> en Europa.....	19
Figura 7: Microfotografías de transmisión electrónica mostrando la morfología de <i>H. pylori</i>	27
Figura 8: Representación esquemática de la diferenciación de <i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	32
Figura 9: Ciclo biológico de <i>Acanthamoeba</i> , <i>B. mandrillaris</i> y <i>N. fowleri</i>	33
Figura 10: Microfotografías de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	34
Figura 11: Trofozoito y quiste de <i>B. mandrillaris</i>	34
Figura 12: <i>N. fowleri</i>	35
Figura 13: Clasificación taxonómica de las FLA patógenas.....	36

Figura 14: Vías de entrada de <i>Acanthamoeba</i> en humanos e infecciones que causa. ...	38
Figura 15: Vía de entrada de <i>N. fowleri</i> en humanos e infección que causa.	40
Figura 16: Vía de entrada de <i>B. madrillaris</i> en humanos e infección que causa.	42
Figura 17: Esquema de las diferentes relaciones entre FLA (<i>Acanthamoeba</i> spp) y bacterias.....	45
Figura 18: Microfotografía de <i>Estrella lausannensis</i> dentro de <i>Acanthamoeba commandonii</i> 48 horas después de la infección.....	47
Figura 19: Representación esquemática de componentes básicos para llevar a cabo una PCR convencional y fases de la PCR.....	50
Figura 20: Métodos de detección de la qPCR: SYBR Green I y TaqMan	51
Figura 21: Curvas de amplificación mostrando el incremento de fluorescencia	53
Figura 22: Esquema de la amplificación de DNA usando la combinación PMA-qPCR....	54
Figura 23: Diagrama de un protocolo típico de FISH	55
Figura 24: Estructura del monómero de LNA y su conformación espacial	57
Figura 25: Diferentes aproximaciones metagenómicas	59
Figura 26: Representación gráfica del gen 16S rRNA con sus regiones conservadas y variables	60
Figura 27: Valores de entropía del gen 18S rRNA.....	61
Figura 28: Esquema de las tecnologías de secuenciación de segunda generación.....	62
Figura 29: Amplificación puente del DNA molde inmovilizado en plataforma Illumina.	63
Figura 30: Método de secuenciación mediante nucleótidos terminadores reversibles de Illumina.....	64
Figura 31: Ejemplo de la ayuda de un script de QIIME.....	65
Figura 32: Esquema de trabajo en QIIME	66
Figura 33: Protocolo de cocultivo de <i>H. pylori</i> y <i>A. castellanii</i> para la detección de <i>H. pylori</i> en el interior de <i>A. castellanii</i> mediante técnicas moleculares y de cultivo.....	77
Figura 34: Fotografía en microscopio invertido de cultivo axénico de <i>A. castellanii</i>	84
Figura 35: Visualización de <i>H. pylori</i> teñido con SYTO9-PI antes del cocultivo	87
Figura 36: Visualización de <i>H. pylori</i> teñido con SYTO9-PI antes de la adición de hipoclorito sódico	88
Figura 37: Visualización de <i>H. pylori</i> teñido con SYTO9-PI en el interior de <i>A. castellanii</i> después de 24 horas	88

Figura 38: Resultados de la qPCR para la identificación de <i>H. pylori</i> del interior de <i>A. castellanii</i>	89
Figura 39: Curvas de amplificación de las muestras de cocultivo de <i>H. pylori</i> y <i>A. castellanii</i> , con y sin tratamiento con PMA	90
Figura 40: Identificación de <i>H. pylori</i> después del cocultivo.	91
Figura 41: Identificación de <i>H. pylori</i> en el interior de <i>A. castellanii</i> después del cocultivo mediante FISH	91
Figura 42: Identificación de <i>H. pylori</i> viable después de la incubación en el medio DVC.....	92
Figura 43: Fotografía de una placa de ASP del cocultivo de <i>A. castellanii</i> y <i>H. pylori</i> cultivada bajo las condiciones de <i>H. pylori</i> con el agar degradado	93
Figura 44: Protocolo de aislamiento e identificación de amebas de vida libre y de detección de <i>Helicobacter pylori</i> procedente del interior de amebas de vida libre en aguas residuales y potables mediante técnicas moleculares y de cultivo.....	102
Figura 45: FLA de agua residual con bacterias intracelulares.....	111
Figura 46: Identificación de FLA aisladas mediante PCR múltiple.	113
Figura 47: Resultados de la PCR múltiple de diferentes especies de <i>Acanthamoeba</i> aisladas e identificadas mediante secuenciación	114
Figura 48: Alineamiento <i>in silico</i> de <i>A. tubiashi</i> , <i>A. mauritaniensis</i> , <i>A. castellanii</i> y <i>A. polyphaga</i>	115
Figura 49: Resultados de la FLA-PCR de FLA aisladas	116
Figura 50: Fotografía en microscopio de contraste de fases de FLA aislada identificada como <i>Cercozoa</i> spp. mediante secuenciación	116
Figura 51: Fotografía de <i>Rhogostoma</i>	117
Figura 52: Fotografía en microscopio de contraste de fases (400x) de una FLA aislada identificada como <i>Acanthamoeba</i> spp. mediante secuenciación	118
Figura 53: Fotografía en microscopio de contraste de fases (400x) de una FLA aislada identificada como <i>Naegleria</i> spp. mediante secuenciación	118
Figura 54: Fotografía en microscopio de contraste de fases (400x) de una FLA aislada identificada como <i>Vannella</i> sp. mediante secuenciación.....	118
Figura 55: Identificación de <i>H. pylori</i> viable después de la incubación en el medio DVC en una muestra de agua potable.	122
Figura 56: Identificación de <i>H. pylori</i> viable después de la incubación en el medio DVC en una muestra de agua residual.....	123

Figura 57: Resultados de la qPCR para la identificación de <i>H.pylori</i> en placa en muestras ambientales.....	125
Figura 58: Protocolo de aislamiento e identificación de amebas de vida libre en lechugas y de detección de <i>Helicobacter pylori</i> procedente del interior de amebas de vida libre en lechugas mediante técnicas moleculares y de cultivo.....	133
Figura 59: Alineamiento <i>in silico</i> de diferentes secuencias de <i>A. castellanii</i>	136
Figura 60: Curva patrón para la identificación de <i>Acanthamoeba</i> spp.	138
Figura 61: Visualización bajo el microscopio de epifluorescencia de una muestra de lechuga	145
Figura 62: Crecimiento bacteriano sobre placas de Agar Dent en muestras de lechuga tras el tratamiento de desinfección del cultivo de FLA	146
Figura 63: Ejemplo de calidad de las secuencias por base en una muestra.....	158
Figura 64: Distribución de los filos bacterianos más abundantes en la muestra artificial	158
Figura 65: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes en la muestra artificial	159
Figura 66: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes de la comunidad bacteriana artificial	160
Figura 67: Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras de agua residual (%).....	162
Figura 68: Distribución de filos de cada muestra de agua residual (%).....	163
Figura 69: Distribución de las clases bacterianas más abundantes del promedio de las muestras de agua residual	164
Figura 70: Distribución de clases bacterianas en cada muestra de agua residual (%) .	165
Figura 71: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes del promedio de las muestras de agua residual	166
Figura 72: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes de cada muestra de agua residual (%).....	168
Figura 73: Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras de agua potable	172
Figura 74: Distribución de filos en cada muestra de agua potable (%)	173
Figura 75: Distribución de las clases bacterianas más abundantes del promedio de las muestras de agua potable	174

Figura 76: Distribución de clases bacterianas de cada muestra de agua potable (%) .	175
Figura 77: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes del promedio de las muestras de agua potable	175
Figura 78: Distribución de géneros bacterianos de cada muestra de agua potable (%)	176
Figura 79: Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras de lechuga	180
Figura 80: Distribución de los filos más abundantes de cada muestra de lechuga (%)	181
Figura 81: Distribución de las clases bacterianas más abundantes del promedio de las muestras de lechuga	182
Figura 82: Distribución de las clases bacterianas más abundantes de cada muestra de lechuga (%).....	183
Figura 83: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes del promedio de las muestras de lechuga	183
Figura 84: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes de cada muestra de lechuga (%).....	185

ABREVIATURAS

ADent: Agar Dent

AK: Queratitis amebiana (*Acanthamoeba* Keratitis)

ARB: Bacterias resistentes a las amebas (Amoeba-Resistant Bacteria)

ASC: Agar Sangre de Caballo

ASP: Agar Sangre Piruvato

ATCC: Colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection)

BAE: Encefalitis amebiana por *Balamuthia* (*Balamuthia* amoebic encephalitis)

BSA: Seroalbúmina bovina

Cq: Ciclo de cuantificación (Quantification Cycle)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

DVC: Direct Viable Count

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

fg: Femtogramo

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente (Fluorescent *In Situ* Hybridization)

FLA: Amebas de vida libre (Free-Living Amoebae)

g: Gramo

GAE: Encefalitis amebiana granulomatosa (Granulomatous Amoebic Encephalitis)

l: Litro

ml: Mililitro

mM: Milimolar

NCTC: Colección nacional de cultivos tipo (National Collection of Type Cultures)

ng: nanogramo

NGS: Secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing)

NNAP: Agar no nutritivo (Non-Nutrient Agar)

OTU: Unidad taxonómica operacional (Operational Taxonomic Unit)

PAGE: Solución salina amébrica de Page

PAM: Meningoencefalitis amebiana primaria (Primary Amoebic Meningoencephalitis)

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PFA: Paraformaldehído

PMA: Propidio monoazida (Propidium Monoazide)

PYG: Peptone-Yeast Extract-Glucose

PYG+A: Peptone-Yeast Extract-Glucose con antibióticos

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)

rpm: Revoluciones por minuto

SAE: Encefalitis amebiana por *Sappinia* (*Sappinia* amoebic encephalitis)

SNC: Sistema nervioso central

TBE: Tampón Tris-Borato EDTA

Tm: Temperatura de fusión (Melting Temperature)

VBNC: Viable no cultivable (Viable But Nonculturable)

WGS: Secuenciación de genomas completos (Whole Genome Sequencing)

μl: Microlitro

μm: Micrómetro

μM: Micromolar

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

El agua es un recurso básico de valor insustituible para la vida, siendo seguramente el elemento más valioso e imprescindible de los existentes en el planeta Tierra.

Según el Informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo (WWAP, 2012), aunque el 70% de la superficie terrestre esté cubierta por agua, sólo el 2,5% de esta agua es dulce y únicamente el 0,3% de esta última está disponible para el ser humano.

En el año 2050 se espera que la población mundial haya aumentado un 33% con respecto a la de 2011, pasando de 7.000 millones a 9.300 millones de habitantes (UN DESA, 2011). El crecimiento demográfico plantea un enorme reto, que es el de proveer de agua y alimentos a toda la población, así como crear suficiente trabajo digno, lo que, a su vez, depende del desarrollo económico (PNUMA, 2011). Para mediados del siglo XXI se estima que la demanda de alimentos aumente un 60%. Además, se espera un gran crecimiento de la demanda de energía (Alexandratos y Bruinsma, 2012).

La agricultura representa aproximadamente el 70% de la captación total de agua dulce a nivel mundial y más del 90% en la mayoría de los países menos desarrollados (FAO, 2011). La producción de energía y la industria representan el 15% y el 5% de las captaciones mundiales de agua dulce, respectivamente. El 10% restante se utiliza para fines domésticos, incluyendo agua potable, saneamiento e higiene (WWAP, 2012). Para el año 2050 se prevé que la demanda mundial de agua dulce aumente un 55% debido a la creciente demanda de la industria manufacturera (400%), la generación de electricidad (140%) y el uso doméstico (130%) (Figura 1) (WWAP, 2016).

La escasez de recursos hídricos naturales en zonas áridas y semiáridas, como es el caso de las regiones mediterráneas, constituye un grave problema para la población asentada en ellas, en las que el incremento de la población, unido a una escasa pluviometría irregularmente distribuida en el tiempo y a unos limitados recursos superficiales, están llevando al agotamiento o al deterioro irreversible de los recursos subterráneos. En este contexto, la reutilización de las aguas residuales urbanas se

perfila como una fuente adicional de agua merecedora de ser tenida en cuenta en la gestión global de los recursos hídricos. Es por ello que se necesita un mejor control y vigilancia de la misma para garantizar que esta alternativa tan esencial es segura, propiciando el desarrollo de nuevas estrategias de depuración y control del agua.

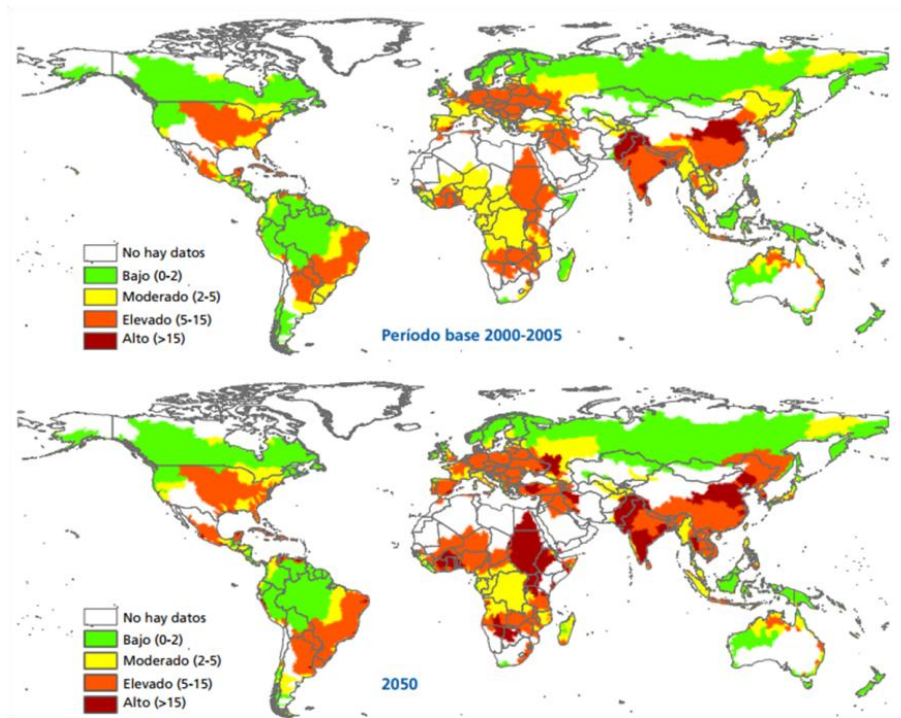


Figura 1: Índices de riesgo de la calidad del agua durante el periodo 2000-2005 en comparación con el año 2050 (WWAP, 2016)

Antes de ser tratadas, las aguas residuales contienen una elevada cantidad de materia orgánica, que ofrece un sustrato idóneo para el desarrollo de toda clase de microorganismos, muchos de los cuales son patógenos (Metcalf y Eddy, 2003). El factor que más influye sobre el proceso de depuración del agua residual es su composición. Por ello, es necesario tener conocimiento de esta, además del origen del agua residual, para llevar a cabo un adecuado proceso de depuración de la misma.

Por otra parte, las aguas potables, o aguas aptas para el consumo humano, se definen como aquellas que pueden ser consumidas sin restricción, debido a que gracias a un proceso de purificación no representan un riesgo para la salud. Son aguas que cumplen con las normas de calidad promulgadas por las autoridades nacionales e

internacionales. En la Unión Europea, la Directiva 98/83/EU, recogida en España bajo el Real Decreto 140/2003, establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (DOUE-L-1998-82174; BOE-A-2003-3596).

El agua potable se obtiene a partir del tratamiento de agua natural o cruda captada en ríos, lagunas, pozos, manantiales o pantanos, que contiene bacterias, protozoos, esporas, polen o productos químicos tóxicos. Por esta razón es muy importante realizar un correcto tratamiento de potabilización del agua antes de que sea consumida, ya que de otra forma puede ser una fuente de transmisión de enfermedades al ser humano.

El control sanitario del agua de consumo humano es un objetivo prioritario de la salud pública. Las directivas europeas y la legislación nacional están destinadas a garantizar que el agua de consumo sea saludable y limpia, eliminando o reduciendo la concentración de contaminantes microbiológicos y físico-químicos que puedan afectar a la salud humana.

Sin embargo, a pesar de los avances y esfuerzos en cuestión de seguridad, en ocasiones el agua de abastecimiento se contamina con patógenos, siendo una fuente de infección para el ser humano (Thomas *et al.*, 2004).

2. EL AGUA RESIDUAL COMO VEHÍCULO DE TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

El agua residual, por definición, es aquella corriente de agua usada por las casas, negocios, industrias, actividades comerciales o instituciones que se dirige a las plantas de tratamiento mediante una red de tuberías cuidadosamente diseñadas y organizadas.

Las aguas residuales se clasifican en municipales e industriales. Las aguas residuales industriales requieren ser tratadas antes de ser descargadas en el sistema de alcantarillado municipal, siendo su tratamiento muy variable dependiendo del tipo de industria del que procedan, si bien existen aguas residuales industriales que tienen características compatibles con las municipales, por lo que pueden descargarse directamente en los sistemas públicos de alcantarillado.

Las aguas residuales de origen doméstico tienen una composición muy variada, debido a la naturaleza de la población residente. La mayor parte de la contaminación tiene su origen en los excrementos humanos y animales y, en menor proporción, en las aguas resultantes del lavado de ropa, preparación de alimentos y duchas. Por otra parte, las aguas pluviales o de lavado de calles de las zonas urbanas aportan también una carga importante de contaminación, por el arrastre de materia sólida inorgánica en suspensión y materia orgánica soluble e insoluble (Espigares y Pérez, 1985). La elevada cantidad de materia orgánica presente en las aguas residuales ofrece un sustrato idóneo para el desarrollo de toda clase de microorganismos, muchos de los cuales son causantes de enfermedades (Metcalf y Eddy, 2003).

Una práctica común en muchos países con escasez de agua es el uso del agua residual para riego agrícola. Sin embargo, el riego con aguas residuales no tratadas o sometidas a un proceso de depuración ineficiente ha provocado la aparición de brotes epidémicos importantes a lo largo del último siglo. Por ejemplo, entre julio de 2004 y mayo de 2005 se llevó a cabo en Camboya una investigación del nivel de contaminación de coliformes termotolerantes, huevos de helmintos y protozoos parásitos en *Iponema aquatica*, vegetal de origen acuático consumido por la población y cultivado con agua procedente de un lago que recibe los vertidos de aguas residuales de las poblaciones cercanas. En las muestras se encontraron elevadas concentraciones de los tres patógenos estudiados y se concluyó que el consumo de estos vegetales fue la causa de la aparición de diversos brotes epidémicos en la zona (Anh *et al.*, 2007).

La reutilización de aguas residuales exige, por tanto, la adopción de medidas de protección de la salud pública, ya que en todo proceso de recuperación y reutilización de aguas residuales existe riesgo por exposición a agentes infecciosos. El riesgo por contaminación biológica dependerá de que el microorganismo esté presente en las aguas residuales en cantidades significativas, de que sobreviva en esas condiciones ambientales conservando su poder infeccioso, así como de los diferentes usos de las aguas (Calduch-Broseta *et al.*, 2003).

El tratamiento de las aguas residuales para su reutilización tiene como enfoque principal la eliminación de dichos agentes patógenos, sean bacterias, virus, protozoos

o helmintos, además de la eliminación de malos olores u otras sustancias que pudiesen tener un efecto negativo durante su reutilización.

La reutilización de aguas residuales en España está regulada por el Real Decreto 1620/2007, del 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas (BOE-A-2007-21092). En él se establecen las condiciones básicas para la reutilización de las aguas depuradas, se recogen los criterios de calidad para la reutilización de las aguas según su uso, se establecen los criterios de evaluación de la calidad de las aguas reutilizadas y las frecuencias mínimas de muestreo y análisis de cada parámetro.

2.1. ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDAR)

Para evitar enfermedades es necesario tratar y depurar las aguas y ayudar a la naturaleza en su proceso de depuración, mediante un conjunto de sistemas que nos permiten acelerar los procesos naturales para que podamos devolver al medio el agua en las debidas condiciones.

Una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) es el conjunto de instalaciones que tienen como objeto, mediante combinación de diversos tratamientos físicos, químicos y/o biológicos, la reducción de la contaminación de las aguas residuales hasta límites aceptables para el cauce receptor (Metcalf y Eddy, 2003).

Dentro del esquema general básico de una EDAR (Figura 2) se distinguen dos líneas de tratamientos: la línea de agua y la línea de fango. El proceso de depuración del agua se divide en cuatro etapas: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario (Metcalf y Eddy, 2003). Sus características principales son:

Pretratamiento: Consiste en una sucesión de etapas físicas y mecánicas en las que se eliminan materias voluminosas en suspensión que, debido a su naturaleza o tamaño, pueden originar problemas en los tratamientos posteriores. Las operaciones que comprende son generalmente: desbaste, desarenado y desengrasado, aunque en

algunos casos también se pueden incluir otras, como la regulación y homogenización de caudales y cargas o la preaireación.

Tratamiento primario: Se eliminan fundamentalmente los sólidos en suspensión, mediante la utilización de tratamientos físicos o físico-químicos. Los primeros utilizan decantadores-digestores, fosas sépticas y decantadores de gravedad, y los segundos se realizan mediante la adición de reactivos químicos que permiten que las partículas se agreguen y puedan sedimentar con mayor facilidad. El nivel de reducción depende del proceso utilizado y de las características de las aguas residuales.

Tratamiento secundario: También recibe el nombre de tratamiento biológico. En esta etapa se elimina gran parte de la contaminación orgánica, separándose las partículas coloidales y disueltas y reteniéndose los sólidos en suspensión. El proceso más utilizado es el de fangos activos. Este es de carácter biológico y se lleva a cabo mediante la oxidación de la materia orgánica por vía aerobia. Consta básicamente de dos unidades: el reactor biológico y el decantador. El reactor está especialmente diseñado para mantener los microorganismos bajo condiciones controladas, acelerando el proceso natural de descomposición y neutralización de los residuos. En el decantador se produce la separación del agua depurada de los fangos activos. Parte de estos se recirculan al reactor biológico para mantener una concentración suficiente de bacterias, mientras que los fangos excedentes pasan a la línea de tratamiento de fangos.

Tratamiento terciario: Es un complemento a la depuración del agua residual para eliminar compuestos no biodegradables o microorganismos patógenos que hayan sobrevivido a los anteriores procesos. Fundamentalmente se utiliza para obtener una mejora del efluente depurado por exigencias del cauce receptor o para su posterior reutilización, llamándose en este caso “tratamiento de regeneración”. Hay diferentes tipos de procesos, en función de cuál sea su objetivo:

- Aquellos cuyo fin principal es reducir los sólidos en suspensión, la turbidez y la DBO_5 (parámetro que mide la cantidad de materia susceptible de ser consumida u oxidada por medios biológicos), como los procesos físico-químicos y la filtración.

- Los que tienen como objetivo la desinfección del efluente, como el tratamiento con cloro gaseoso, hipoclorito, ozono y rayos ultravioleta.
- Los que persiguen la reducción de sales, como la ósmosis inversa, la electrodiálisis reversible y el intercambiador iónico.

Los fangos producidos en los procesos de tratamiento del agua residual proceden del tratamiento primario (fangos primarios) y del tratamiento secundario (fangos secundarios), aunque a veces se mezclan antes de ser tratados en la línea de fangos (fangos mixtos).

Las operaciones y procesos de la línea de tratamiento de fangos tienen fundamentalmente los objetivos de reducir el contenido en agua y materia orgánica del fango y acondicionar el fango para su reutilización y evacuación final. Las operaciones más comunes son el espesamiento, la estabilización, el acondicionamiento y la deshidratación de fangos.

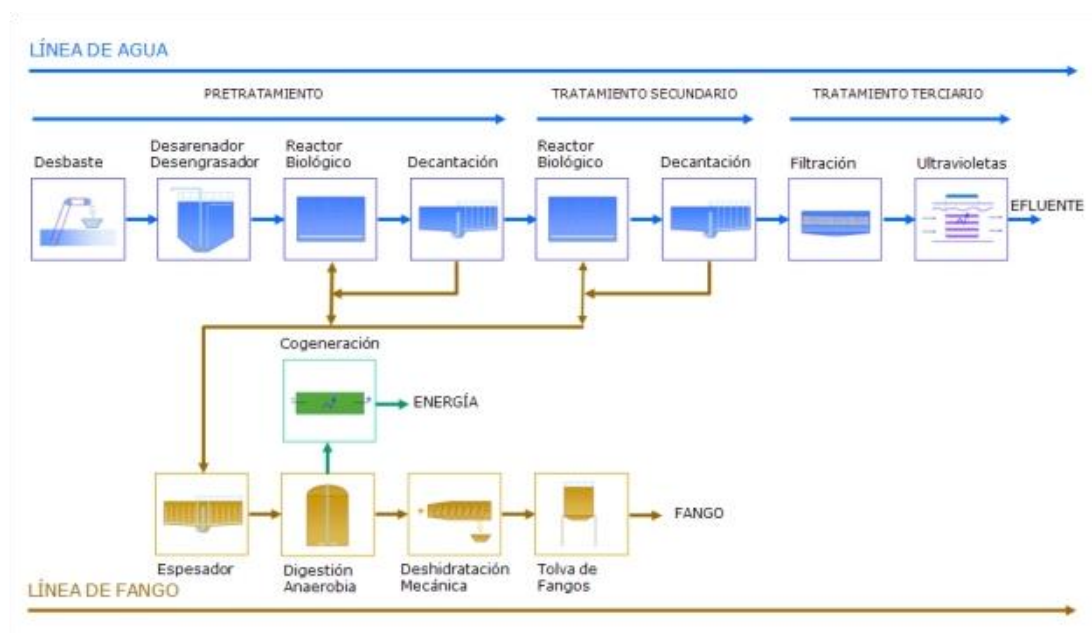


Figura 2: Diagrama de bloques del proceso de depuración de una EDAR (EPSAR; <http://www.epsar.gva.es/sanejament/instalaciones/buscadordedar.aspx>)

3. AGUAS Y SALUD PÚBLICA

A pesar de los programas de control y prevención del agua, son numerosos los brotes de infecciones producidos directa o indirectamente por las aguas. Por ejemplo, entre los años 2007 y 2008, según la “Waterborne Disease Outbreak Surveillance System” (WBD OSS), se registraron 164 brotes infecciosos producidos por agua de bebida o agua reutilizada para el recreo en EE.UU., afectando a miles de personas (Ingerson-Mahar y Reid, 2012).

En realidad, se asume que el número de brotes que se producen es mayor de lo reconocido, ya que sólo una fracción de los mismos se registra, debido a que se ve afectada muy poca gente o a que estos son esporádicos, por lo que no aparecen en las estadísticas. En estas tampoco aparecen los casos derivados de alimentos contaminados con aguas o las enfermedades crónicas asociadas a los sistemas de agua municipales.

Además de los costes humanos, también es importante tener en cuenta los costes económicos derivados de las infecciones producidas por el agua. Por ejemplo, un brote producido en el año 2000 por *Escherichia coli* O157:H7 en agua en Ontario (EE.UU.) supuso un daño económico de unos 150 millones de dólares (Ingerson-Mahar y Reid, 2012).

La mayoría de patógenos que se encuentran en el agua potable no son bacterias propias de su microbiota, sino que proceden de alguna contaminación externa. Por tanto es imprescindible discernir cuál es la fuente de contaminación. La presencia de coliformes es uno de los marcadores de contaminación más utilizados (Ingerson-Mahar y Reid, 2012).

Actualmente, la lista completa de patógenos potencialmente presentes en aguas todavía es desconocida, pero sí que se conoce una fracción importante de estos (Varela y Manaia, 2013). Entre los patógenos oportunistas presentes tanto en el agua depurada como en los sistemas de distribución de agua potable se encuentran *Mycobacterium*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y algunos protozoos como *Acanthamoeba*, *Naegleria* o *Cryptosporidium* (Barbeau y Buhler, 2001; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Bonilla-Lemus, 2010; Varela y Manaia, 2013). Asimismo,

varios microorganismos patógenos habituales en aguas residuales son reconocidos como patógenos emergentes en agua potable: *Cryptosporidium*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7 o *Helicobacter pylori*, entre otros (Wingender y Flemming, 2011).

Muchos de estos patógenos son capaces de adherirse a biopelículas (aglomeración de bacterias unidas por polímeros extracelulares formados por DNA, proteínas y carbohidratos) o sobrevivir en el interior de protozoos, como las amebas de vida libre (FLA). Tanto las biopelículas como las FLA pueden actuar como reservorio, protegiéndolos de los tratamientos de desinfección (Wingender y Flemming, 2011) e incluso propiciar su multiplicación (Dupuy *et al.*, 2011).

Para estimar los riesgos sobre la salud humana que presentan las FLA en los sistemas de tratamiento de agua de bebida y en los cada vez más comunes sistemas de agua urbana reciclada, es necesario considerar tres aspectos: en primer lugar, las FLA pueden infectarse con microorganismos patógenos resistentes a las amebas; en segundo lugar, las FLA pueden actuar como hospedadores transportadores de dichos patógenos, facilitando la infección a los humanos; y, en tercer lugar, algunas FLA son patógenos humanos *per se* (Peralta y Ayala, 2009).

De entre todos los patógenos emergentes en aguas, *H. pylori* es uno de los que mayor interés despierta en estos momentos, ya que su epidemiología aún no está clara. Aunque hay evidencias epidemiológicas que asocian la infección en humanos e incluso la aparición de cáncer gástrico con el agua de bebida contaminada en países en vías de desarrollo (Bunn *et al.*, 2002), en los países desarrollados es más difícil establecer esta relación debido, fundamentalmente, a que la bacteria rara vez puede aislarse del ambiente. Tampoco queda clara la forma de supervivencia de este patógeno en este tipo de hábitats, por lo que todos los estudios orientados a entender y demostrar cómo puede sobrevivir y llegar a representar un riesgo para la salud humana resultan de gran interés para la Salud Pública.

4. *Helicobacter pylori*

4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A finales del siglo XIX se realizaron las primeras descripciones de bacterias espirales en el estómago de animales. Concretamente, en 1881 Rappin observó una bacteria espiral en el estómago canino, a la que denominó *Spirocheta rappini*. En 1893, Bizzozero publicó varios dibujos de organismos espirales en el estómago de perros, que probablemente pertenecían a las especies que hoy conocemos como *Helicobacter heilmannii* o *Helicobacter felis*. Tres años después, en 1896, Salomon fue capaz de propagar estos organismos espirales en los estómagos de ratones después de alimentarlos con mucosa gástrica de gatos y perros. Este trabajo es el precursor de estudios más actuales en los que ratones infectados con *H. felis* son un modelo importante en estudios terapéuticos y de vacunas para la erradicación de *Helicobacter*. En 1899 Jaworski fue el primero que sugirió un posible papel patógeno de esta bacteria en la enfermedad gástrica (Danon y Lee, 2001; Marshall, 2001; Konturek, 2003).

En 1939, Doenges encontró organismos espirales en la mucosa gástrica de macacos. Más tarde, Freedberg y Baron encontraron “espiroquetas” en un 40% de los estómagos de adultos jóvenes. En las décadas de 1950 y 1960, Ito, del Colegio Médico de Harvard, hizo una de las primeras y más detalladas descripciones anatómicas de la apariencia de la mucosa gástrica infectada, mediante el microscopio electrónico. En los años siguientes, Lockard y Boler encontraron una vez más este tipo de organismos en el estómago de gatos y perros y también publicaron microfotografías de ellos (Danon y Lee, 2001; Marshall, 2001).

Sin embargo, este microorganismo no fue considerado de importancia hasta que Marshall y Warren, en 1982, lograron el primer cultivo de *Campylobacter pyloridis*, el actual *Helicobacter pylori* (Marshall y Warren, 1984), siguiendo la metodología descrita por Skirrow para el aislamiento de *Campylobacter* spp. Este hecho revolucionó la ciencia de la gastroenterología y fue por el que se les concedió el Premio Nobel de Medicina en octubre de 2005. *H. pylori* está hoy en día considerado como el agente infeccioso más extendido en humanos, se distribuye a lo largo del mundo y se estima

que más de la mitad de la población humana está infectada por este patógeno (Torres *et al.*, 2000).

4.2. SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL

En 1989, mediante análisis de la región 16S del rRNA y estudios ultraestructurales, se demostró que la especie denominada *Campylobacter pylori* era distinta de las especies de *Campylobacter* descritas hasta entonces. De esta forma se estableció la denominación del género *Helicobacter*, renombrándose *C. pylori* como *Helicobacter pylori*, siendo este el primer miembro del nuevo género. Las claves para adscribir microorganismos al género fueron: bacterias curvadas Gram-negativas, móviles mediante un flagelo envainado, capaces de formar estructuras cocoides, microaerófilas, quimiorganótrofas, incapaces de fermentar u oxidar carbohidratos, con crecimiento óptimo a 37°C e incapaces de crecer a 25°C (Goodwin *et al.*, 1989).

En la actualidad, el género *Helicobacter*, junto con los géneros *Sulfurimonas*, *Thiovulum* y *Wolinella*, se agrupa formando la familia Helicobacteriaceae, que junto con las familias Campylobacteraceae, Nautilaceae e Hydrogenimonaceae conforman el orden Campylobacterales, que se engloba dentro de la clase Epsilonproteobacteria del filo Proteobacteria (Mitchell *et al.*, 2014) (Tabla 1).

Tabla 1: Taxonomía del género *Helicobacter*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001)

DOMINIO	BACTERIA
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	Epsilonproteobacteria
Orden I	Campylobacterales
Familia I	Campylobacteraceae
Género I	<i>Campylobacter</i>
Género II	<i>Arcobacter</i>
Género III	<i>Sulfurospirillum</i>
Familia II	Helicobacteraceae
Género I	<i>Helicobacter</i>
Genero II	<i>Sulfurimonas</i>
Género III	<i>Thiovulum</i>
Género IV	<i>Wolinella</i>
Familia III	Nautilaceae
Familia IV	Hydrogenimonaceae

En la actualidad, el género *Helicobacter* contiene 39 especies que han sido descritas y validadas (<http://www.bacterio.net/helicobacter.html>). Estas se clasifican en dos grupos en función de si su reservorio es principalmente el estómago (Tabla 2) o el tracto intestinal (Tabla 3).

Tabla 2: Especies gástricas del género *Helicobacter* (Parte, 2013)

ESPECIE	HOSPEDADOR	REFERENCIA
<i>H. acinonychis</i>	guepardo	Eaton <i>et al.</i> (1993)
<i>H. ailurogastricus</i>	gato	Joosten <i>et al.</i> (2016)
<i>H. apri</i>	jabalí	Zanoni <i>et al.</i> (2016)
<i>H. baculiformis</i>	gato	Baele <i>et al.</i> (2008b)
<i>H. bizzozeronii</i>	perro	Hänninen <i>et al.</i> (1996)
<i>H. cetorum</i>	delfín	Harper <i>et al.</i> (2002)
<i>H. cynogastricus</i>	perro	Van den Bulck <i>et al.</i> (2006)
<i>H. felis</i>	gato, perro	Paster <i>et al.</i> (1991)
<i>H. heilmannii</i>	gato	Smet <i>et al.</i> (2012)
<i>H. himalayensis</i>	marmota	Hu <i>et al.</i> (2015)
<i>H. mustelae</i>	hurón	Goodwin <i>et al.</i> (1989)
<i>H. nemestrinae</i>	macaco	Bronsdon <i>et al.</i> (1991)
<i>H. pylori</i>	hombre, macaco	Goodwin <i>et al.</i> (1989)
<i>H. salomonis</i>	perro	Jalava <i>et al.</i> (1997)
<i>H. suis</i>	cerdo	Baele <i>et al.</i> (2008a)

Tabla 3: Especies intestinales del género *Helicobacter* (Parte, 2013)

ESPECIE	HOSPEDADOR	REFERENCIA
<i>H. anseris</i>	ganso	Fox <i>et al.</i> (2006)
<i>H. aurati</i>	hámster	Patterson <i>et al.</i> (2000)
<i>H. bilis</i>	ratón, perro y hombre	Fox <i>et al.</i> (1995)
<i>H. brantae</i>	ganso	Fox <i>et al.</i> (2006)
<i>H. canadensis</i>	hombre	Fox <i>et al.</i> (2000)
<i>H. canicola</i>	perro	Kawamura <i>et al.</i> (2016)
<i>H. canis</i>	perro, hombre	Stanley <i>et al.</i> (1993)
<i>H. cholecystus</i>	hámster	Franklin <i>et al.</i> (1996)
<i>H. cinaedi</i>	hombre, hámster y macaco	Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<i>H. equorum</i>	caballo	Moyaert <i>et al.</i> (2007)
<i>H. fennelliae</i>	hombre	Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<i>H. ganmani</i>	ratón, perro y hombre	Robertson <i>et al.</i> (2001)
<i>H. hepaticus</i>	ratón, perro y hombre	Fox <i>et al.</i> (1994)
<i>H. macacae</i>	mono	Fox <i>et al.</i> (2007)
<i>H. marmotae</i>	marmota y gato	Fox <i>et al.</i> (2002)
<i>H. mastomyrinus</i>	roedor	Shen <i>et al.</i> (2005)
<i>H. mesocricetorum</i>	hámster	Simmons <i>et al.</i> (2000)
<i>H. muridarum</i>	ratón y rata	Lee <i>et al.</i> (1992)
<i>H. pametensis</i>	aves y cerdo	Dewhirst <i>et al.</i> (1994)
<i>H. pullorum</i>	pollo y hombre	Stanley <i>et al.</i> (1994)
<i>H. rodentium</i>	ratón	Shen <i>et al.</i> (1997)
<i>H. trogontum</i>	rata	Mendes <i>et al.</i> (1996)
<i>H. typhlonius</i>	ratón	Franklin <i>et al.</i> (2001)
<i>H. valdiviensis</i>	pájaro	Collado <i>et al.</i> (2014)

4.3. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DEL GÉNERO *Helicobacter*

Todas las especies del género *Helicobacter* se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos no ramificados, con forma helicoidal, curvada o recta, de 0,3-1,0 μm de ancho y de 1,5-5 μm de largo. Presentan extremos redondeados y cuando son curvados muestran periodicidad espiral. No forman esporas. Las células de cultivos antiguos pueden formar estructuras esféricas o cocoides (Vandamme *et al.*, 1991). Pueden tener un único flagelo polar (*H. cinaedi* y *H. fenneillae*) o múltiples flagelos laterales, unipolares o bipolares (*H. pylori* y *H. mustelae*), con una protuberancia terminal, de 2,5 μm de longitud y 30 nm de grosor. Todos los flagelos están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa. Esta parece tener la misión de proteger a los flagelos de su degradación, siendo una adaptación para

vivir, moverse a través de la mucosa y protegerse contra el ácido del estómago (Owen, 1998).

Son bacterias que viven en ambientes microaerófilos, con metabolismo de tipo respiratorio y que no utilizan carbohidratos. En los medios de cultivo típicos para *Helicobacter* originan, tras 2-5 días de incubación a 37°C, colonias no pigmentadas, translúcidas y de 1-2 mm de diámetro. Crecen a 30°C pero no a 25°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento 37°C. Tienen actividad catalasa y oxidasa. No producen H₂S y tampoco son capaces de hidrolizar el hipurato. Las especies gástricas sintetizan la enzima ureasa. Su contenido en G+C varía entre el 35 y el 44% (Vandamme *et al.*, 1991).

H. pylori es la especie tipo del género y la más importante en patología humana por su estrecha relación con la úlcera péptica y el cáncer gástrico (Dunn *et al.*, 1997). En el estómago aparecen como bacilos cortos espirales o en forma de "S", de 0,5 a 1 µm de ancho y aproximadamente 3 µm de largo. Las bacterias cultivadas *in vitro* son menos espirales y aparecen más como bacilos curvados. Presentan de 4 a 6 flagelos polares envainados (Figura 3). En cultivos viejos aparecen formas cocoides (Bode *et al.*, 1993). Es inactivo frente a la mayoría de las pruebas bioquímicas e incapaz de utilizar carbohidratos ni por la vía fermentativa ni por la oxidativa. Produce catalasa y citocromo oxidasa, pero en mucha mayor cantidad produce ureasa y fosfatasa alcalina (Goodwin y Armstrong, 1990).



Figura 3: Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori* (ASM MicrobeLibrary.org)

El nicho en el cual vive *H. pylori*, la mucosa gástrica, presenta características peculiares y únicas. Para alcanzar este microambiente, la bacteria debe pasar a través de la cavidad oral y el tracto del esófago. Cuando llega al píloro, el pH en el lumen del estómago presenta valores de entre 1 y 4, condiciones que desnaturalizan la mayoría de las proteínas. Sin embargo, *H. pylori* sobrevive a estas condiciones, ya que es capaz de tamponar el pH en su zona más próxima debido a la acción de la enzima ureasa. Esta enzima, que *H. pylori* produce en abundancia, convierte la urea en amoníaco y dióxido de carbono, alcalinizando el medio y permitiendo que el microorganismo sea capaz de sobrevivir en la mucosa gástrica a pesar de la acidez del lumen (Marshall *et al.*, 1990).

4.4. ETIOPATOGENIA

H. pylori se asocia específicamente con la mucosa gástrica humana. En la mayoría de los casos produce gastritis de tipo inflamatorio, aunque en muchos casos la presencia de este microorganismo resulta asintomática (Dunn *et al.*, 1997; Correa y Piazuelo, 2011). Sin embargo, en algunos pacientes también existe la posibilidad de desarrollar una gastritis crónica de tipo superficial y/o úlcera gástrica. Los síntomas más comunes cuando los individuos presentan manifestaciones clínicas de gastritis o úlcera son náuseas, dolor abdominal, acidez o sangrado. La mayoría de ellos desaparecen rápidamente tras la erradicación de la bacteria mediante terapias con antibióticos.

Todavía no se conoce claramente por qué en unos pacientes la enfermedad es casi asintomática mientras que en otros se producen enfermedades digestivas de diferente gravedad. Parece ser que algunos factores genéticos, ambientales o los factores de patogenicidad de la propia bacteria pueden influir en el desarrollo de la enfermedad (Höcker y Hohenberger, 2003).

La infección crónica por *H. pylori* puede conducir al desarrollo de cáncer gástrico (Wroblewski *et al.*, 2010). De hecho, *H. pylori* es actualmente la única bacteria con acción carcinógena demostrada. En el año 1994, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud incluyó a *H.*

pylori como agente biológico carcinógeno para el hombre (categoría 1) por su estrecha relación con el cáncer gástrico y el linfoma gástrico de tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosas), lo cual se reconfirmó en 2009 (IARC *Helicobacter pylori* Working Group, 2014) (Figura 4).

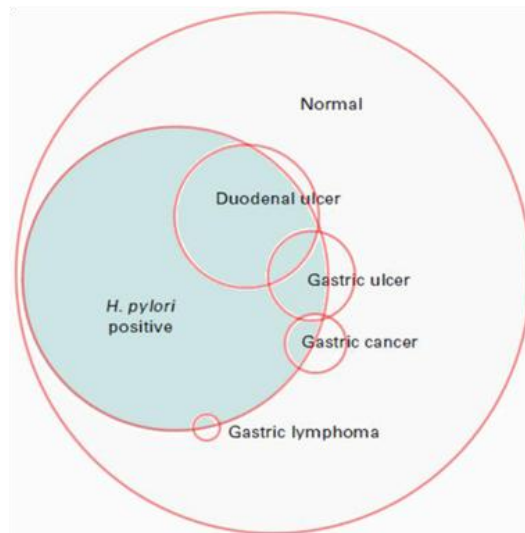


Figura 4: Enfermedades asociadas con *H. pylori* (Ryan *et al.*, 2014, reproducida de Marshall, 2002)

Aproximadamente el 89% de los casos de cáncer gástrico no relacionados con el cardias estomacal, los cuales representan el 78% de todos los casos de cáncer gástrico, se atribuyen en la actualidad a una infección crónica por *H. pylori* (IARC *Helicobacter pylori* Working Group, 2014). El cáncer gástrico es actualmente la tercera causa de mortalidad por cáncer en el mundo y el quinto tipo de cáncer más diagnosticado. Las estimaciones más recientes del informe GLOBOCAN llevado a cabo en 2012 (Ferlay *et al.*, 2013) indican que en ese año ocurrieron cerca de 1 millón de nuevos casos de cáncer gástrico en el mundo y aproximadamente 725.000 muertes por esta causa, lo cual supone el 7% de los nuevos casos de cáncer y el 9% del total de las muertes por cáncer.

Recientemente, la IARC señaló como una prioridad mundial establecer estrategias de prevención del cáncer gástrico mediante la erradicación de *H. pylori*, y recomendó a todos los países que consideraran el incluir el cáncer gástrico en sus programas de control de cáncer, previa valoración de los impactos económicos y

humanos actuales y futuros y del valor potencial de las estrategias de prevención (IARC *Helicobacter pylori* Working Group, 2014). A pesar de ello, la misma IARC señala que en estos momentos ningún país ha implementado ningún tipo de estrategia de prevención que incluya el control de *H. pylori* en el ambiente, debido en gran parte al desconocimiento existente sobre su epidemiología.

Por otra parte, la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. ha incluido a *H. pylori* en la Lista 3 de candidatos para incorporar su control en la legislación sobre el control de patógenos ambientales (EPA, 2009). Sin embargo, la bacteria permanece como un candidato a la espera de obtener un método estándar para su detección.

Una de las terapias de erradicación de *H. pylori* más extendida es la triple terapia, conocida como “OCA”, que consiste en el suministro de un inhibidor de la bomba de protones, omeprazol (20 mg/12h), como antisecretor, junto con claritromicina (500 mg/12 h) y amoxicilina (1 g/24h) como antibióticos, durante 7 a 10 días. A los pacientes alérgicos a la amoxicilina se les suministra metronidazol (500 mg/12h). Sin embargo, cada vez se detectan más fallos terapéuticos por la aparición de cepas resistentes. Recientemente, la Organización Mundial de la Salud ha publicado una lista con las 12 bacterias que suponen un gran riesgo para la salud humana por su resistencia a distintos antibióticos, entre las cuales se encuentra *H. pylori* en el grupo de prioridad 2 (alto riesgo), por su resistencia a la claritromicina (OMS, 2017). Las recomendaciones nacionales e internacionales actuales sobre la terapia de erradicación de *H. pylori* proponen que, en zonas geográficas en las que la resistencia a la claritromicina sea superior al 15%, tal y como sucede en el sur de Europa, se abandone la terapia OCA y se utilicen pautas cuádruples con o sin bismuto (Chey *et al.*, 2017). De hecho, un estudio español propone abandonar la terapia triple como tratamiento de primera línea por las bajas tasas de erradicación alcanzadas y recomienda la pauta OCAM (inhibidor de la bomba de protones, claritromicina, amoxicilina y metronidazol) durante 14 días (Gisbert *et al.*, 2016). Sin embargo, debido a la dificultad de disponer de datos locales y actualizados de resistencia a claritromicina, la triple terapia clásica “OCA” ampliada hasta 14 días podría considerarse una opción en zonas en las que se tenga evidencia de estar alcanzando tasas de erradicación del orden del 85% (Fallone *et al.*, 2016).

4.5. EPIDEMIOLOGÍA

La infección por *H. pylori* es una de las infecciones crónicas más comunes en la humanidad. Desde que se produjera en 1983 el descubrimiento de la existencia de la infección en los seres humanos, se han llevado a cabo numerosos estudios epidemiológicos sobre la misma. Estos han tenido como objetivo determinar su prevalencia, identificar factores de riesgo que pudieran participar en su adquisición, así como detectar su modo de transmisión. Actualmente se estima que más de la mitad de la población mundial, aproximadamente 4,4 mil millones de personas, está infectada con esta bacteria (Hooi *et al.*, 2017) (Figura 5).

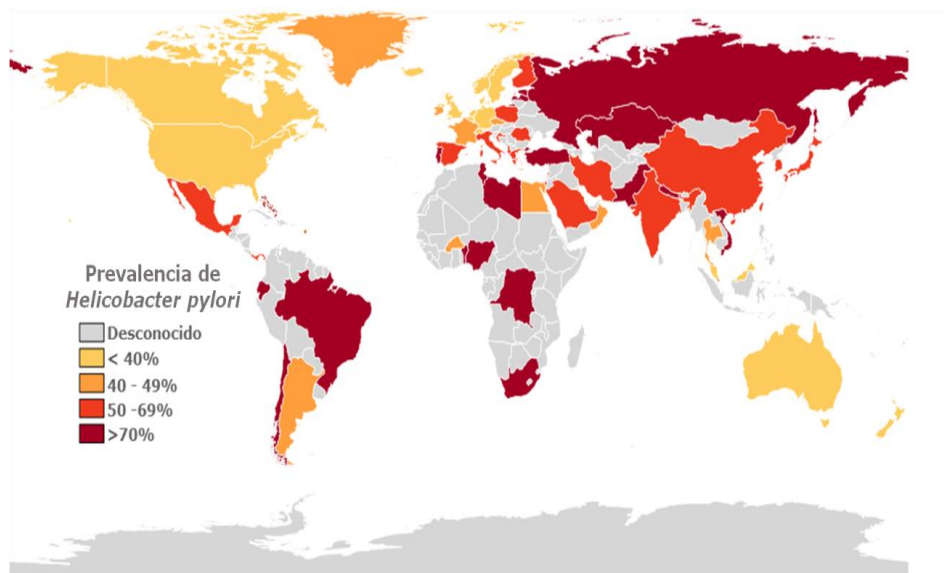


Figura 5: Prevalencia mundial de *H. pylori*. Adaptado de <https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html>

Sin embargo, existe una amplia variabilidad en la prevalencia de *H. pylori* entre regiones y países. Las regiones con prevalencias más altas son África (79,1%), América Latina y el Caribe (63,4%) y Asia (54,7%). Por el contrario, las prevalencias más bajas se encuentran en las regiones de América del Norte (37,1) y Oceanía (24,4%). El país con la prevalencia de *H. pylori* más baja es Suiza (18,9%). España tiene una prevalencia del 54,9% (Figura 6). En los últimos años la prevalencia de *H. pylori* ha ido disminuyendo en los países muy industrializados de Occidente, mientras que ha alcanzado unos

niveles estables, aunque elevados, en los países en desarrollo o recientemente industrializados (Hooi *et al.*, 2017).

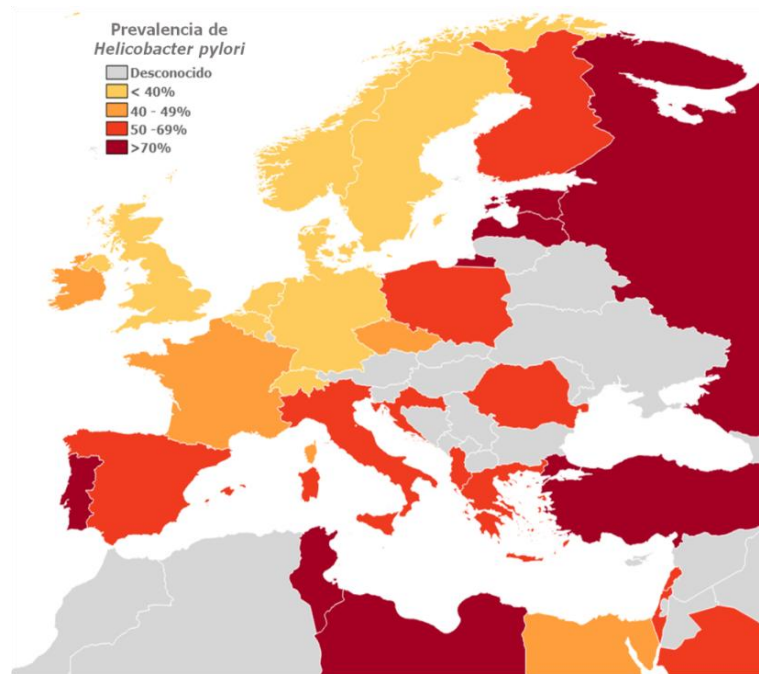


Figura 6: Prevalencia de *H. pylori* en Europa. Adaptado de

<https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html>

Esta gran diferencia en la prevalencia de *H. pylori* probablemente refleja el nivel de urbanización, sanidad, acceso a agua limpia y el estatus socioeconómico de la población (Hooi *et al.*, 2017). De hecho, existen grandes diferencias en la prevalencia de *H. pylori* dentro de un mismo país. Por ejemplo, en Estados Unidos, en personas blancas no hispánicas esta prevalencia oscila entre el 18,4% y el 26,2% de la población, mientras que en personas no blancas varía entre el 34,5 y el 61,6% (Everhart *et al.*, 2000; Cardenas *et al.*, 2006). Además, alcanza el 75,0% en la población nativa de Alaska (Parkinson *et al.*, 2000).

En África, pese a la alta prevalencia de *H. pylori*, las tasas de cáncer gástrico permanecen bajas comparadas con las de China o Japón. Para explicar esta cuestión se han postulado factores relacionados con la variable virulencia de diferentes cepas, el polimorfismo genético humano o el tipo de dieta (Graham *et al.*, 2009).

Es probable que la verdadera prevalencia de *H. pylori* esté subestimada, especialmente en áreas con acceso limitado a instalaciones sanitarias. Además, *H. pylori* no se incluye rutinariamente en revisiones de salud, lo cual reduce la posibilidad de identificar su presencia en la población general. Asimismo, se podría también estar subestimando la prevalencia global de *H. pylori*, ya que la infección bacteriana tiende a desaparecer en las personas mayores, con la progresión de las lesiones gástricas (Hooi *et al.*, 2017). Esto podría explicar por qué la prevalencia de esta bacteria parece que se haya mantenido estable en partes de Asia, América Latina y el Caribe cuando se compara con áreas desarrolladas de Europa, América del Norte y Oceanía.

4.6. MODO DE TRANSMISIÓN

El modo de transmisión de *H. pylori* ha sido fuertemente debatido y hasta el momento no se ha determinado con exactitud (Percival *et al.*, 2009; Eusebi *et al.*, 2014), si bien existen evidencias que indican que *H. pylori* puede ser adquirido por múltiples vías.

Transmisión persona-persona:

Se cree que el modo de transmisión persona-persona es la ruta más probable en países desarrollados, aunque en países en vías de desarrollo también juega un papel importante. Se ha demostrado que el contacto personal cercano, particularmente con familiares, es un factor de riesgo para la transmisión de la enfermedad (Dominici *et al.*, 1999; Escobar y Kawakami, 2004).

La transmisión persona-persona puede ocurrir mediante varias rutas, siendo las más probables la fecal-oral, oral-oral y la gastro-oral.

H. pylori ha sido cultivado a partir de heces de individuos infectados (Thomas *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1994; Falsafi *et al.*, 2007), existiendo cada vez más evidencias que sugieren una ruta de transmisión fecal-oral para *H. pylori* (Mladenova *et al.*, 2006). Sin embargo, esta ruta sigue siendo cuestionada, ya que la concentración de *H. pylori* en las heces es considerada baja, particularmente cuando se compara con la de otros patógenos fecales de importancia en la salud pública (Dolan *et al.*, 2018). Además, el

cultivo de *H. pylori* a partir de heces se ha conseguido en muy pocas ocasiones, aunque la presencia de sus antígenos y su DNA en heces de individuos infectados es un hecho común (Ford y Axon, 2010).

H. pylori también ha sido encontrado en saliva, placa dental y en la cavidad oral (Fernández-Tilapa *et al.*, 2011; Rasmussen *et al.*, 2010; Cellini *et al.*, 2010), lo que sugiere que éstos podrían ser reservorios de *H. pylori*, apoyando la existencia de la ruta oral-oral. Un estudio relativamente reciente (Zou y Li, 2011) mostró que la prevalencia de *H. pylori* en la cavidad oral de pacientes infectados fue significativamente superior a la de los pacientes no infectados. Además, demostraba que la tasa de erradicación de *H. pylori* del estómago es mucho mayor que la de la cavidad oral, sugiriendo que *H. pylori* en la cavidad oral podría ser una fuente de reinfección después de la erradicación de la infección gástrica. Sin embargo, la imposibilidad de haber cultivado *H. pylori* a partir de estos reservorios plantea ciertas reservas sobre esta hipótesis, ya que la detección de DNA de la bacteria no implica que el microorganismo esté vivo y sea infectivo.

Asimismo, dado que una infección aguda por *H. pylori* puede causar vómitos, se facilitaría la diseminación y supervivencia de la bacteria, dando lugar a una ruta de transmisión gastro-oral. Lizza *et al.* (2000), en un estudio realizado en cien niños y adolescentes en Italia, concluyeron que, en los hermanos estudiados, existía una relación directa entre la infección y la historia de vómitos, sugiriéndose que esta ruta podría ser más importante en niños que la fecal-oral o la oral-oral. Además, Leung *et al.* (1999) consiguieron cultivar *H. pylori* procedente del vómito de niños con gastroenteritis, lo cual también apoya la existencia de la ruta gastro-oral.

Transmisión por agua:

Aunque el nicho natural de *H. pylori* es el estómago humano, para su transmisión indirecta el organismo necesita sobrevivir en el medio ambiente externo. Mientras que la principal ruta de transmisión queda lejos de estar clara, la prevalencia de la infección por *H. pylori* muestra una fuerte correlación con el acceso a agua limpia. Por tanto, la transmisión de *H. pylori* a través del agua puede ser particularmente importante en

regiones del mundo donde la calidad de la misma es baja, y podría ser una razón para la diferencia observada en la prevalencia de *H. pylori* entre países desarrollados y en vías de desarrollo (Bunn *et al.*, 2002).

H. pylori se ha detectado en plantas de depuración de aguas residuales, tanto en el afluente como en el efluente. Moreno y Ferrús (2012) analizaron 45 muestras de agua residual y consiguieron cultivar *H. pylori* en 6 de ellas. Bai *et al.* (2016) detectaron *H. pylori* mediante PCR y qPCR y también consiguieron cultivos de la bacteria a partir de agua residual tratada.

H. pylori también se ha detectado en agua potable, tanto por PCR convencional (Moreno *et al.*, 2003; Benson *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2012; Amirhooshang *et al.*, 2014; El-Sharouny *et al.* 2015) como por qPCR (Liu *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2015). Sin embargo, la presencia de DNA no implica que la bacteria sea viable, lo cual se demostraría mediante cultivo o el uso de técnicas moleculares que sean capaces de determinarla. Al Sulami *et al.* (2010) y Santiago *et al.* (2015) consiguieron cultivar *H. pylori* a partir de aguas potables en Iraq y España, respectivamente. Además, Santiago *et al.* (2015) mostraron, mediante las técnicas moleculares indicadoras de viabilidad DVC-FISH y PMA-qPCR, que 6 de las 16 muestras de agua potable en las que se había detectado *H. pylori* contenían formas viables de la bacteria, indicando que el sistema de distribución de agua potable podría ser una ruta de transmisión para *H. pylori*.

Los niveles de cloro en sistemas de distribución de aguas oscilan entre 0,1 y 0,3 mg/l. En tratamientos inadecuados, interrumpidos o intermitentes, es posible que no se produzca una adecuada inactivación de *H. pylori* para prevenir la entrada y persistencia de la bacteria dentro de los sistemas de distribución de agua, suponiendo un riesgo de infección para los individuos que consuman estas aguas tratadas de forma deficiente (Baker *et al.*, 2002). De hecho, Bunn *et al.* (2002) llevaron a cabo un estudio sobre la presencia de *H. pylori* en biopelículas en el sistema de distribución de agua potable de Gambia para determinar si el consumo de esta agua supone un factor de riesgo para la adquisición de la bacteria en niños. Durante el estudio, la disponibilidad del agua se redujo inesperadamente y se empezó a consumir agua superficial, lo cual supuso un incremento en la proporción de niños colonizados por *H. pylori*. Además,

cuando la calidad y disponibilidad del agua mejoraron, *H. pylori* se adquirió significativamente a una edad más avanzada. En este caso, aunque no se consiguió cultivar la bacteria a partir de las biopelículas formadas en el sistema de distribución del agua potable, sí que se detectó DNA de *H. pylori* en ellas.

Parece que esta bacteria es capaz de tolerar los tratamientos de desinfección mejor que los indicadores fecales básicos (Azevedo *et al.*, 2004). Por esta razón, es razonable sugerir que *H. pylori* puede estar presente en aguas cuando la enumeración de coliformes en medios selectivos indique que el agua es potable. Es más, es concebible que *H. pylori* sea capaz de persistir durante largos periodos de tiempo en sistemas de distribución de agua que contengan bajos niveles de cloro residual. Esto está reforzado por estudios que demuestran que *H. pylori* puede ser más resistente al cloro libre que *E. coli* (Johnson *et al.*, 1997). De hecho, Moreno *et al.* (2007) realizaron un estudio *in vitro* en el que expusieron a *H. pylori* a una concentración de cloro libre de 0,96 mg/l y demostraron, mediante técnicas moleculares indicadoras de viabilidad, que *H. pylori* puede sobrevivir a los tratamientos de desinfección normalmente aplicados en las aguas potables, aunque pierde su capacidad de crecimiento sobre medios de cultivo.

H. pylori también es capaz de sobrevivir en biopelículas cuando crece en altas condiciones de C:N (Percival *et al.*, 2004). Stark *et al.* (1999) demostraron que *H. pylori* es capaz de formar biopelículas insolubles al agua, lo cual podría conferirle un aumento de la resistencia frente a las defensas del hospedador y a los antibióticos o factores ambientales desfavorables, facilitando su crecimiento y supervivencia. Por tanto, la asociación de *H. pylori* con comunidades de biopelículas dentro de un sistema de distribución de aguas podría ofrecer a la bacteria protección frente a la desinfección y a la predación por protozoos (Watson *et al.*, 2004).

Algunas FLA pueden actuar como hospedadores de bacterias resistentes a las amebas (ARB) y favorecer su protección y diseminación en los sistemas de agua (Loret y Greub, 2010). De hecho, las biopelículas parecen ser el lugar donde principalmente ocurre la colonización de FLA por bacterias resistentes a las amebas (Loret y Greub, 2010). Debido al bajo porcentaje de supervivencia de *H. pylori* en aguas, se sospecha que la bacteria podría sobrevivir en FLA, que la protegerían frente a los distintos

tratamientos, y a través de ellas llegar a los humanos. En este sentido, actualmente existen pocos trabajos que estudien esta relación, y los que existen han sido llevados a cabo exclusivamente *in vitro* (Winiiecka-Krusnell *et al.*, 2002; Smith y Ashbolt, 2012).

Debido a que la forma habitual de *H. pylori* en aguas es la forma VBNC (viable no cultivable), siendo la bacteria incapaz de crecer en los medios de cultivo conocidos (Signoretto *et al.*, 2000), se ha recurrido a diferentes métodos moleculares para la detección de este patógeno en aguas. Se han publicado diversos artículos en los que se detecta la presencia de *H. pylori* mediante PCR en aguas residuales (Moreno y Ferrús, 2012; Bai *et al.*, 2016) e incluso en aguas potables (Watson *et al.*, 2004). También se han utilizado métodos sensibles como la qPCR (Zhang *et al.*, 2012b), que han revelado la presencia de este patógeno. Pero en estos casos, sólo se ha demostrado la presencia del DNA de esta bacteria. La primera vez que se identificaron formas viables de *H. pylori* en aguas residuales depuradas se realizó mediante la técnica DVC-FISH (Piqueres *et al.*, 2006).

Transmisión por alimentos:

Actualmente existen diversos estudios que abordan el papel de la transmisión de *H. pylori* a través de los alimentos. En concreto, los tipos de alimentos más estudiados son la leche y las verduras.

Los productos derivados de los animales, y más concretamente la leche sin tratar, se consideran como una posible fuente de infección humana con *H. pylori*, ya que se ha detectado su DNA en este tipo de muestras (Dore *et al.*, 1999; Momtaz *et al.*, 2014). Contrariamente, otros estudios no han obtenido resultados positivos de la presencia de *H. pylori* en muestras de leche, lo que podría explicarse por una desigual distribución geográfica de la bacteria (Turutoglu y Mudul, 2002; Tabatabaei, 2012). Mousavi *et al.* (2014) estudiaron muestras de productos que habían sido producidos usando leche sin pasteurizar y demostraron la presencia de *H. pylori* en el 19,8% de las muestras de leche analizadas, 30% de las muestras de queso, 15% de las de crema, 5% de las de mantequilla y 27% de las de crema de arroz analizadas. Además, otros estudios han sugerido que la alta prevalencia de *H. pylori* entre los pastores podría

deberse a que las ovejas juegan un papel importante en la transmisión de esta bacteria (Papież *et al.*, 2003; Plonka *et al.*, 2006).

Respecto a las verduras, Atapoor *et al.* (2014) realizaron un estudio con 460 vegetales, entre los que se incluían espinacas y lechugas, y detectaron *H. pylori* mediante cultivo en el 9,56% de las muestras y mediante PCR en el 10,86% de las mismas. Yahaghi *et al.* (2014) analizaron 380 muestras de verduras y 50 muestras de ensaladas comerciales y demostraron, mediante cultivo y posterior confirmación por PCR, que el 13,68% de las muestras de verduras y el 14% de las de ensalada contenían *H. pylori*. Estos resultados demuestran que las verduras son una probable fuente de transmisión de *H. pylori* a los humanos. La forma mediante la cual *H. pylori* puede llegar a los vegetales es, probablemente, mediante el agua de riego o el agua usada para su lavado (Mazari-Hiriart *et al.*, 2008).

4.7. ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE (VBNC)

Desde que en 1982 Xu *et al.* (1982) publicaran su trabajo sobre la supervivencia y viabilidad de células no cultivables de *E. coli* y *Vibrio cholerae* en ambientes marinos, se han publicado más de 400 estudios en los que se describen varios aspectos de lo que se conoce como el estado VBNC. Se sabe que un gran número de microorganismos, tanto patógenos como no patógenos, entran en este estado de latencia, en el que no son capaces de crecer en los medios de cultivo habituales, aunque mantienen su capacidad metabólica (Oliver, 2000a). Este hecho es de gran importancia en los estudios microbiológicos, en los que el cultivo se emplea a menudo como el único indicador de viabilidad, lo que supone que podría estar infravalorándose su potencial como agentes infecciosos (Oliver, 2005a).

La lista de bacterias patógenas que pueden entrar en el estado VBNC es cada vez más amplia e incluye no sólo a aquellas bacterias que infectan a los humanos, sino también las que infectan a diversos animales y a plantas (Oliver, 2010). En 2015, Pinto *et al.* (2015) revisaron las bacterias con estado VBNC conocido y presentaron una lista actualizada con 68 especies. Entre las bacterias patógenas se incluyen *Campylobacter*

spp., *E. coli* (incluyendo las cepas patógenas), *H. pylori*, *L. pneumophila*, *P. aeruginosa* o *Vibrio* spp.

Las células entran en el estado VBNC como una respuesta a condiciones de estrés, tales como la falta de nutrientes (Cook y Bolster, 2007), la incubación fuera de su rango de temperatura (Besnard *et al.*, 2002; Wong y Wang, 2004), elevadas o bajas concentraciones osmóticas (Asakura *et al.*, 2008), la concentración de oxígeno (Kana *et al.*, 2008), la temperatura (Phillips, 2001) o la exposición a la luz (Gourmelon *et al.*, 1994). Estos tipos de estrés ambiental podrían ser letales si las células no entrasen en este estado de latencia. Por ejemplo, Oliver (2005b) determinó que el tratamiento de cloración del agua residual promovía que las células entrasen en el estado VBNC. Por todo ello, se cree que es una estrategia de supervivencia en respuesta a condiciones ambientales desfavorables, y parece que el estado VBNC constituye un reservorio importante de patógenos en el medio ambiente (Lleò *et al.*, 2007).

El tránsito a este estado se ha relacionado con cambios morfológicos en estas bacterias, las cuales adquieren una forma esférica o cocoide, haciéndose más pequeñas. Esta disminución del tamaño celular permitiría que las células tuvieran una mayor superficie para la captación de nutrientes mientras mantienen la menor cantidad de masa celular (Krebs y Taylor, 2011). Por ejemplo *Vibrio vulnificus* mide 2 μm de largo en su fase de crecimiento logarítmica, pero se reduce hasta 0,6 μm de diámetro en su estado VBNC. Sin embargo, otros autores han demostrado la existencia de células en estado VBNC que conservan su morfología espiral (Lázaro *et al.*, 1999).

En este estado las células cambian la composición de la pared y membrana celulares, la expresión génica, la resistencia física y química, sus propiedades de adherencia y su potencial de virulencia; también disminuyen la síntesis de macromoléculas y las tasas de respiración, aunque mantienen altos niveles de ATP y potencial de membrana (Oliver, 2010; Li *et al.*, 2014).

Aunque pierden su capacidad para crecer en medios, mantienen la viabilidad y parece que también la patogenicidad (Signoretto *et al.*, 2000). Sin embargo, no todos los investigadores consideran que los patógenos sean capaces de iniciar un proceso de infección cuando se encuentran en el estado VBNC. Por ejemplo, Cappelier *et al.* (2007) demostraron que se requieren ciertas condiciones para observar la virulencia

de células VBNC de *Listeria monocytogenes*. De hecho, parece más probable que los patógenos no sean capaces de iniciar la enfermedad cuando se encuentran en su estado VBNC, y la infección solo pueda ser iniciada después de su reversión al estado cultivable y metabólicamente activo.

El estado VBNC de *H. pylori* se describió en 2005 (Oliver, 2005b). Este estado suele asociarse con una modificación de su morfología espiral elongada para transformarse en una forma cocoide (esférica), con la consiguiente pérdida de cultivabilidad (Cellini *et al.*, 1998; Andersen y Rasmussen, 2009) (Figura 7).

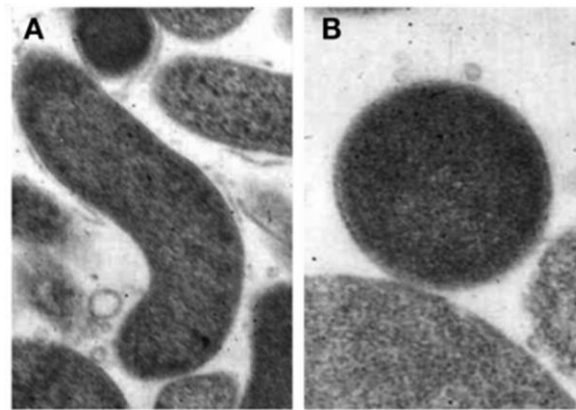


Figura 7: Microfotografías de transmisión electrónica mostrando la morfología de *H. pylori*. A: bacilo; B: coco. Aumentos originales x20000 (Cellini, 2014)

Costa *et al.* (1999) demostraron que el cambio de morfología en *H. pylori* está relacionado con su condición de resistencia, debido a que se produce una modificación significativa en la pared celular parecida a la de las endosporas. De hecho, también mostraron que el peptidoglicano de las células cocoides de *H. pylori* es similar al de los esporulados de *Bacillus sphaericus*.

En el estado cocoide se observa una pequeña disminución en el contenido de DNA, aunque este mantiene su integridad (Moreno *et al.*, 2007). A pesar de la disminución de los niveles de DNA y RNA, no hay degradación de los ácidos nucleicos ni de los plásmidos, y la síntesis de ureasa y la presencia y posible expresión de toxina vacuolizante serían argumentos que apoyarían el posible papel de las formas VBNC como agentes transmisores de la infección (Hultén *et al.*, 1998; Wang y Wang, 2004).

Sin embargo, en la actualidad, todavía existe controversia sobre la viabilidad e infecciosidad de estas formas (Andersen y Rasmussen, 2009). Debido a que se detectan estas formas viables no cultivables con mucha frecuencia en el agua, si la forma cocoide fuera viable e infecciosa, no habría duda sobre la importancia del agua para la transmisión de *H. pylori*.

Dos años después de la primera descripción del estado VBNC, investigadores del mismo laboratorio describieron la “resucitación” de *Salmonella enteritidis* (Roszak *et al.*, 1984). Desde ese momento han sido muchos los estudios que demuestran que distintas especies capaces de adquirir el estado VBNC tienen la capacidad de “resucitar”, es decir, de revertir de ese estado, volviendo a ser cultivables una vez las condiciones adversas se vuelven óptimas para su desarrollo (Pinto *et al.*, 2015). En el caso de *H. pylori*, se ha publicado algún trabajo en el que formas VBNC de la bacteria son capaces de volver a crecer en medios de cultivo (Andersen *et al.*, 1997; Cellini *et al.*, 1998; Kurokawa *et al.*, 1999). Recientemente, Richards *et al.* (2011) cuantificaron los niveles de RNA y del gen *cdrA*, relacionado con la división celular, para demostrar la resucitación de formas VBNC de *H. pylori* utilizando un medio de cultivo líquido especializado suplementado con minerales, eritrocitos y suero humanos.

De forma general, los estudios admiten que el estado celular VBNC es una herramienta de supervivencia que confiere a las bacterias la capacidad de persistir en ambientes con condiciones adversas. Dado que estas formas celulares podrían ser infectivas, pero no pueden ser detectadas mediante los métodos convencionales de cultivo, plantean un riesgo de salud pública significativo. De esta forma, se necesitan métodos alternativos no dependientes de cultivo para demostrar que las células en este estado están vivas (Oliver, 2010).

5. AMEBAS DE VIDA LIBRE (FLA)

Las amebas de vida libre (FLA) son un grupo heterogéneo de protozoos encontrados en todo el mundo (Rodríguez-Zaragoza, 1994). El término “ameba” deriva de la palabra griega *amoibé*, la cual significa “cambiante” y precisamente hace referencia al aspecto cambiante de las FLA cuando se mueven. Son organismos de vida

libre porque tienen la capacidad de existir en la naturaleza como organismos libres, aunque ocasionalmente sean capaces de invadir a un hospedador y vivir como parásitos de éste (Page *et al.*, 1988). Por esta razón a las FLA también se las conoce como amebas anfitriónicas, pese a que este término no es el más comúnmente utilizado.

5.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A finales del siglo XIX se mencionó por primera vez a una ameba que se transformaba en un flagelado, a la que se nombró *Amoeba gruberi*. Unos años más tarde, Alexeieff acuñó el nombre del género *Naegleria* y Craig estableció que este género tenía poco interés médico, ya que no contenía ningún organismo que afectara a los humanos. No fue hasta finales de la década de 1960 cuando se descubrió que *Naegleria* podía provocar una terrible enfermedad en humanos. Esta *Naegleria* patógena fue descrita por Carter como una especie separada, *Naegleria fowleri*, en honor a Fowler, quien describió los primeros casos de la enfermedad en 1965 en Australia. En 1966 esta enfermedad se nombró como meningoencefalitis amebiana primaria (PAM) (De Jonckheere, 2014).

También a finales del siglo XIX, Dangeard aisló *Sappinia* de cultivos antiguos de excrementos de caballo. Se trataba de *Sappinia pedata*, una FLA binucleada con un glicocálix denso. La segunda especie del género *Sappinia*, *Sappinia diploidea*, fue descrita originalmente por Hartmann y Nägler en 1908. La llamaron *Amoeba diploidea* y consiguieron aislarla del colon de un lagarto. En 1912, Alexeieff transfirió *A. diploidea* al género *Sappinia*. Este género se definió como de amebas generalmente binucleadas con división promitótica (Walochnik, 2010).

Por otra parte, en 1913 Puschkarew aisló una ameba a partir de polvo y la nombró *Acanthamoeba polyphagus*. Esta misma ameba sería renombrada por Page como *Acanthamoeba polyphaga*. En 1930, Castellani aisló una ameba que se encontraba como contaminante en un cultivo del hongo *Cryptococcus paratoseus*. Basándose en su morfología, la ameba fue clasificada dentro del género *Hartmannella* (actualmente renombrado como *Vermamoeba*), como *Hartmannella castellanii*. En 1967, después de estudiar varias cepas de *Hartmannella* y *Acanthamoeba*, Page

determinó que el género *Hartmannella* no tenía nada en común con *Acanthamoeba* excepto por un patrón mitótico similar, el cual comparten con muchas otras amebas (Fuerst *et al.*, 2014).

Pese a que el descubrimiento de *Acanthamoeba* se realizó a principios del siglo XX, no fue hasta la década de 1950 cuando esta ameba empezó a cobrar importancia, al descubrirse su capacidad patógena tanto en animales como en personas. Además, también en la misma década se descubrió que esta ameba tiene la capacidad de albergar a bacterias endosimbiontes en su interior y que está relacionada con la legionelosis (Kahn, 2015).

A lo largo de los años se han descrito casos de encefalitis por amebas, y, aunque estas no podían ser inequívocamente identificadas como *Acanthamoeba* o *Naegleria*, se consideraba que eran *Acanthamoeba* simplemente por el hecho de observar quistes en las secciones de cerebro analizadas (Visvesvara *et al.*, 2007). Fue en el año 1986 cuando se aisló una ameba morfológicamente distinta de *Acanthamoeba* del cerebro de un mandril que murió de meningoencefalitis en el parque natural de San Diego (California) (Visvesvara *et al.*, 1990) y se estableció que también era la responsable de los casos de encefalitis anteriores en los que las amebas no habían podido identificarse (Schuster y Visvesvara, 2004). En un primer momento se la describió como a una ameba leptomixida (por su parecido con las amebas del suelo incluidas dentro de la familia Leptomyxidae), pero, en 1993 fue diferenciada de las amebas de esta familia mediante observación al microscopio, tests de patogenicidad y análisis antigénicos y genéticos, lo que derivó en la designación de un nuevo género y especie, *Balamuthia mandrillaris* (Visvesvara *et al.*, 1993, Amaral-Zettler *et al.*, 2000; Booton *et al.*, 2003).

5.2. DISTRIBUCIÓN

Las FLA son organismos ubicuos que se han aislado en el medio ambiente del suelo (Reyes-Batlle *et al.*, 2014, Denet *et al.*, 2017), del agua (García *et al.*, 2013; Montalbano Di Filippo *et al.*, 2015) y del aire (Rivera *et al.*, 1994). Además se han aislado de otros ambientes, como lentillas y estuches para guardarlas (Martín-Navarro *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2016), aires acondicionados (Astorga *et al.*, 2011) e incluso vegetales (Chavatte *et al.*, 2016).

De todos estos ambientes el más estudiado es el agua. Se han detectado e identificado FLA en aguas residuales (García *et al.*, 2011; Magnet *et al.*, 2013; Mosteo *et al.*, 2013), potables (Thomas *et al.*, 2008; Delafont *et al.*, 2013; Magnet *et al.*, 2013), de río (Niyati *et al.*, 2012; Magnet *et al.*, 2013), de pozo (Baquero *et al.*, 2014; Montalbano Di Filippo *et al.*, 2015), recreacionales (Heggie, 2010; Sifuentes *et al.*, 2014; Reyes-Batlle *et al.*, 2017), embotellada (Maschio *et al.*, 2015a) y de uso industrial (Scheikl *et al.*, 2014).

Su abundancia y diversidad en el ambiente dependen en gran medida de la estación, la temperatura, la humedad, las lluvias, el pH y la disponibilidad de nutrientes (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Anderson, 2000; Bass y Bischoff, 2001). Las FLA son más abundantes a pH 7,6; su abundancia disminuye a pH 7,3-7,5 y 7,7-7,8 y es incluso menor a pH 7-7,2 y 7,9-8. Sin embargo, algunas amebas pueden tolerar niveles de pH de 8,6 o superiores. Las FLA normalmente toleran temperaturas de 10 a 30°C (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Las termotolerantes, como *Naegleria fowleri*, crecen bien por encima 37°C, y algunas cepas de *Vermamoeba* pueden incluso tolerar 48°C (Griffin, 1983).

5.3. CICLO DE VIDA

Las FLA tienen al menos dos estados de desarrollo: el trofozoito, la forma vegetativa metabólicamente activa mediante la cual es capaz de moverse, alimentarse y replicarse por fisión binaria, y el quiste, la forma de latencia metabólicamente inactiva.

El proceso por el cual las amebas pierden su movimiento de pseudópodos característico y se proveen de una pared protectora e impenetrable se denomina enquistamiento (Murti y Shukla, 1984). Este fenómeno es eficientemente inducido bajo ciertas condiciones, como la falta de nutrientes, estrés osmótico o como respuesta a toxinas bacterianas (Fritzinger y Marciano-Cabral, 2004; Lee *et al.*, 2012) (Figura 8). Los cuerpos redondos resultantes del enquistamiento son los quistes. Estos son inmóviles y metabólicamente inertes. Los quistes son mucho más resistentes a los tratamientos biocidas que los trofozoitos y pueden resistir durante largos periodos de tiempo bajo condiciones ambientales desfavorables (Fouque *et al.*, 2012). Las FLA enquistadas están protegidas de la desecación, la falta de nutrientes, y una gran variedad de agentes tanto químicos (desinfectantes y antimicrobianos) como físicos (calor, frío, radiación ultravioleta) (Aksozek *et al.*, 2002). Por tanto, tienen un papel estratégico en la supervivencia y propagación de FLA (Fouque *et al.*, 2012). Los quistes tienen una doble pared exterior, la pared del quiste. Su forma depende del género y especie de cada FLA, y es la base para su identificación morfológica (Fouque *et al.*, 2012). Sin embargo, las condiciones de cultivo pueden afectar a la morfología de los quistes, por lo que las identificaciones únicamente basadas en la morfología son poco fiables (Stratford y Griffiths, 1978). De hecho, actualmente muchos autores realizan la identificación de FLA mediante la secuenciación del gen 18S rRNA (Schuster y Visvesvara, 2004).

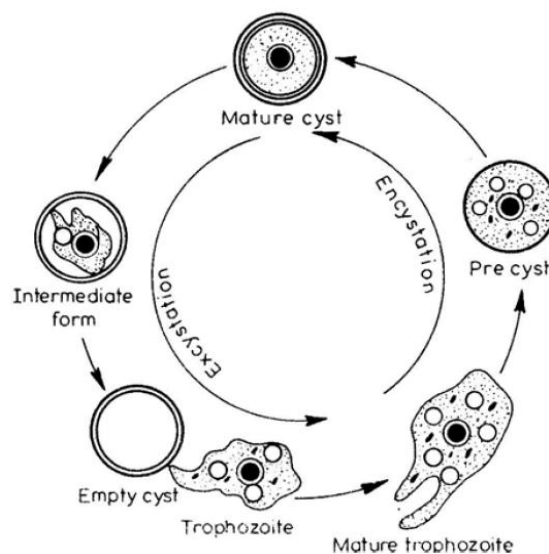


Figura 8: Representación esquemática de la diferenciación de *Acanthamoeba culbertsoni* (Murti y Shukla, 1984)

Los quistes se deshacen de su cubierta y vuelven a su forma vegetativa, el trofozoito, responsable de la infección, mediante el proceso denominado desenquistamiento (Murti y Shukla, 1984), que es inducido cuando las condiciones del medio se vuelven favorables (Rodríguez-Zaragoza, 1994) (Figura 8). Los trofozoitos se reconocen porque presentan pseudópodos que se proyectan hacia el exterior de la superficie celular.

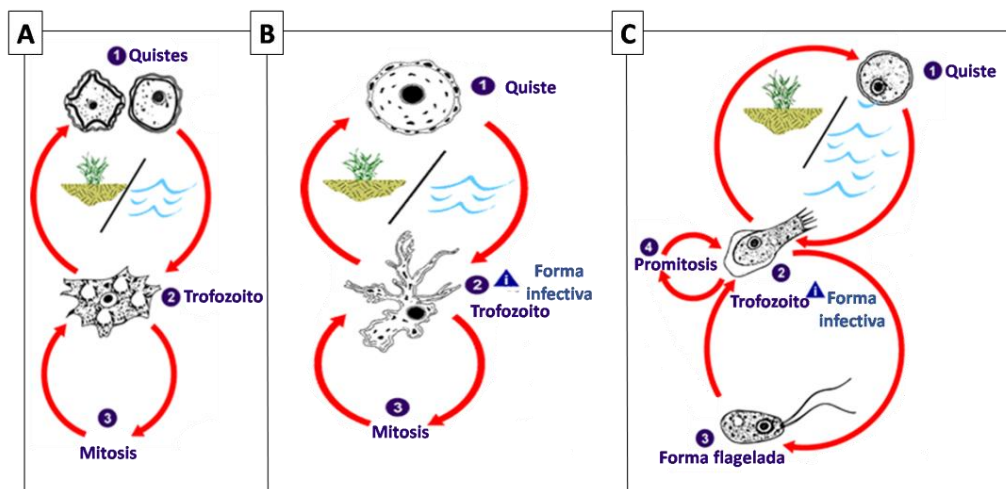


Figura 9: Ciclo biológico de A: *Acanthamoeba*, B: *B. mandrillaris*, y C: *N. fowleri*. Adaptado de la web de Center of Disease and Control (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>)

El trofozoito de *Acanthamoeba* es unicelular, con un núcleo de gran tamaño y una gran vacuola contráctil que controla el contenido de agua en la célula. Dependiendo de la especie de *Acanthamoeba*, el tamaño de los trofozoitos varía entre 25 y 40 μm . Presenta unas proyecciones filamentosas en su superficie llamadas acantopodos, de donde le viene el prefijo “*acantha-*” de su nombre, el cual significa “*espina*” en griego. Estas estructuras participan en su adhesión a superficies, tanto inertes como biológicas (Figura 10A) (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Khan, 2009). El quiste es una estructura redondeada que presenta una doble pared. La pared externa, el ectoquiste, es rugosa con pliegues y ondas, y la pared interna, el endoquiste, está formada por celulosa y se une al ectoquiste (Figura 10B). Su tamaño varía entre 13-20 μm y cambia entre especies.

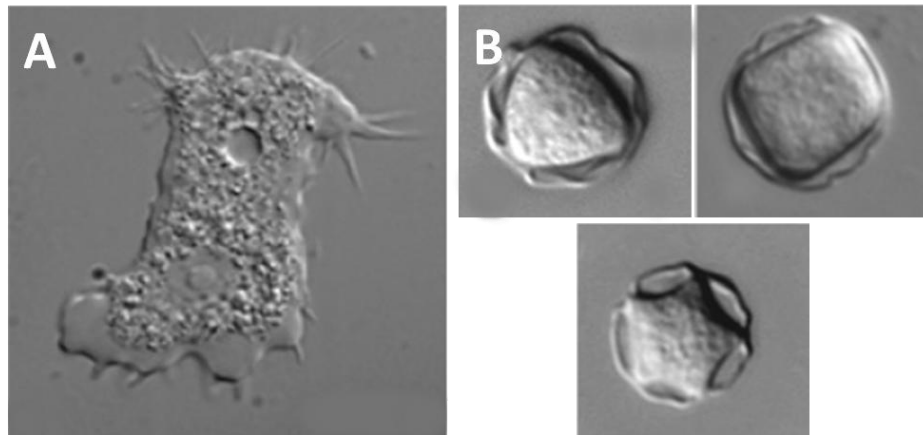


Figura 10: Microfotografías de *Acanthamoeba castellanii*. A: Trofozoito; B: diferentes morfologías de quistes (Kong, 2009)

En el caso de *B. mandrillaris*, el trofozoito se mueve lentamente comparado con otras FLA, con una velocidad estimada de $0,15 \mu\text{m/s}$ (Schuster *et al.*, 2003). Tienen un diámetro de $30\text{-}60 \mu\text{m}$ y generalmente presentan un único núcleo, aunque se han observado formas binucleadas y multinucleadas (Figura 11A) (Visvesvara *et al.*, 2007; Siddiqui y Khan, 2008). Los quistes miden $10\text{-}30 \mu\text{m}$, son esféricos y uninucleados. La pared del quiste no tiene poros y está hecha de tres capas: 1- una capa externa, el ectoquiste, que es arrugada; 2- una pared intermedia, el mesoquiste, que tiene una composición reticulada y 3- una pared interior, el endoquiste, que envuelve al citoplasma (Figura 11B).

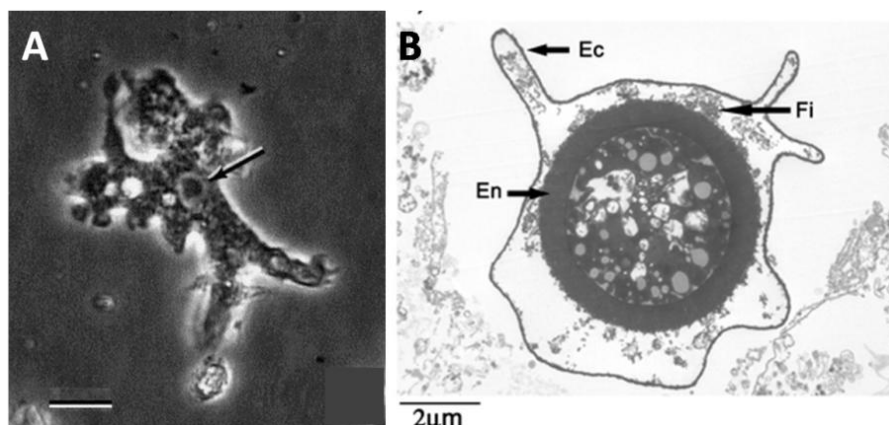


Figura 11: Trofozoito y quiste de *B. mandrillaris*. A: Microfotografía de contraste de fases de un trofozoito de *B. mandrillaris*. Flecha: núcleo. Barra: $10 \mu\text{m}$ (Schuster y Visvesvara, 2004); B: Microfotografía electrónica de transmisión de un quiste de *B. mandrillaris*. Ec: ectoquiste; En: endoquiste; Fi: filamentos (Aqeel *et al.*, 2015)

Por último, *N. fowleri* es un ameboflagelado que presenta una fase flagelada transitoria, además de las fases de trofozoito y quiste. El trofozoito tiene un diámetro de 10-25 μm , se mueve rápidamente y su locomoción es sinusoide (Figura 12A). Se transforma en la forma flagelar, que normalmente presenta dos flagelos en un extremo, cuando cambia la concentración iónica del medio. Sin embargo, esta forma puede reconvertirse en trofozoito cuando las condiciones vuelven a ser favorables (Figura 12B). En el estado flagelado la ameba tiene forma de pera, una longitud de 10-16 μm y normalmente revierte a la forma ameboide, al trofozoito, en menos de una hora (Visvesvara *et al.*, 2007). El quiste tiene un diámetro de 8-20 μm y es normalmente esférico con una doble pared, formada por un endoquiste grueso y un exoquiste fino, que tiene poros difícilmente observables en el microscopio óptico (Figura 12C) (Schuster y Visvesvara, 2004; Visvesvara, 2007).

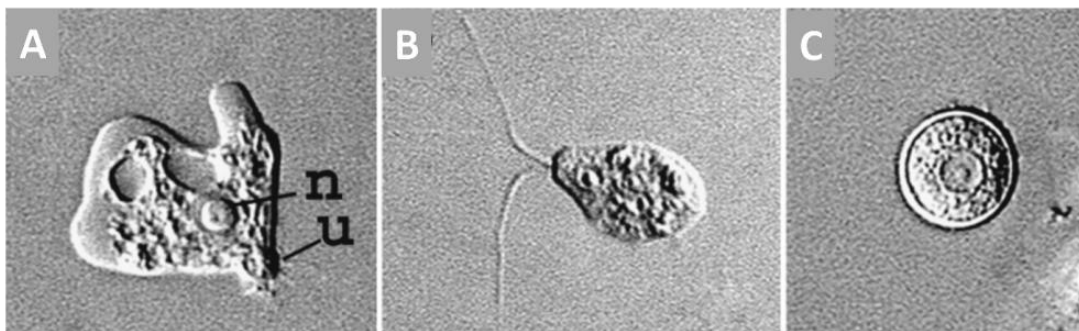


Figura 12: *N. fowleri*. A: Trofozoito; B: Flagelado; C: Quiste. Observación a 1000x (Visvesvara, 2007)

5.4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS FLA PATÓGENAS

Las FLA se engloban dentro del reino Protista, descrito por Ernst Haeckel en 1866, un grupo diverso de organismos unicelulares que contiene a aquellos eucariotas que no pueden ser clasificados en ningún otro reino eucariota, como el de los hongos, animales o plantas (Khan, 2009).

La última clasificación de estos eucariotas fue llevada a cabo por el Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad Internacional de Protistólogos (Adl *et al.*, 2012) y sitúa a los géneros *Acanthamoeba* y *Balamuthia* dentro del filo Amoebozoa, la clase Discosea, la subclase Longamoebia y el orden Centramoebida. El género *Sappinia* se sitúa dentro del filo Amoebozoa, la clase Discosea, la subclase Longamoebia y la familia

Thecamobidae. Por último, el género *Naegleria* se sitúa dentro del grupo Excavata, el grupo Discoba, el filo Discicrístata, la clase Heterolobosea y la subclase Tetramitia (Figura 13).

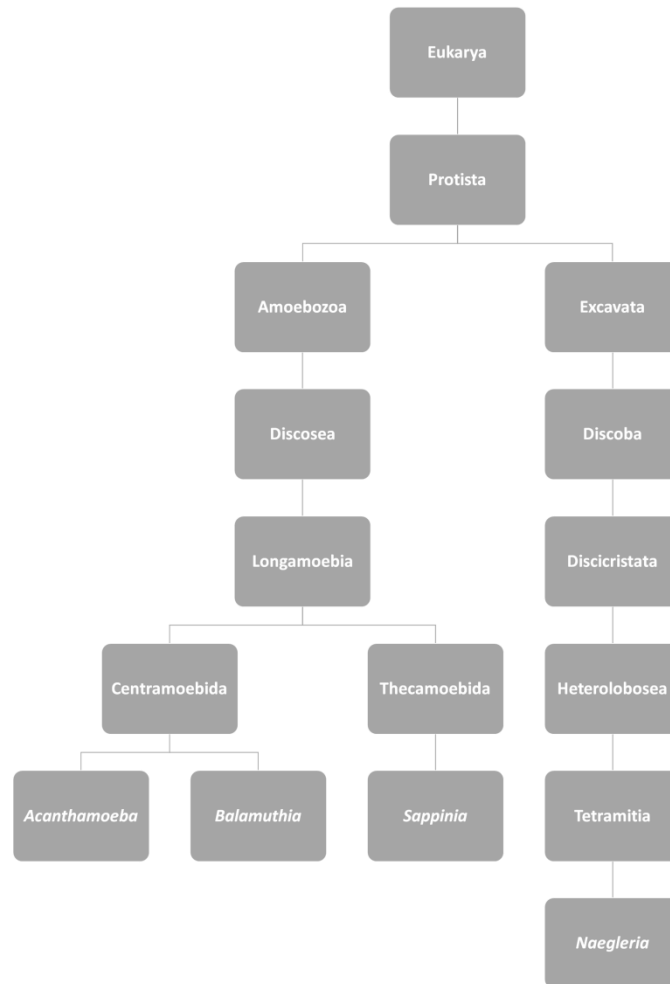


Figura 13: Clasificación taxonómica de las FLA patógenas. Adaptado de Adl *et al.* (2012)

5.5. PATOGENICIDAD

En 1958 Culbertson advirtió por primera vez el potencial patógeno de las FLA. Se observó que la citopatología producida en los cultivos de células de riñón de mono que usaban para crecer el virus poliovirus era causada por *Acanthamoeba* y no por un virus de simio, como originalmente pensaban. Más tarde Culbertson observó que cuando esta ameba se inoculaba en monos producía la muerte de los animales (Schuster y Visvesvara, 2004).

El primer caso humano de meningoencefalitis amebiana fue descrito en Australia. En primer lugar se pensó que el agente etiológico causante era *Acanthamoeba*, sin embargo, más tarde se identificó como *Naegleria*. Los primeros casos que claramente establecieron *Acanthamoeba* como un agente causante de enfermedad en humanos surgieron en la década de 1970. Se ha de tener en cuenta que en algunos estudios, particularmente los más tempranos, se refieren a las infecciones causadas por *Acanthamoeba* como causadas por *Hartmannella* (actualmente conocida como *Vermamoeba*) o incluso usan estos dos nombres indistintamente (Schuster y Visvesvara, 2004).

El primer caso reconocido de una infección por *Balamuthia* fue identificado por Visvesvara *et al.* (1990) en un babuino que murió en un zoo, aunque en humanos se detectó poco después (Visvesvara *et al.*, 1993; Schuster y Visvesvara, 2004).

En 2001 se describió un caso de encefalitis humana que fue causado por una ameba morfológicamente distinta a las especies previamente asociadas con la infección en humanos (Gelman *et al.*, 2001). Esta ameba fue identificada posteriormente como *Sappinia diploidea* en base a sus características morfológicas (Gelman *et al.*, 2003; Schuster y Visvesvara, 2004).

5.5.1. PATOGENICIDAD DE *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba es un patógeno oportunista cuyo hábitat natural es la naturaleza. Sin embargo, si encuentra un huésped susceptible es capaz de infectarlo y producir enfermedad (Khan, 2009). La vía de entrada de *Acanthamoeba* puede ser a través de los ojos, las fosas nasales o la piel dañada o con úlceras. A través de los ojos *Acanthamoeba* produce queratitis amebiana (AK), a través de las fosas nasales produce encefalitis amebiana granulomatosa (GAE) y/o infección diseminada en individuos inmunocomprometidos, y a través de la piel produce GAE, infección diseminada o lesiones cutáneas en individuos inmunocomprometidos (Figura 14).

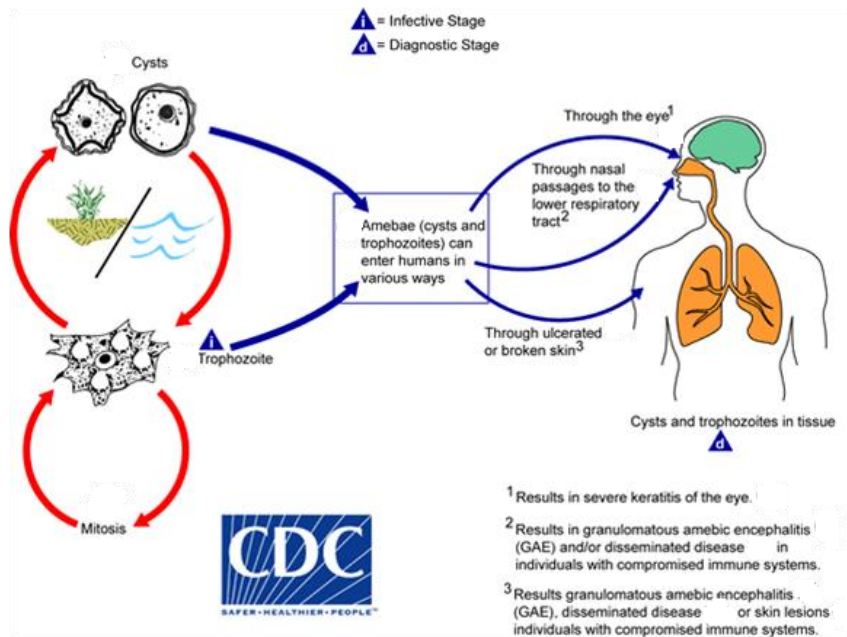


Figura 14: Vías de entrada de *Acanthamoeba* en humanos e infecciones que causa. Center of Disease and Control (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>)

La AK es una infección dolorosa causada por *Acanthamoeba* que afecta a la cornea, y por tanto, a la visión. La enfermedad ocurre en todo el mundo en individuos inmunocompetentes después de haber sufrido un traumatismo corneal o, de forma más común, en usuarios de lentes de contacto (Visvesvara *et al.*, 2007; Król-Turmińska y Olender, 2017). Es una infección que se caracteriza por inflamación de la córnea, presencia de un infiltrado estromal en forma de anillo, dolor ocular intenso, sensación de algo en el ojo, rojez, visión borrosa, lagrimeo excesivo y fotofobia (Visvesvara *et al.*, 2007; Lorenzo-Morales, 2013b). Trofozoitos y especialmente quistes de *Acanthamoeba* pueden ser recuperados de raspados corneales o biopsias y su diagnóstico definitivo se basa, tanto en la observación microscópica de las amebas como en el uso de técnicas moleculares, como PCR o ensayos de inmunofluorescencia (Visvesvara *et al.*, 2007; Da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009; Itahashi *et al.*, 2011; Siddiqui y Khan, 2012). Aunque en ocasiones se puede restablecer farmacológicamente la integridad de la superficie ocular, en el caso de que se haya producido una gran perforación corneal se necesita realizar una queratoplastia para restaurar la integridad ocular (Abdulhalim *et al.*, 2015).

Por otra parte, la GAE por *Acanthamoeba* es una infección oportunista crónica del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por una progresión lenta y que generalmente se asocia con hospedadores inmunocomprometidos, particularmente personas con VIH, con diabetes o que han experimentado un trasplante de órganos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Trabelsi *et al.*, 2012), aunque se ha descrito algún caso en individuos inmunocompetentes (Visvesvara *et al.*, 2007). Aunque el periodo de incubación de la infección se desconoce, se piensa que harían falta varias semanas o meses para observar signos clínicos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Los síntomas de la infección incluyen dolor de cabeza, confusión, cambios de comportamiento, perturbaciones visuales, náuseas, vómitos, fiebre, letargo, cuello rígido, déficits neurológicos, signos de aumento de presión intracraneal y, en las últimas etapas, pérdida de conciencia, coma y muerte (Martínez *et al.*, 1980b; Martínez y Visvesvara, 1997; Trabelsi *et al.*, 2012). La GAE puede afectar a otros órganos además del SNC: tejidos subcutáneos, piel, hígado, pulmones, riñones, glándulas suprarrenales, páncreas, próstata, nódulos linfáticos y médula espinal (Khan, 2006). Desafortunadamente, la diseminación de la enfermedad acaba produciendo la muerte en el 85 % de los casos (Zamora *et al.*, 2014).

Por último, la acantamebiasis cutánea es una infección oportunista rara que se da en individuos inmunocomprometidos, particularmente en paciente infectados con VIH (Murakawa *et al.*, 1995; Casper *et al.*, 1999;), con o sin afección del SNC (Trabelsi *et al.*, 2012). La infección cutánea se caracteriza por la aparición de nódulos, pústulas, pápulas y úlceras en la piel que contienen trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba*, y afecta principalmente a la cara, al tronco y a las extremidades corporales (Trabelsi *et al.*, 2012). Se desconoce si las lesiones cutáneas representan un foco de infección primario o son el resultado de una diseminación hematológica de otros órganos (Friedland *et al.*, 1992). La tasa de mortalidad de la acantamebiasis cutánea en individuos sin afección del SNC es de aproximadamente el 73%, mientras que cuando sí existe afección del SNC es del 100% (Torno *et al.*, 2000).

5.5.2. PATOGENICIDAD DE *Naegleria fowleri*

N. fowleri es el agente causal de meningoencefalitis amebiana primaria (PAM). Pese a la existencia de 47 especies de *Naegleria*, sólo *N. fowleri* ha demostrado ser patógena para humanos. Otras especies de *Naegleria* (*Naegleria australiensis*, *Naegleria itálica* y *Naegleria philippinensis*) podrían ser patógenas en ratones y también causarían PAM (Schuster y Visvesvara, 2004).

La vía de entrada de *N. fowleri* al organismo humano es a través de las mucosas nasales, desde donde migra al cerebro a través de los nervios olfativos, afectando al SNC (Trabelsi *et al.*, 2012) (Figura 15).

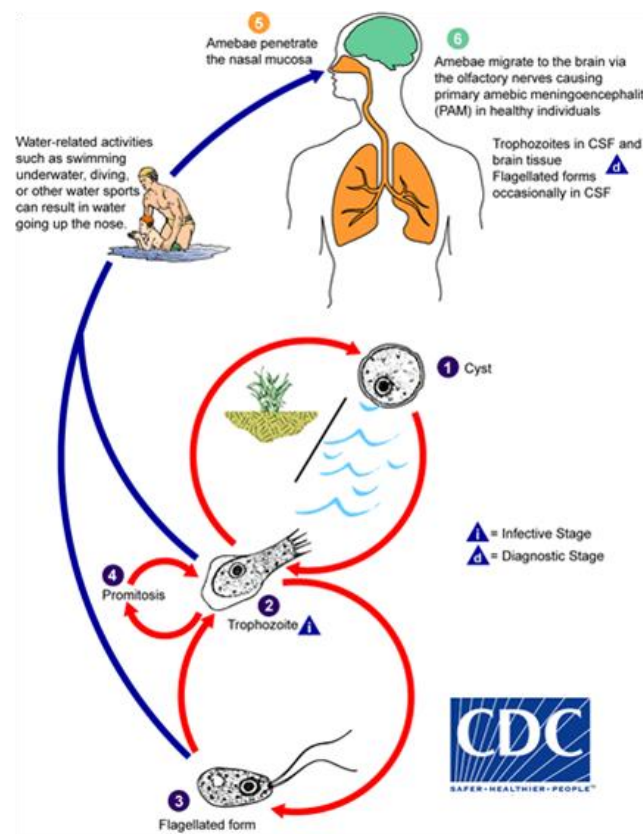


Figura 15: Vía de entrada de *N. fowleri* en humanos e infección que causa. Center of Disease and Control (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>)

La PAM es una meningoencefalitis hemorrágica fulminante que principalmente afecta a niños sanos y adultos jóvenes que han tenido una exposición reciente a agua dulce cálida. Debido a que la PAM ocurre principalmente en individuos sanos, a la ameba no se la considera como oportunista, sino como patógena (Visvesvara *et al.*,

2007). Típicamente, los casos de PAM ocurren durante los meses de verano u otras épocas del año en los que la temperatura es alta y ha ocurrido una exposición a aguas cálidas contaminadas (Visvesvara *et al.*, 2007; Trabelsi *et al.*, 2012). Globalmente se han descrito alrededor de 310 casos de infectados por PAM y, de forma aproximada, únicamente el 5% de los individuos ha sobrevivido (Gautam *et al.*, 2012).

La característica más llamativa de la PAM es la rápida aparición de los síntomas después de la exposición al agua cálida contaminada, lo que normalmente ocurre en 5-7 días, aunque este periodo puede ser incluso de 24 horas. Los síntomas más tempranos incluyen dolores de cabeza severos (normalmente frontales o bitemporales), fiebre, náuseas, y rigidez nuchal, seguidos de vómitos, irritabilidad y agitación. Más tarde los pacientes infectados suelen presentar fotofobia seguida de anomalías neurológicas que incluyen letargo, ataques, confusión, comportamientos extraños y coma (Visvesvara *et al.*, 2007; Heggie, 2010). El diagnóstico temprano de la PAM es crucial para la supervivencia del individuo infectado. Sin embargo, este es complicado, ya que sus síntomas son parecidos a los de una meningitis bacteriana, lo cual, sumado a la rapidez del desarrollo de la enfermedad, hace que en muchos casos esta cause la muerte.

5.5.3. PATOGENICIDAD DE *Balamuthia mandrillaris*

B. mandrillaris produce una encefalitis similar a la GAE: encefalitis amebiana por *Balamuthia* (BAE). La puerta de entrada en el cuerpo es a través de lesiones en la piel contaminadas con suelo o a través del tracto respiratorio, al cual llegan los quistes transportados por corrientes de aire (Trabelsi *et al.*, 2012) (Figura 16).

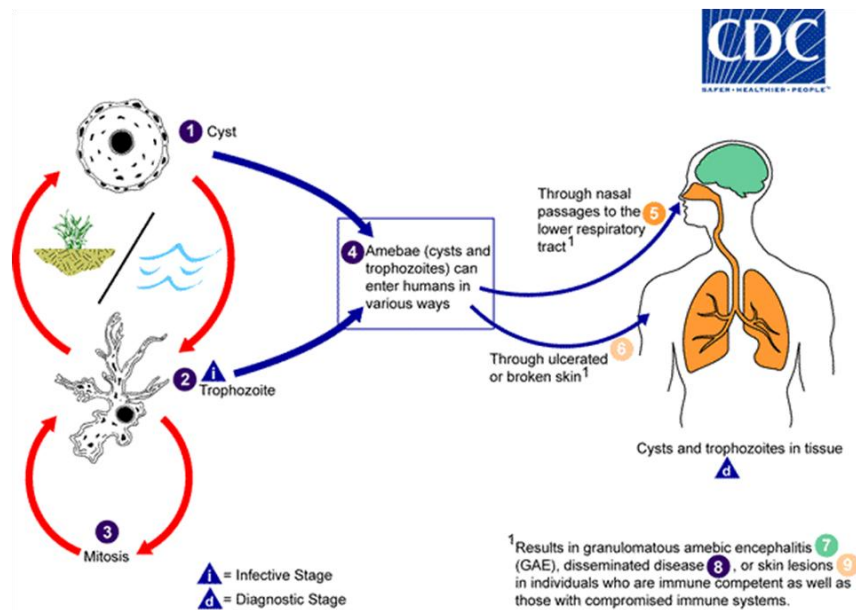


Figura 16: Vía de entrada de *B. madriilaris* en humanos e infección que causa. Center of Disease and Control (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>)

La BAE es una enfermedad crónica que dura desde tres meses hasta dos años y casi siempre acaba con la muerte del infectado. Al contrario que la GAE, la BAE puede desarrollarse tanto en individuos inmunocomprometidos como inmunocompetentes (Visvesvara *et al.*, 2007). Los niños y los adultos jóvenes son las poblaciones más afectadas. Actualmente se han documentado alrededor de 100 casos de BAE (Schuster y Visvesvara, 2004). La mayoría de ellos se han dado en América Latina seguido del Sudoeste de Estados Unidos (Matin *et al.*, 2007).

La vía de entrada más probable es la nariz, donde se observan lesiones, aunque también se han observado en otras localizaciones (Bravo *et al.*, 2011; Bravo y Seas, 2012). La invasión del cerebro por la ameba ocurre probablemente en la barrera hemetoencefálica y/o vía migración a través de las fibras nerviosas, aunque los mecanismos todavía no están claros (Kiderlen y Laube, 2004).

Los síntomas clínicos de la BAE incluyen fiebre, dolor de cabeza, cuello rígido y fotofobia. Según avanza la enfermedad se manifiestan otros síntomas: náuseas, vómitos, cambios de personalidad, afasia, confusión, convulsiones y letargia, todo ello relacionado con una mayor presión intracraneal, lo cual lleva al coma, y, finalmente a la muerte (Siddiqui y Khan, 2008; Bravo *et al.*, 2011).

El diagnóstico actual de BAE es complicado, y usualmente se realiza después de la muerte, ya que los síntomas de la infección suelen ser sutiles e inespecíficos (Lorenzo-Morales, 2013a).

5.5.4. PATOGENICIDAD DE *Sappinia*

Sappinia produce encefalitis amebiana por *Sappinia* (SAE). Tanto el periodo de incubación como la ruta de la infección son desconocidos, aunque se piensa que la ameba podría adquirirse por inhalación y posterior propagación al cerebro (Gelman *et al.*, 2001).

El primer y único caso de SAE ocurrió en un individuo adulto sano inmunocompetente que sobrevivió a la infección. La ameba que causó la encefalitis se identificó originalmente como *S. diploidea*, aunque actualmente, mediante el empleo de métodos moleculares se ha identificado como *S. pedata* (Qvarnstrom *et al.*, 2009).

En este caso, se produjo una infección nasal antes del comienzo de los síntomas. El paciente sufrió náuseas, vómitos, dolores de cabeza, fotofobia y visión borrosa. Además, sufrió pérdida de conciencia durante un breve periodo de tiempo (Gelman *et al.*, 2001; Gelman *et al.*, 2003; Visvesvara *et al.*, 2007). El paciente logró sobrevivir después de que le extirparan una masa parecida a un tumor del cerebro y de seguir un tratamiento.

6. LAS AMEBAS COMO “CABALLO DE TROYA”

La asociación de varias especies bacterianas con las FLA es un hecho común. Ya en 1967 se observó bajo el microscopio la presencia de endosimbiontes citoplasmáticos en *A. castellanii* (Jeon y Lorch, 1967). Durante 40 años, Jeon y su equipo publicaron varios estudios describiendo una bacteria endosimbionte, a la cual llamaron X-bacteria, que infectaba a las amebas inicialmente como parásitos intracelulares, se transfería de unos aislados a otros y establecía nuevas relaciones endosimbiónicas con el nuevo hospedador (Jeon y Jeon, 1976). Posteriormente, se demostró que X-bacteria pertenecía al género *Legionella*, y se le propuso el nombre *Legionella jeonii* (Park *et al.*, 2004).

Con el tiempo se ha ido generando un mayor interés por la interacción entre las FLA y las bacterias, debido al hecho de que varias bacterias patógenas como *L. pneumophila* pueden proliferar en FLA hospedadoras. Rowbotham (1980) fue el primero en documentar que *L. pneumophila* es un parásito intracelular de las FLA, y lo hizo poco después de la identificación de la enfermedad de los legionarios (legionelosis). Más tarde, Fritsche *et al.* (1993) demostraron que el 25% de los aislados tanto ambientales como clínicos de *Acanthamoeba* spp. albergaban en su interior alguna variedad de bacterias endosimbióticas. Otro estudio mostró que las FLA eran más frecuentemente infectadas en las torres de refrigeración (55%) que en los ambientes naturales (7,5%), sugiriendo que las condiciones artificiales podrían favorecer la asociación de las bacterias con las FLA (Berk *et al.*, 2006). Además, en algunos casos se ha mostrado que una única ameba albergaba dos especies bacterianas diferentes (Michel *et al.*, 2006; Heinz *et al.*, 2007).

Las FLA podrían incrementar la transmisión de bacterias patógenas, actuando como un vehículo que lleva un gran número de microorganismos (Greub y Raoult, 2004). Pero las FLA serían más que simples vehículos. De hecho podrían considerarse como “Caballos de Troya” para su hospedador (Barker y Brown, 1994), ya que transportan en su interior ARB que pasan desapercibidas ante la primera línea de defensa de un organismo. Cirillo *et al.* (1997) definitivamente confirmaron esta hipótesis demostrando que la colonización del intestino de ratones era mayor cuando se inoculaban amebas viables con *Mycobacterium avium*.

Es desconcertante que las FLA puedan albergar bacterias, llamadas bacterias resistentes a las amebas (ARB), y, al mismo tiempo, se alimenten de bacterias en el medio ambiente. Estas relaciones parásito-parásito son altamente complejas y dependientes de la virulencia de la ameba, la virulencia de la bacteria y de las condiciones ambientales. El resultado de estas interacciones puede ser beneficioso únicamente para la ameba o para la bacteria; o también puede resultar en el desarrollo de una relación simbiótica entre ambas (Siddiqui y Khan, 2012) (Figura 17).

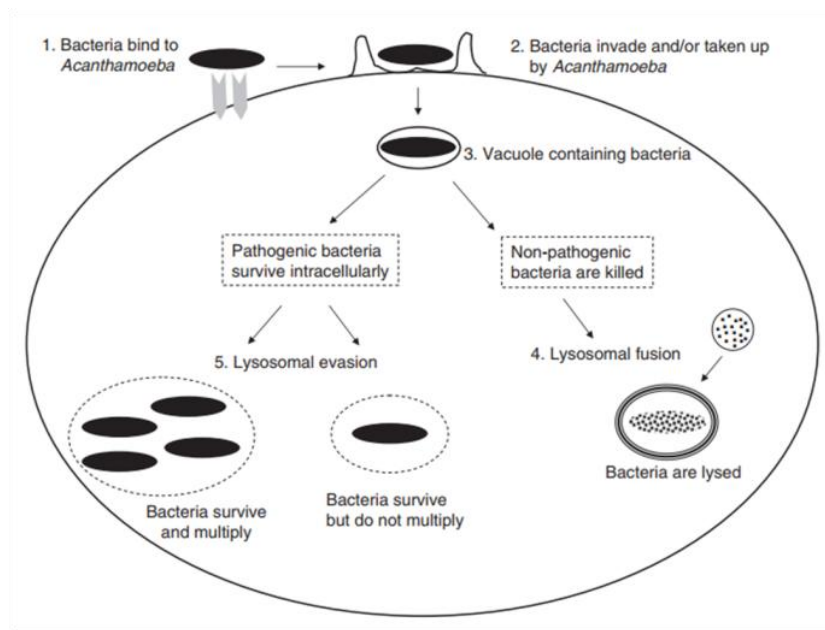


Figura 17: Esquema de las diferentes relaciones entre FLA (*Acanthamoeba* spp) y bacterias (Siddiqui y Khan, 2012)

Acanthamoeba usa normalmente como alimento bacterias que no son patógenas. En este contexto, las amebas atrapan a las bacterias mediante fagocitosis, las lisan en los fagolisosomas y de esta forma aprovechan sus nutrientes. En el caso de algunas especies de bacterias patógenas, estas invaden a la ameba y evaden la muerte lisosomal (Greub y Raoult, 2004). Las bacterias permanecen viables en *Acanthamoeba* (bacterias resistentes, ARB) y son transportadas a hospedadores susceptibles. Cuando la densidad bacteriana es alta, estas son capaces de lisan a las amebas e infectar nuevas amebas o producir enfermedad (Siddiqui y Khan, 2012) (Figura 17). De hecho, se ha propuesto que, debido a la capacidad que tienen las ARB para resistir la digestión por las FLA, estas podrían también resistir la digestión por los macrófagos (Greub y Raoult, 2004).

Desde la observación inicial por Rowbotham, la interacción de *Legionella* con las FLA ha sido ampliamente estudiada (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). La relación ARB-FLA más estudiada es la de *Legionella-Acanthamoeba*, aunque hay muchas otras bacterias patógenas de interés para la salud pública que interactúan con FLA, tales como *M. avium*, *P. aeruginosa*, *Campylobacter jejuni* o *H. pylori* (Tabla 4).

Se pueden encontrar listas más completas de la interacción de bacterias con FLA en Balczun y Scheid (2017) y Thomas *et al.* (2010). Además, Balczun y Scheid (2017) también describen interacciones de FLA con hongos, protistas y virus.

Tabla 4: Selección de bacterias que interactúan con FLA

BACTERIA	FLA HOSPEDADORA	REFERENCIA
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Fernández <i>et al.</i> , 2012 Medina <i>et al.</i> , 2014
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Snelling <i>et al.</i> , 2008
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Axelsson-Olsson <i>et al.</i> , 2010 Bui <i>et al.</i> , 2012
		Olofsson <i>et al.</i> , 2013
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Winiacka-Krusnell <i>et al.</i> , 2002
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Smith y Ashbolt, 2012
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Rowbotham, 1980
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	García <i>et al.</i> , 2007
	<i>Naegleria gruberi</i>	Ducret <i>et al.</i> , 2014
	<i>Naegleria jadini</i> <i>Vermamoeba vermiformis</i>	Buse <i>et al.</i> , 2017
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2007
	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	Akya <i>et al.</i> , 2009a
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Akya <i>et al.</i> , 2009b
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Cirillo <i>et al.</i> , 1997
	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	White <i>et al.</i> , 2010 Ovrutsky <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Cengiz <i>et al.</i> , 2000
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Sandström <i>et al.</i> , 2010
		Van der Henst <i>et al.</i> , 2016

Además de estas interacciones, se ha descrito un grupo de bacterias conocidas como LLAP (*Legionella*-like amoebal pathogens). Estas no pueden crecer en medios de cultivo, por lo que deben de ser cocultivadas con protozoos. Son bacterias que están filogenéticamente relacionadas con *Legionella* y adquirieron ese nombre por su habilidad de infectar y multiplicarse dentro de FLA (Adeleke *et al.*, 1996). El cocultivo con FLA es una aproximación que ha demostrado ser efectiva para aislar especies bacterianas nuevas (Thomas *et al.*, 2006a; Corsaro *et al.*, 2009). Por ejemplo, *Estrella lausannensis* fue descubierta gracias a su habilidad de crecer fácilmente dentro de FLA del género *Acanthamoeba* (Lienard *et al.*, 2011) (Figura 33).

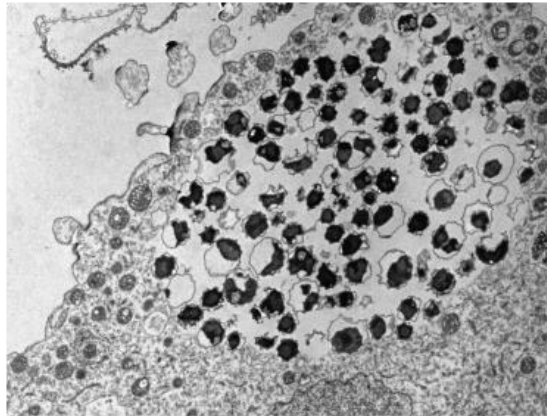


Figura 18: Microfotografía de *Estrella lausannensis* dentro de *Acanthamoeba commandonii* 48 horas después de la infección (Tosetti *et al.*, 2014)

Hasta el momento se han llevado a cabo dos únicos estudios sobre la interacción entre *H. pylori* y FLA. En 2002, Winiiecka-Krusnell *et al.* (2002) llevaron a cabo un estudio de cocultivo *in vitro* entre *H. pylori* y *A. castellanii* y mostraron la interacción de ambos microorganismos mediante FISH y microscopía electrónica. Diez años más tarde, Smith y Ashbolt (2012) también realizaron un estudio de cocultivo *in vitro*, esta vez entre *H. pylori* y *A. polyphaga*, en el que mostraron mediante microscopía de fluorescencia la localización de *H. pylori* dentro de la ameba y controlaron la cantidad de *H. pylori* a lo largo del tiempo cuando está en cocultivo con *A. polyphaga*.

Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio que investigue la relación de *H. pylori* con FLA en muestras ambientales. Únicamente Kawaguchi *et al.* (2009) estudiaron si la presencia de *Helicobacter* estaba relacionada con la de *Acanthamoeba* en muestras de agua de río y de suelo. Sin embargo, no obtuvieron correlaciones estadísticas que lo corroborasen.

7. MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Desde los inicios de la microbiología, los métodos basados en el cultivo han sido usados para demostrar la viabilidad de los microorganismos. El cultivo sigue siendo hoy en día el “gold standard” para algunas aplicaciones (Emerson *et al.*, 2017). Por ejemplo, cuando se analiza la calidad microbiológica del agua, las muestras se cultivan en placas de agar para determinar la contaminación microbiana (Köster *et al.*, 2003).

Sin embargo, las técnicas independientes de cultivo, particularmente las basadas en el DNA, han permitido una mayor resolución en la determinación de la estructura de las comunidades microbianas y sus funciones (Emerson *et al.*, 2017). A pesar de ello, estos métodos independientes de cultivo no pueden diferenciar inequívocamente entre las células vivas y muertas. El DNA puede persistir en el medio ambiente como DNA extracelular o de células muertas, indistinguible del DNA de las células vivas (Josephson *et al.*, 1993; Pammi *et al.*, 2013; Torti *et al.*, 2015; Carini *et al.*, 2016). El DNA y/o el material celular de los microorganismos muertos son importantes en ciertos contextos, como por ejemplo cuando sirven de nutrientes. Sin embargo, son los microorganismos vivos los que tienen el potencial de crecer, adaptarse y cambiar en un ambiente. Sin la identificación selectiva de los microorganismos vivos, es probable que las técnicas de cuantificación y secuenciación del DNA sobreestimen los tipos y el número de microorganismos que están participando activamente en un ecosistema (Carini *et al.*, 2016).

Por otra parte, se estima que sólo un 1% de los microorganismos pueden ser cultivados en medios de cultivo, mientras que el otro 99% no es cultivable *in vitro* (Kimura, 2006). Además, esperar a la detección de células por cultivo significa un retraso temporal, lo que supone un gran inconveniente cuando están en riesgo la salud y la seguridad. Asimismo, algunos microorganismos, como *H. pylori*, adquieren la forma VBNC mediante la cual no pueden crecer en los medios de cultivo pero están vivos y tienen capacidad metabólica (Oliver, 2000a). Para salvar estos inconvenientes, se han desarrollado métodos moleculares independientes de cultivo (Kimura, 2006) tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la Hibridación *in situ* con Sondas Fluorescentes (FISH) y la metagenómica.

7.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR)

La PCR es un método de amplificación enzimática *in vitro* del DNA que permite copiar de forma exponencial una zona concreta del genoma, pudiendo llegar a obtener millones de copias de ella. Es un proceso que se lleva a cabo cíclicamente (Figura 19).

Cada ciclo está dividido en tres fases:

- Desnaturalización: la doble hélice de DNA se separa en dos hebras. Se lleva a cabo elevando la temperatura a 93-97 °C.
- Hibridación: la temperatura desciende para permitir que los iniciadores se unan por complementariedad a las zonas que flanquean el fragmento que se desea amplificar. La temperatura a la cual se lleva a cabo esta fase depende de los iniciadores.
- Elongación: la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios en dirección 5'-3' a partir del extremo 3' libre de la región en la que están hibridados los iniciadores. La temperatura a la cual se lleva a cabo esta fase depende de la polimerasa empleada: si se utiliza la *Taq* polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72 °C.

Si los ciclos se producen un número “n” de veces, al final se obtendrán 2^n copias del fragmento de DNA amplificado, es decir, en la PCR se amplifica exponencialmente un fragmento de DNA específico. Los productos de la PCR se denominan amplicones.

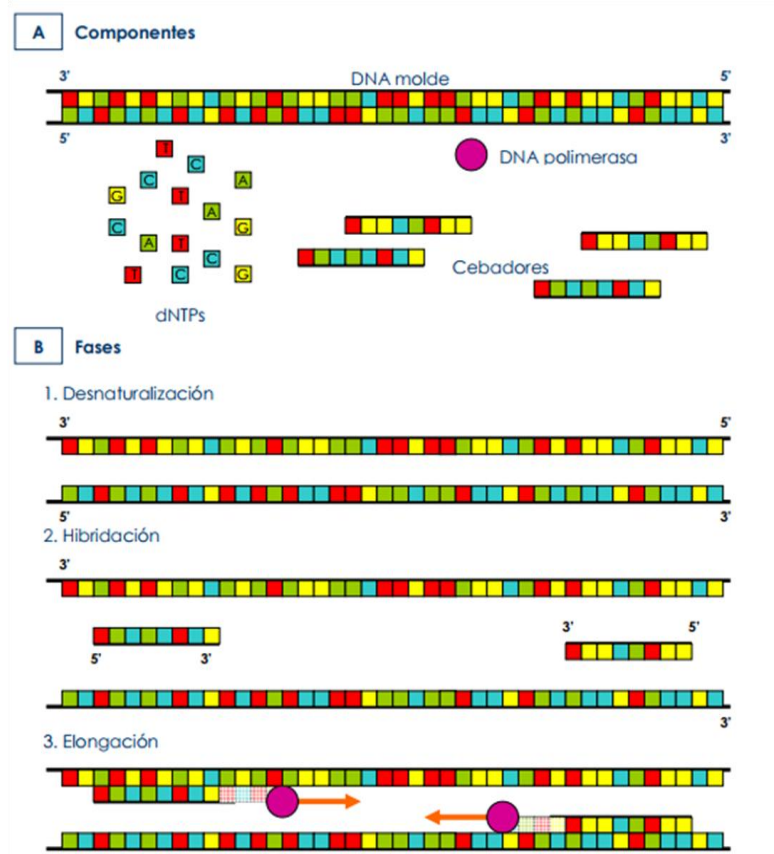


Figura 19: Representación esquemática de A: componentes básicos para llevar a cabo una PCR convencional y B: Fases de la PCR

Una cuestión importante para el éxito de la PCR es el diseño de los iniciadores. Estos son moléculas de DNA monocatenario de pequeño tamaño, de unos 15-30 nucleótidos, que se unen por complementariedad a las secuencias flanqueantes de la región que se quiere amplificar. La enzima polimerasa utiliza estos iniciadores como punto de inicio de síntesis de nuevas moléculas de DNA. Una condición indispensable es que los iniciadores sean específicos del DNA que se desea amplificar. La recopilación de las secuencias de DNA en los bancos de datos es una excelente ayuda en el desarrollo de nuevos iniciadores para la detección de microorganismos mediante PCR (Bou *et al.*, 2011).

Entre las ventajas de esta técnica destacan su sencillez, rapidez y sensibilidad. Además, se requiere muy poco material biológico de partida mientras que la mayoría de análisis químicos precisan de grandes cantidades.

La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) es una variante de la PCR convencional, que permite la cuantificación del DNA en cada ciclo de amplificación. Es una herramienta simple y rápida que está destinada a sustituir a muchas técnicas tradicionales en los laboratorios de microbiología y que ha demostrado ser más sensible que la PCR convencional (McDaniels *et al.*, 2005).

Las reacciones de qPCR pueden monitorizar el progreso de la amplificación de DNA en tiempo real y visualizar la fase de amplificación exponencial. Las reacciones de qPCR utilizan los mismos componentes que las de PCR convencional más un marcador fluorescente. La monitorización en tiempo real se consigue midiendo la señal de fluorescencia emitida por los amplicones a medida que estos se generan.

Hay varios métodos de detección de los amplicones. Entre estos se incluyen los basados en el uso de fluoróforos no específicos que se unen al DNA, las sondas de hidrólisis o las sondas de hibridación (Lim *et al.*, 2011). Aunque cada método de detección tiene sus propias características, en todos ellos el nivel de la señal de fluorescencia refleja la cantidad acumulativa de los amplicones. Entre los distintos métodos de detección, los que utilizan SYBR Green I y sondas TaqMan son los más usados en los estudios de microbiología ambiental (Kim *et al.*, 2013) (Figura 20).

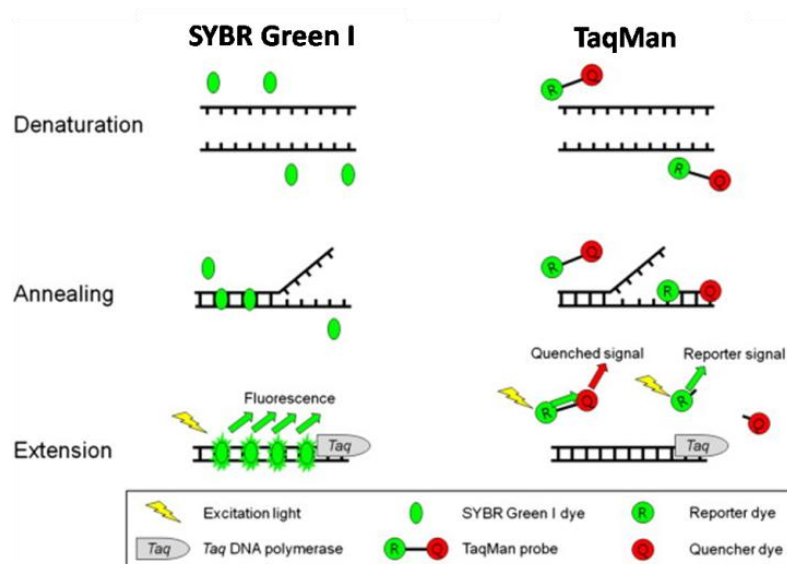


Figura 20: Métodos de detección de la qPCR: SYBR Green I y TaqMan (Kim *et al.*, 2013)

El SYBR Green I es un fluoróforo que se une al surco menor de la doble hélice del DNA de forma inespecífica y, cuando está unido a este, emite una fluorescencia 1000 veces mayor que cuando no está unido al DNA (Wittwer *et al.*, 1997). Por tanto, la señal de fluorescencia aumenta conforme se van generando amplicones. Debido a que el SYBR Green I es un fluoróforo de unión no específica, su uso puede causar falsos positivos. La especificidad de este tipo de análisis la determinan los iniciadores. Además, esta especificidad puede ser comprobada mediante el análisis de la curva de fusión, mediante la cual se diferencian fragmentos de DNA en función de las temperaturas de fusión (T_m , *melting temperature*) (Ririe *et al.*, 1997). A pesar de sus limitaciones, la qPCR que emplea SYBR Green I es muy usada debido a su bajo coste, simplicidad y flexibilidad de aplicación comparada con otras opciones (Malinen *et al.*, 2003).

El método TaqMan implica el uso de un oligonucleótido adicional, la sonda TaqMan, además de los dos iniciadores. Una sonda TaqMan está marcada doblemente por un fluoróforo reportero en el extremo 5' y un fluoróforo apagador en el extremo 3'. En una sonda TaqMan intacta, en la que los dos fluoróforos están situados muy próximos entre sí, la fluorescencia del reportero es absorbida por la del apagador mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) (Giulietti *et al.*, 2001). Durante la amplificación, las sondas TaqMan, que hibridan con las secuencias complementarias del DNA molde, son degradadas por la actividad exonucleasa de la polimerasa cuando tiene lugar la elongación del DNA. Una vez degradadas, el fluoróforo reportero se separa de las proximidades del fluoróforo apagador y emite fluorescencia, que es detectada. La intensidad de fluorescencia indica la cantidad de amplicones producidos, permitiendo que se pueda monitorizar en tiempo real la amplificación. Debido al uso de la sonda TaqMan además de los iniciadores, la especificidad de este tipo de qPCR es mayor que la que usa SYBR Green I, por lo que los falsos positivos se reducen (Yu *et al.*, 2005).

La cuantificación de los microorganismos de interés es el propósito principal de la qPCR. Idealmente, a una muestra con una concentración más alta de las secuencias diana le llevará menos ciclos de amplificación llegar a cierto nivel de concentración de este DNA diana. Esto significa que la cantidad inicial de una secuencia diana en una

muestra es inversamente proporcional al valor del ciclo umbral (Ct). El Ct, también llamado ciclo de cuantificación (Cq), es el número de ciclos necesarios para que la concentración del DNA diana (monitorizada mediante fluorescencia) exceda un valor umbral sobre la señal de fluorescencia basal durante la fase exponencial de amplificación (Valasek y Repa, 2005) (Figura 21).

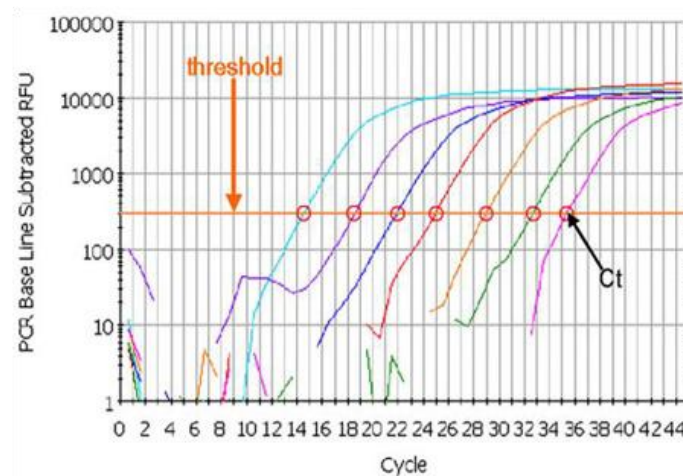


Figura 21: Curvas de amplificación mostrando el incremento de fluorescencia (<http://www.bio-analyze.com/OurRealtimeProject1.htm>)

La cuantificación absoluta de un gen diana requiere de una curva estándar, que puede ser construida usando DNA genómico de cepas de cultivo puras, fragmentos de PCR del gen diana o plásmidos recombinantes con el inserto del gen diana (Kim *et al.*, 2013). La cuantificación basada en una curva estándar se apoya en la premisa de que todas las muestras tienen la misma eficiencia de amplificación (Souaze *et al.*, 1996). Esta eficiencia depende básicamente de los iniciadores y de las condiciones de temperatura de la reacción de amplificación. La eficiencia se define como el número de copias en el ciclo $n+1$ dividido por el número de copias en el ciclo n . Una reacción con una eficiencia del 100% duplicaría el número de amplicones en cada ciclo.

Otra forma de cuantificación mediante qPCR es la cuantificación relativa. En esta forma de cuantificación, la concentración de la secuencia diana en una muestra se expresa en relación a la de otra muestra (Klein, 2002). Este método es raramente

empleado para la cuantificación microbiana, aunque sí que se usa ampliamente para monitorizar cambios en los niveles de expresión de genes (Wong y Medrano, 2005).

La qPCR se ha empleado para detectar *H. pylori* en aguas, como ya se ha comentado (Yáñez *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2016). Además, también se ha utilizado en diversos estudios para detectar FLA en aguas (Corsaro *et al.*, 2010; Magnet *et al.*, 2013; García *et al.*, 2013).

Diversos autores han proporcionado evidencias de que el DNA de *H. pylori* persiste en el agua aún cuando la bacteria está muerta. Queralt y Araujo (2007) llegaron a la conclusión de que los métodos de cultivo subestiman la presencia de *H. pylori* en agua, mientras que la PCR la sobreestima. Es por ello que los métodos de detección de células viables son en estos momentos los únicos capaces de ofrecer una imagen exacta o al menos más aproximada de la magnitud del problema que supone la presencia de *H. pylori* en agua para la salud pública.

La combinación de la qPCR después del tratamiento con PMA (Propidium Monoazide) permite el análisis únicamente de aquellas células cuya membrana celular no está dañada (Figura 22). El PMA es un agente intercalante de DNA que se une irreversiblemente mediante fotoactivación, tanto al DNA extracelular como al DNA de células cuya membrana está dañada y que, por tanto, son consideradas células muertas. Una vez unido al DNA, este no puede ser amplificado mediante PCR. Como consecuencia, su aplicación permite detectar únicamente el DNA de células viables (Agustí *et al.*, 2010).

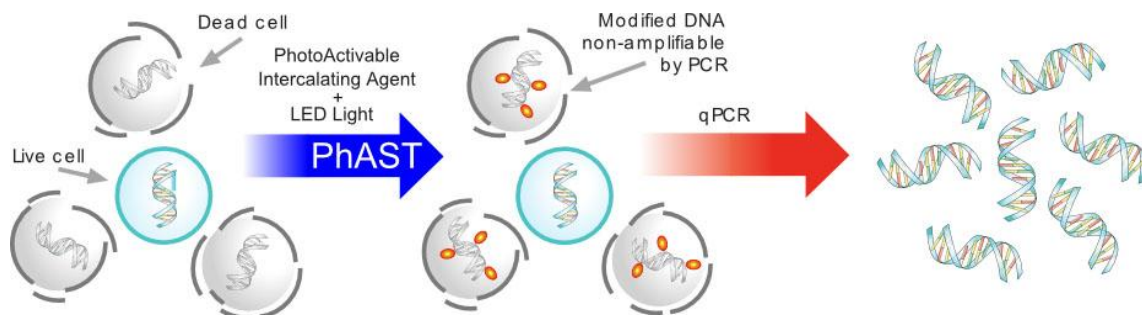


Figura 22: Esquema de la amplificación de DNA usando la combinación PMA-qPCR

7.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH) Y FISH COMBINADO CON DIRECT VIABLE COUNT (DVC-FISH)

La técnica de Hibridación *in situ* con Sondas Fluorescentes (FISH) se basa en la hibridación de sondas de oligonucleótidos sintéticas con regiones específicas del ribosoma bacteriano. Es una técnica que no necesita de cultivo (Bottari *et al.*, 2006).

La técnica FISH detecta secuencias de ácidos nucleicos mediante una sonda marcada con fluorocromos, que hibrida específicamente con la secuencia complementaria sin dañar la célula. Un protocolo típico de FISH incluye cuatro pasos: fijación y permeabilización de la muestra, hibridación, lavados para eliminar las sondas no unidas y visualización de las células marcadas mediante microscopía (Amann *et al.*, 2001) (Figura 23).

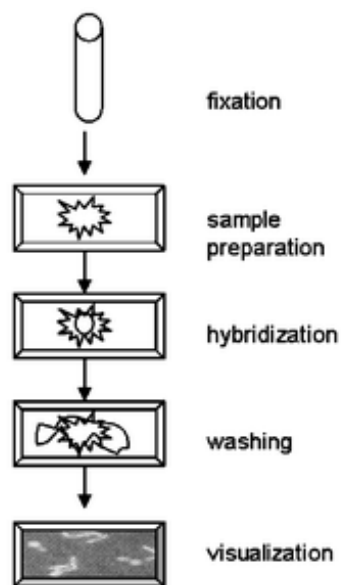


Figura 23: Diagrama de un protocolo típico de FISH (Bottari *et al.*, 2006)

Antes de la hibridación las bacterias deben de ser fijadas y permeabilizadas para permitir la penetración de las sondas fluorescentes en el interior de las células y proteger el RNA de la degradación por RNAsas endógenas (Moter y Göbel, 2000). La hibridación debe de hacerse bajo condiciones estrictas para conseguir una unión correcta entre la sonda y la secuencia diana.

Se emplea como diana una región del RNA ribosómico 16S o 23S por su estabilidad genética, por su estructura, en la que coexisten regiones conservadas con regiones variables, y por su alto número de copias (Woese, 1987), lo que permite una amplificación de la señal fácilmente detectable.

La parte más crítica de esta técnica es el diseño de las sondas, que deben ser suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que queremos detectar en presencia de otras, en muchos casos con moléculas de rRNA muy homólogas. La accesibilidad de la sonda al rRNA es diferente según la molécula de rRNA de la que se trate (16S o 23S) y la zona del mismo de la que sea complementaria, lo que se ha de tener en cuenta en el diseño de la sonda. Su tamaño oscila entre 15 y 30 pares de bases y las más cortas son las que presentan una mayor accesibilidad (Fuchs *et al.*, 2001).

Para asegurar la especificidad de las sondas, los dos parámetros determinantes van a ser la temperatura y la concentración de formamida en el tampón de hibridación. En la mayoría de los protocolos, la temperatura de hibridación se mantiene constante y es la concentración de formamida lo que va a dar lugar a unas condiciones más o menos astringentes. La formamida hace que disminuya la temperatura de unión de las sondas mediante el debilitamiento de los puentes de hidrógeno entre los dúplex DNA-DNA y DNA-RNA, entre 0,6-0,72 °C por porcentaje utilizado, incrementando el nivel de astringencia (Moter y Göbel, 2000). De esta forma, aumentando la astringencia de la reacción se consigue una reducción de la hibridación inespecífica, favoreciendo su posterior visualización (Rodríguez, 2011)

La técnica FISH se ha convertido en una herramienta potente, rápida y sensible para la detección e identificación de microorganismos en diferentes ambientes microbianos (Amman *et al.*, 1995). Presenta ventajas sobre otros métodos, como la PCR o la detección con anticuerpos, ya que no requiere de un cultivo previo ni de la extracción de ácidos nucleicos y tampoco surgen problemas de uniones inespecíficas o sustancias inhibitoras que dificulten la hibridación. Además, la técnica FISH combina la precisión de la genética molecular con la información visual de la microscopía, permitiendo la visualización e identificación de células microbianas individuales con su morfología intacta, dentro de su microambiente natural.

La mayor limitación del método es su sensibilidad, en función de la propia sonda y de la matriz donde se esté hibridando. El medio utilizado para el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla parece que también ejercen una importante influencia en la intensidad de la señal (Fuchs *et al.*, 2001).

El uso de sondas FISH modificadas con LNA (Locked Nucleic Acid) hacen posible aumentar la especificidad y la sensibilidad de unión con las regiones de rRNA, debido a sus propiedades térmicas. Son sondas que tienen una modificación en los anillos de ribosa, que consiste en la formación de un puente entre el oxígeno 2' y el carbono 4' de dicho anillo (Figura 24), lo cual les confiere un aumento de la estabilidad térmica y de la especificidad (Sarma *et al.*, 2010). Por cada nucleótido LNA que contenga la sonda se posibilita un aumento entre 1-8 °C en la temperatura de fusión (T_m) del duplex de RNA-DNA, lo que le confiere mayor estabilidad en condiciones de hibridación más restrictivas y por tanto más selectivas.

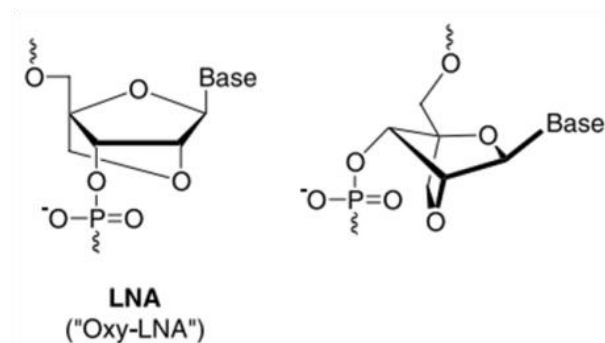


Figura 24: Estructura del monómero de LNA y su conformación espacial (Wengel *et al.*, 2003)

El uso de sondas LNA hace posible que la temperatura de fusión pueda alcanzar valores elevados, aún tratándose de fragmentos cortos. Resultan muy adecuadas para la hibridación *in situ* bajo condiciones estrictas. Se ha demostrado que las sondas FISH modificadas con LNA superan a las sondas convencionales de DNA en la detección de fragmentos de RNA (Thomsen *et al.*, 2005).

Mediante la técnica FISH se detectan tanto células viables como no viables, siendo un método incapaz de discriminar entre unas y otras. Para diferenciarlas,

Kogure *et al.* (1979) propusieron un método para la enumeración de bacterias viables en un ambiente marino, al que denominaron Direct Viable Count (DVC). Este método se basa en la incubación de las muestras con nutrientes y un agente antimicrobiano, que actúa como un inhibidor específico de la síntesis de DNA. De esta manera, se evita la división celular sin afectar a otras actividades metabólicas. Las células pueden, por tanto, continuar metabolizando nutrientes y aparecen elongadas y/o más gruesas tras la incubación. Los antibióticos utilizados suelen pertenecer al grupo de las quinolonas (novobiocina, ácido nalidíxico, ácido pipemídico y ciprofloxacina) (Barcina *et al.*, 1995).

La combinación de la incubación DVC con la técnica FISH permite la detección específica que aporta la hibridación de las sondas fluorescentes de DNA, junto con la diferenciación entre las células viables de las no viables, por la diferente elongación de las mismas.

Tanto la técnica FISH como la técnica combinada DVC-FISH se han utilizado con éxito para la detección de células de *H. pylori*. Concretamente, la técnica FISH se ha empleado para detectar *H. pylori* en agua residual (Moreno y Ferrús, 2012), en biopelículas de agua potable (Bragança *et al.*, 2007) y en agua dulce (Fernández-Delgado *et al.*, 2016). La técnica DVC-FISH se ha utilizado para detectar células de *H. pylori* en agua potable (Santiago *et al.*, 2015), agua residual (Moreno y Ferrús, 2012) y agua de río (Tirodimos *et al.*, 2014).

7.3. METAGENÓMICA DE SECUENCIACIÓN DIRIGIDA

La metagenómica, o genómica de comunidades, es una disciplina emergente que busca entender los ecosistemas microbianos estudiando el contenido genómico de los microorganismos presentes en un ambiente sin necesidad de cultivarlos (Handelsman, 2004). Es una tecnología relativamente nueva que ha surgido gracias al avance de la secuenciación de nueva generación (NGS, Next Generation Sequencing), la cual permite secuenciar a bajo coste el DNA de una muestra de cualquier ambiente (Illumina, 2017).

Un estudio metagenómico puede abordarse de dos formas diferentes: secuenciación de genomas completos (WGS, Whole Genome Sequencing) y secuenciación dirigida a zonas concretas del genoma (Figura 25).

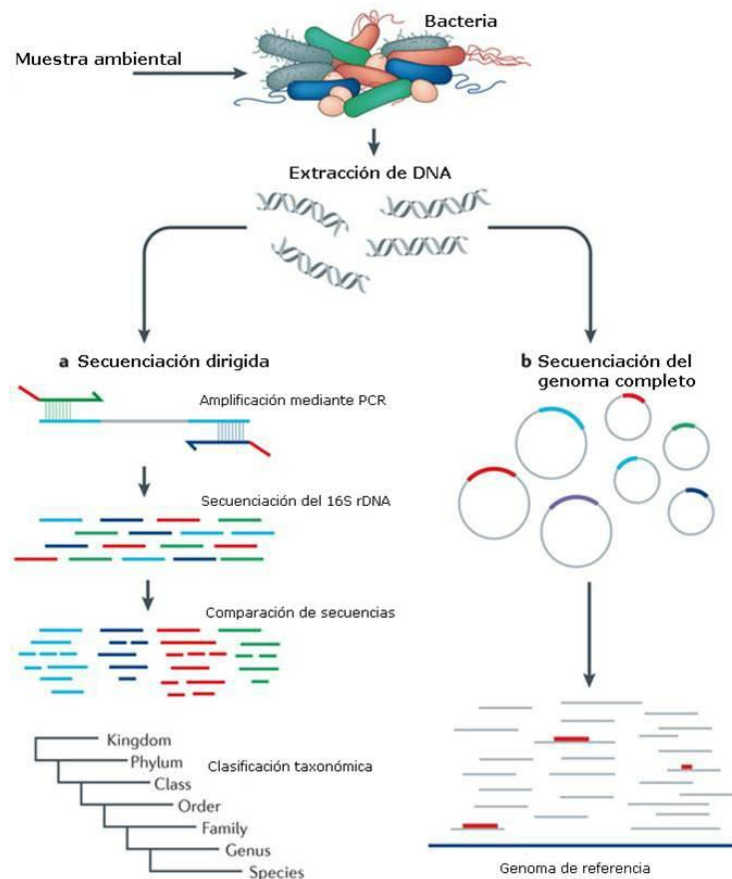


Figura 25: Diferentes aproximaciones metagenómicas (Adaptado de Lasken y McLean, 2014)

La metagenómica de secuenciación de genomas completos caracteriza toda la comunidad de microorganismos presentes en las muestras. Para ello, se extrae el DNA de la muestra y se emplea un abordaje de tipo *shotgun*: el DNA se fragmenta en trozos pequeños que son posteriormente secuenciados. Las secuencias resultantes se ensamblan bioinformáticamente para reconstituir los distintos genomas, obteniéndose habitualmente genomas parciales (Tringe y Rubin, 2005). Inicialmente se construía una librería de clones de DNA, pero con la introducción de las técnicas de NGS se puede evitar esta etapa, ya que se pueden secuenciar directamente los fragmentos de DNA. Mediante el empleo de esta técnica se pueden determinar los microorganismos

presentes en una muestra (Sharpton, 2014). Sin embargo, debido a que se obtiene gran cantidad de información, el análisis bioinformático puede llegar a ser muy complejo. La profundidad de secuenciación (cobertura) no es suficiente para detectar las especies con una menor concentración en la población (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008). Además, los errores de secuenciación pueden llevar a un ensamblaje incorrecto de ciertas secuencias y complicar la identificación de los organismos presentes (Oulas *et al.*, 2015).

La metagenómica de secuenciación dirigida es el método más usado para caracterizar la diversidad microbiana. En este método se extrae el DNA de la muestra que se desea caracterizar y se amplifica mediante PCR un gen marcador taxonómicamente informativo que es común a todos los organismos de interés. Los amplicones resultantes se secuencian y se caracterizan bioinformáticamente para determinar qué microorganismos están presentes en una muestra y en qué abundancia relativa (Sharpton, 2014).

En el caso de las bacterias y de las arqueas, los estudios de metagenómica de secuenciación dirigida se centran en el gen de la subunidad pequeña del RNA ribosómico (16S rRNA), el cual es un marcador informativo, tanto taxonómica como filogenéticamente (Pace *et al.*, 1986; Hugenholtz y Pace, 1996). Está ampliamente aceptado que el gen 16S rRNA refleja la evolución bacteriana (Woese, 1987). Este gen contiene regiones altamente conservadas, que son útiles para el diseño de los iniciadores, y regiones hipervariables, lo que permite diferenciar los distintos microorganismos y clasificarlos taxonómicamente (Figura 26).



Figura 26: Representación gráfica del gen 16S rRNA con sus regiones conservadas (verde) y variables (azul) (Modificado de Singer *et al.*, 2016)

En el caso de los eucariotas, el gen marcador empleado para los estudios metagenómicos es el 18S rRNA, que también tiene regiones conservadas y regiones hipervariables (Figura 27).

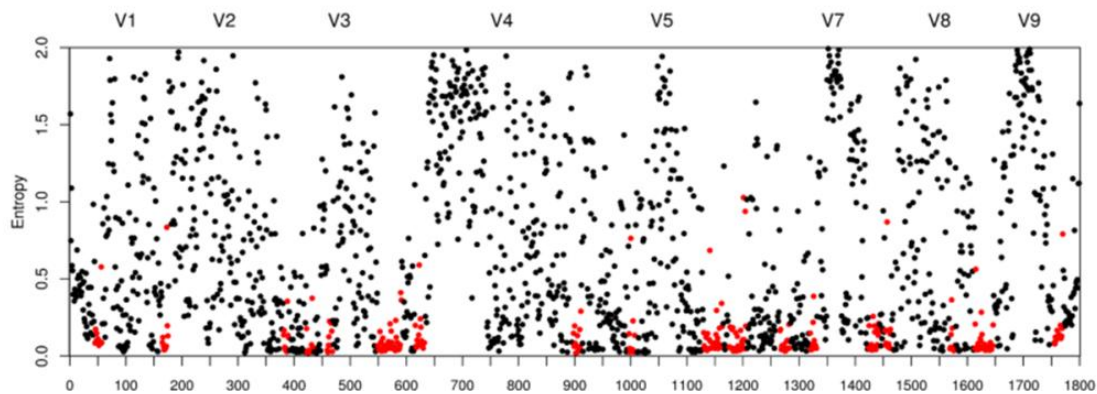


Figura 27: Valores de entropía del gen 18S rRNA. Los puntos rojos marcan las posiciones conservadas (Hadziavdic *et al.*, 2014)

Debido a las limitaciones de las técnicas de secuenciación, las secuencias de los genes 16S y 18S rRNA son parciales en la mayoría de los estudios. Por tanto, la selección de unos iniciadores adecuados es crucial para estudiar la composición microbiana de los distintos ambientes (Yang *et al.*, 2016).

Pese a que la metagenómica de secuenciación dirigida es una herramienta potente, tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, puede no determinar una gran fracción de la diversidad en una comunidad, debido a sesgos asociados a la PCR (Hong *et al.*, 2009; Sharpton *et al.*, 2011; Logares *et al.*, 2014). En segundo lugar, la secuenciación de los amplicones puede producir valores de diversidad muy diferentes en función de los iniciadores empleados (Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group, 2012). Además, los errores de secuenciación y los amplicones incorrectamente ensamblados (las quimeras) pueden producir secuencias artificiales difíciles de identificar (Wylie *et al.*, 2012). En tercer lugar, esta herramienta determina la composición taxonómica de una comunidad microbiana, pero no puede determinar sus funciones biológicas asociadas. (Sharpton, 2014). Finalmente, es una herramienta limitada al análisis de los microorganismos de los que se conocen genes taxonómicamente informativos y pueden ser amplificados. Los microorganismos nuevos o muy diversos, especialmente los virus, son difíciles de estudiar mediante el uso de esta herramienta (Sharpton, 2014).

De entre las plataformas de secuenciación masiva, una de las más usadas para el estudio de las comunidades microbianas es la de Illumina®, en la que se emplean diversos secuenciadores, entre los que destaca el secuenciador MiSeq®. Esta plataforma pertenece a la secuenciación de segunda generación y emplea la tecnología de secuenciación de síntesis, concretamente, la de terminación reversible (Figura 28).

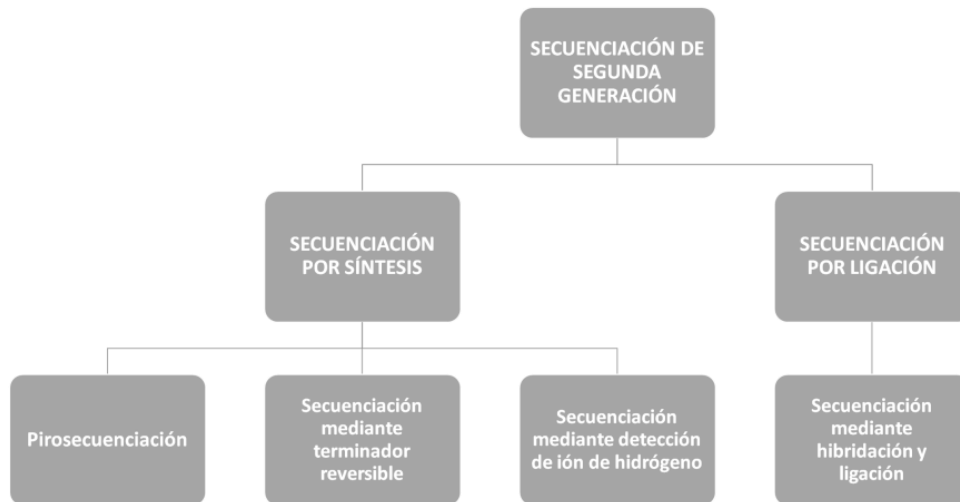


Figura 28: Esquema de las tecnologías de secuenciación de segunda generación. Adaptado de Ambardar *et al.* (2016)

En ella, los fragmentos de DNA de las librerías se someten a una amplificación clonal mediante una PCR puente (Figura 29), seguida de una secuenciación utilizando un nucleótido terminador reversible que está protegido por un grupo 3'-OH y está marcado fluorescentemente (Berglund *et al.*, 2011).

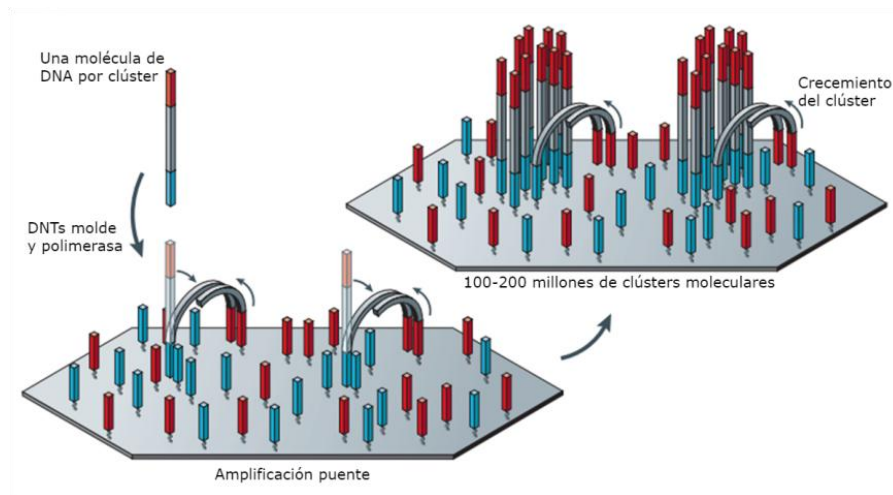


Figura 29: Amplificación puente del DNA molde inmovilizado en plataforma Illumina.

Traducido de Metzker (2010)

Después de la adición de los nucleótidos terminadores reversibles, la DNA polimerasa incorpora estos nucleótidos modificados en la hebra de DNA que se está sintetizando. Cada ciclo consiste en: 1- Incorporación de un nucleotido terminador reversible a la hebra de DNA inmovilizada en la cámara de flujo; 2- Detección de la señal de fluorescencia generada; y 3- Eliminación del grupo 3'-OH mediante descomposición de este grupo y de la molécula fluorescente. Este ciclo se repite hasta 300 veces en el secuenciador MiSeq® y da lugar a la secuenciación de la molécula de DNA molde de cada clúster (Figura 30). No se producen errores de secuenciación de homopolímeros, ya que cada vez se incorpora una única base y para la adición de la siguiente se elimina el nucleótido terminador.

Sólo la plataforma de secuenciación de Illumina permite la secuenciación del amplicón por ambos extremos, lo cual permite una mayor cobertura, mayor número de secuencias y la secuenciación de amplicones de hasta 550 pb en el secuenciador MiSeq, ya que realiza lecturas de 300 pb por cada extremo (Van Dijk *et al.*, 2014; Ambardar *et al.*, 2016).

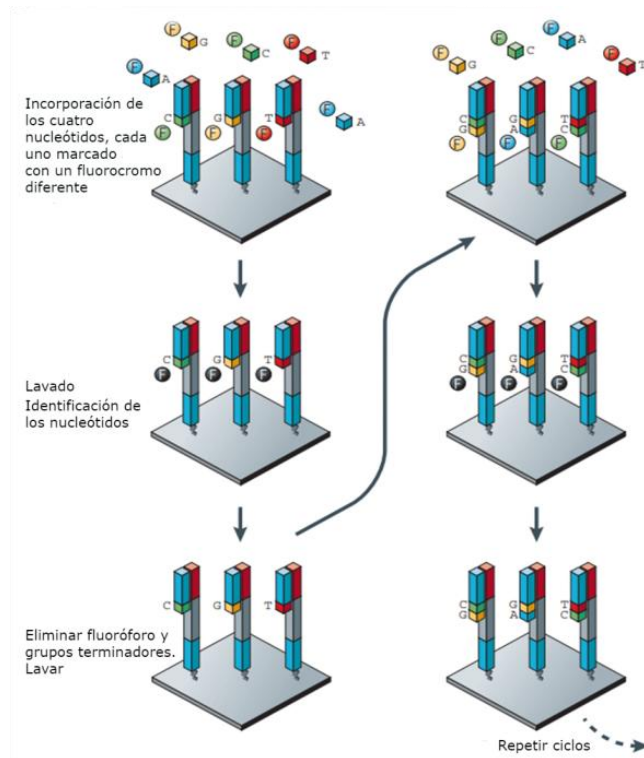


Figura 30: Método de secuenciación mediante nucleótidos terminadores reversibles de Illumina. Traducido de Metzker (2010)

Una vez secuenciados los amplicones se obtienen las secuencias de los mismos, denominadas “lecturas”. En este momento, las lecturas son “lecturas crudas”, ya que no han sido procesadas de ninguna forma.

Para el análisis de estas lecturas crudas generadas en los secuenciadores existen varios tipos de herramientas: con licencia comercial, en la nube y *open source*. Estas últimas son las más utilizadas en investigación. Entre estas destaca QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*; <http://qiime.org/>), una herramienta bioinformática de código abierto instalable en los terminales de trabajo, capaz de realizar análisis metagenómicos sobre comunidades microbianas a partir de lecturas crudas generadas en la plataforma Illumina, entre otras (Caporaso *et al.*, 2010).

Para ello, esta herramienta dispone de alrededor de 150 comandos diferentes, cada uno de los cuales tiene una función distinta, los cuales pueden ejecutarse a través de la terminal de comandos de Linux. Cada comando va acompañado de argumentos obligatorios y opcionales. Los obligatorios suelen ser la ruta del fichero de entrada o de

salida de resultados. Los opcionales son argumentos que por ejemplo modifican los valores predeterminados de dicho comando, como un valor umbral o la utilización de un algoritmo específico para realizar algún cálculo (Figura 31)

pick_rep_set.py - Pick representative set of sequences

Description:

After picking OTUs, you can then pick a representative set of sequences. For each OTU, you will end up with one sequence that can be used in subsequent analyses.

Usage: *pick_rep_set.py* [options]

Input Arguments:

```
[REQUIRED]
-i, --input_file
    Path to input otu mapping file [REQUIRED]

[OPTIONAL]
-f, --fasta_file
    Path to input fasta file [REQUIRED if not picking against a reference set; default: None]
-m, --rep_set_picking_method
    Method for picking representative sets. Valid choices are random, longest, most_abundant, first [default: first (first chooses cluster seed when picking otus with uclust)]
-o, --result_fp
    Path to store result file [default: <input_sequences_filepath>_rep_set.fasta]
-l, --log_fp
    Path to store log file [default: No log file created.]
-s, --sort_by
    Sort by otu or seq_id [default: otu]
-r, --reference_seqs_fp
    Collection of preferred representative sequences [default: None]
```

Figura 31: Ejemplo de la ayuda de un script de QIIME (<http://qiime.org/>)

El proceso de obtener información de las lecturas crudas usando QIIME se divide en dos fases (Figura 32). La primera comienza con la elaboración de un archivo, el *mapping file*, que contiene información acerca de las muestras con las que se va a trabajar. Después se identifican y eliminan secuencias químéricas, que son artefactos de la secuencia. Un paso importante de esta primera fase es la formación de OTUs (Operational Taxonomic Unit), que son agrupaciones de secuencias que se forman entre secuencias altamente similares. A cada OTU se le asigna una taxonomía microbiana, para lo cual se debe de proporcionar una base de datos taxonómica. Finalmente se construye la tabla de OTUs, que es una matriz que contiene el número de secuencias da cada OTU y su predicción taxonómica. Con estos datos se pueden obtener los porcentajes de abundancia relativa de cada OTU (Navas-Molina *et al.*, 2015).

La segunda fase comienza una vez se ha generado la tabla de OTUs. Se puede resumir la abundancia relativa de cada OTU a diferentes niveles taxonómicos (filo, clase, orden, familia, género y especie) para, por ejemplo identificar rápidamente qué

muestras son distintas, o los patrones de abundancia de ciertos organismos en función de las características de las muestras (Navas-Molina *et al.*, 2015).

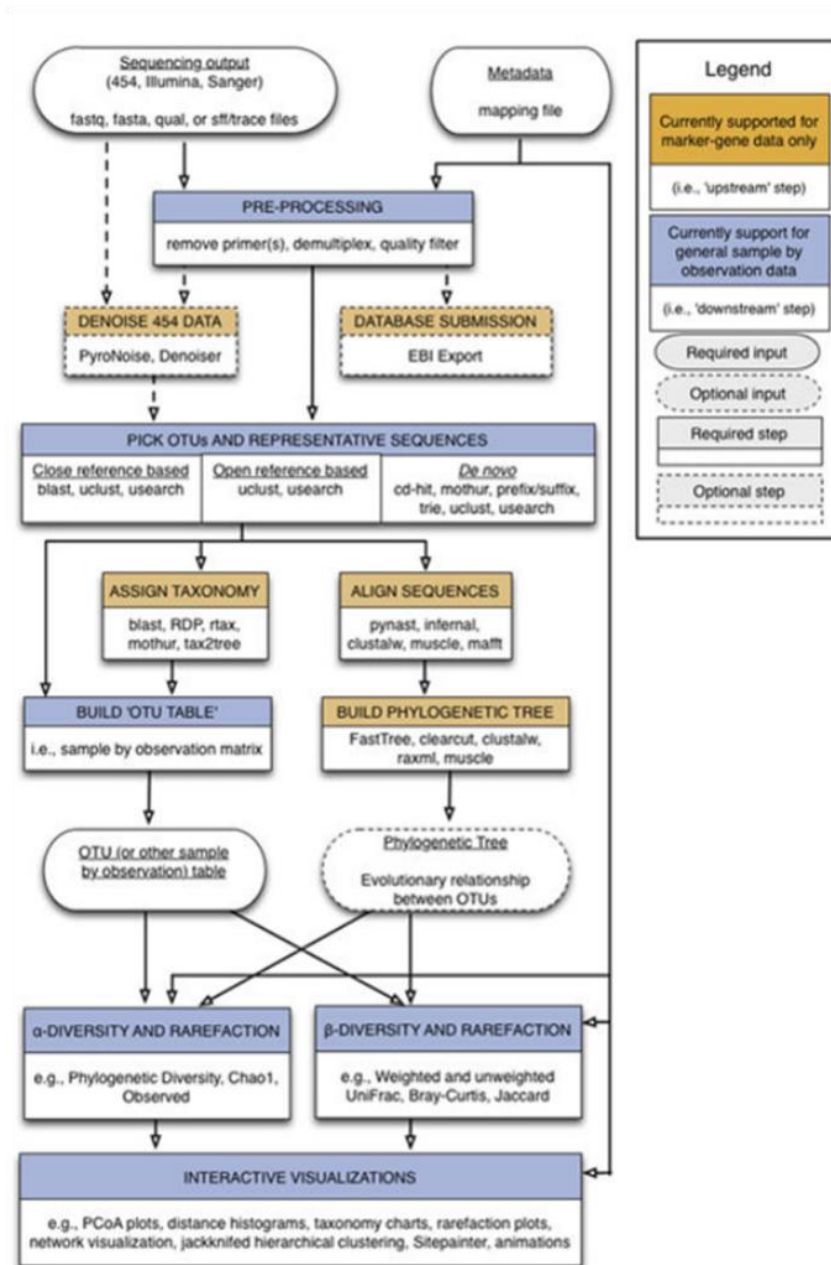


Figura 32: Esquema de trabajo en QIIME (Navas-Molina *et al.*, 2015)

OBJETIVO

De entre todos los patógenos emergentes en agua, *H. pylori* es la única bacteria clasificada como carcinógena humana de Clase I por la Organización Mundial de la Salud por su directa relación con el cáncer gástrico y la úlcera péptica.

Su modo de transmisión no se ha determinado de forma precisa todavía, aunque se piensa que se podría adquirir por diferentes rutas, entre las cuales se encuentra la ruta fecal-oral a través del agua. Sin embargo, la relación entre la adquisición de la enfermedad y el consumo de agua no está bien establecida todavía, ya que esta bacteria rara vez puede aislarse del medio ambiente, lo que impide además la implantación de políticas preventivas.

Hoy en día existe un número creciente de estudios que confirman la presencia de *H. pylori* en aguas. Sin embargo, debido a que *H. pylori* adquiere la forma viable no cultivable (VBNC) bajo condiciones ambientales desfavorables, la detección de esta bacteria mediante métodos de cultivo podría dar lugar a la subestimación de su presencia. Por ello, el uso de herramientas moleculares que sean capaces de diferenciar entre células viables y no viables es fundamental cuando se pretende determinar el riesgo que supone la presencia de esta especie patógena en aguas y alimentos.

Por otra parte, las amebas de vida libre (FLA) son protozoos predadores de bacterias ampliamente distribuidos en el medio ambiente, que pueden actuar como hospedadoras de bacterias patógenas capaces de resistir a su digestión (bacterias resistentes a las amebas, ARB). Dentro de las FLA, las bacterias son más resistentes a condiciones ambientales desfavorables que normalmente comprometerían su viabilidad, como la cloración o la presencia de biocidas. De esta forma, las FLA podrían ser consideradas como “Caballo de Troya” de estas ARB, permitiendo que las bacterias resistan más en el ambiente y puedan infectar a sus hospedadores.

Algunos trabajos realizados *in vitro* sugieren que *H. pylori* podría sobrevivir en FLA, que le protegerían frente a los distintos tratamientos y condiciones ambientales adversas, y, a través de ellas, llegar a los humanos.

Teniendo todo esto en cuenta, en esta Tesis se plantea el siguiente objetivo:

Estudiar el posible papel de las amebas de vida libre como reservorio de *Helicobacter pylori* y otras bacterias patógenas en aguas y alimentos mediante técnicas moleculares.

Para ello, se plantean los siguientes estudios:

1. Comprobar *in vitro* si una ameba de vida libre como *Acanthamoeba castellanii* es capaz de internalizar *Helicobacter pylori* y si este patógeno es capaz de permanecer viable en el interior de la ameba, comportándose como una ARB.

2. Aislar e identificar FLA en aguas potables y residuales, así como determinar la presencia de células de *H. pylori* viables del interior de FLA en las mismas muestras de agua, mediante cultivo y métodos moleculares.

3. Aislar e identificar FLA en muestras de lechuga, así como determinar la presencia de células de *H. pylori* viables procedentes del interior de FLA en dichas muestras, mediante cultivo y métodos moleculares.

4. Determinar el microbioma de las FLA aisladas a partir de aguas residuales, aguas potables y lechugas, mediante el uso de metagenómica de secuenciación dirigida.

CAPÍTULO I

Cocultivo de *A. castellanii* y *H. pylori*

I.1. OBJETIVO

Hasta el momento hay muy pocos trabajos que hayan investigado la interacción entre las FLA y *H. pylori*. Además, ninguno de ellos ha establecido si *H. pylori* permanece o no viable dentro de FLA, por lo que no queda claro si esta bacteria patógena es capaz de sobrevivir en ellas.

Por tanto, el objetivo general del presente capítulo es:

Comprobar *in vitro* si una ameba de vida libre como *Acanthamoeba castellanii* es capaz de internalizar la bacteria patógena *Helicobacter pylori* y si este patógeno es capaz de permanecer viable en el interior de la ameba, comportándose como una ARB.

Para ello, se desarrollaron tres objetivos específicos:

1. Desarrollo de un método de cocultivo entre *A. castellanii* y *H. pylori*.
2. Realización de ensayos de cocultivo para comprobar el comportamiento de *H. pylori* en el interior de *A. castellanii*.
3. Aplicación de técnicas moleculares (DVC-FISH y PMA-qPCR) y de cultivo que permitan tanto la detección de *H. pylori* como la determinación de su viabilidad una vez dentro de la ameba.

I.2. MATERIAL Y MÉTODOS

I.2.1. MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para la realización de este estudio se emplearon 2 cepas de referencia. La primera de ellas pertenece a la especie *Helicobacter pylori* y procede de la National Collection of Type Cultures (11638 NCTC). La segunda cepa pertenece a la especie *Acanthamoeba castellanii* y procede de la American Type Culture Collection (30010 ATCC). Esta cepa fue cedida por Marie-Cecile Trouilhé, Centre Scientifique et Technique du Batiment, AQUASIM, Francia.

La pureza de la cepa liofilizada de *H. pylori* se comprobó mediante la siembra en Agar Sangre de Caballo (ASC, Anexo A.1), incubándola a 37°C durante 24-48 horas en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂). Las cepas se conservaron a -80°C en crioviales CRYOFAST Natural (Scharlau, Barcelona).

La cepa de *Acanthamoeba castellanii* se recuperó a partir de un cultivo en placa mediante su siembra en 10 ml de Peptone-Yeast Extract-Glucose (PYG, Anexo A.2.) en un frasco de cultivo celular, incubándola a 28°C durante 24-48 horas en condiciones de aerobiosis. Su crecimiento se comprobó mediante un microscopio óptico invertido. Para su conservación a -80°C, se eliminó el caldo de cultivo, se adicionaron 1,5 ml de tampón fosfato salino (PBS, Anexo B.2) y se rascó la superficie del frasco de cultivo celular con un raspador de células estéril. Esta solución se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 500 g durante 3 minutos; se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 500µl de PBS 1X y 500 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) al 14%. Pasados 30 minutos se guardó a -80°C.

I.2.2. CULTIVO DE *H. pylori*

Para el cultivo de *H. pylori* se utilizó el medio Agar Sangre Piruvato (ASP, Anexo A.1.). Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂). Pasado este tiempo se recogió el contenido de la placa en un microtubo con 250 µl de PBS.

I.2.3. TINCIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE SYTO9-PI

Para la tinción diferencial de células vivas y muertas de *H. pylori* se añadieron 0,8 µl de una solución de SYTO9-PI (1:1) del sistema comercial LIVE/DEAD® Cell Viability Assays (Invitrogen, Reino Unido) a 250 µl de la suspensión de *H. pylori*. Se mantuvo en oscuridad y en agitación constante durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se observó una alícuota en el microscopio de epifluorescencia. Además, se tomaron y observaron diferentes alícuotas a lo largo del proceso de cocultivo.

I.2.4. CULTIVO DE *A. castellanii*

El cultivo axénico de *A. castellanii* se realizó en un frasco de cultivo celular con 10 ml de Peptone-Yeast Extract-Glucose con antibióticos (PYG+A, Anexo A.2) según Khan (2006) y Dupuy *et al.* (2011). El medio se incubó a 28°C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis. Pasado este tiempo, se eliminó el PYG, se sustituyó por solución salina amébrica de Page (PAGE, Anexo A.2) y el cultivo se incubó durante 24 horas a 28°C en aerobiosis. Seguidamente, se recogió el cultivo en PAGE mediante la utilización de un raspador de células estéril, el contenido se centrifugó a 500 g durante 3 minutos, se resuspendió en 500 µl de PAGE y finalmente se ajustó la concentración de *A. castellanii* a 10³ células/ml.

I.2.5. COCULTIVO DE *A. castellanii* Y *H. pylori*

El ensayo de cocultivo de *H. pylori* y *A. castellanii* se llevó a cabo por triplicado.

Antes de realizar el cocultivo se comprobó que las células de *H. pylori* presentaban su morfología típica helicoidal mediante una tinción GRAM, y que el cultivo de *A. castellanii* estaba en su forma vegetativa, trofozoito, mediante su observación en el microscopio óptico invertido.

Para que se produjera la internalización de *H. pylori* en *A. castellanii* se adicionaron 100 µl de una solución de 10⁵ células de *H. pylori*/ml (Apartado I.2.2) teñida con una solución de SYTO9 y yoduro de propidio (SYTO9-PI) (Apartado I.2.3) a 500 µl de PAGE conteniendo 10³ células de *A. castellanii*/ml (Apartado I.2.4). La

solución se mantuvo en aerobiosis y en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente.

Pasada la hora, el cocultivo se centrifugó a 500 g durante 3 minutos y se resuspendió en 500 μ l de PBS. A continuación se añadieron 100 μ l de una solución de hipoclorito sódico para conseguir una concentración final de 104 ppm, con el objetivo de matar las células de *H. pylori* que hubiera fuera de las células de *A. castellanii*. Se volvió a mantener en aerobiosis y en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente.

Seguidamente, el cocultivo tratado se lavó tres veces con PBS, centrifugándolo a 500 g durante 3 minutos para eliminar el hipoclorito sódico residual y el sedimento se resuspendió en 2,2 ml de PBS. Finalmente, se recogieron las siguientes alícuotas para la detección de *H. pylori* mediante cultivo y técnicas moleculares:

- 1 ml para el análisis mediante DVC-FISH (Apartado I.2.6).
- 20 μ l para el análisis mediante FISH directamente en portaobjetos (Apartado I.2.7).
- 500 μ l para el análisis mediante qPCR (Apartado I.2.8).
- 500 μ l para el análisis mediante PMA-qPCR (Apartado I.2.9)
- 100 μ l para la siembra en masa en el medio de cultivo Agar Sangre Piruvato (ASP) (Apartado I.2.10)
- 10-50 μ l para la observación directa al microscopio de epifluorescencia.

El esquema del proceso del cocultivo se encuentra detallado en la figura 33.

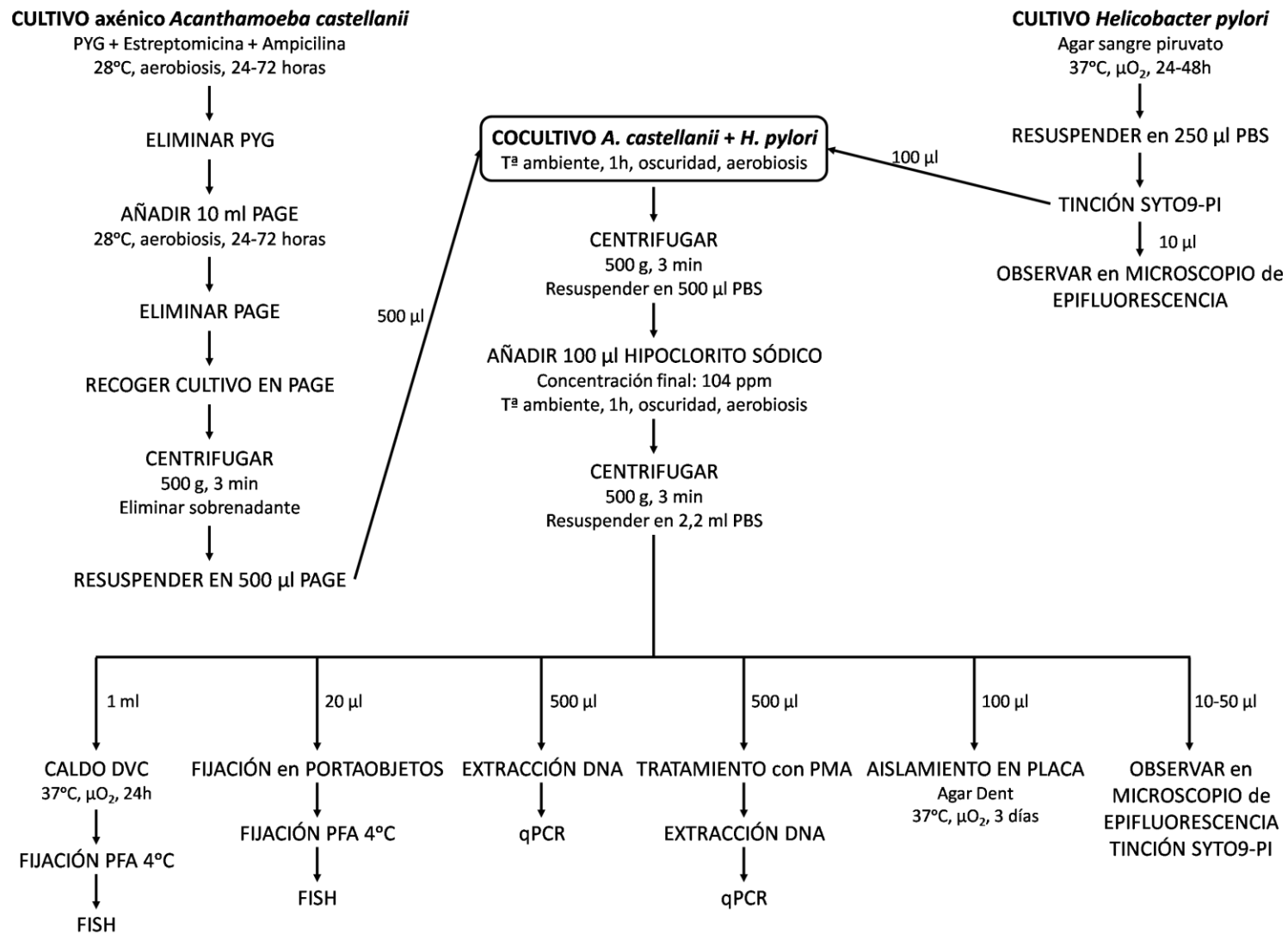


Figura 33: Protocolo de cocultivo de *H. pylori* y *A. castellanii* para la detección de *H. pylori* en el interior de *A. castellanii* mediante técnicas moleculares y de cultivo

I.2.6. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE *H. pylori* MEDIANTE FISH

Se depositaron 20 µl de muestra sobre un pocillo de un portaobjetos de hibridación, tratado previamente con gelatina (Anexo B.3). Se dejó secar al aire o en estufa, para acelerar el proceso. Para la fijación, se añadieron 20 µl de PFA sobre el pocillo y el portaobjetos se mantuvo durante 3 horas a 4°C. Seguidamente, se lavó el portaobjetos con PBS y se procedió a realizar la hibridación descrita en el apartado I.2.6.1.

I.2.6.1. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Condiciones de fijación:

Para llevar a cabo la fijación de las células, se tomó 1 ml de las muestras a analizar y se procedió a su centrifugación a 8000 rpm durante 8 minutos. El sedimento se resuspendió en PBS y se realizó un lavado mediante otra centrifugación a 8000 rpm durante 8 minutos. Este sedimento se resuspendió en PBS y paraformaldehído (PFA) (Anexo B.3) en proporción 1:3 y se mantuvo durante 3 horas a 4°C. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS, centrifugando a 8.000 rpm durante 8 minutos para eliminar el PFA. Tras los mismos, se resuspendió el sedimento en etanol absoluto a -20°C y PBS en proporción 1:1 y se almacenó a -20°C (Moreno *et al.*, 2003) a la espera de la hibridación.

Condiciones de hibridación:

Una alícuota de las muestras fijadas se depositó sobre los pocillos de los portaobjetos de hibridación, tratados previamente con gelatina (Anexo B.3). A continuación, los portaobjetos se dejaron secar al aire o en estufa, para acelerar el proceso, y se procedió a realizar tres deshidrataciones sucesivas, sumergiendo el portaobjetos en volúmenes de 50, 80 y 100% de etanol, durante 3 minutos en cada uno.

Una vez seco el portaobjetos, cada uno de los pocillos se cubrió con 10 µl de tampón de hibridación (Anexo B.3) conteniendo 50 ng de cada una de las sondas

detalladas a continuación, marcadas con el correspondiente fluorocromo. Se realizaron las hibridaciones de *H. pylori* con el 30% de formamida en el tampón de hibridación.

El portaobjetos se introdujo en posición horizontal en un tubo de 50 ml, en el que se había introducido previamente una base de papel de celulosa humedecido con el tampón de hibridación restante para crear una atmósfera húmeda. La reacción se llevó a cabo a 46°C y en oscuridad según Moreno *et al.* (2001). El tiempo de hibridación fue de 1,5 horas.

A continuación se procedió al lavado del portaobjetos con 50 ml de una solución de lavado (Anexo B.3) atemperada a 48°C. Primero se vertió una pequeña cantidad de esta solución sobre el portaobjetos para arrastrar el tampón de hibridación y a continuación se sumergió el portaobjetos en el volumen restante de la solución de lavado para eliminar los restos de sonda que no se hubieran unido al rRNA. El tiempo de lavado fue de 15 minutos, manteniéndose a 48°C en oscuridad.

Tras los 15 minutos de lavado, los portaobjetos se lavaron con agua ultrapura estéril y se secaron al aire en oscuridad. A continuación, estos se montaron con FluoroGuard Antifade Reagent (Bio-Rad, CA, EE.UU.) (Anexo B.3) entre el portaobjetos y el cubreobjetos y se visualizó mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Las fotografías se realizaron con la cámara DP-10 de Olympus.

Sondas:

Como control positivo de la técnica FISH se utilizó una combinación de tres sondas complementarias a una región del rRNA 16S del dominio Eubacteria, ya que hibridan con todas las bacterias que pueden estar presentes en la muestra (Amann *et al.*, 1995). La secuencia de cada una de las sondas EUB338 es:

EUB338-I: 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

EUB338-II: 5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'

EUB338-III: 5'-GCT GCC ACC CGT AGG TGT-3'

Las sondas EUB338 fueron sintetizadas y marcadas por TIB MOLBIOL (Berlín, Alemania) con 5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide éster (FLUOS), que emite en el espectro del verde (517 nm).

Para identificar específicamente *H. pylori* se empleó la sonda HPY, diseñada por Moreno *et al.* (2001), con modificaciones LNA (Locked Nucleic Acid) para aumentar la sensibilidad y la especificidad de unión de la hibridación (Kubota *et al.*, 2006). Esta sonda es complementaria a una región específica del rRNA 16S de *H. pylori*:

HPY-LNA: 5'-CTG GAG AGA C+TA AGC CC+T CC-3'

La sonda HPY-LNA fue sintetizada y marcada por Exiqon (EE.UU.) con CY3, que emite en el espectro del rojo (568 nm).

I.2.7. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE *H. pylori* MEDIANTE DVC-FISH

I.2.7.1. INCUBACIÓN EN DVC

Para la incubación en el medio DVC (Anexo A.2) se añadió 1 ml de cada muestra a 9 ml de caldo DVC. Se incubó durante 24 horas en condiciones óptimas para el crecimiento de *H. pylori* (Piqueres *et al.*, 2006).

Pasado el tiempo de incubación, los 10 ml se centrifugaron a 8000 rpm durante 8 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS, el cual se fijó e hibridó según las condiciones expuestas en el apartado I.2.6.1.

I.2.8. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR)

I.2.8.1. EXTRACCIÓN DE DNA

Se extrajo el DNA de las alícuotas del cocultivo utilizando el sistema GeneJET™ Genomic DNA Purification kit (ThermoScientific, Alemania). Se siguieron las indicaciones para la extracción de DNA de células de mamífero, modificando el tiempo de incubación a 56°C para lisar las células, pasando a ser de 30 minutos en lugar de los 10 especificados en el protocolo.

I.2.8.2. qPCR ESPECÍFICA DE *H. pylori*

Para la identificación específica de *H. pylori* se seleccionó un fragmento de 372 pb del gen *vacA*, que codifica la proteína vacuolizante Vac de *H. pylori*. Para ello, se utilizó el par de iniciadores VacAR y VacAF, descritos por Nilsson *et al.* (2002):

VacAF: 5'-GGC ACA CTG GAT TTG TGG CA-3'

VacAR: 5'- CGC TCG CTT GAT TGG ACA GA-3'

La reacción de qPCR se realizó en el termociclador LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, España), empleando el sistema comercial LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, España).

Las reacciones de qPCR se realizaron según las condiciones optimizadas por Santiago *et al.* (2015). Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, que contenía 2 µl de LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, España), 0,5 µl de cada primer (20 mM), 1,6 µl de MgCl₂ (50 mM) y 2 µl de DNA. Se incluyó un control negativo en el que el DNA se reemplazó por agua ultrapura estéril y un control positivo en el que el DNA procedía de la cepa de referencia de *H. pylori*.

La mezcla de reacción se sometió a las condiciones mostradas en la tabla 5.

Tabla 5: Condiciones de qPCR para la identificación de *H. pylori*

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	FASES
1	95	10 min	Desnaturalización
40	95	10 s	Desnaturalización
	62	5 s	Unión de iniciadores
	72	16 s	Extensión del producto
1	40	30 s	Extensión final

La temperatura de fusión (T_m) característica de los fragmentos amplificados de *H. pylori* es de 85 °C (Santiago *et al.*, 2015).

Para comparar las muestras del cocultivo tratadas y sin tratar con PMA se tuvo en cuenta el valor del C_q .

Finalmente se recogió el producto de cada muestra de la qPCR para ser analizado mediante electroforesis en gel de agarosa.

I.2.8.3. ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO DE qPCR

El producto de la qPCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Anexo B.4) en tampón Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) al que se le adicionó un 0,001% de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, CA, EE.UU.), a 90 V durante 90 minutos.

Se incluyó un marcador de pesos moleculares (M100-1000, Blirt, Polonia) para poder estimar el tamaño de los fragmentos de DNA amplificados. Finalmente, los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

I.2.9. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* VIABLE MEDIANTE PMA-qPCR

Para la detección e identificación de *H. pylori* viable mediante PMA-qPCR en primer lugar es necesario tratar las alícuotas con PMA. Seguidamente se ha de extraer el DNA para posteriormente realizar la qPCR específica de *H. pylori* y observar los fragmentos amplificados mediante electroforesis.

I.2.9.1. TRATAMIENTO CON PMA

El PMA (GenIUL, España) se disolvió en 782 μ l de agua Milli-Q para crear una concentración stock de 1250 μ M, según las instrucciones del fabricante. Se añadieron 20 μ l de la solución stock de PMA a las alícuotas de las muestras de cocultivo tratadas con hipoclorito sódico para conseguir una concentración final de PMA de 50 μ M. Después de mantenerlas en oscuridad y agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente, las muestras se fotoactivaron durante 15 minutos usando el equipo PhAST Blue (GenIUL, España). Seguidamente, se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 μ l de PBS (Agustí *et al.*, 2010).

Finalmente las muestras se congelaron a -20°C hasta que se extrajo el DNA.

I.2.10. AISLAMIENTO DE *H. pylori* EN PLACA TRAS EL TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN

Para el aislamiento de *H. pylori* en placa tras el tratamiento de desinfección con hipoclorito sódico se utilizó el medio ASP. Las placas se incubaron a 37°C durante 3 días en condiciones de microaerofilia (5% O_2 , 10% CO_2 y 85% de N_2). Pasado este tiempo, en caso de observar alguna colonia sospechosa de ser *H. pylori*, esta se recogió y se resuspendió en 200 μ l de PBS para la posterior extracción del DNA e identificación mediante qPCR (Apartados I.2.8.1 y I.2.8.2).

I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de comprobar la internalización de *H. pylori* en amebas se realizó un ensayo *in vitro* de cocultivo por triplicado. Se utilizaron diferentes técnicas moleculares y de cultivo para la detección de las células de *H. pylori* procedentes exclusivamente del interior de *A. castellanii*, así como para comprobar su viabilidad. En las tres réplicas del ensayo de cocultivo se observaron resultados equivalentes.

Para conseguir un cultivo axénico de *A. castellanii*, pese a que se trataba de una cepa de referencia, se hizo necesaria la suplementación del medio PYG con antibióticos (PYG+A) para evitar su contaminación. De esta forma se consiguió mantener un cultivo axénico de *A. castellanii* adecuado para el cocultivo con *H. pylori* (Figura 34). Para eliminar los antibióticos y que no afectaran a *H. pylori* durante el cocultivo se procedió a realizar diversos lavados con 5 ml de tampón PBS mediante la adición y posterior eliminación por decantación del citado tampón. La concentración de trofozoitos no disminuyó después de los diversos lavados, debido a que estos se encontraban adheridos a la base del frasco de cultivo celular. Sin embargo, se eliminaron la práctica totalidad de los quistes, ya que estos no tienen adherencia al frasco de cultivo celular. Este hecho no afectó al cocultivo, ya que la forma amébrica deseada para el mismo es la del trofozoito, debido a que es la metabólicamente activa, y por tanto la que es capaz de internalizar la bacteria.

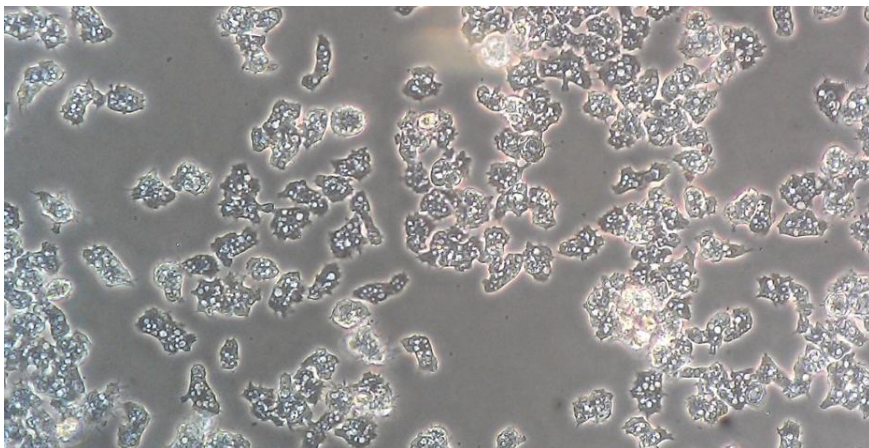


Figura 34: Fotografía en microscopio invertido (200x) de cultivo axénico de *A. castellanii*

Después de los lavados, los 10 ml de PYG+A se sustituyeron por 10 ml de PAGE según Smith y Ashbolt (2012), para que las amebas dispusieran de menos nutrientes y así aumentara la fagocitosis de *H. pylori*. Después de un periodo de carencia de nutrientes de 48 horas, se observó que la mayoría de células de *A. castellanii* se encontraba en su forma de quiste, lo cual era inviable para la práctica del cocultivo. Probablemente esto fue debido a una exposición demasiado larga a la condición adversa de falta de nutrientes. Por este motivo la sustitución por el medio PAGE se realizó 24 horas antes del cocultivo. En este caso se observó que sólo una pequeña proporción de las amebas estaba enquistada, permaneciendo la mayoría en forma de trofozoito, lo cual ya hacía posible la realización del cocultivo, por lo que se seleccionó como condición óptima el cultivo en PAGE durante 24 horas.

Una vez se pusieron en contacto *A. castellanii* y *H. pylori*, estos se mantuvieron en condiciones de aerobiosis a temperatura ambiente y en oscuridad hasta la finalización del cocultivo. *H. pylori* necesita condiciones de microaerofilia para su crecimiento y, pese a que su viabilidad se ve más comprometida cuanto más tiempo pasa fuera de estas condiciones, el cocultivo se realizó en aerobiosis para asemejar las condiciones ambientales. Además, se hizo necesaria la realización del ensayo en oscuridad porque *H. pylori* estaba teñido por los fluorocromos SYTO9-PI y porque el hipoclorito sódico se descompone por exposición a la luz.

Seguidamente, la solución conteniendo las amebas y las bacterias se centrifugó para concentrar las amebas y eliminar parte de las células de *H. pylori* que no se encontrasen dentro de *A. castellanii*.

Para asegurar que no hubieran células viables de *H. pylori* fuera de la ameba, se sometió al cocultivo a un tratamiento de desinfección con hipoclorito sódico al que esta bacteria patógena fuera sensible (Moreno *et al.*, 2007), de tal forma que las células de *H. pylori* internalizadas habrían estado protegidas del tratamiento de desinfección, y mantendrían su viabilidad.

Para la adición de la solución de hipoclorito sódico era necesario el cambio del medio PAGE por PBS, según Dupuy *et al.* (2011), ya que el primero consume el 52% de hipoclorito ClO^- , que es la molécula que realmente actúa sobre las membranas celulares, y el segundo sólo un 20%. Esta diferencia es debida a que el PAGE contiene

Ca^{2+} y Mg^{2+} , los cuales catalizan fuertemente una reacción de descomposición del hipoclorito (Gordon *et al.*, 1995).

Mediante la adición de hipoclorito sódico se eliminaron las células de *H. pylori* del exterior de las amebas, ya que estas mueren por la alta exposición a este agente. García *et al.* (2013) añadieron suero salino acidificado (pH 2) después de hacer varios subcultivos de muestras de agua con FLA y antes de la extracción de DNA para identificar bacterias del interior de FLA. Sin embargo, este tratamiento no es efectivo contra ARB resistentes a condiciones ácidas, como *H. pylori*. En otro estudio, llevado a cabo por Thomas *et al.* (2008) se emplearon también varios pasos de subcultivo de muestras de agua positivas para FLA para eliminar bacterias exógenas. Seguidamente, se lisaron las FLA y el contenido liberado se añadió a cultivos de *A. castellanii* para recuperar las ARB presentes. Sin embargo, en este caso, al igual que en el de García *et al.* (2013), no se puede estar seguro de que el DNA de las bacterias externas se haya eliminado completamente y que el DNA exógeno no va a ser detectado mediante PCR. Por tanto, en estos casos, las bacterias asociadas a FLA podrían estar sobreestimándose.

El tratamiento con hipoclorito sódico se llevó a cabo a una concentración final de 104 ppm. Se decidió usar esta concentración tan elevada para tener la certeza de que todas las células de *H. pylori* en el exterior de *A. castellanii* fueran inactivadas. Según Loret y Greub (2010), los quistes de *Acanthamoeba* pueden resistir concentraciones de varios cientos de mg·min/ml de cloro, y, aunque el cocultivo se realizó con el trofozoito, se comprobó mediante observación al microscopio invertido que la integridad y culturabilidad de *A. castellani* no se vieron afectadas después del tratamiento de desinfección, por lo que este método se determinó como válido.

Después de la actuación del hipoclorito sódico, el cocultivo se lavó para eliminar el cloro libre residual, en lugar de añadir una solución de tiosulfato para neutralizarlo (Bonilla-Lemus *et al.*, 2010). La adición de tiosulfato está condicionada por la cantidad de cloro libre que quede en la muestra (Clesceri *et al.*, 1992). Esto haría necesario realizar una medición del cloro libre, con la consiguiente pérdida de parte de la muestra.

La tinción de *H. pylori* con SYTO9-PI permitió comprobar *in situ* el estado de viabilidad de las células de esta bacteria antes, durante y después del cocultivo. Antes del mismo, nada más realizar la tinción, se comprobó que la mayoría de células estaban en forma helicoidal y viable, ya que se observaban con fluorescencia verde (Figura 35). Después de 1 h en cocultivo en aerobiosis se observaron tanto en forma viable, verde, como no viable, roja (Figura 36), existiendo células de *H. pylori* viables dentro de *A. castellanii* (Figura 36C). También se observaron células viables de *H. pylori* dentro de *A. castellanii* a las 24 horas (Figura 37), con lo que se comprobó, de acuerdo con otros autores (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002; Smith y Ashbolt, 2012), la internalización de *H. pylori* incluso después de estas 24 horas, sugiriéndose que la bacteria es capaz de sobrevivir en el interior de *A. castellanii*.

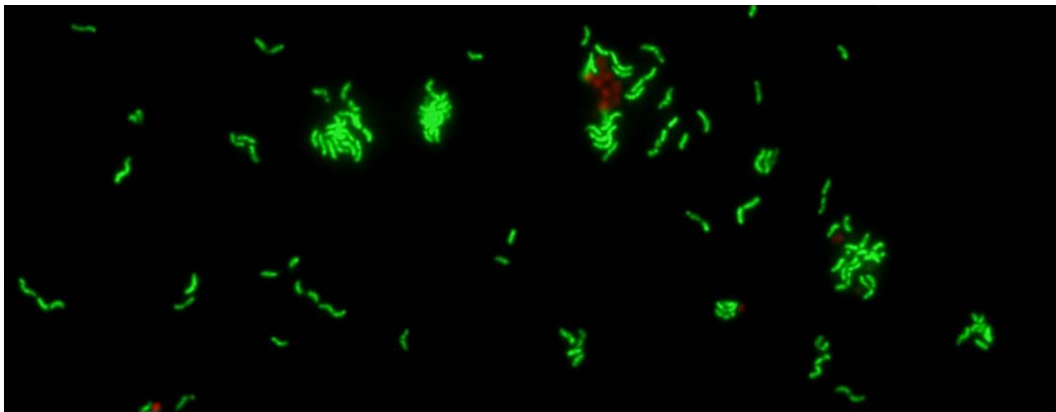


Figura 35: Visualización de *H. pylori* teñido con SYTO9-PI antes del cocultivo

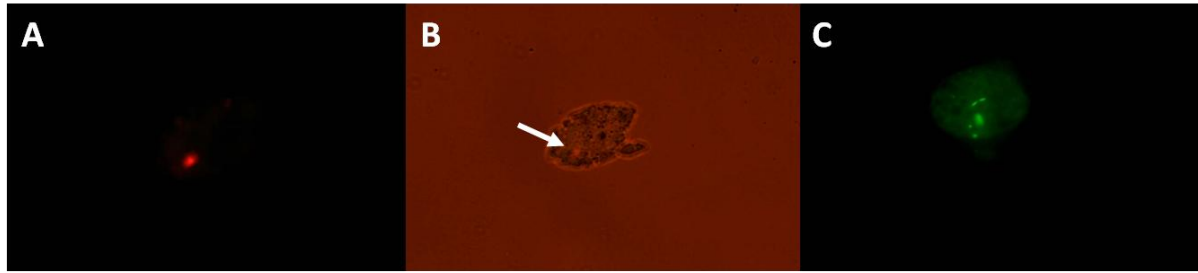


Figura 36: Visualización de *H. pylori* teñido con SYTO9-PI antes de la adición de hipoclorito sódico: (A) Visualización de *H. pylori* teñido con SYTO9-PI dentro del trofozoito de *A. castellanii* de B. (B) Visualización de la morfología de un trofozoito de *A. castellanii* con *H. pylori* en su interior. (C) Visualización de *H. pylori* teñido con SYTO9-PI dentro de un trofozoito de *A. castellanii*

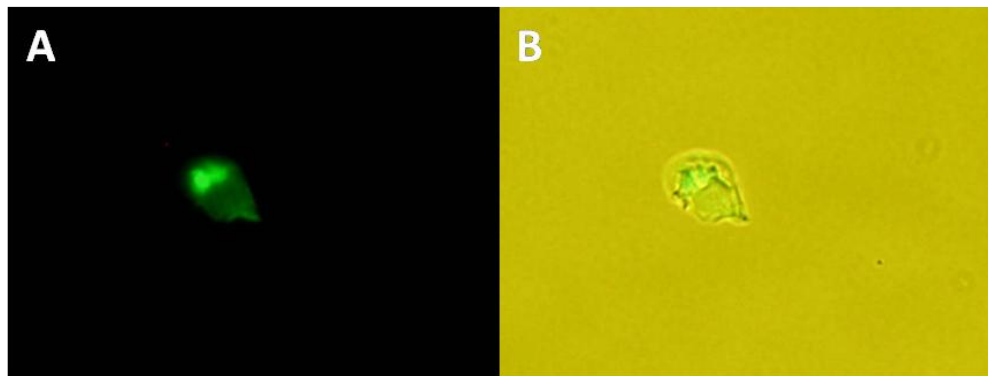


Figura 37: Visualización de *H. pylori* teñido con SYTO9-PI en el interior de *A. castellanii* después de 24 horas

Durante el proceso de cocultivo se pudo comprobar que conforme avanzaba el tiempo, el porcentaje de células bacterianas no viables, rojas, aumentaba, aunque siempre se observaron células viables dentro de *A. castellanii*.

La mayoría de ARB son capaces de entrar en el estado VBNC, lo que hace que pierdan la habilidad de crecer en medios de cultivo sintéticos, lo cual podría dar lugar a una subestimación de la presencia de bacterias viables cuando las muestras son analizadas mediante cultivo. La identificación mediante técnicas moleculares podría ser una alternativa y, de hecho, estas han sido previamente usadas para monitorizar la presencia de *H. pylori* en cocultivo con *Acanthamoeba* spp. (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002; Smith y Ashbolt, 2012). Concretamente, en el presente estudio se han empleado

las técnicas FISH y qPCR, solas y en combinación con DVC (DVC-FISH) y PMA (PMA-qPCR) para determinar la internalización y viabilidad de *H. pylori* en *A. castellanii*.

El tratamiento de la solución de cocultivo con PMA se utilizó para eliminar la amplificación del DNA procedente de las células de *H. pylori* que pudieran quedar fuera de las células de *A. castellanii* después del tratamiento con hipoclorito sódico, o de fragmentos de DNA libres en el medio, y de esta forma detectar solo el DNA de las células de *H. pylori* procedente del interior de *A. castellanii*. Los resultados indicaron que *H. pylori* sí había sido internalizado por *A. castellanii*, ya que hubo producto de amplificación tras la qPCR, cuyo tamaño se comprobó posteriormente por electroforesis (Figura 38).

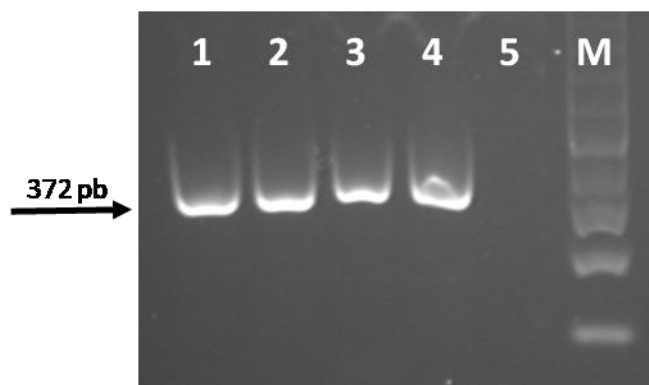


Figura 38: Resultados de la qPCR para la identificación de *H. pylori* del interior de *A. castellanii*.

1, 2, 3: cocultivo de *Acanthamoeba castellanii* + *Helicobacter*; **4:** Control +; **5:** Control -; **M:** marcador de pesos moleculares 100pb

Cuando las muestras no se trataron con PMA, el Cq promedio de la qPCR (26,34) fue menor que cuando las muestras se trataron con PMA (28,01). Este resultado indica, como es de esperar, que en las muestras del cocultivo sin el tratamiento de PMA se detecta una mayor cantidad de DNA (DNA externo, DNA de las células muertas de *H. pylori* del exterior de *A. castellanii* y DNA de *H. pylori* del interior de *A. castellanii*) que en las muestras tratadas con este agente, apoyando la teoría de que el PMA elimina el DNA de las células muertas y el DNA extracelular (Fittipaldi *et al.*, 2012), mostrando la presencia de *H. pylori* dentro de *A. castellanii*, aunque mediante este método no se pueda distinguir células internalizadas viables y no viables (Figura 39).

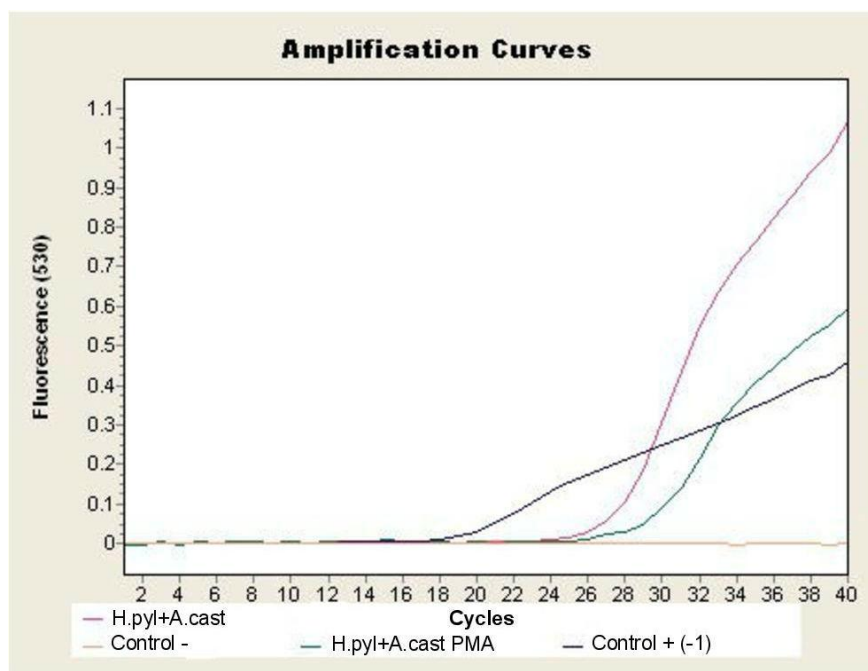


Figura 39: Curvas de amplificación de las muestras de cocultivo de *H. pylori* y *A. castellanii*, con y sin tratamiento con PMA

Por otra parte, el análisis mediante FISH mostró la presencia de *H. pylori* con morfología tanto cocoide como helicoidal fuera (Figura 40) y dentro (Figura 41) de *A. castellanii*.

El análisis mediante FISH no puede demostrar que las células de *H. pylori*, internalizadas o no, sean viable después del tratamiento con hipoclorito sódico. Algunos autores consideran que la detección mediante este método está directamente relacionada con la viabilidad (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002). Sin embargo, Nocker y Camper (2006) detectaron rRNA mediante PCR de transcripción reversa en muestras que contenían células muertas mediante exposición a calor e isopropanol hasta 16 horas después de la muerte. Otros autores demostraron la presencia de rRNA 16S hasta 48 horas, o del DNA hasta 24 horas después de la muerte celular, por lo que, cuando la detección de un patógeno en muestras ambientales se basa en estos marcadores no puede demostrarse que las células detectadas sean viables (McKillip *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2007).

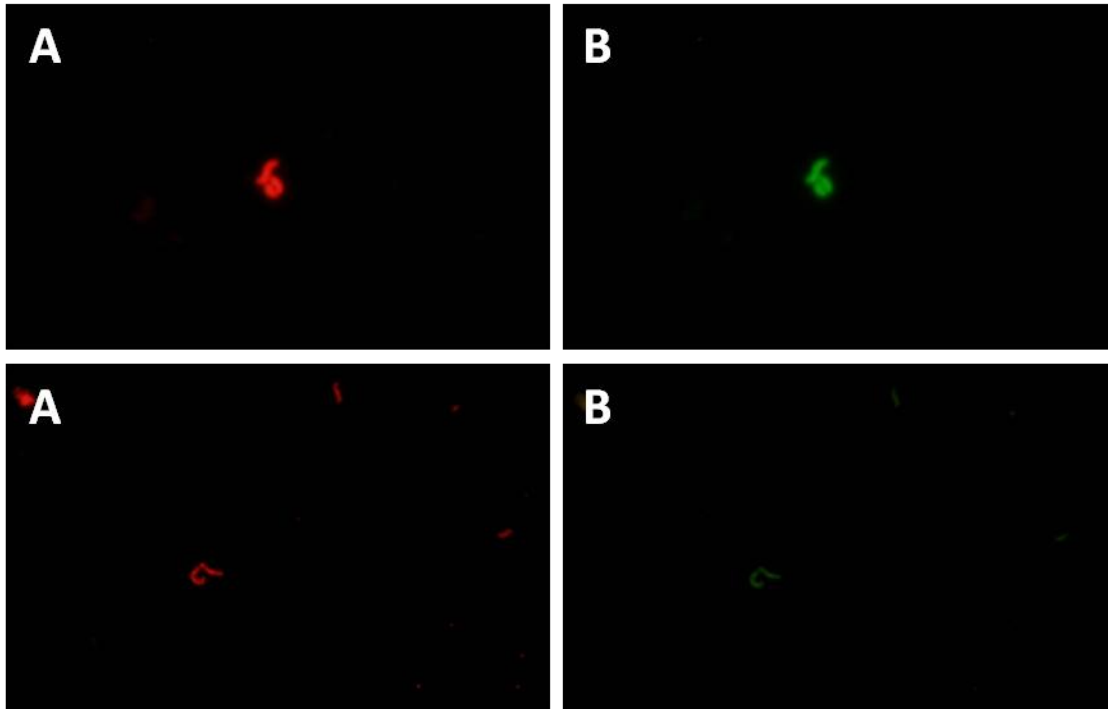


Figura 40: Identificación de *H. pylori* después del cocultivo. (A) Hibridación con la sonda HPY-LNA. (B) Hibridación con la sonda EUB-338

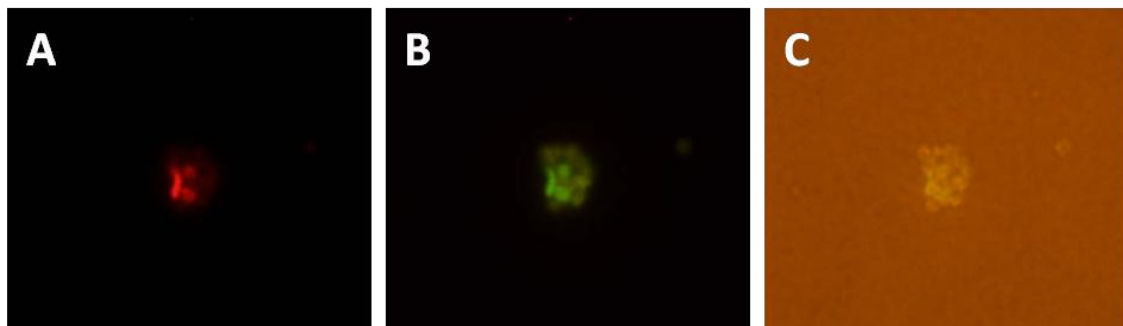


Figura 41: Identificación de *H. pylori* en el interior de *A. castellanii* después del cocultivo mediante FISH. (A) Hibridación con la sonda HPY-LNA. (B) Hibridación con la sonda EUB-338. (C) Visualización de la morfología del mismo trofozoito en el microscopio de epifluorescencia con luz blanca

Por este motivo, en este trabajo se utilizó el método DVC-FISH para la detección e identificación de células viables de *H. pylori* excretadas por *A. castellanii* después del tratamiento de desinfección, ya que éste método sí que permite evidenciar la viabilidad de *H. pylori* (Piqueres *et al.*, 2006). Según los estudios disponibles en la bibliografía, las FLA excretan las bacterias endógenas cada 2 ó 4 horas tras la ingestión (Gaze *et al.*, 2003; Axelsson-Olsson *et al.*, 2010; Smith y Ashbolt, 2012) pero el periodo

de excreción depende de las condiciones ambientales y de las especies de bacteria excretadas (Vaerewijck *et al.*, 2014). Por tanto, las muestras del cocultivo se analizaron tras 24 horas de incubación en el medio DVC, tiempo que se consideró suficiente para que se hubieran excretado un número alto de células.

El análisis mediante FISH tras el tratamiento con DVC mostró la presencia de células de *H. pylori* elongadas y con mayor intensidad de fluorescencia, lo cual implica que esta bacteria es excretada en forma viable tras el proceso de cocultivo con *A. castellanii* (Figura 42). De esta forma se demuestra la capacidad de las células de *H. pylori* de sobrevivir, no sólo a cortos periodos de cloración (Moreno *et al.*, 2007), sino también a periodos más largos en presencia de *A. castellanii* cuando son internalizadas por esta. Aunque existen trabajos en los que se ha estudiado la internalización de *H. pylori* en amebas *in vitro* (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002; Smith y Ashbolt, 2012) en ninguno de ellos se ha demostrado su supervivencia, siendo el presente trabajo el primero en demostrarla.

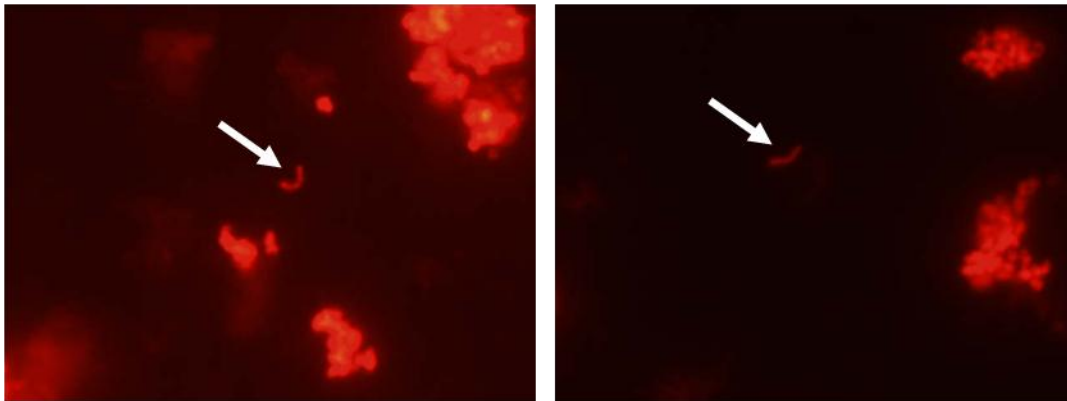


Figura 42: Identificación de *H. pylori* viable después de la incubación en el medio DVC. Hibridación con la sonda HPY-LNA.

El último paso de este trabajo consistió en tratar de determinar la cultivabilidad de las células de *H. pylori* presentes en el interior de las amebas, puesto que otras bacterias patógenas, tales como *Campylobacter*, *Legionella* y *Salmonella*, son recuperadas por cultivo después de ser excretadas a través de vesículas de expulsión o

pellets fecales (Axelsson-Olsson *et al.*, 2010; Denoncourt *et al.*, 2014; Vaerewijck *et al.*, 2014).

Para la identificación de células cultivables de *H. pylori* después del ensayo de cocultivo se utilizó el medio ASP, debido a que, según algunos autores, favorece el crecimiento de esta bacteria (Jiang y Doyle, 2000).

Aunque que muchas ARB no son capaces de excretarse, teniendo en cuenta los estudios de Marciano-Cabral y Cabral (2003), quienes describieron que *H. pylori* puede ser excretado tras 4 días en cocultivo con *Acanthamoeba astronyxis*, se decidió inocular el cocultivo en el medio de cultivo sin desintegrar previamente las células de *A. castellanii*.

En las placas cultivadas en las condiciones de microaerofilia y en medio ASP se observaron unas zonas donde el agar se había degradado (Figura 43). Se hizo una preparación al microscopio y se observó que se trataba de amebas y por tanto de *A. castellanii*. De esta forma, se sugiere que esta ameba es capaz de crecer en cultivo bajo las condiciones óptimas para *H. pylori*.



Figura 43: Fotografía de una placa de ASP del cocultivo de *A. castellanii* y *H. pylori* cultivada bajo las condiciones de *H. pylori* con el agar degradado

En este trabajo no se pudieron cultivar células de *H. pylori* en ninguno de los ensayos. Esto sugiere que, tras el cocultivo, *H. pylori* adquiere la forma viable no cultivable (VBNC), ya que mediante DVC-FISH sí que se ha demostrado en este estudio la viabilidad de la bacteria tras el proceso de cocultivo y desinfección con hipoclorito sódico.

Tras obtener estos resultados y teniendo en cuenta el hecho de que *H. pylori* ha sido previamente detectado en diferentes sistemas acuáticos, incluyendo ríos, aguas residuales o aguas potables (Moreno y Ferrús, 2012; Piqueres *et al.*, 2006; Tirodimos *et al.*, 2014), se considera que este estudio demuestra por primera vez que *H. pylori* pertenece al grupo de bacterias ARB, pudiendo sobrevivir dentro de FLA, y, por lo tanto, actuando estas como “Caballos de Troya”, protegiendo a la bacteria y pudiendo ser un vehículo de transmisión para la misma.

I.4. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

ARTÍCULOS:

- Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J.L., Ferrús, M.A. 2016. DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii*. *Res Microbiol*, 167: 29-34.

CONGRESOS:

- Moreno-Mesonero, L., Alonso, J.L., Amorós, I., Ferrús, M.A., Moreno, Y. 2017. Evaluation of different DNA extraction methods for the detection of both bacteria (*Helicobacter pylori*) and protozoa (*Acanthamoeba castellanii*) in the same sample. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS). Valencia, Spain. 9-13 July 2017.

CAPÍTULO II

Detección de *H. pylori* dentro de FLA en muestras
de agua

II.1. OBJETIVO

En el capítulo anterior se ha demostrado que *H. pylori* es capaz de sobrevivir dentro de la FLA *Acanthamoeba castellanii* después de resistir un tratamiento de desinfección por cloración.

Por otra parte, diversas FLA son patógenas humanas y pueden suponer un riesgo para la salud pública si alcanzan al consumidor.

Por tanto, el objetivo general de este capítulo es:

Aislar e identificar FLA en aguas residuales y potables, así como determinar la presencia de células de *H. pylori* viables procedentes del interior de FLA en las mismas muestras de agua, mediante la técnicas empleadas en el ensayo de cocultivo.

Para conseguirlo, se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar e identificar FLA en aguas residuales y potables de la Comunidad Valenciana
2. Detectar, mediante la técnica qPCR, células de *H. pylori* procedentes del interior de las FLA presentes en aguas residuales y potables
3. Detectar, mediante la técnica DVC-FISH, células viables de *H. pylori* procedentes del interior de las FLA presentes en aguas residuales y potables
4. Detectar formas cultivables de *H. pylori* procedentes del interior de las FLA presentes en aguas residuales y potables
5. Evaluar el proceso de desinfección con UV en las aguas residuales

II.2. MATERIAL Y MÉTODOS

II.2.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE AGUA

Se analizaron un total de 100 muestras ambientales, 69 muestras de agua residual y 31 muestras de agua potable.

Las 69 muestras de agua residual (R1-R69), recogidas desde febrero de 2013 hasta julio de 2016, provenían de varias Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) localizadas en la Comunidad Valenciana. Las muestras se tomaron después de los procesos de tratamiento secundario y terciario (Anexo C).

Una de las EDAR, fuente del 65% de las muestras del estudio, depura las aguas para 180.000 habitantes equivalentes; con un caudal de 40.000 m³/día. El pretratamiento consta de una reja para sólidos gruesos, una reja para sólidos finos, desarenador y desengrasador. El tratamiento primario se realiza por decantación. El tratamiento secundario tiene lugar en reactores biológicos para el tratamiento con fangos activos y el tratamiento terciario se realiza mediante coagulación, filtración y desinfección con radiación ultravioleta.

El otro 35 % de las muestras de agua residual se tomaron de diversas EDARs. En todas ellas el tratamiento secundario tiene lugar en reactores biológicos para el tratamiento con fangos activos y el tratamiento terciario se realiza mediante coagulación, filtración y desinfección con radiación ultravioleta.

Además, se analizaron un total de 31 muestras de agua potable (P1-P31) recogidas desde febrero de 2013 hasta julio de 2016, que provenían tanto de fuentes públicas de agua potable localizadas en la Comunidad Valenciana como de la red de distribución de agua de diferentes unidades domésticas, también situadas en la Comunidad Valenciana (Anexo C).

II.2.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE AGUA

La concentración de las muestras para determinar la presencia de FLA en aguas, tanto residuales como potables, se realizó por filtración. Todas las muestras fueron tomadas en botellas estériles y se mantuvieron refrigeradas hasta que fueron procesadas en un plazo máximo de 24 horas.

En aguas potables se procesó un volumen de 5 litros. En aguas residuales se procesó un volumen de 1 litro. En ambos casos las muestras se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa estéril de 3 μm (Scharlab, España).

Tras la filtración, se transfirió la membrana asépticamente a una placa de agar no nutritivo (non-nutrient agar Page; NNAP; Anexo A.1) de forma que todo lo retenido por la misma estuviera en contacto con el agar. Pasadas 24 horas se retiró la membrana. En el caso del agua potable, antes de la filtración, la placa de NNAP se sembró con 100 μl de células muertas de *Escherichia coli* (manteniendo una suspensión del microorganismo durante 5 minutos a 100°C) según Badirzadeh *et al.* (2011).

La incubación de las placas de NNAP se realizó a 28°C hasta 30 días en aerobiosis. Durante este tiempo se comprobó si había crecimiento de FLA mediante la observación de las placas cada dos o tres días, usando tanto un microscopio invertido como un microscopio de contraste de fases.

Cuando se detectó crecimiento de FLA se procedió a la identificación de las mismas (Apartado II.2.3) y a la detección de posibles células de *H. pylori* procedentes del interior de las FLA presentes (Apartado II.2.4).

El esquema del procesado de las muestras de agua se encuentra detallado en la figura 44.

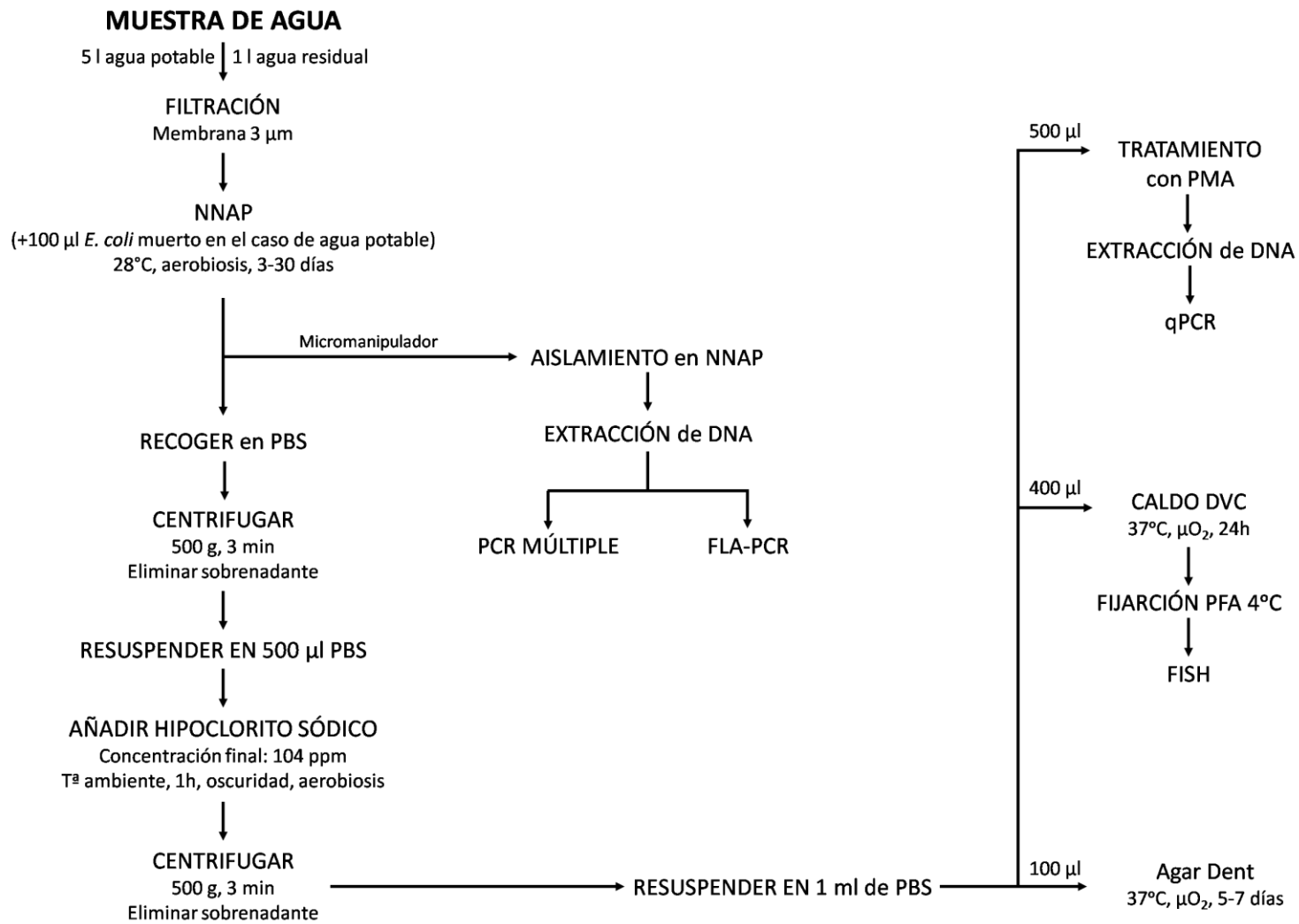


Figura 44: Protocolo de aislamiento e identificación de amebas de vida libre y de detección de *Helicobacter pylori* procedente del interior de amebas de vida libre en aguas residuales y potables mediante técnicas moleculares y de cultivo.

II.2.3. IDENTIFICACIÓN DE AMEBAS DE VIDA LIBRE (FLA)

Para el aislamiento de FLA a partir de la placa de NNAP se utilizó un micromanipulador (Narishige, Japón). A través de una cánula de vidrio se aspiró una única ameba, bien en forma de quiste o de trofozoito, para separarla del resto. Este procedimiento se realizó en 13 muestras de agua residual y en 4 muestras de agua potable.

Cada FLA aislada se depositó sobre una placa de NNAP (Anexo A.1), que se incubó a 28°C de 3 a 5 días en aerobiosis y se resembró en tres nuevas placas de NNAP, que se incubaron en las mismas condiciones, para conseguir una mayor concentración de la misma. Cuando se volvió a observar crecimiento, se recogió el contenido de las tres placas mediante la adición de tampón PBS (Anexo B.2) y la utilización de un raspador de células estéril, depositando el contenido en un microtubo, el cual se centrifugó a 500 g durante 3 minutos y cuyo pellet se resuspendió en 200 µl de PBS.

Seguidamente se extrajo el DNA de cada cultivo de FLA aislada (Apartado I.2.8.1) y se procedió a la identificación de las mismas mediante PCR, tal y como se describe a continuación.

II.2.3.1. PCR MÚLTIPLE

Se seleccionaron dos regiones del 18S rRNA para la detección específica de distintos géneros de amebas. Para la detección de amebas del filo Amoebozoa se amplificó un fragmento de 130 pb para el género *Acanthamoeba* y un fragmento de 50 pb para los géneros *Echinamoeba* y *Vermamoeba*, utilizándose los iniciadores Amo1400F y Amo1540R. Para la detección de amebas pertenecientes a la familia Vahlkampfiidae tales como *Naegleria* o *Vahlkampfia*, entre otras, se amplificó un fragmento de 150 pb utilizándose los iniciadores Vahl560F y Vahl730R (Le Calvez *et al.*, 2012).

Las secuencias de los iniciadores son las siguientes:

Amo1400F: 5'- ATG CCG ACC ARS GAT YMG GAG -3'

Amo1540R: 5'- CAA GST GCY MGG GGA GTC AT -3'

Vahl560F: 5'-AGG TAG TGA CAA GMY RTA GYG ACT-3'

Vahl730R: 5'- GGG CGT TTT AAC TAC ARC AGT ATT A-3'

Para la reacción de amplificación se utilizaron las siguientes concentraciones de reactivos, adaptadas de Le Calvez *et al.* (2012): 5 µl de Tampón 10X (Anexo B.4), 1,5 µl de MgCl₂ 50mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada uno de los iniciadores a 20 µM, 1 U del enzima *Taq* polimerasa, 0,3 µl de BSA (1 mg/ml) y 3 µl de DNA molde de cada muestra en un volumen final de 25 µl. Se incluyó un control negativo en el que el DNA se reemplazó por agua Milli-Q y un control positivo en el que DNA procedía de la cepa de referencia de *A. castellanii*.

La mezcla de reacción se sometió a las condiciones mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones de la PCR múltiple para la identificación de amebas de vida libre (FLA)

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	FASES
1	94	1,5 min	Desnaturalización
40	94	30 s	Desnaturalización
	62	1 min	Unión de iniciadores
	72	1 min	Extensión del producto
1	72	10 min	Extensión final

Los productos de la PCR múltiple se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Apartado II.2.3.3)

II.2.3.2. FLA-PCR

Se amplificó una región del 18S rDNA de aproximadamente 850 pb conservado en todas las amebas, mediante los iniciadores Ami6F y Ami9R, descritos por Thomas *et al.* (2006b).

Las secuencias de los iniciadores son las siguientes:

Ami6F: 5'-CCA GCT CCA ATA GCG TAT ATT-3'

Ami9R: 5'- GTT GAG TCG AAT TAA GCC GC-3'

Para la reacción de amplificación se utilizaron las siguientes concentraciones de reactivos: 5 µl de Tampón 10X (Anexo B.4), 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 1,5 µl de dNTPs a 10 mM, 1 µl de cada uno de los iniciadores a 25 µM, 1 U del enzima *Taq* polimerasa, 0,5 µl de BSA (1 mg/ml) y 3 µl de DNA molde de cada muestra en un volumen final de 50 µl. Se incluyó un control negativo en el que el DNA se reemplazó por agua ultrapura estéril, y un control positivo en el que DNA procedía de la cepa de referencia de *A. castellanii*.

La reacción de PCR se realizó adaptando las condiciones descritas por Thomas *et al.* (2006b) (Tabla 7).

Tabla 7: Condiciones de la FLA-PCR para la identificación de amebas de vida libre

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	FASES
1	94	5 min	Desnaturalización
40	94	1 min	Desnaturalización
	50	45 s	Unión de iniciadores
	72	2 min	Extensión del producto
1	72	8 min	Extensión final

Los productos de la FLA-PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Apartado II.2.3.3.) y se sometieron a secuenciación (Apartado II.2.3.4.).

II.2.3.3. ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA FLA-PCR Y LA PCR MÚLTIPLE

Para los productos de la PCR múltiple, el gel de agarosa se preparó al 2% (Anexo B.4.) en tampón TBE 1X y se sometió a 90 V durante 90 minutos en una cámara electroforética.

Para los productos de la FLA-PCR, el gel de agarosa se preparó al 1,5% (Anexo B.4.) en tampón TBE 1X y se sometió a 90V durante 90 minutos.

Ambos geles se prepararon con un 0,001% (v/v) de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EE.UU.). Al cargar cada gel se incluyó un marcador de pesos moleculares (M100-1000, Blirt, Polonia).

Finalmente, los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

II.2.3.4. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de la FLA-PCR se purificaron mediante el sistema comercial GenElute™ PCR clean-up kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), en España.

Las secuencias se visualizaron mediante el software Chromas versión 2.1.1 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) y se analizaron mediante la herramienta de análisis online BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

II.2.4. DETECCIÓN DE *H. pylori* EN FLA AISLADAS

Cuando se detectó crecimiento de FLA en las placas de NNAP de las muestras ambientales y la gran mayoría se encontraba en su forma vegetativa, trofozoito, se recogió el contenido de cada placa adicionándole PBS y utilizando un raspador de células estéril. Si las FLA se encontraban mayoritariamente en su forma de resistencia, el quiste, se adicionó PAGE a las placas de NNAP y se mantuvieron a 28°C durante 1-2 días hasta observar abundantes trofozoitos.

La solución de FLA se centrifugó a 500 g durante 3 minutos para recuperar todas las amebas y el sedimento se resuspendió en 500 µl de PBS. A continuación, se añadió una solución de hipoclorito sódico hasta una concentración final de 104 ppm, con el objetivo de matar las células de *H. pylori* que hubiera fuera de las FLA, manteniendo esta solución en aerobiosis y en oscuridad durante una hora, tal y como se describe en el capítulo anterior.

Seguidamente, esta solución se lavó tres veces con PBS, centrifugándose a 500 g durante 3 minutos para eliminar el hipoclorito sódico residual que no hubiera actuado y el sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS. Se emplearon diferentes alícuotas de esta suspensión para la detección de *H. pylori* mediante cultivo y las técnicas moleculares descritas en apartados anteriores:

- 500 µl para ser tratados con PMA, extraer el DNA y posteriormente realizar una qPCR (Apartados I.2.9.1, I.2.8.1 y I.2.8.2).
- 400 µl para el tratamiento mediante DVC-FISH (Apartado I.2.7, modificando los volúmenes: 400 µl de muestra y 3,6 ml de caldo DVC).
- 100 µl para la siembra en masa en el medio de cultivo ADent (Anexo A.1) (Apartado I.2.10, aumentando el tiempo de incubación a 37°C hasta 5-7 días).

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE (FLA)

El volumen de agua a procesar fue menor en el agua residual depurada debido a que ésta tiene una mayor carga microbiana que el agua potable. El tamaño de poro de 3 μm de las membranas utilizadas en la filtración era superior al utilizado por la mayoría de autores: 0,2 μm (Corsaro *et al.*, 2010), 0,45 μm (Bonilla-Lemus *et al.*, 2010; Mahmoudi *et al.*, 2012) 0,7 μm (García *et al.*, 2013), 1,2 μm (Pernin *et al.*, 1998) o 1,6 μm (Behniafar *et al.*, 2015). Sin embargo, Maschio *et al.* (2015a) también utilizaron membranas de 3 μm de tamaño de poro para el aislamiento de *Acanthamoeba* en agua embotellada. Se decidió usar este gran tamaño de poro porque iba a permitir eliminar una mayor cantidad de carga microbiana, que podía influir en el crecimiento de las FLA, a la vez que no iba a permitir el paso de las mismas, ya que tienen tamaños más grandes. Por ejemplo, los trofozoitos de *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris* miden 20-60 μm , 13-25 μm y 12-60 μm y sus quistes 11-30 μm , 8-20 μm y 6-30 μm respectivamente (Peralta y Ayala, 2009).

Se observó crecimiento de FLA en un 67,0% de las muestras procesadas. Concretamente se cultivaron FLA en un 79,7% de las muestras de agua residual y en un 38,7% de las muestras de agua potable (Tabla 8).

Tabla 8: Número y porcentaje de muestras de agua residual y potable con presencia de FLA

TIPO DE AGUA	MUESTRAS PROCESADAS	PRESENCIA DE FLA
	n	n (%)
Agua residual	69	55 (79,7)
Agua potable	31	12 (38,7)
TOTAL	100	67 (67,0)

La evaluación del proceso de desinfección con UV en las aguas residuales se realizó cuando, en un mismo muestreo, se pudo tomar una muestra procedente de un punto situado antes de la entrada al tratamiento terciario, el de desinfección, y otra de un punto situado después de dicho tratamiento. Concretamente, el proceso de

desinfección con UV se evaluó en 48 de las 69 muestras de agua residual procesadas, tomadas en 24 muestreos (Muestras R1-R48, Anexo C).

De los 24 muestreos, 16 fueron positivos para la presencia de FLA tanto a la entrada como a la salida del tratamiento de desinfección, lo que indica que este no fue efectivo, al menos para la presencia de amebas de vida libre. Cinco de los muestreos fueron negativos para la presencia de FLA a la entrada de tratamiento de desinfección pero positivos a la salida de este, sugiriendo la existencia de un reservorio de FLA en el tanque de tratamiento terciario, donde se realiza el tratamiento con lámparas UV. Dos de los muestreos fueron positivos para la presencia de FLA a la entrada del tratamiento de desinfección pero negativos a la salida del mismo, lo cual indica que en estos casos el tratamiento de desinfección resultó efectivo para la eliminación de FLA. Finalmente, hubo un muestreo que fue negativo para la presencia de FLA tanto a la entrada como a la salida del tratamiento de desinfección. En un estudio llevado a cabo por Magnet *et al.* (2013), se detectó *Acanthamoeba* en aguas residuales y potables tanto crudas como depuradas mediante cultivo y qPCR. Estos resultados, en concordancia con los del presente trabajo, indican que el tratamiento seguido en estas plantas no es efectivo en la eliminación de FLA. Además, en algunos casos Magnet *et al.* (2013) no detectaron *Acanthamoeba* en agua cruda pero sin embargo sí en agua depurada, lo cual también ocurre en el presente trabajo. Esto parece sugerir que la presencia de FLA en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas podría ser debido no sólo a su resistencia al tratamiento, sino también al hecho de que estas pueden sobrevivir y crecer en los diferentes conductos de las plantas, probablemente protegidas en biopelículas (Thomas y Ashbolt, 2011).

En España se han realizado varios trabajos en los que se estudió la presencia de FLA en muestras de agua. García *et al.* (2011) analizaron muestras de efluente de plantas depuradoras de agua residual y consiguieron aislar FLA del 100% de las muestras. En 2012, Magnet *et al.* realizaron un estudio sobre la caracterización molecular de *Acanthamoeba* en muestras de agua procedentes de depuradoras de agua residual. Mediante qPCR detectaron *Acanthamoeba* en el 87,5% de las muestras de agua residual tanto crudas como tratadas. En el mismo trabajo (Magnet *et al.*, 2012), los autores detectaron *Acanthamoeba* en una planta depuradora de agua

potable mediante qPCR en un 85,7% del agua cruda y en un 100% del agua tratada, demostrando también una posible contaminación durante el proceso de desinfección. Y más tarde, Magnet *et al.* (2013) llevaron a cabo un extenso estudio sobre la presencia de FLA en muestras de plantas depuradoras de agua residual y potable y localizaciones de influencia. Mediante qPCR detectaron *Acanthamoeba* en un 94,6% del global de las muestras (93,7% en agua potable, 96,5% en agua residual y 91,7% en localizaciones de influencia) e incluso en una muestra detectaron *B. mandrillaris* por primera vez en aguas.

La presencia de FLA en los efluentes de aguas residuales representa un riesgo para la salud humana, ya que algunas amebas, como *Naegleria* spp, y *Acanthamoeba* spp. son potencialmente patógenas. Concretamente, las aguas residuales depuradas de la Comunidad Valenciana se reutilizan para el riego de campos de cultivo. Esto supone que las FLA podrían estar presentes en los vegetales, como demuestran Vaerewijck *et al.* (2011). A este riesgo, por su potencial patógeno intrínseco, hay que añadir el riesgo que pueden suponer las FLA, por ser hospedadoras de posibles bacterias patógenas que sobreviven en su interior sin ser digeridas (ARB), actuando como “Caballos de Troya” (Barker y Brown, 1994). Las amebas, y concretamente los quistes de amebas, pueden ser altamente resistentes a diversos biocidas físicos y químicos, y, de este modo pueden proteger a cualquier microorganismo intracelular de condiciones ambientales adversas que normalmente los matarían (Barker *et al.*, 1992). De hecho, en algunas de las muestras analizadas se observaron claramente FLA con bacterias en su interior (Figura 45).

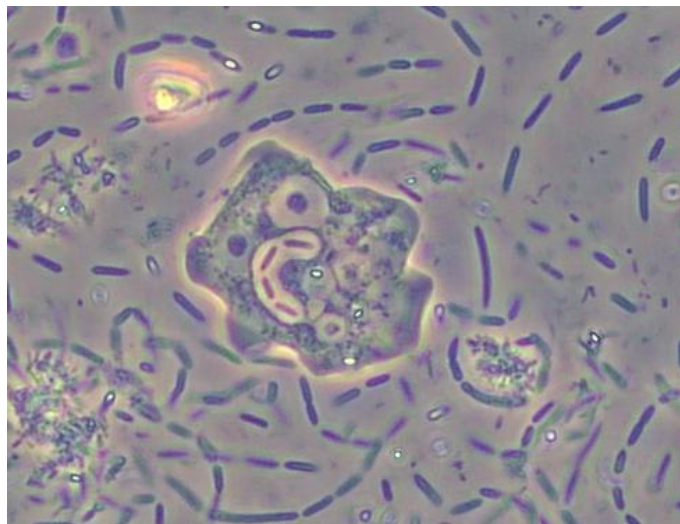


Figura 45: FLA de agua residual con bacterias intracelulares

En el presente trabajo se ha demostrado que la presencia de FLA, tanto en aguas residuales (79,7% de las muestras analizadas) como en aguas potables (38,7% de las muestras analizadas), es un hecho generalizado. Sin embargo, actualmente la calidad microbiológica del agua está todavía basada en la presencia de bacterias coliformes como indicadores de contaminación fecal, pese a que la directiva Europea sobre la calidad del agua potable (Directiva 98/83/CE) indique que el agua destinada al consumo humano no debería de contener ningún tipo de microorganismo patógeno.

En España hay una única directriz para la detección en aguas potables del protozoo patógeno *Cryptosporidium* u otros microorganismos o parásitos que no se especifican, siempre y cuando la determinación de *Clostridium perfringens* sea positiva y la autoridad sanitaria lo considere oportuno (Real Decreto de Ley 140/2003). Por otra parte, no existe una regulación específica de la presencia de protozoos en la actual directiva ambiental Europea (Directiva 86/278/CEE) para la reutilización de lodos procedentes de depuración de aguas residuales.

En este trabajo, para la purificación y posterior identificación de FLA no se siguió el método basado en la observación microscópica de las diferentes morfologías características de cada FLA y purificación mediante el corte del fragmento de agar que la contenía (Thomas *et al.*, 2008; Mahmoudi *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013), ya que estas no pueden identificarse inequívocamente por su morfología, que es cambiante, y hay muchas especies de FLA que son muy similares al observarlas con el microscopio

de contraste de fases. Además, en el fragmento de agar cortado, por muy pequeño que sea, puede haber diferentes morfotipos que no se han observado bajo el microscopio. Por esta razón se decidió utilizar un micromanipulador, mediante el cual sí era posible aislar una única FLA.

En total se aislaron para su identificación 39 amebas de vida libre, 31 de aguas residuales (A1-A31, Anexo D) y 8 de aguas potables (A32-A39, Anexo D). De estas, se consiguieron identificar 37 FLA. En primer lugar se realizó la PCR múltiple, y cuando la amplificación resultó negativa o dudosa se realizó la FLA-PCR seguida de secuenciación.

Mediante PCR múltiple se identificaron un total de 23 FLA aisladas. Se observaron algunos resultados acordes con lo descrito por Le Calvez *et al.* (2012) y otros no descritos previamente: Se detectó el fragmento de 130 pb de *Acanthamoeba*, el de 150 pb de la familia Vahlkampfiidae (entre las que se encuentran *Naegleria* y *Vahlkampfia*) y el de 50 pb perteneciente a *Echinamoeba* y/o *Vermamoeba* (Figura 46). Además, se observaron bandas que no estaban descritas por Le Calvez *et al.* (2012) (Figura 46). Esto puede ser debido a que en la PCR múltiple descrita por estos autores sólo se consideraron ciertas especies, y en cultivo puro (*Acanthamoeba castellanii*, *Naegleria lovaniensis*, *Vermamoeba vermiformis* y *Vahlkampfia inornata*) y aquí se está tratando con muestras ambientales que contienen diversas FLA, seguramente distintas a las cepas de referencia empleadas en dicho estudio. En las FLA purificadas de aguas residuales se identificó *Acanthamoeba* spp. y amebas de la familia Vahlkampfiidae. Característicamente se detectó un fragmento de 100 pb en dos de las FLA purificadas de agua residual (Carreras 3 y 4, figura 46) que no se pudo atribuir a ninguna especie de FLA. Entre las FLA purificadas de agua potable se identificaron *Acanthamoeba* spp. y *Echinamoeba* y/o *Vermamoeba*.



Figura 46: Identificación de FLA aisladas mediante PCR múltiple. **1:**A9; **2:**A10; **3:**A14; **4:**A15; **5:**A19; **6:**A20; **7:** *Acanthamoeba polyphaga*; **8:** *Acanthamoeba castellanii*; **9:** *Acanthamoeba tubiashi*; **10:** *Acanthamoeba mauritaniensis*; **11:** *Vannellidae spp.*; **12:**A21; **13:**A12; **14:**A16; **15:**A17; **16:**A18; **17:** Control- ; **M:** marcador de pesos moleculares 100 pb

Mediante FLA-PCR y su posterior secuenciación se identificaron un total de 14 FLA (números de acceso de GenBank MF399028-MF399037) (Anexo D). En agua residual se identificaron *Acanthamoeba spp.*, *A. castellanii*, *A. tubiashi*, *A. polyphaga*, *Naegleria spp.*, *Vannella spp.* y *Cercozoa spp.* En las muestras de agua potable, las FLA identificadas fueron *Acanthamoeba spp.* y *A. mauritaniensis*. Se intentó purificar un mayor número de FLA pero no fue posible ya que, o no se observó crecimiento inicial tras la purificación de una única célula con el micromanipulador, o la FLA purificada no creció tras sucesivos pases.

En algunos casos, pese a utilizar el micromanipulador para aislar una única FLA, no se consiguió un cultivo axénico de la misma, como se demuestra en las carreras 4, 5 y 6 de la figura 46, en las que aparecen varios fragmentos amplificados de igual o distinta intensidad, en función de la concentración de cada FLA.

Como era de esperar, el género *Acanthamoeba* fue el que presentó mayor abundancia entre las FLA identificadas para ambos tipos de muestras, agua residual y potable. Como ya se ha comentado antes, en dos estudios llevados a cabo en España se detectó *Acanthamoeba* mediante qPCR en un 87,5% y 94,6% de las muestras de agua analizadas, que incluían agua residual y potable (Magnet *et al.*, 2012; 2013).

Además, en el presente estudio también se ha identificado en aguas residuales *Naegleria* spp. por secuenciación y miembros de la familia Vahlkampfiidae, entre las cuales se encuentra *Naegleria*, mediante PCR múltiple. En España, García *et al.*, 2011 detectaron *Naegleria* spp. en agua residual depurada.

En las aguas potables de este estudio se han identificado *Echinamoeba* y/o *Vermamoeba*. *V. vermiformis* ya había sido previamente identificada en España en agua residual (García *et al.*, 2011), en agua con fines recreativos (Reyes-Batlle *et al.*, 2016a) e incluso en suelo (Reyes-Batlle *et al.*, 2016b). Además, Thomas *et al.* (2008) también identificaron *V. vermiformis* y *Echinamoeba exudans* en agua de río y en varias fases de depuración de una planta de tratamiento de agua potable en Francia, cuya agua de entrada es ese mismo río.

En algunos de los aislados identificados por PCR múltiple como *Acanthamoeba* spp. se observó una ligera variación en el tamaño del fragmento amplificado, si bien estas variaciones a penas se aprecian en algunos casos (Figura 47), por lo que se concluye que esta PCR múltiple no permite la diferenciación visual de especies del género *Acanthamoeba*.

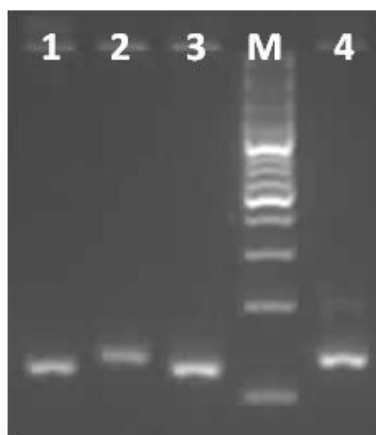


Figura 47: Resultados de la PCR múltiple de diferentes especies de *Acanthamoeba* aisladas e identificadas mediante secuenciación. **1:** *Acanthamoeba polyphaga*; **2:** *Acanthamoeba castellanii*; **3:** *Acanthamoeba tubiashi*; **4:** *Acanthamoeba mauritaniensis*; **M:** marcador de pesos moleculares 100pb

La diferencia en los tamaños amplificados de las cuatro especies de *Acanthamoeba* (*A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. tubiashi* y *A. mauritaniensis*) se comprobó *in silico*. Se seleccionaron las secuencias de cada FLA en la base de datos de secuencias GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y posteriormente estas se alinearon con la herramienta de alineamiento múltiple Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Los números de acceso de las secuencias seleccionadas para *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. tubiashi* y *A. mauritaniensis* fueron U07407, U07401, AF19065 y AY351647, respectivamente. Las secuencias del alineamiento que contienen el fragmento amplificado pueden observarse en la figura 48.

Tras el alineamiento *in silico* se confirmó que para el fragmento del 18S rDNA hay variaciones en las secuencias de las diferentes especies del género *Acanthamoeba*. Para *A. tubiashi* el tamaño amplificado en la PCR múltiple por la pareja de iniciadores Amo1400F y Amo1540R es de 128 pb, para *A. mauritaniensis* de 137 pb, para *A. castellanii* de 137 pb y para *A. polyphaga* de 133 pb. Estos resultados se corresponden con el tamaño de las bandas observadas en el gel de la figura 47.

AF019065-tubi	TCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACCA	TGCCGACCAGCGATTGGG	1469
AY351647-mau	TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACCA	TGCCGACCAGCGATTAGG	1224
U07401-cast	TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACCA	TGCCGACCAGCGATTAGG	1265
U07407-poly	TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACCA	TGCCGACCAGCGATTAGG	1270
	*****	*****	**
AF019065-tubi	AGACGTTTACACCGAGGTGGCTCGGGCGCGGTGCCCTG-----	TCGCGCAAGCG	1520
AY351647-mau	AGACGTTGAATACAAAACACCAACCATCGGCGCGGTGCTCCTTGGCGTTCGTGTTCAAGCA		1284
U07401-cast	AGACGTTGAATACAAAACACCAACCATCGGCGCGGTGCTCCTTGGCGTTCGTGTTCAAAAG		1325
U07407-poly	AGACGTTGAATACAAAACACCAACCATCGGCGCGGTGCTCCTTGGCGTTCGTGTTTCG----		1326
	*****	* * * *	* * * *
AF019065-tubi	GCAGGCGGACGCTTTTGGGCTGCTTCCAGTAAAGGATGACTCCCCAGCAGCTTGTGA		1580
AY351647-mau	CGAGCGCGAGGGCGGTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCTAGCAGCTTGTGA		1344
U07401-cast	CCAGCGCGGGGTGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCTAGCTGCTTGTGA		1385
U07407-poly	CGGCGCGGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCTAGCAGCTTGTGA		1386
	*	* * * * * * * * * *	*****

Figura 48: Alineamiento *in silico* de *A. tubiashi*, *A. mauritaniensis*, *A. castellanii* y *A.*

polyphaga. Las bases marcadas en verde se corresponden con el iniciador Amo1400F y

las bases marcadas en azul se corresponden con el iniciador Amo1540R.

Por otra parte, en la FLA-PCR también se observó una ligera variación entre diferentes aislados de amebas respecto al fragmento amplificado del 18S rDNA, lo cual indica que, pese a ser un fragmento genómico conservado, existe variación entre las diferentes FLA (Figura 49).

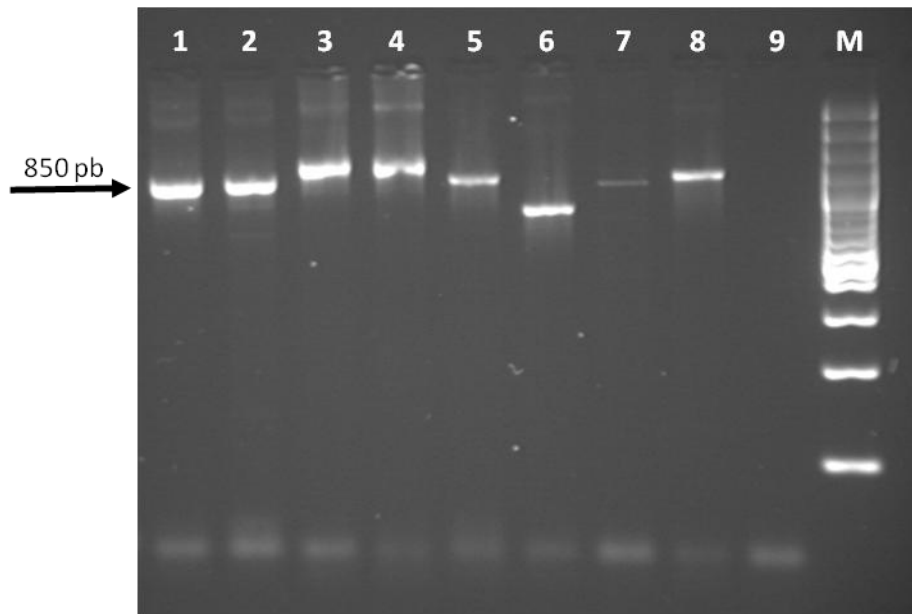


Figura 49: Resultados de la FLA-PCR de FLA aisladas. 1:A25; 2:A29; 3:A30; 4:A31; 5:A3; 6:A7; 7:A13; 8:A34; 9: Control-; M: marcador de pesos moleculares 100pb

Una muestra negativa en la PCR múltiple (carrera 6, figura 49) presentó un tamaño inferior al descrito por Thomas *et al.* (2006b) para las FLA (850 pb) en la FLA-PCR. Tras la secuenciación se comprobó que presentaba una homología del 99% con *Cercozoa* spp. y del 98% con *Rhogostoma*, que no están consideradas como FLA (Howe *et al.*, 2011), lo que explica que no fuera amplificada mediante PCR múltiple, pese a que pudo cultivarse en las condiciones para FLA. Se comprobó que su morfología no era la característica de las FLA (Figura 50) y que se asemejaba mucho al género *Rhogostoma* (Figura 51).

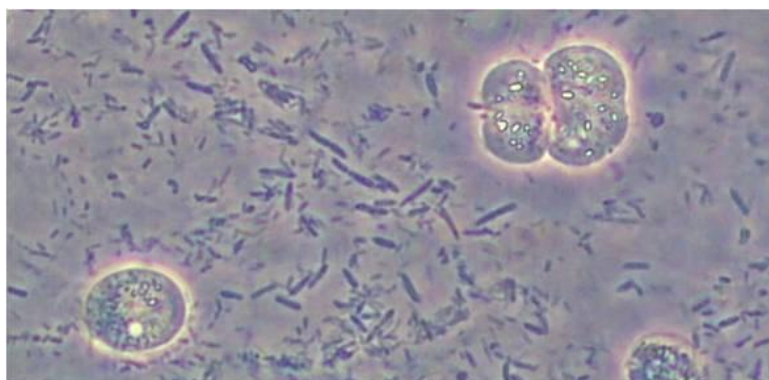


Figura 50: Fotografía en microscopio de contraste de fases (400x) de FLA aislada identificada como *Cercozoa* spp. mediante secuenciación

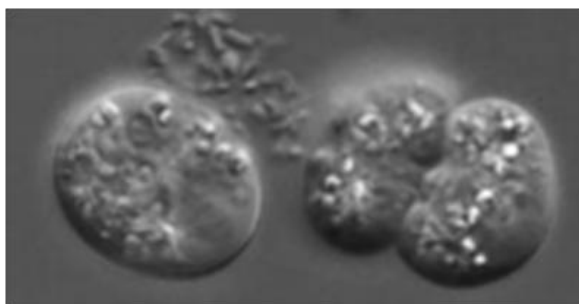


Figura 51: Fotografía de *Rhogostoma* (Howe *et al.*, 2011)

Por otra parte, es llamativa la detección en agua residual de una ameba perteneciente al género *Vannella* sp., ya que es una FLA que no es muy común en aguas. En 2003, en Virginia, EE.UU., Ettinger *et al.* (2003) identificaron visualmente *Vannella* spp. en agua de río. Más tarde, en 2011 se identificó *Vannella* spp. mediante PCR y posterior secuenciación por primera vez en biopelículas de un ambiente hospitalario en Irán (Lasjerdi *et al.*, 2011). En 2012, también en Irán, se identificó *Vannella persistens* mediante PCR y secuenciación en el 4% de las muestras de agua de ambientes recreacionales analizadas. En 2013 Buse *et al.* (2013) identificaron *Vannella* spp. en agua potable de Ohio, EE.UU., mediante amplificación y secuenciación del gen 18S rDNA. También en 2013 García *et al.* (2013) identificaron *Vannella* spp. en agua de pantano en España. Las amebas que pertenecen a este género podrían actuar como “caballo de Troya” y podrían ayudar a la proliferación de sus endosimbiontes (Scheid, 2007; Lasjerdi *et al.*, 2011). Por tanto, aunque hasta la fecha no se haya demostrado que esta FLA sea patógena, sí que puede ser portadora de bacterias que lo sean.

Tras la secuenciación, se confirmaron las morfologías presuntivas observadas previamente en los diferentes aislados: *Acanthamoeba* spp. (Figura 52), *Naegleria* spp. (Figura 53) y *Vannella* spp. (Figura 54).

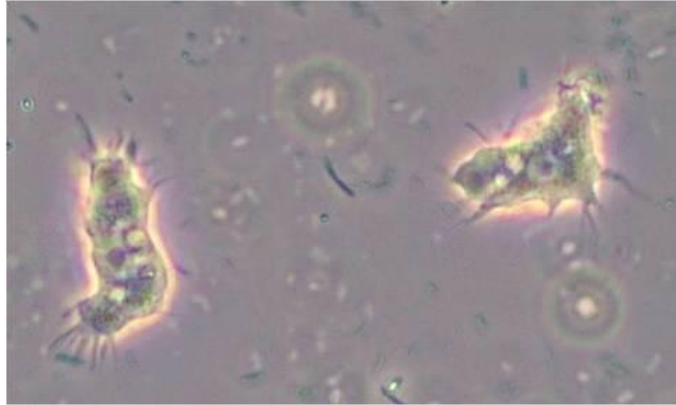


Figura 52: Fotografía en microscopio de contraste de fases (400x) de una FLA aislada identificada como *Acanthamoeba* spp. mediante secuenciación

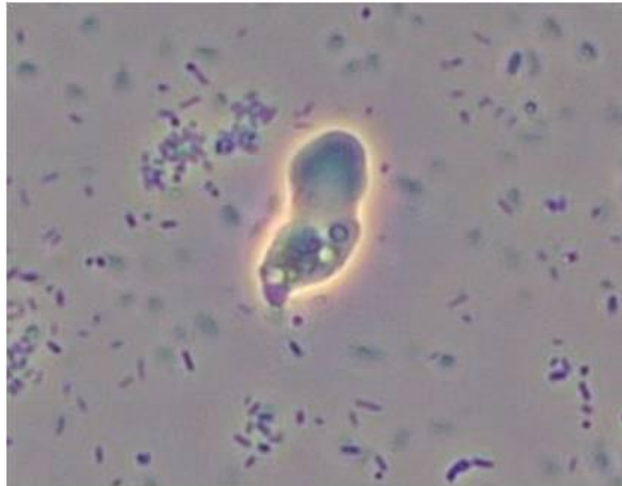


Figura 53: Fotografía en microscopio de contraste de fases (400x) de una FLA aislada identificada como *Naegleria* spp. mediante secuenciación



Figura 54: Fotografía en microscopio de contraste de fases (400x) de una FLA aislada identificada como *Vannella* sp. mediante secuenciación

II.3.2. DETECCIÓN DE *H. pylori* EN FLA AISLADAS

Solo se evaluó la presencia de *H. pylori* en aquellas muestras que resultaron positivas para el aislamiento de FLA, ya que se pretendía estudiar la presencia de esta bacteria patógena dentro de las mismas.

Otros autores ya demostraron la presencia de este patógeno en agua residual tanto después del tratamiento secundario como en el efluente, tras el tratamiento de desinfección (Moreno y Ferrús, 2012), así como en agua potable (Al-Sulami *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2015). Precisamente la detección de esta bacteria tras los tratamientos de desinfección habituales, a los que teóricamente es sensible, ha dado lugar a estudios en los que se hipotetizaba que las amebas podían ser hospedadoras de *H. pylori* y ofrecerle así protección frente a condiciones adversas (Thomas *et al.*, 2010).

Las técnicas moleculares utilizadas en este trabajo para detectar células viables de *H. pylori* ya se optimizaron en trabajos anteriores (Piqueres *et al.*, 2006; Agustí *et al.*, 2010)

El análisis mediante PMA-qPCR mostró la presencia de *H. pylori* en el interior de FLA en un 58,2% del global de las 67 muestras positivas para el aislamiento de FLA. Concretamente se detectó *H. pylori* en un 50,9% de las muestras de aguas residuales con presencia de FLA (Tabla 9), tanto después del tratamiento secundario como terciario, en concentraciones cuantificables desde $3,41 \cdot 10^1$ hasta $2,77 \cdot 10^3$ unidades genómicas por muestra. En el caso de las aguas potables, el 91,7% de las analizadas tenían *H. pylori* internalizado (Tabla 9) en concentraciones cuantificables desde $1,48 \cdot 10^1$ hasta $1,36 \cdot 10^4$ unidades genómicas por muestra. Para ambos tipos de agua algunas muestras fueron positivas pero se encontraban fuera del rango de cuantificación ($Cq > 35,00$) (Anexo C).

Tabla 9: Detección de *H. pylori* en el interior de FLA en aguas residuales y potables mediante PMA-qPCR

TIPO DE AGUA	PRESENCIA DE FLA n	<i>H. pylori</i> DENTRO DE FLA MEDIANTE PMA-QPCR n (%)
Agua residual	55	28 (50,9)
Agua potable	12	11 (91,7)
TOTAL	67	39 (58,2)

Los resultados del presente estudio (Tabla 9) evidencian que *H. pylori* se encuentra en el interior de las FLA presentes en aguas residuales y potables y que estas podrían protegerlo frente a las condiciones adversas del medio, tales como la temperatura, concentraciones de oxígeno o de cloro, entre otras.

El porcentaje de detección de *H. pylori* dentro de FLA en las aguas potables fue elevado. Hay que considerar, sin embargo, que de las 31 muestras analizadas, sólo 12, un 38,7% de las mismas, fueron positivas para la presencia de FLA (Tabla 8), y por tanto sólo fueron estas las que se analizaron para la detección de *H. pylori*. Si estos resultados son confirmados por estudios posteriores, estarían indicando que en la gran mayoría de las aguas potables con presencia de FLA se puede encontrar esta bacteria patógena. Para comprobarlo se deberían analizar un mayor número de aguas potables. Aunque la concentración de *H. pylori* en una muestra de agua potable fue mayor que las obtenidas en agua residual, el valor de cuantificación está dentro de los valores descritos por Santiago *et al.* (2015) en muestras de agua potable, en las cuales describen valores cuantificables de *H. pylori* de hasta $1,59 \cdot 10^6$ unidades genómicas por litro.

En aguas residuales el porcentaje de detección de *H. pylori* dentro de FLA fue más bajo. En este caso, de las 55 muestras positivas para la presencia de FLA (Tabla 8), se detectó *H. pylori* en 39 de ellas (58,2%).

Todas las amebas purificadas a partir de las aguas residuales en las que se detectó *H. pylori* fueron identificadas como pertenecientes al género *Acanthamoeba*, aunque no todas las FLA purificadas inicialmente pudieron ser identificadas. Mediante PCR múltiple se obtuvieron muchos resultados negativos, y se observaron morfotipos

diferentes a los del género *Acanthamoeba* en el microscopio de contraste de fases, lo que indica la probable presencia de FLA de otros géneros en este tipo de agua. Además, cuando dichos aislados se amplificaron mediante FLA-PCR y se secuenciaron, los cromatogramas de las secuencias tenían múltiples posiciones con diversas bases, indicando que había mezcla de FLA a pesar del proceso de purificación.

Las amebas purificadas de agua potable, positivas para la detección *H. pylori* se identificaron dentro de los géneros *Acanthamoeba* y *Echinamoeba* y/o *Vermamoeba*.

Los resultados obtenidos en ambos tipos de agua sugieren que las FLA pueden ser un reservorio de *H. pylori*, de acuerdo con Codony *et al.* (2012) y evidencian que las amebas pueden promover la resistencia de esta bacteria a los tratamientos de desinfección realizados en las aguas, tanto residuales como potables. Sin embargo, estos resultados sólo indican la presencia o la ausencia de *H. pylori* en el interior de las FLA, pero no demuestran su viabilidad. La mera presencia de este microorganismo en aguas no implica riesgos en la salud a menos que esté vivo, lo cual se comprobó mediante otra técnica, DVC-FISH. Al igual que en el cocultivo, el método DVC-FISH se utilizó tras el tratamiento de las muestras con hipoclorito sódico para la detección e identificación exclusiva de células viables de *H. pylori* que hubieran sido excretadas por FLA.

El análisis mediante FISH tras el tratamiento con DVC (Tabla 10) mostró la presencia de células de *H. pylori* elongadas, es decir, viables, en un 31,3% de las FLA aisladas, tanto en aguas potables (Figura 55) como en aguas residuales (Figura 56).

Tabla 10: Detección de *H. pylori* viable en el interior de FLA en aguas residuales y potables mediante DVC-FISH

TIPO DE AGUA	PRESENCIA DE FLA n	<i>H. pylori</i> VIABLE DENTRO DE FLA MEDIANTE DVC-FISH n (%)
Agua residual	55	16 (29,1)
Agua potable	12	5 (41,7)
TOTAL	67	21 (31,3)

El porcentaje de resultados positivos en aguas residuales (29,1%) fue más bajo que en aguas potables (41,7%). Sin embargo, debido a que es la primera vez que se detectan células viables de *H. pylori* en el interior de FLA, los resultados obtenidos en este trabajo no pueden compararse con otros para determinar si el número de muestras positivas por este método, DVC-FISH, es similar al de otros trabajos.

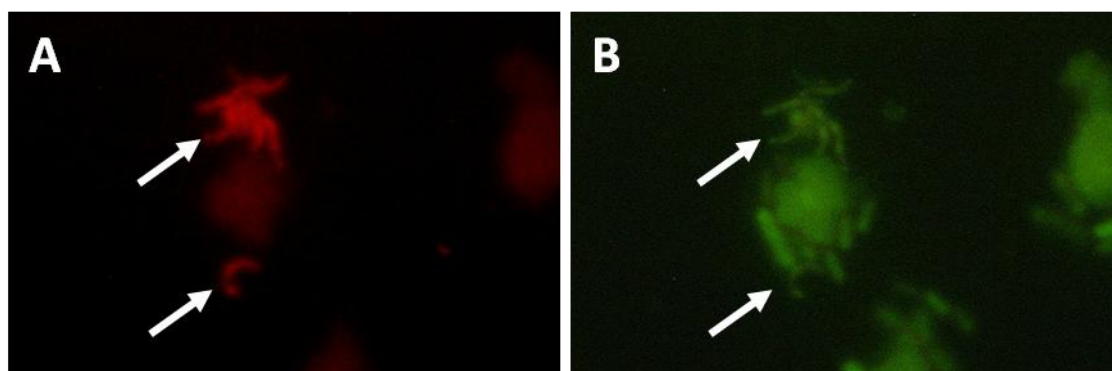


Figura 55: Identificación de *H. pylori* viable después de la incubación en el medio DVC en una muestra de agua potable. (A) Hibridación con la sonda HPY-LNA. (B) Hibridación con la sonda EUB-338. 100X

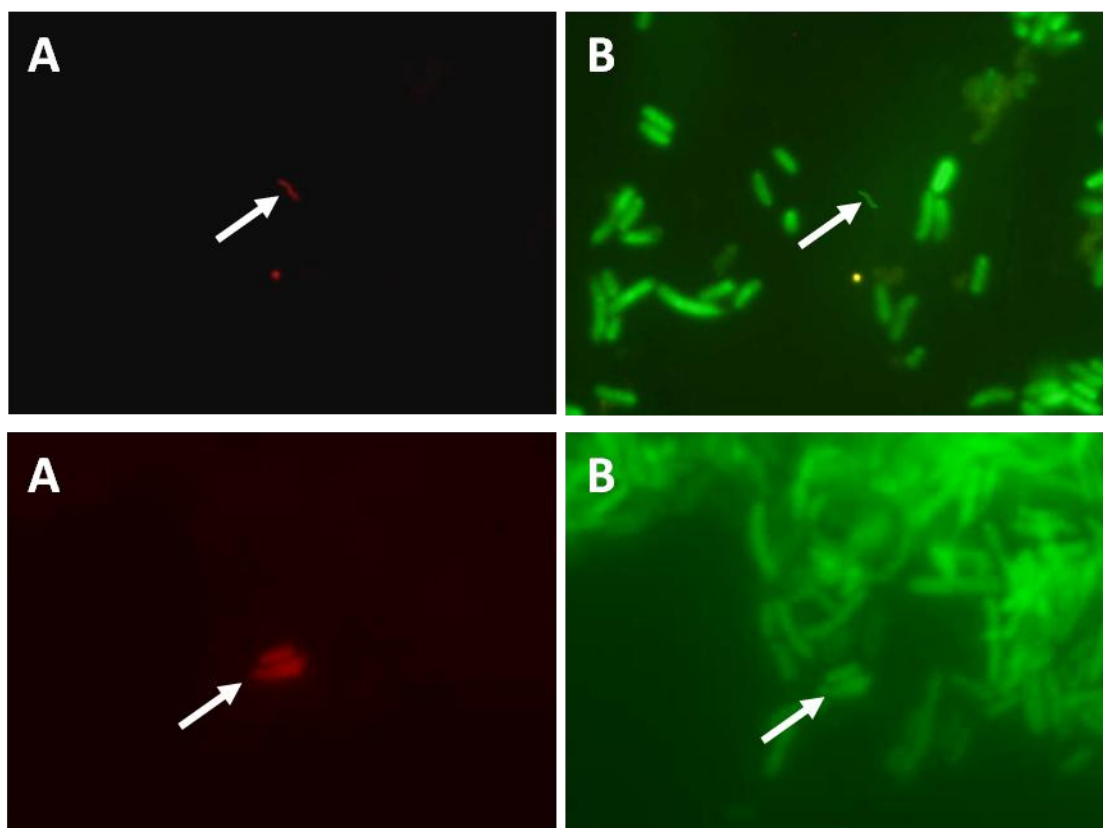


Figura 56: Identificación de *H. pylori* viable después de la incubación en el medio DVC en una muestra de agua residual. (A) Hibridación con la sonda HPY-LNA. (B) Hibridación con la sonda EUB-338. 100X

Los resultados positivos para las técnicas combinadas PMA-qPCR y DVC-FISH en aguas potables y residuales (Tablas 9 y 10) es la primera evidencia de que no sólo *H. pylori* es capaz de introducirse en el interior de FLA y conseguir evadir los mecanismos de fagocitosis de las mismas, sino que, además, es capaz de sobrevivir largos periodos de tiempo en aerobiosis en un medio de cultivo desfavorable y continuar siendo viable. Para ambos tipos de agua, el porcentaje de resultados positivos de la técnica DVC-FISH fue más bajo que el obtenido mediante PMA-qPCR. Esta diferencia de resultados está dentro de lo normal, ya que el PMA únicamente impide la amplificación del DNA procedente de las células de *H. pylori* externas a las FLA e inactivadas por el tratamiento de desinfección, pero no permite distinguir entre las células internalizadas viables y no viables, ya que este agente no penetra en el interior de las FLA. Por tanto, las diferencias entre los resultados de DVC-FISH y PMA-qPCR es probable que se deban a la presencia de células muertas, no viables, en el interior de algunas FLA, cuyo DNA sí que podría ser amplificado mediante qPCR.

Pese al tratamiento de desinfección con hipoclorito sódico, se observaron bacterias distintas a *H. pylori* tras la incubación DVC (Figuras 55 y 56). Esto puede ser debido a que estas bacterias estuvieran en el interior de las FLA o a que sean resistentes al tratamiento de desinfección realizado. Como era esperable, siempre se observó una mayor cantidad de bacterias en las muestras de aguas residuales que en las de aguas potables.

Para recuperar las posibles formas cultivables de *H. pylori* presentes en el interior de las FLA se realizó un cultivo en Agar selectivo Dent, durante 5-7 días, para que las FLA pudieran excretar la bacteria (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). En un estudio *in vitro* de predación de *Salmonella* y *A. polyphaga* se comprobó que las amebas excretaban las bacterias entre 2 y 4 horas tras internalización (Gaze *et al.*, 2003). Sin embargo, los periodos de egestión podrían depender de las condiciones ambientales, de las especies de FLA y de las especies de bacteria excretadas. Además, *H. pylori* es un microorganismo de crecimiento lento. Esta es la razón por la que los cultivos fueron mantenidos bajo las condiciones óptimas de cultivo para *H. pylori* hasta 7 días, para que así las bacterias pudieran ser excretadas y crecer en el medio de cultivo.

Cuando aparecieron colonias sospechosas, estas se identificaron mediante qPCR específica de *H. pylori* (Apartado 1.2.8). Los resultados fueron positivos para 10 muestras de agua residual (18,2%) (Tabla 11, figura 57), que también habían resultado positivas para *H. pylori* dentro de FLA mediante qPCR o DVC-FISH (Anexo C).

Tabla 11: Cultivo de *H. pylori* del interior de FLA en aguas residuales y potables

TIPO DE AGUA	PRESENCIA DE FLA n	CULTIVO DE <i>H. pylori</i> N (%)
Agua residual	55	10 (18,2)
Agua potable	12	0 (0,0)
TOTAL	67	10 (14,9)

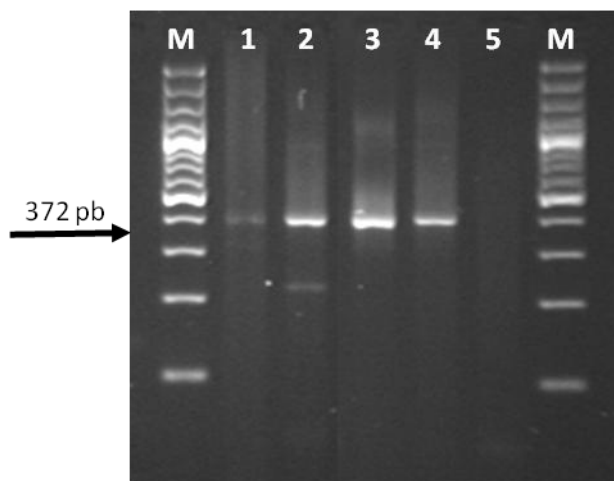


Figura 57: Resultados de la qPCR para la identificación de *H. pylori* en placa en muestras ambientales. **1:**R15; **2:**R25; **3:** R41; **4:** Control +; **5:** Control - ; **M:** marcador de pesos moleculares 100pb

El haber obtenido colonias de *H. pylori* en algunas muestras tras el tratamiento de hipoclorito sódico demuestra que estas contienen células de *H. pylori* cultivables, y, por tanto potencialmente infectivas, lo que podría considerarse como uno de los resultados más relevantes de este trabajo.

El hecho de que no se hayan obtenido más resultados positivos para el crecimiento de *H. pylori* procedente del interior de FLA en placa sugiere que el microorganismo adquiere la forma VBNC, ya que por DVC-FISH sí se ha demostrado en este trabajo la viabilidad de la bacteria tras soportar condiciones desfavorables durante un largo periodo de tiempo y superar el tratamiento de desinfección, dentro de las FLA.

Tras haberse detectado la presencia de células viables de *H. pylori* pero no cultivables en la mayoría de los casos, de acuerdo con Codony *et al.* (2012), se propone que las amebas podrían ser unos buenos indicadores para señalar la presencia de microorganismos patógenos resistentes al proceso de digestión de las mismas.

El que no se hayan recuperado formas cultivables en ninguna de las tres réplicas del cocultivo (Capítulo I) y sí en muestras de agua ambientales sugiere que sería necesario un mayor tiempo de contacto de *A. castellanii* y *H. pylori* antes de realizar el tratamiento con hipoclorito sódico. También podría ser que algunas especies de FLA,

diferentes de *A. castellanii*, que es con la que se realizó el cocultivo, sean las que promuevan en mayor medida la replicación y/o el mantenimiento de *H. pylori* viable durante más tiempo o en mejores condiciones que otras FLA.

La detección de formas viables no cultivables de *H. pylori* no demuestra su infectividad. Sería necesario realizar estudios de infección *in vivo* para comprobarlo. Boehnke *et al.* (2015) contaminaron agua de bebida para ratones con diferentes concentraciones de *H. pylori* y observaron que *H. pylori* era capaz de infectar a los ratones, demostrando además que el agua en este caso había sido el vehículo de transmisión de la infección. Sin embargo, más tarde Boehnke *et al.* (2017) contaminaron agua de bebida para ratones con formas VBNC de *H. pylori* y, en este caso, no consiguieron que ningún ratón fuera infectado.

A pesar de que sí que se ha comprobado en este y otros estudios (Alves de Matos *et al.*, 2012) que *H. pylori* se localiza en el interior de las amebas con pocos signos de degradación, la metodología utilizada en este trabajo no permite afirmar que *H. pylori* sea capaz de multiplicarse en el interior de la amebas, como ocurre con otros patógenos como *Legionella* y *Listeria* (Akya *et al.*, 2009b; Dupuy *et al.*, 2011).

Este trabajo es el primero que demuestra que *H. pylori* puede sobrevivir dentro de FLA en muestras de agua ambientales, incluyendo agua potables y residual, incluso después de un tratamiento de desinfección. Otros autores han demostrado que *H. pylori* en cocultivo con *Acanthamoeba* spp. puede mantenerse viable durante 8 semanas (Winiiecka-Krusnell *et al.*, 2002), lo que indica que las amebas parecen favorecer la supervivencia de este patógeno. Los resultados obtenidos apoyan firmemente la hipótesis de que las FLA pueden actuar como Caballos de Troya para *H. pylori*, jugando un papel en la transmisión de *H. pylori* a los seres humanos a través del consumo de agua.

II.4. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

ARTÍCULOS:

- Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J.L., Ferrús, M.A. 2017. Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain. *Environ Microbiol*, 19: 4103-4112.

CONGRESOS:

- Moreno-Mesonero, L., Ferrús, M.A., Santiago, P., Moreno, Y. 2014. Identification of *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in water supplies. XXVIIth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. Roma, Italia. 11-13 Septiembre 2014.
- Moreno-Mesonero, L., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Moreno, Y. 2015. Free-living amoebae in water sources by PCR and sequencing in Spain. VII European Congress of Protistology. Sevilla, España. 5-10 Septiembre 2015.
- Moreno-Mesonero, L., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Moreno, Y. 2015. DVC-FISH technique to confirm Free-living amoebae as reservoirs of viable *Helicobacter pylori* in drinking water. XXVIIIth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer. Nicosia, Chipre. 24-26 Septiembre 2015
- Moreno-Mesonero, L., Santiago, P., Hortelano, I., Moreno, Y., Ferrús, M.A. 2017. Presence of *Helicobacter pylori* in treated wastewater intended for irrigation. Congreso Young Water Professionals Spain. Bilbao, España. 16-18 Noviembre 2017.

CAPÍTULO III

Detección de *H. pylori* dentro de FLA en muestras
de alimentos

III.1. OBJETIVO

En el capítulo anterior ya se ha demostrado que hay FLA en aguas residuales y potables que contienen en su interior células de *H. pylori* viables que han evadido los tratamientos de depuración y cloración.

En la actualidad existen estudios que demuestran que *H. pylori* puede transmitirse a través de alimentos. Sin embargo únicamente unos pocos han demostrado la presencia de la bacteria en alimentos en su estado viable.

En el área geográfica del Este de España el agua residual es reutilizada, tras un proceso de depuración, para riego agrícola. De esta manera, si existen microorganismos patógenos en estas aguas, podrían contaminar los vegetales de consumo. Esta hipótesis es de especial preocupación cuando se considera que muchos de estos vegetales se consumen crudos y, en algunos casos, sin una desinfección o lavado adecuados.

Por esta razón el objetivo general de este capítulo es:

Aislar e identificar FLA en muestras de lechuga, así como determinar la presencia de células de *H. pylori* viables procedentes del interior de FLA en dichas muestras, mediante las técnicas moleculares empleadas en los capítulos anteriores.

Para conseguirlo, se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar *Acanthamoeba* spp. y *Vermamoeba vermiformis* en muestras de lechuga adquiridas en comercios locales
2. Detectar, mediante la técnica qPCR, células de *H. pylori* procedentes del interior de las FLA presentes en las muestras de lechuga
3. Detectar, mediante la técnica DVC-FISH, células viables de *H. pylori* procedentes del interior de las FLA presentes en las muestras de lechuga
4. Detectar células cultivables de *H. pylori* procedentes del interior de las FLA presentes en las muestras de lechuga

III.2. MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1. ORIGEN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE ALIMENTOS

Se analizaron un total de 20 muestras de alimentos, concretamente de lechugas de variedad romana. Todas las muestras se adquirieron en comercios locales y se procesaron en menos de 2 horas tras la compra.

Para ello, se pesaron 10 gramos de las hojas exteriores de las lechugas, que se homogeneizaron en Stomacher (Mayo Homogenius HG 400, Brasil) durante 1 minuto a máxima velocidad con 90 ml de PAGE (Anexo A.2). El homogeneizado se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa estéril de 3 µm (Scharlab, España). Seguidamente la membrana se transfirió asépticamente a una placa de NNAP (Anexo A.1) de forma que todo lo retenido por la misma estuviera en contacto con el agar. Pasadas 24 horas, se retiró la membrana.

La incubación de las placas de NNAP se realizó a 28°C hasta un máximo de 30 días en aerobiosis. Durante este tiempo se comprobó periódicamente si había crecimiento de FLA mediante la observación directa de las placas usando tanto un microscopio invertido como un microscopio de contraste de fases.

Cuando se detectó crecimiento de FLA en las placas, se procedió a la recogida del contenido de las mismas para su identificación (Apartado III.2.3) y para la detección de *H. pylori* procedente del interior de las FLA (Apartado III.2.2).

El esquema del procesado de las muestras de alimentos se encuentra detallado en la figura 58.

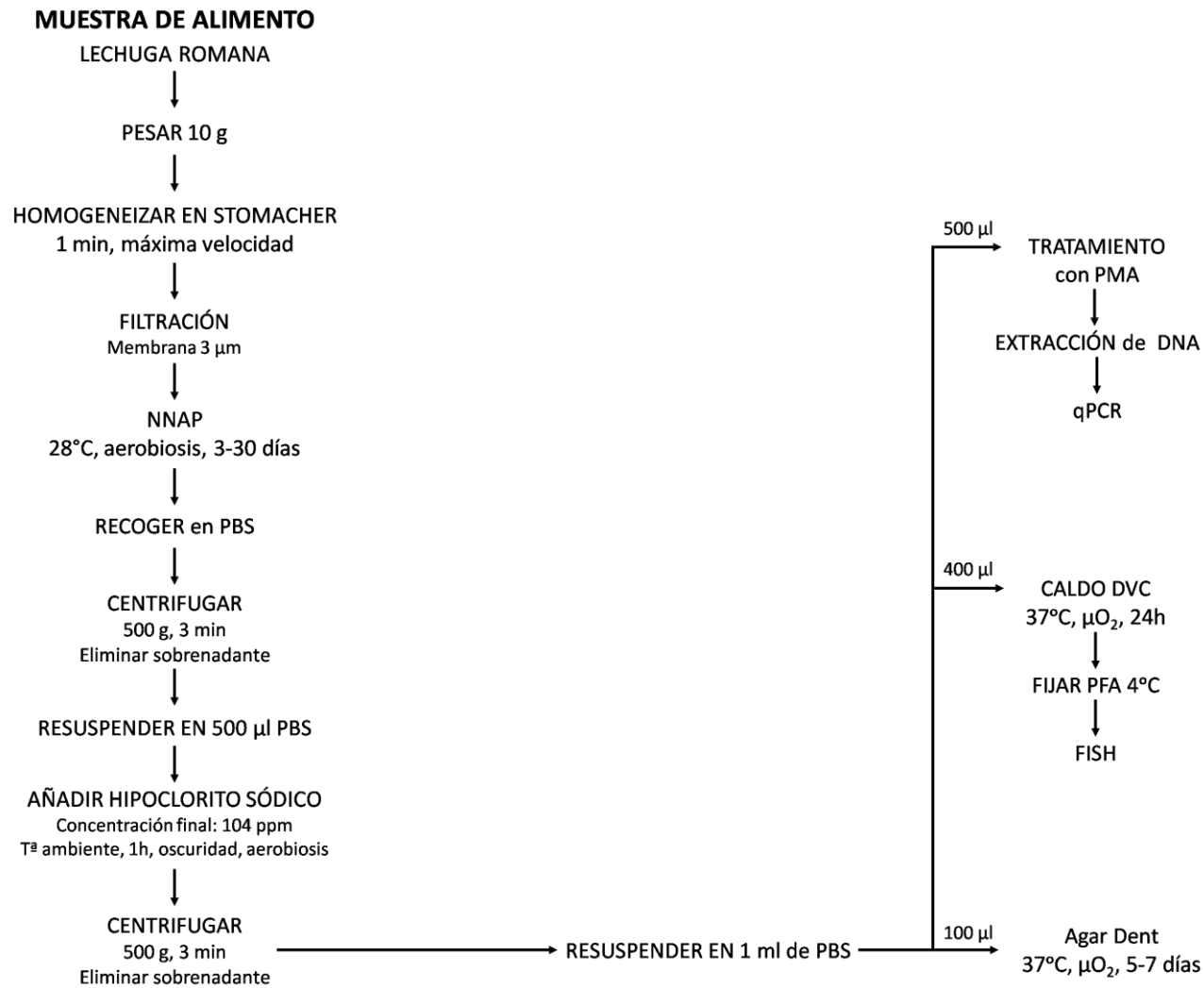


Figura 58: Protocolo de aislamiento e identificación de amebas de vida libre en lechugas y de detección de *Helicobacter pylori* procedente del interior de amebas de vida libre en lechugas mediante técnicas moleculares y de cultivo

III.2.2. DETECCIÓN DE *H. pylori* EN FLA AISLADAS

Cuando se detectó crecimiento de FLA en las placas de NNAP de las muestras de lechuga y la gran mayoría se encontraba en su forma vegetativa, trofozoito, se recogió el contenido de cada placa en un microtubo mediante la adición de PBS (Anexo B.2) utilizando un raspador de células estéril. Si las FLA se encontraban mayoritariamente en su forma de resistencia, quiste, se adicionó PAGE a las placas de NNAP y se mantuvieron a 28°C durante 1-2 días hasta observar mayoritariamente trofozoitos.

La solución de FLA se centrifugó a 500 g durante 3 minutos para recuperar todas las amebas y el sedimento se resuspendió en 500 µl de PBS. A continuación, se añadió una solución de hipoclorito sódico hasta una concentración final de 104 ppm con el objetivo de matar las células de *H. pylori* que hubiera fuera de las FLA, manteniendo esta solución en aerobiosis y en oscuridad durante una hora, tal y como se describe en el capítulo I (Figura 59). Seguidamente, esta solución se lavó tres veces, centrifugando a 500 g durante 3 minutos, para eliminar el hipoclorito sódico residual que no hubiera actuado y el sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS.

Finalmente, se emplearon diferentes alícuotas para la detección de *H. pylori* mediante cultivo y las técnicas moleculares descritas en apartados anteriores:

- 500 µl para ser tratados con PMA (Apartado I.2.9.1), extraer el DNA (Apartado I.2.8.1) y posteriormente realizar una qPCR (Apartado I.2.8.2).
- 400 µl para el tratamiento mediante DVC-FISH (Apartado I.2.7, modificando los volúmenes: 400 µl de muestra y 3,6 ml de caldo DVC).
- 100 µl para la siembra en masa en el medio de cultivo ADent (Anexo A.1) (Apartado I.2.10, aumentando el tiempo de incubación a 37°C a 5-7 días).

III.2.3. IDENTIFICACIÓN DE *Acanthamoeba* spp. Y *Vermamoeba vermiformis*

Tanto *Acanthamoeba* spp. (Apartado III.2.3.1) como *V. vermiformis* (Apartado III.2.3.2) se identificaron mediante qPCR, a partir del DNA extraído después del tratamiento con PMA.

III.2.3.1. IDENTIFICACIÓN DE *Acanthamoeba* spp. MEDIANTE qPCR

Se utilizó el par de iniciadores AcantF900 y AcantR1100 para la amplificación de un fragmento del gen 18S rDNA de aproximadamente 180 pb (diferiendo en unas cuantas bases dependiendo de la especie de *Acanthamoeba*) y la sonda TaqMan AcantP1000 para su detección, según Qvarnstrom *et al.* (2006).

Las secuencias nucleotídicas de los iniciadores y de la sonda TaqMan son las siguientes:

AcantF900: 5'-CCC AGA TCG TTT ACC GTG AA-3'

AcantR1100: 5'-TAA ATA TTA ATG CCC CCA ACT ATC C-3'

AcantP1000: 5'-Cy5-CT GCC ACC GAA TAC ATT AGC ATG G-BHQ3-3'

La reacción de qPCR se realizó en el sistema LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, España), empleando el sistema comercial LightCycler® TaqMan® Master (Roche Applied Science, España).

Las reacciones de qPCR se realizaron adaptando las condiciones de Qvarnstrom *et al.* (2006). Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, que contenía 4 µl de LightCycler® TaqMan® Master Reaction mix (Roche Applied Science, España), 0,8 µl de cada primer (10 µM), 0,4 µl de la sonda (10 µM), 0,4 µl de BSA (1 mg/ml) y 3 µl de DNA. Se incluyó un control negativo en el que el DNA se reemplazó por agua ultrapura estéril y un control positivo en el que el DNA procedía del DNA sintético usado para hacer la curva patrón.

La mezcla de reacción se sometió a las condiciones mostradas en la tabla 12.

Tabla 12: Condiciones de qPCR para la identificación de *Acanthamoeba* spp.

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	RAMPA DE Tª (°C/s)	FASES
40	95	10 min	20	Desnaturalización
	95	10 s	20	Desnaturalización
	63	8 s	20	Unión de iniciadores
	72	7 s	20	Extensión del producto
1	40	30 s	20	Enfriamiento

Para poder llevar a cabo la cuantificación de la concentración de células de *Acanthamoeba* spp. se realizó una curva patrón con DNA sintético (Integrated DNA Technologies, Inc (IDT), IA, EE.UU.) del amplicón de 180 pb. A fin de determinar la secuencia nucleotídica del amplicón se obtuvieron diferentes secuencias del gen 18S rDNA de *A. castellanii* de la base de datos de secuencias GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), que se alinearon mediante la herramienta de alineamiento múltiple Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Figura 59).

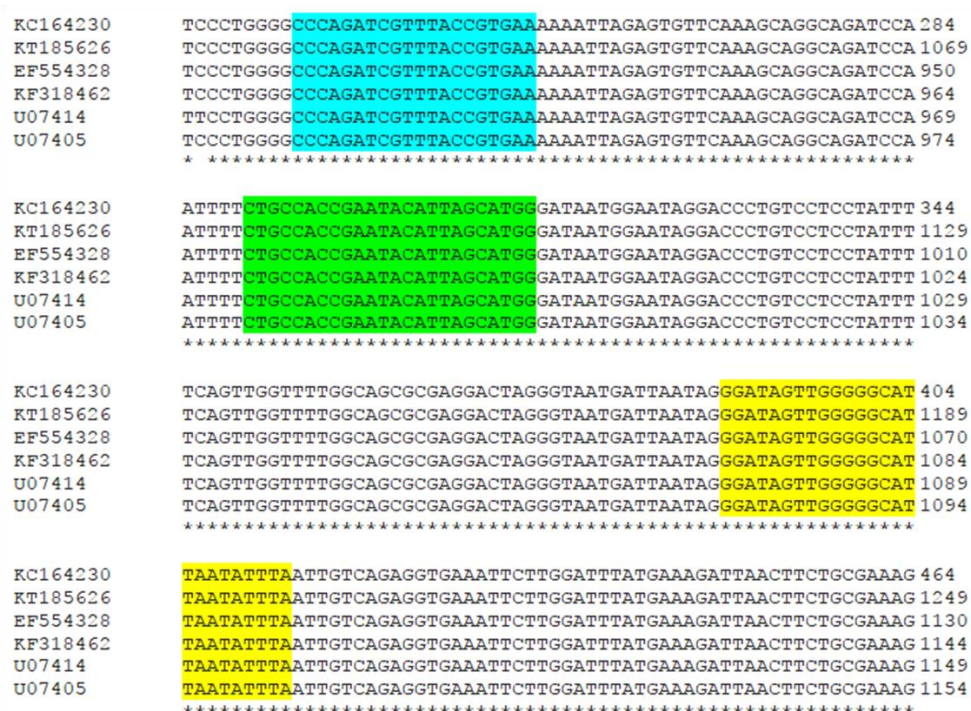


Figura 59: Alineamiento *in silico* de diferentes secuencias de *A. castellanii*. Las bases marcadas en azul se corresponden con el iniciador AcantF900, las bases marcadas en amarillo se corresponden con el iniciador AcantR1100 y las bases marcadas en verde se corresponden con la sonda TaqMan AcantP1000.

Para poder establecer una relación entre la concentración del DNA sintético y la concentración del número de células de *Acanthamoeba* spp. en una muestra se ha de construir una curva patrón. Para ello, se debe conocer que *Acanthamoeba* tiene aproximadamente 600 copias del gen 18S rDNA (Yang *et al.*, 1994). Sabiendo además que cada base tiene una masa de $1,096 \cdot 10^{-21}$ g/pb, el amplicón de 180 pb tendrá una masa de $1,973 \cdot 10^{-19}$ g, por lo que las 600 copias de cada ameba tendrán una masa de $1,184 \cdot 10^{-16}$ g, es decir, $1,184 \cdot 10^{-1}$ fg. Teniendo en cuenta que por cada reacción de qPCR se añaden 3 μ l de DNA, la concentración de DNA sintético que se corresponde con 1 ameba es $3,946 \cdot 10^{-2}$ fg/ μ l. De forma análoga se fueron construyendo los demás puntos de la curva patrón, los cuales se encuentran resumidos en la tabla 13. Se generó un stock de DNA sintético de $3,946 \cdot 10^5$ fg/ μ l a partir del cual se realizaron diluciones seriadas con las que se construyó la curva patrón.

Tabla 13: Cálculo de la concentración de DNA del fragmento sintético de *A. castellanii* para la curva patrón de la qPCR de *Acanthamoeba* spp.

Nº AMEBAS	[DNA] TOTAL (fg)	μ l DNA/REACCIÓN	[DNA] PARA qPCR (fg/ μ l)
1 000 000	$1,184 \cdot 10^5$		$3,946 \cdot 10^4$
100 000	$1,184 \cdot 10^4$		$3,946 \cdot 10^3$
10 000	$1,184 \cdot 10^3$		$3,946 \cdot 10^2$
1 000	$1,184 \cdot 10^2$	3 μ l	$3,946 \cdot 10^1$
100	$1,184 \cdot 10^1$		$3,946 \cdot 10^0$
10	$1,184 \cdot 10^0$		$3,946 \cdot 10^{-1}$
1	$1,184 \cdot 10^{-1}$		$3,946 \cdot 10^{-2}$

Una vez hecho el ensayo con las diferentes concentraciones de DNA sintético se obtuvo la curva patrón (Figura 60). En esta, el logaritmo de la concentración de las muestras patrón se enfrenta a los ciclos de cuantificación (Cq), cuyo valor es inversamente proporcional a la concentración de DNA. La inclinación de la curva patrón indica la rapidez con la que la concentración de DNA amplificado aumenta con los ciclos de amplificación. Una reacción de amplificación teóricamente perfecta tendría una eficiencia de “2”. Sin embargo, en la práctica, las reacciones suelen tener

una menor eficiencia. En concreto en la curva patrón obtenida para la identificación de *Acanthamoeba* spp. se obtuvo una eficiencia de 1,86.

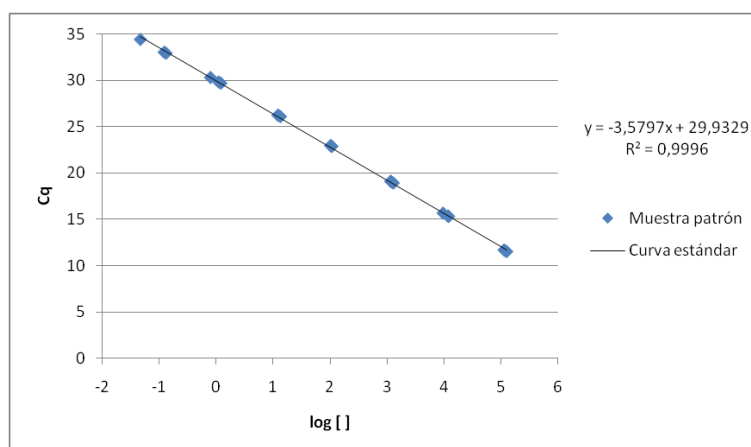


Figura 60: Curva patrón para la identificación de *Acanthamoeba* spp.

III.2.3.2. IDENTIFICACIÓN DE *V. vermiformis* MEDIANTE qPCR

Se seleccionó una región del gen 18S rDNA para la identificación de *V. vermiformis*. Concretamente se amplificó un fragmento de 502 pb mediante los iniciadores Hv1227F y Hv1728R descritos por Kuiper *et al.*, 2006.

Las secuencias nucleotídicas de los iniciadores son las siguientes:

Hv1227F: 5'-TTA CGA GGT CAG GAC ACT GT-3'

Hv1728R: 5'-GAC CAT CCG GAG TTC TCG-3'

Se utilizó el sistema LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, España), empleando el sistema comercial LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, España).

Las reacciones de qPCR se realizaron según Kuiper *et al.* (2006). Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, que contenía 2 µl de LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, España), 0,4 µl de cada primer (10 µM), 2,4 µl de MgCl₂, 2 µl de BSA (4 mg/ml) y 4 µl de DNA. Se incluyó un control negativo en el que el DNA se reemplazó por agua ultrapura estéril y

un control positivo en el que el DNA procedía del DNA usado para hacer la curva patrón.

La mezcla de reacción se sometió a las condiciones mostradas en la tabla 14.

Tabla 14: Condiciones de qPCR para la identificación de *V. vermiformis*

Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	RAMPA DE Tª (°C/S)	FASES
1	95	10 min	20	Desnaturalización
45	95	10 s	20	Desnaturalización
	56	10 s	20	Unión de iniciadores
	72	25 s	20	Extensión del producto
1	95	0 s	20	Curva fusión
	65	15 s	20	
	95	0 s	0,1	
1	40	30 s	20	Enfriamiento

La temperatura de fusión (T_m) característica de los fragmentos amplificados de *V. vermiformis* es de 88,3±0,6 °C (Kuiper *et al.*, 2006).

Finalmente se recogió el producto de cada muestra de la qPCR para ser analizado mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para poder llevar a cabo la cuantificación de las células de *V. vermiformis* se realizó una curva patrón con DNA de *V. vermiformis* amplificado (Dobrowsky *et al.*, 2016) según las condiciones anteriormente descritas (Tabla 14). El amplicón resultante se purificó de un gel de agarosa mediante el kit illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido) y se midió su concentración con Qubit® dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, CA, EE.UU) empleando el fluorímetro Qubit® 2.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA. EE.UU)

Para poder establecer una relación entre la concentración del DNA amplificado y la concentración del número de células de *V. vermiformis* se ha de construir una curva patrón. Para ello, se debe conocer que *V. vermiformis* tiene 1330 ± 127 copias del gen 18S rRNA. Sabiendo además que cada base tiene una masa de 1,096·10⁻²¹ g/pb, el amplicón de 502 pb tendrá una masa de 5,502·10⁻¹⁹ g, por lo que las 1330 copias de cada ameba tendrán una masa de 7,318·10⁻¹⁶ g, es decir, 7,318·10⁻¹ fg. Teniendo en

cuenta que por cada reacción de qPCR se añaden 4 μl de DNA, la concentración de DNA sintético que se corresponde con 1 ameba es $1,829 \cdot 10^{-1} \text{ fg}/\mu\text{l}$. De forma análoga se fueron construyendo los demás puntos de la curva patrón, los cuales se encuentran resumidos en la tabla 15. Se generó un stock de DNA de $1,829 \cdot 10^5 \text{ fg}/\mu\text{l}$ a partir del cual se realizaron diluciones seriadas con las que se construyó la curva patrón.

Tabla 15: Cálculo de la concentración de DNA del fragmento amplificado de *V. vermiformis* para la curva patrón de su qPCR

N° AMEBAS	[DNA] TOTAL (fg)	μl DNA/REACCIÓN	[DNA] PARA qPCR (fg/ μl)
1 000 000	$7.319 \cdot 10^5$		$1.829 \cdot 10^5$
100 000	$7.319 \cdot 10^4$		$1.829 \cdot 10^4$
10 000	$7.319 \cdot 10^3$		$1.829 \cdot 10^3$
1 000	$7.319 \cdot 10^2$	4 μl	$1.829 \cdot 10^2$
100	$7.319 \cdot 10^1$		$1.829 \cdot 10^1$
10	$7.319 \cdot 10^0$		$1.829 \cdot 10^0$
1	$7.319 \cdot 10^{-1}$		$1.829 \cdot 10^{-1}$

Una vez hecho el ensayo con las diferentes concentraciones de DNA se obtuvo la curva patrón, cuya eficiencia fue de 1,79.

El producto de la qPCR de *V. vermiformis* se analizó mediante gel de agarosa al 1% (Anexo B.4) en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) al que se le adicionó un 0,001% de GelRed™ Nucleic Acid Gen Stain (Biotium, CA, EE.UU.), y un marcador de pesos moleculares (M100-1000, Blirt, Polonia), sometido a 90 V durante 90 minutos.

Finalmente los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE AMEBAS DE VIDA LIBRE (FLA)

El método de procesado empleado en este trabajo permitió analizar los 10 gramos de muestra seleccionados ya que, después de homogeneizarlos en el Stomacher, todo el volumen pudo filtrarse a través de una membrana apta para el aislamiento de FLA. Sin embargo, otros autores utilizan generalmente menor cantidad de muestra para el procesado de vegetales. Vaerewijck *et al.* (2011), después de homogeneizar durante 1 minuto una hoja de lechuga con nueve veces el volumen de PAGE en Stomacher, sólo utilizaron 1 ml del homogeneizado para el aislamiento de protozoos de vida libre, entre los que se encuentran las FLA. Chavatte *et al.* (2016) también homogeneizaron en Stomacher 10 gramos de brotes de vegetales, esta vez durante 2 minutos, en 90 ml de PAGE y de igual forma sólo emplearon 1 ml del homogeneizado para el aislamiento de protozoos de vida libre. Vaerewijck *et al.* (2011), además, procesaron hojas de lechuga de una en una en 50 ml de PAGE y las agitaron en un agitador a 350 rpm durante 5 minutos. En este caso el aislamiento de protozoos de vida libre lo realizaron a partir de 30 ml de PAGE, por lo que tampoco emplearon la totalidad del volumen homogeneizado. Por otra parte, Gourabathini *et al.* (2008) lavaron hojas de lechuga y espinaca con una solución salina para posteriormente transferir alícuotas de la misma a placas NNAP para el aislamiento de FLA.

En el presente trabajo se observó crecimiento de FLA de diversos morfotipos en las placas de NNAP en el 100% de las muestras de lechuga procesadas (Tabla 16).

Tabla 16: Número y porcentaje de muestras de lechuga con presencia de FLA

MUESTRAS PROCESADAS	PRESENCIA DE FLA
n	n (%)
20	20 (100,0)

En la actualidad existen muy pocos estudios en los que se analice la presencia de protozoos, y más concretamente de FLA, en muestras de vegetales. Vaerewijck *et al.* (2011) estudiaron la existencia y diversidad de protozoos de vida libre en muestras de lechuga. La identificación la realizaron mediante observación al microscopio de fluorescencia y secuenciación de los fragmentos del gen 18S rRNA separados mediante electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE). Coincidiendo con el presente estudio, todos los cultivos fueron positivos para la presencia de protozoos de vida libre tras una semana de incubación. Mediante observación microscópica presuntamente identificaron las FLA *Vannella simplex*, *V. vermiformis*, *Vahlkampfia* sp. y *Saccamoeba* sp. Sin embargo, mediante secuenciación de los amplicones del gen 18S rRNA sometidos a DGGE no se identificó ninguna FLA, lo que los autores atribuyen a que las FLA rara vez son identificadas mediante métodos moleculares por razones que son todavía desconocidas pero que podrían deberse a problemas con la extracción de DNA y/o a artefactos de PCR (Berney *et al.*, 2004; Epstein y López-García, 2008).

Gourabathini *et al.* (2008) estudiaron la prevalencia de protozoos en espinacas y lechugas para examinar su interacción con *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. La única especie de FLA que aislaron fue *Acanthamoeba palestinensis* a partir de una muestra de lechuga. En este tipo de muestras no encontraron gran variedad de protozoos directamente después de los lavados de las hojas. La aparente falta de diversidad podría ser explicada por el hecho de que las hojas más externas de las lechugas son eliminadas al ser cosechadas. Sin embargo, cuando estas muestras se enriquecieron, los investigadores observaron una mayor diversidad de protozoos, entre los cuales se observaban FLA, lo cual indicaría que estaban presentes en concentraciones por debajo del límite de detección. Además, como las FLA tienden a adherirse fuertemente a las superficies, es muy probable que estuvieran infrarrepresentadas en los lavados de las hojas, lo cual indica que sería mejor emplear un método de homogenización más vigoroso para el aislamiento de FLA como el uso de Stomacher, empleado en el presente estudio.

III.3.2. IDENTIFICACIÓN DE *Acanthamoeba* spp. Y *V. vermiformis*

Las respectivas qPCRs específicas para la identificación de *Acanthamoeba* spp. y *V. vermiformis* mostraron la presencia de cada una de las FLA en un 60% de las muestras para ambos casos (Tabla 17; Anexo C).

Tabla 17: Detección de *Acanthamoeba* spp. y *V. vermiformis* en lechugas mediante qPCRs específicas

PRESENCIA DE FLA	<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>V. vermiformis</i>
n	n (%)	n (%)
20	12 (60,0)	12 (60,0)

Acanthamoeba spp. se encontró en las muestras en concentraciones cuantificables desde 13,6 hasta 231,1 amebas en los 10 g de muestra analizados, con un valor promedio de 63,9 células de *Acanthamoeba* spp. por muestra. Por su parte, las concentraciones de *V. vermiformis* variaron entre 5,8 y 10.675 amebas por muestra, con un valor promedio de 2185,5 células de *V. vermiformis* por muestra.

Debido al escaso número de trabajos que investigan la presencia de FLA en vegetales y a la inexistencia de valores de cuantificación de FLA en este tipo de muestras, los valores de cuantificación de *Acanthamoeba* spp. y *V. vermiformis* obtenidos en este trabajo no pueden ser debidamente contrastados. De todas formas, debido a que la cuantificación de ambas FLA en estas muestras no se hizo inmediatamente después de realizar la concentración de las mismas, sino que hubo un periodo de incubación, o enriquecimiento, los valores obtenidos se consideran como una cuantificación relativa. Es decir, se pueden emplear para la comparación de los niveles de cada FLA en las muestras, pudiendo así determinar qué muestras estaban más o menos contaminadas con *Acanthamoeba* spp y/o *V. vermiformis*, pero no se pueden emplear para determinar la concentración de dichas FLA en los 10 gramos de las hojas de las lechugas procesadas.

En el estudio llevado a cabo por Vaerewijck *et al.* (2011) los autores identificaron microscópicamente *V. vermiformis* en muestras de lechuga, pero, sin embargo, no detectaron ninguna especie de *Acanthamoeba*, lo cual contrasta con el presente trabajo y con el estudio de Napolitano y Colletti-Eggolt (1984), quienes determinaron

este género como el más frecuente en muestras de lechuga. También Rude *et al.* (1984) identificaron las especies *A. polyphaga*, *A. rhysondes* y *A. castellanii* como las FLA más comúnmente aisladas a partir de muestras de vegetales frescos. Además, Chavatte *et al.* (2016) estudiaron la presencia de protozoos de vida libre en brotes de ocho vegetales distintos, los cuales fueron identificados morfológicamente. Las FLA más abundantemente identificadas fueron tanto *Acanthamoeba* spp. como *Vannella* spp., aunque también identificaron *Vermamoeba* spp. En cuatro de los ocho vegetales analizados detectaron la presencia de FLA en el 100% de las muestras, lo cual está en concordancia con los resultados del presente trabajo (Tabla 16). En el resto de vegetales detectaron la presencia de FLA en porcentajes muy variados (94%, 75%, 50% y 13%), dependiendo del tipo de muestra.

Por otra parte, Hsueh y Gibson (2015) demostraron en un ensayo *in vitro* que dos especies de *Acanthamoeba*, *A. castellanii* y *A. polyphaga*, asociadas o no con norovirus murino (MNV-1), pueden transferirse a vegetales tales como espinacas, col rizada y tomates cherry a través del agua. Sin embargo, su transferencia a dichos vegetales a través de superficies de contacto es mucho más limitada. Vaerewijck *et al.* (2010) concluyeron que también ocurría el proceso contrario, es decir, que las FLA pueden transferirse desde los alimentos en los que están presentes a superficies, concretamente a neveras, donde se guardan los vegetales hasta ser consumidos. Los autores llegaron a esta conclusión después de analizar y detectar distintos protozoos en neveras domésticas, siendo los cajones para las verduras los que mostraban con mayor frecuencia la presencia de protozoos, presentando además la mayor diversidad de los mismos. Las FLA que se identificaron en estas neveras fueron *Acanthamoeba* spp, *Vermamoeba* spp., *Vannella* sp. y *Vahlkampfia enterica* mediante observación morfológica y *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *V. vermiformis* mediante métodos moleculares.

III.3.3. DETECCIÓN DE *H. pylori* EN FLA AISLADAS

La presencia de *H. pylori* procedente del interior de FLA se evaluó en todas las muestras de lechuga procesadas, ya que todas resultaron positivas para el aislamiento de FLA (Tabla 16).

Las técnicas moleculares empleadas, PMA-qPCR y DVC-FISH fueron las mismas que se aplicaron en el cocultivo entre *H. pylori* y *A. castellanii* y en muestras de agua (Capítulos I y II).

Se detectó *H. pylori* procedente del interior de las FLA aisladas en el 55% de las muestras de lechuga mediante PMA-qPCR después del proceso de desinfección con hipoclorito sódico. Mediante DVC-FISH, se pudo detectar *H. pylori* viable procedente del interior de las FLA presentes en lechugas en el 25 % de las muestras (Figura 61). Sin embargo, no se obtuvieron cultivos positivos de *H. pylori* a partir de ninguna de las muestras (Tabla 18).

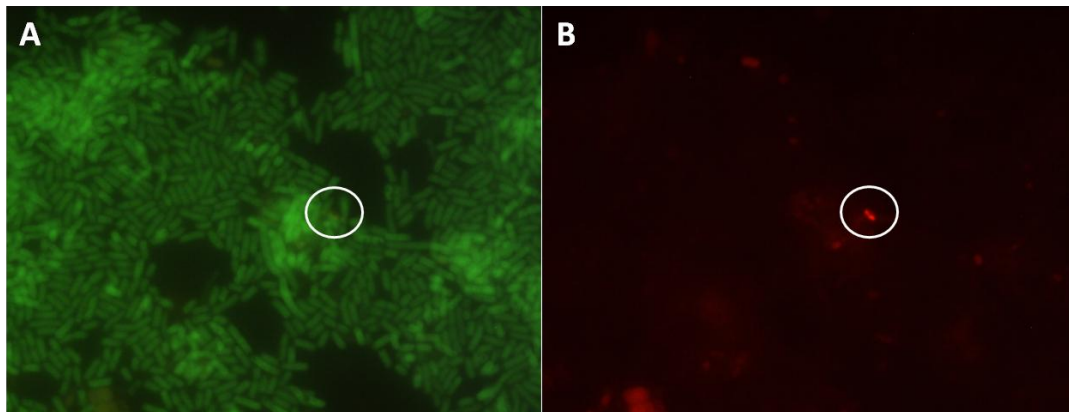


Figura 61: Visualización bajo el microscopio de epifluorescencia de una muestra de lechuga (A: Hibridación con la sonda EUB-338. B: Hibridación con la sonda HPY-LNA). 100X

Tabla 18: Detección de *H. pylori* en el interior de FLA mediante técnicas moleculares y de cultivo

PRESENCIA DE FLA n	<i>H. pylori</i> DENTRO DE FLA MEDIANTE PMA-qPCR n (%)	<i>H. pylori</i> VIABLE DENTRO DE FLA MEDIANTE DVC-FISH n (%)
20	11 (55,0)	5 (25,0)

Mediante PMA-qPCR se detectó *H. pylori* en concentraciones cuantificables desde $8,00 \cdot 10^1$ hasta $5,48 \cdot 10^3$ unidades genómicas en las FLA presentes en los 10 gramos de lechuga procesados. Dos de las muestras positivas para *H. pylori* procedente del interior de FLA no se pudieron cuantificar, ya que estaban fuera del rango de cuantificación ($Cq > 35,00$).

La viabilidad de *H. pylori* procedente del interior de FLA pudo confirmarse mediante DVC-FISH en un porcentaje inferior de las muestras con respecto al valor obtenido mediante PMA-qPCR, lo cual coincide con los resultados obtenidos en las muestras de agua del capítulo II. Esto podría deberse a que no todas las células de *H. pylori* internalizadas son viables.

Pese a haber detectado células viables de *H. pylori* mediante DVC-FISH, no se obtuvo ninguna colonia de la bacteria en ninguna de las muestras, lo cual puede deberse a la gran cantidad de microbiota acompañante presente en estas muestras, cuyo crecimiento no se ve inhibido en los medios selectivos, o bien a que *H. pylori* se encuentre en una forma VBNC, o a ambos (Figura 62).

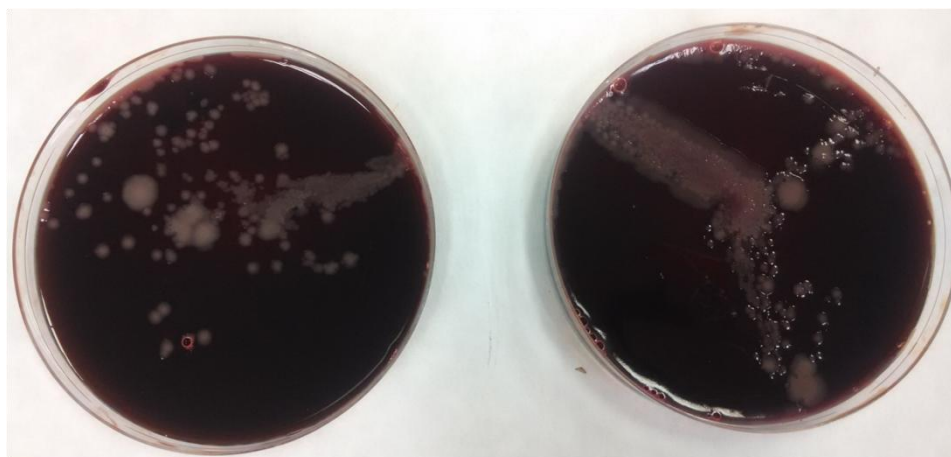


Figura 62: Crecimiento bacteriano sobre placas de Agar Dent en muestras de lechuga tras el tratamiento de desinfección del cultivo de FLA

Según los resultados obtenidos acerca de la presencia de *Acanthamoeba*, *V. vermiformis* y *H. pylori* en las muestras de lechugas analizadas (Anexo C) se puede observar que la presencia de uno no está ligada a la de otro. Hay muestras con presencia de una de las dos especies de FLA, otras con ambas, otras con la presencia

exclusiva de *H. pylori* y otras con la presencia de una de las FLA y *H. pylori*. Por tanto, sería interesante abordar un estudio para la identificación de otras FLA, además de *Acanthamoeba* spp. y *V. vermiformis*, que pudieran albergar *H. pylori*.

Este trabajo evidencia que, en muestras de lechuga, *H. pylori* es capaz de encontrarse en el interior de FLA y evadir sus mecanismos de fagocitosis. Además, la bacteria es capaz de sobrevivir largos periodos de tiempo en aerobiosis y seguir siendo viable, al estar protegidas dentro de FLA.

Este es el primer trabajo que estudia la presencia de una bacteria patógena en el interior de FLA en muestras de vegetales. Específicamente se demuestra que formas viables de la bacteria patógena *H. pylori* pueden ser albergadas dentro de FLA en lechugas. Por tanto, al igual que en las muestras de agua del capítulo II, estos resultados apoyan la hipótesis de que las FLA podrían jugar un papel importante en la transmisión de *H. pylori* a los seres humanos a través del consumo de vegetales que se consumen crudos y, en algunos casos, sin una desinfección o lavado adecuados.

Los resultados obtenidos en este trabajo dan veracidad a la hipótesis de Hsueh y Gibson (2015), quienes plantearon que, teniendo en cuenta la presencia generalizada de FLA, y más concretamente de *Acanthamoeba* spp., en el medio ambiente y su establecida relación con patógenos de origen alimentario, es posible que amebas del género *Acanthamoeba* que albergan en su interior patógenos pudieran entrar en las cadenas de suministro de productos frescos en el punto de la producción, cosecha o procesado, por lo que una correcta desinfección capaz de eliminar estos organismos es fundamental para asegurar la completa eliminación de las bacterias patógenas internalizadas.

III.4. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

ARTÍCULOS:

- Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Ferrús, M.A. 2018-2019. Free-living amoebae as reservoirs of viable *H. pylori* in vegetable samples. En fase de redacción.

CAPÍTULO IV

Microbioma de FLA procedentes de muestras de
agua y alimentos

IV.1. OBJETIVO

Un gran número de trabajos han estudiado la concurrencia de ciertas bacterias, sobre todo patógenas, con la presencia de FLA en gran diversidad de ambientes. Sin embargo, son muy escasos los estudios sobre la totalidad de bacterias asociadas a FLA o el microbioma de las FLA en ciertos tipos de muestras.

Para ello se requiere el uso de herramientas moleculares capaces de detectar la totalidad, o al menos gran parte, de las bacterias asociadas a FLA o intracelulares de estas. Esta herramienta es la metagenómica de secuenciación dirigida, la cual se ha empleado para determinar la composición microbiana de una gran diversidad de muestras de orígenes distintos.

En los capítulos II y III se han estudiado muestras de agua y lechugas con el objetivo de detectar células viables de *H. pylori* como parte del microbioma de las FLA, pero no se conoce qué otras bacterias pueden estar presentes.

Por tanto, el objetivo general de este capítulo es:

Determinar el microbioma de las FLA aisladas a partir de aguas residuales, aguas potables y lechugas mediante el uso de metagenómica de secuenciación dirigida.

Para conseguirlo, se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar y evaluar iniciadores para la amplificación de bacterias asociadas a FLA
2. Determinar el microbioma de las FLA presentes en muestras de agua residual
3. Determinar el microbioma de las FLA presentes en muestras de agua potable
4. Determinar el microbioma de las FLA presentes en muestras de lechugas

IV.2. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.2.1. EVALUACIÓN DE INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A FLA

Tras el estudio de la bibliografía disponible se seleccionaron los iniciadores 341F y 802R, que amplifican las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rRNA de bacterias asociadas a FLA (Tabla 19).

Tabla 19: Secuencias de los iniciadores 341F y 802R

INICIADOR	SECUENCIA (5'-3')	REFERENCIA
341F	CCT ACG GGN GGC WGC AG	Herlemann <i>et al.</i> (2011)
802R	TAC NVG GGT ATC TAA TCC	RDP: http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp

Se comprobó la especificidad y la cobertura taxonómica de los iniciadores *in silico* mediante la herramienta TestPrime (<https://www.arb-silva.de/search/testprime/>) usando la base de datos SILVA SSU r132 y la colección de secuencias RefNR permitiendo 0 y 1 mismatches (bases no complementarias) en la unión de los iniciadores (Klindworth *et al.*, 2013).

Una vez comprobada la especificidad, se construyó una comunidad artificial de bacterias con las especies bacterianas especificadas en la tabla 20 para comprobar la especificidad de los iniciadores *in vitro*.

Tabla 20: Bacterias incluidas en la comunidad artificial

MICROORGANISMO	CEPA	ORIGEN
<i>Arcobacter cibarius</i>		Aislado ambiental
<i>Arcobacter skirrowii</i>	51132	ATCC
<i>Campylobacter jejuni</i>	33560	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	25922	ATCC
<i>Helicobacter pullorum</i>	12824	NCTC
<i>Helicobacter pylori</i>	11637	NCTC
<i>Helicobacter pylori</i>		Aislado ambiental

Para ello, las cepas de *H. pylori*, *H. pullorum* y *C. jejuni* fueron sembradas en el medio de cultivo ASC (Anexo A.1) e incubadas a 37 °C en condiciones de microaerofilia

(5% O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂) durante 48 horas. Las cepas de *Arcobacter* fueron sembradas en el medio de cultivo agar sangre e incubadas durante 48 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis. Por último, la cepa de *E. coli* fue sembrada en el medio de cultivo Plate Count (Anexo A.1) e incubada durante 48 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis

Una vez obtenidos los cultivos, se recogió una concentración celular de cada uno de ellos mediante un asa de siembra, la cual se resuspendió en PBS. Posteriormente, se extrajo el DNA de cada una de las cepas siguiendo el protocolo de bacterias gram negativas del kit de extracción GeneJET™ Genomic DNA Purification kit (ThermoScientific, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo el DNA en un volumen final de 50 µl.

Una vez extraído el DNA, se midió la concentración del mismo mediante el kit Qubit® dsDNA HS Assay (Invitrogen, CA, USA) y el fluorímetro Qubit® 2.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la construcción de la comunidad artificial de bacterias se inocularon 1,5 ng del DNA de cada una de ellas.

Esta misma comunidad artificial de bacterias se inoculó en una muestra de DNA (en proporción 1:1) extraído de un cultivo de FLA a partir de un agua residual procesada en este trabajo (muestra R22, capítulo II) con el objetivo de comprobar el efecto de los posibles inhibidores de la misma.

Por tanto, para la evaluación de los iniciadores, se amplificaron y secuenciaron tres muestras: la comunidad artificial de bacterias, la muestra de FLA de agua residual y la mezcla de la comunidad artificial de bacterias con la muestra de FLA.

IV.2.1.1. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La secuenciación de las muestras se realizó en la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq del servicio de secuenciación y bioinformática de la Fundación para el Fomento de la Investigación Biomédica, FISABIO (Valencia, España). El proceso de construcción de las librerías de amplicones de DNA también fue llevado a cabo en FISABIO. Estas librerías se generaron empleando los iniciadores 341F y 802R, siguiendo

las instrucciones descritas en la guía de preparación de las librerías de DNA para secuenciar mediante metagenómica en el secuenciador Illumina MiSeq (Amplicon P.C.R., 2013). La secuenciación se llevó a cabo siguiendo el protocolo *paired-end* (2 x 300 pb).

Una vez obtenidas las secuencias brutas, estas se procesaron bioinformáticamente mediante la plataforma de acceso libre QIIME 1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010) aplicando comandos adicionales disponibles en la máquina virtual Microbiome Helper (Comeau *et al.*, 2017). En primer lugar, las secuencias *forward* y *reverse* se unieron mediante PEAR v0.9.19 (Zhang *et al.*, 2014). La herramienta FastQC se empleó para confirmar que las secuencias habían sido unidas correctamente (Andrews, 2010). Posteriormente, las secuencias unidas se filtraron por longitud y calidad empleando FASTX-Toolkit v0.0.14: se eliminaron las secuencias de menos de 200 pb y con valor mínimo de calidad Q30 en al menos el 90 % de las mismas (Gordon, 2009), lo cual se comprobó empleando de nuevo la herramienta FastQC (Andrews, 2010). Las secuencias potencialmente quiméricas también fueron eliminadas usando VSEARCH v1.11.1 (Rognes *et al.*, 2016). Las secuencias restantes fueron procesadas mediante el comando *open reference* de QIIME, aplicando los métodos SortMeRNA v2.0 (Kopylova *et al.*, 2012) y SUMACLUST v1.0.00 (Mercier *et al.*, 2013) para los pasos de agrupamiento en OTUs basados en una referencia y *de novo*, respectivamente. Las OTUs se definieron al 97 % de similitud de secuencia, empleando la base de datos SILVA r132 (Quast *et al.*, 2013).

IV.2.2. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A FLA EN MUESTRAS AMBIENTALES

Una vez evaluados los iniciadores para la identificación de bacterias asociadas a FLA en muestras inoculadas, se pasó a emplearlos en muestras ambientales.

Se analizaron un total de 20 muestras ambientales: 11 de agua residual, 3 de agua potable y, por último, 6 de lechugas. Todas estas muestras ya habían sido procesadas y analizadas para la identificación de *H. pylori* dentro de FLA en este trabajo. El protocolo de procesado de las muestras de agua y vegetales puede

encontrarse en los capítulos II y III. De forma breve, en todos los casos, después de concentrar las muestras, observar FLA, recoger el contenido de las placas que las contenían, añadir hipoclorito sódico y realizar el tratamiento con PMA, se extrajo el DNA de las mismas, el cual fue el empleado para determinar las bacterias asociadas a FLA mediante metagenómica de secuenciación dirigida.

A partir de este DNA, se generaron las librerías de amplicones, empleando los iniciadores 341F y 802R, las cuales fueron secuenciadas en el secuenciador Illumina MiSeq, tal y como se especifica en el apartado IV.2.1.1. Una vez obtenidas las secuencias crudas, estas se procesaron bioinformáticamente siguiendo la línea de comandos también especificada en dicho apartado.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1. EVALUACIÓN DE INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A FLA

Los estudios de las comunidades microbianas permiten conocer en profundidad la diversidad de los ecosistemas e incluso llegar a entender procesos microbiológicos complejos (Vanwonterghem *et al.*, 2014). En los últimos años ha habido un gran incremento en el uso de estrategias de metagenómica de secuenciación dirigida para determinar la diversidad microbiana de diversos ambientes (Caporaso *et al.*, 2012; Bhattacharjee *et al.*, 2017; Gad, 2017). Uno de los pasos más críticos para llevar a cabo un buen análisis de amplicones del gen rRNA es la elección de los iniciadores (Klindworth *et al.*, 2013).

En este trabajo se seleccionó una pareja de iniciadores procedentes de fuentes bibliográficas distintas (Tabla 19). Dado que no habían sido empleados conjuntamente en ningún trabajo previo, se analizó su cobertura *in silico* mediante el programa TestPrime. Cuando no se permitió ningún mismatch en la unión de iniciadores, la cobertura del reino Bacteria fue del 88,2 %, la del reino Archaea del 0,6 % y la del reino Eukarya del 0,0 %. Cuando se permitió 1 mismatch en el análisis, las coberturas de los reinos Bacteria y Archaea aumentaron a 95,0 % y 67,0 %, respectivamente. Específicamente, la cobertura del género *Helicobacter* fue del 95,8 % cuando no se permitieron mismatches y aumentó a 97,4 % cuando se permitió 1 mismatch. En la tabla 21 pueden observarse los porcentajes de cobertura de los iniciadores 341F y 802R para distintas bacterias.

Tabla 21: Cobertura de los iniciadores 341F y 802R para distintas bacterias

MICROORGANISMO	COBERTURA	
	0 mismatch	1 mismatch
	%	%
<i>Aeromonas</i> sp.	86,8	93,0
<i>Arcobacter</i> sp.	93,5	96,3
<i>Burkholderia</i> sp.	94,2	96,7
<i>Campylobacter</i> sp.	96,1	98,1
<i>Escherichia coli</i>	90,6	94,6
<i>Francisella</i> sp.	96,8	98,9
<i>Helicobacter</i> sp.	95,8	97,4
<i>Klebsiella</i> sp.	96,0	97,6
<i>Legionella</i> sp.	92,7	96,1
<i>Mycobacterium</i> sp.	93,3	97,0
<i>Pseudomonas</i> sp.	91,9	95,0
<i>Salmonella</i> sp.	98,6	99,4
<i>Vibrio</i> sp.	93,0	95,8
<i>Yersinia</i> sp.	96,8	98,1

Como puede observarse, los iniciadores 341F y 802R son capaces de detectar *in silico* diferentes especies bacterianas, incluyendo aquellas de importancia para la salud pública, lo cual es ventajoso para determinar las bacterias asociadas a FLA en muestras ambientales, en las que la diversidad bacteriana es muy elevada.

Para comprobar *in vitro* que efectivamente los iniciadores escogidos eran capaces de detectar gran diversidad de bacterias, se construyó una comunidad artificial de bacterias con DNA de aquellas que interesaba ineludiblemente detectar posteriormente en muestras ambientales. Además, esta comunidad artificial de bacterias se inoculó en el DNA de una muestra de agua residual que había sido empleada para la detección de *H. pylori* procedente del interior de FLA y que había resultado positiva mediante qPCR, es decir, *H. pylori* estaba internalizado en las FLA de esa muestra.

Una vez secuenciadas las muestras, se obtuvieron un total de 159.717 secuencias. Tras filtrarlas por calidad y eliminar las quimeras quedaron un total de 138.766 secuencias, las cuales se agruparon en 303 OTUs o unidades taxonómicas. La

calidad de las mismas se comprobó mediante la herramienta FastQC, a través de la cual se verificó que todas tenían valores de calidad por encima de Q30, lo cual se considera como secuencias de alta calidad (Figura 63).

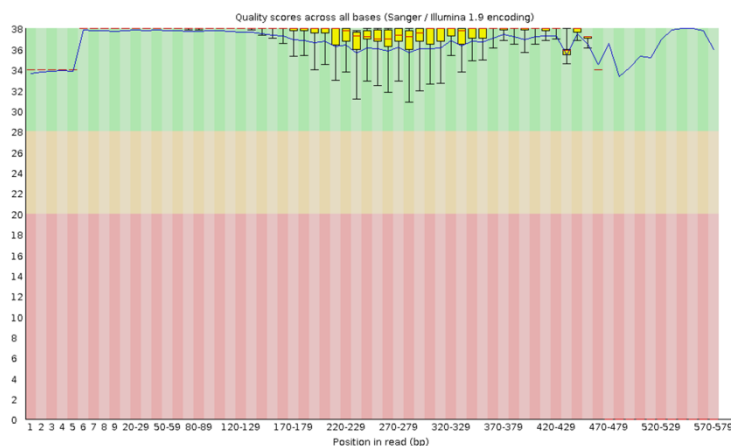


Figura 63: Ejemplo de calidad de las secuencias por base en una muestra

Los filos bacterianos más abundantes de la comunidad artificial generada fueron Epsilonbacteraeota, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (Figura 64). Dentro de Epsilonbacteraeota encontramos los géneros *Arcobacter*, *Campylobacter* y *Helicobacter*, dentro de Proteobacteria el género *Escherichia*, dentro de Firmicutes el género *Lactobacillus* y dentro de Bacteroidetes el género *Pedobacter*. Estos dos últimos géneros bacterianos posiblemente se hayan detectado en la muestra artificial debido a una contaminación del DNA, o a una mala asignación taxonómica.

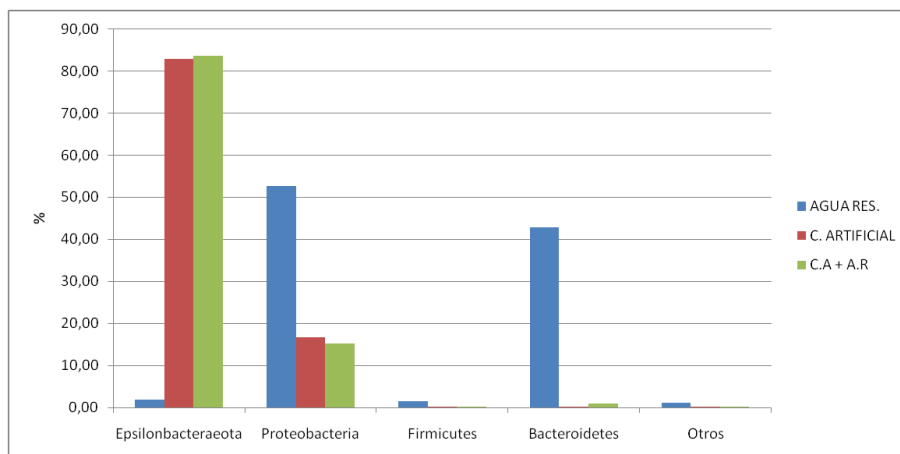


Figura 64: Distribución de los filos bacterianos más abundantes en la muestra artificial

Hasta hace relativamente poco, bacterias de los géneros *Campylobacter*, *Arcobacter* o *Helicobacter* estaban clasificadas dentro del Filo Proteobacteria y la clase Epsilonproteobacteria. Mientras que esta clase constituye un grupo monofilético estable dentro del árbol bacteriano, diversos estudios sugieren que no se afilian de una forma reproducible con otras Proteobacteria, sugiriéndose así que se necesita una revisión taxonómica a nivel de Phylum (Wu *et al.*, 2009; Di Rienzi *et al.*, 2013; McLean *et al.*, 2013; Rinke *et al.*, 2013; Zhang y Sievert, 2014; Hug *et al.*, 2016; Yeoh *et al.*, 2016). De hecho, Waite *et al.* (2017) proponen reclasificar Epsilonproteobacteria y Desulfurellales como un nuevo filo, Epsilonbacteraeota, junto con los consiguientes cambios en la clasificación de los niveles taxonómicos inferiores. Esta propuesta está recogida en la taxonomía de la última versión de la base de datos SILVA (versión 132), con la que se ha trabajado en el presente estudio.

Los géneros más abundantes en la muestra artificial de bacterias fueron *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Escherichia* y *Helicobacter*, los cuales comprendían el 99,66% de la muestra (Figura 65).

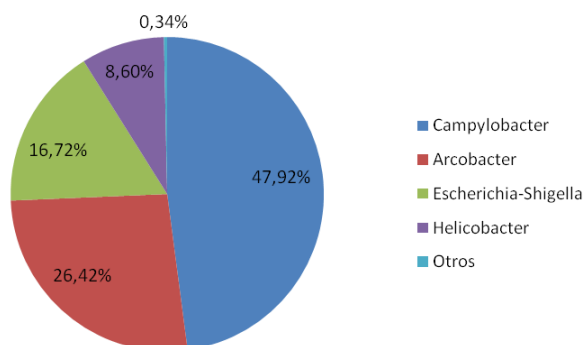


Figura 65: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes en la muestra artificial

Pese a haber incluido únicamente 1,5 ng de *Campylobacter* y 4,5 ng de *Helicobacter* sp. (*H. pylori* y *H. pullorum*) (Tabla 20), según los resultados obtenidos, puede observarse que los iniciadores 341F y 802R amplifican preferentemente el primer género. Estos resultados podrían deberse a que cada célula de *H. pylori* tiene entre 1 y 2 copias del gen 16S rRNA y *Campylobacter* entre 1 y 3 copias de este mismo gen (<https://rrndb.umms.med.umich.edu/>; Klappenbach *et al.*, 2001).

Como puede observarse en la figura 66, la muestra de agua residual tenía poca abundancia de los géneros más abundantes en la comunidad artificial de bacterias generada, en la que otros géneros suponían el 95,8 % de la muestra. Sin embargo, cuando esta muestra fue inoculada con la comunidad artificial de bacterias, las abundancias relativas de dichos géneros fueron muy similares a las de la muestra artificial, lo cual indica que la matriz del agua residual no inhibe la amplificación de estos géneros. El hecho de haber obtenido abundancias relativas inferiores para todas las bacterias, excepto para *Campylobacter*, puede haberse debido a que al haber una mayor diversidad bacteriana en la muestra de agua residual, también se hayan amplificado estas en detrimento de las bacterias inoculadas.

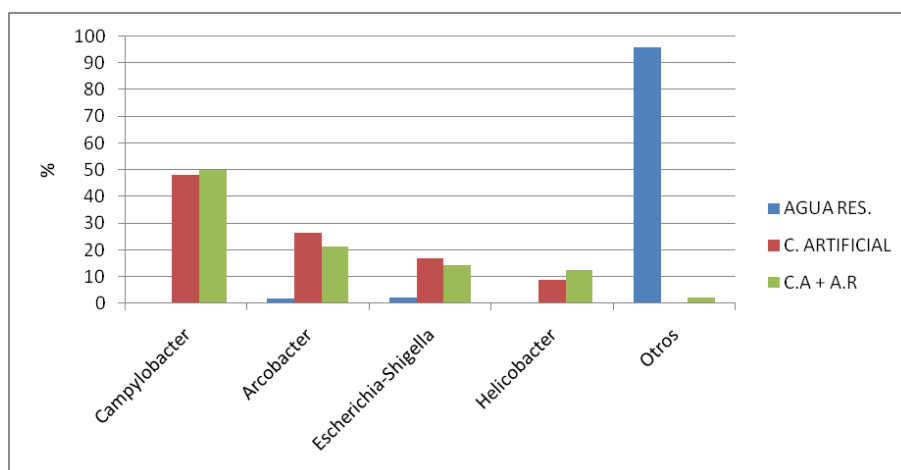


Figura 66: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes de la comunidad bacteriana artificial

IV.3.2. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A FLA EN MUESTRAS AMBIENTALES

Una vez comprobado que los iniciadores elegidos amplifican el grupo bacteriano de interés en este estudio, el del filo recientemente reclasificado como Epsilonbacteraeota por la versión 132 de la base de datos SILVA, se analizó el microbioma asociado a FLA en 20 muestras ambientales ya estudiadas en esta tesis: 14 muestras de agua, residual y potable, y 6 de lechugas.

De entre las 14 muestras de agua analizadas, 11 procedían de agua residual (SR1-SR11) y 3 de agua potable (SP1-SP3) (tabla 22). Excepto las muestras SR1, SR6, SR7 y

SR11, todas las demás habían resultado previamente positivas para la identificación de *H. pylori* dentro de FLA por alguno de los métodos empleados en este trabajo.

Tabla 22: Relación de muestras de agua secuenciadas y resultados para la identificación de *H. pylori* del interior de FLA (Capítulo II)

Nº DE MUESTRA	ID MUESTRA	CORRESPONDENCIA CON ID MUESTRA CAPÍTULO II	<i>H. pylori</i>		
			PMA-qPCR	DVC-FISH	CULTIVO
1	SR1	R11	-	-	-
2	SR2	R14	+	+	-
3	SR3	R15	-	+	+
4	SR4	R34	+	+	-
5	SR5	R37	+	-	-
6	SR6	R38	-	-	-
7	SR7	R39	-	-	-
8	SR8	R42	-	+	+
9	SR9	R43	-	-	+
10	SR10	R53	+	-	+
11	SR11	R60	-	-	-
12	SP1	P16	+	-	-
13	SP2	P23	+	+	-
14	SP3	P25	+	+	-

Agua residual:

Una vez secuenciadas las muestras de agua residual se obtuvieron un total de 691.316 secuencias. Tras filtrarlas por calidad y eliminar las quimeras quedaron un total de 547.664 secuencias, las cuales se agruparon en 12.281 OTUs.

Los filos bacterianos más abundantes en el promedio de las muestras de agua residual fueron Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Chloroflexi y Nitrospirae, los cuales representaron el 95,98 % de la diversidad de las muestras (Figura 67).

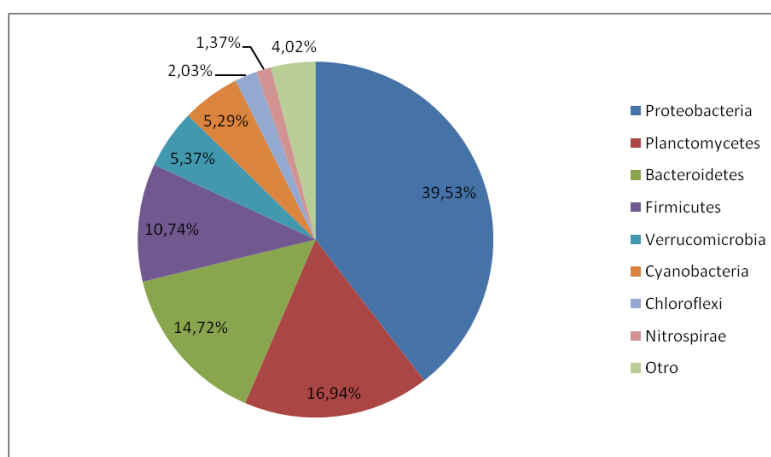


Figura 67: Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras de agua residual (%)

Las abundancias relativas de cada uno de estos filos en cada muestra se representan en la figura 68. El filo Proteobacteria fue el de mayor abundancia en las muestras SR1, SR3, SR4, SR8, SR9 y SR10. El filo Planctomycetes dominó en las muestras SR5, SR6 y SR7. El filo Bacteroidetes únicamente obtuvo la mayor abundancia en la muestra SR2. Y por último, el filo Firmicutes prácticamente representó a toda la población bacteriana de la muestra SR11.

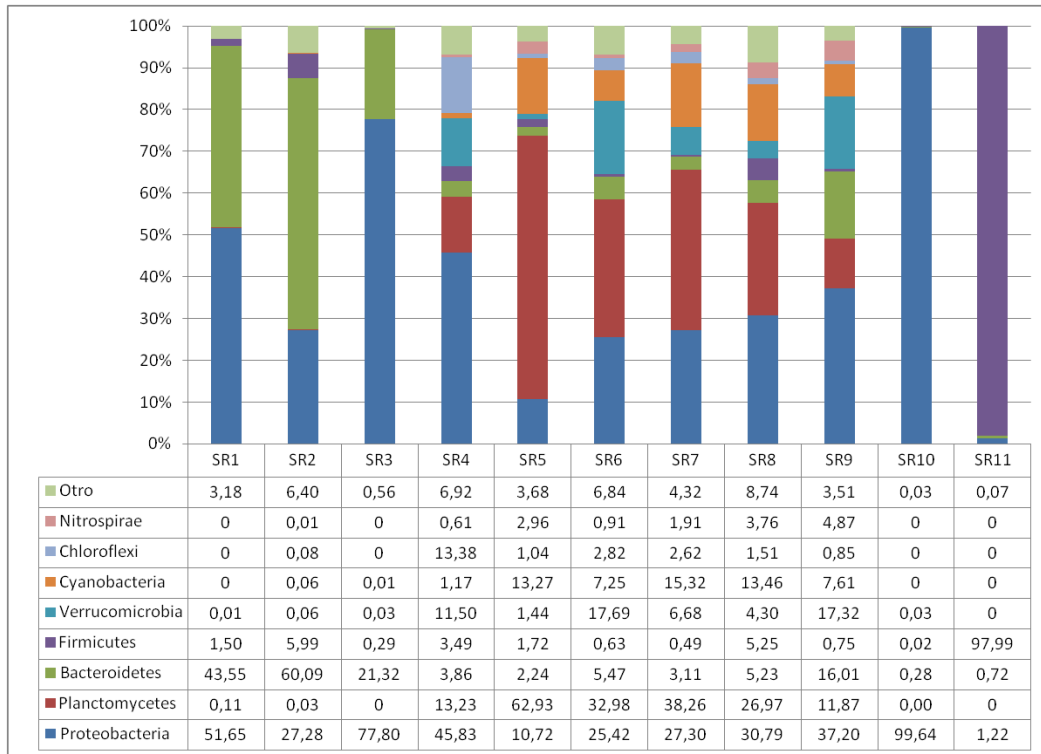


Figura 68: Distribución de filas de cada muestra de agua residual (%)

El filo Epsilonbacteraeota tuvo una abundancia relativa promedio del 0,179 %. Se detectaron bacterias pertenecientes a este filo en las muestras SR1, SR2, SR4, SR5, SR8, SR10 y SR11, con abundancias relativas desde 0,002 % hasta 1,942 % (Tabla 23).

Tabla 23: Distribución del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua residual

MUESTRA	Epsilonbacteraeota (%)
SR1	1,942
SR2	0,010
SR3	0
SR4	0,002
SR5	0,002
SR6	0
SR7	0
SR8	0,002
SR9	0
SR10	0,006
SR11	0,007

En plantas de tratamiento de agua residual municipal, como es el caso de las muestras analizadas en este estudio, el filo Proteobacteria predomina. Los filos subdominantes suelen ser Bacteroidetes, Acidobacteria y Chloroflexi (Nielsen *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). En las muestras de agua residual analizadas en el presente trabajo, el filo Proteobacteria fue el predominante en el promedio de las muestras, el filo Bacteroidetes fue el tercero más abundante y el filo Chloroflexi únicamente obtuvo una abundancia del 2,03 %. La mayor abundancia relativa de este último filo se obtuvo en la muestra SR4, 13,38 %, en la que fue el segundo filo más abundante. El filo Acidobacteria únicamente representó al 0,81 % del promedio de las bacterias. Su abundancia relativa más abundante fue del 2,36 % en la muestra SR8. El filo Planctomycetes engloba bacterias presentes en una gran diversidad de hábitats, aunque, en general, parece que su abundancia en muestras ambientales sea relativamente baja (Rusch *et al.*, 2007).

Las clases de bacterias más abundantes en el promedio de las muestras de agua residual fueron Gammaproteobacteria, Planctomycetacia, Alphaproteobacteria, Bacteroidia, Bacilli, Verrucomicrobiae, Melainabacteria, Oxyphotobacteria, Deltaproteobacteria, Nitrospira, Chloroflexia y Clostridia, las cuales representaron el 94,12 % de la abundancia relativa del promedio de las muestras (Figura 69).

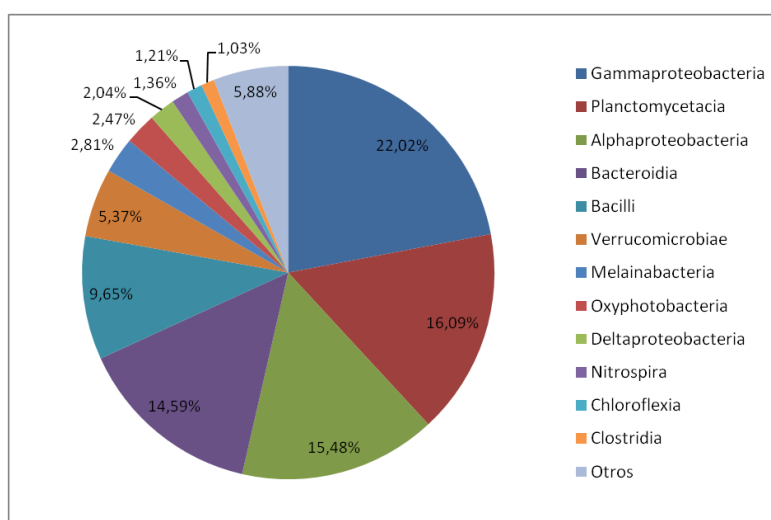


Figura 69: Distribución de las clases bacterianas más abundantes del promedio de las muestras de agua residual

La distribución de estas clases bacterianas en cada una de las muestras de agua residual puede visualizarse en la figura 70. Las clases Gammaproteobacteria, Planctomycetacia, Alphaproteobacteria y Bacteroidia representaron el 74,12 % - 99,92 % en las muestras SR1, SR2, SR3, SR5 y SR10. En las muestras SR3, SR6, SR7, SR8 y SR9, la abundancia relativa de estas clases fue del 57,27 % - 60,61 %. En la muestra SR11, el 97,90 % de las bacterias amplificadas pertenecieron a la clase Bacilli.

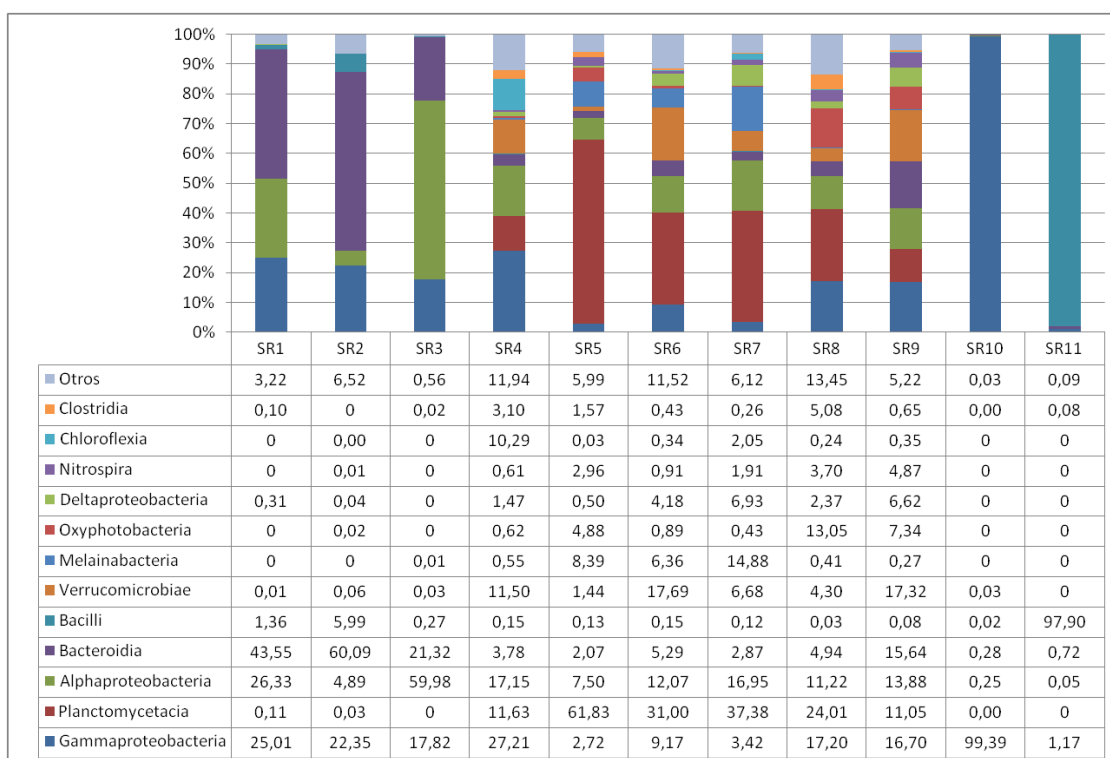


Figura 70: Distribución de clases bacterianas en cada muestra de agua residual (%)

Todas las bacterias amplificadas asignadas taxonómicamente al filo Epsilonbacteraeota fueron asignadas a la clase Campylobacteria.

La clase de bacterias dominante dentro del filo Proteobacteria en plantas de tratamiento de agua residual urbana es Betaproteobacteria, las cuales son responsables de la eliminación de materia orgánica y nutrientes (Cyzdik-Kwiatkowska y Zielińska, 2016). Sin embargo, esta clase de Proteobacteria ni siquiera ha tenido representación en las muestras analizadas en este estudio, lo cual puede ser debido a que en este estudio se están analizando las bacterias asociadas a FLA y no las presentes en el agua residual de forma global. La clase de Proteobacteria más

abundante fue Gammaproteobacteria, en la que se encuentran *E. coli*, patógenos como *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Coxiella* y *Francisella* y bacterias endosimbiontes (Williams *et al.*, 2010). Dentro del mismo filo, la segunda clase más abundante fue Alphaproteobacteria, en la cual se incluyen muchas bacterias importantes a nivel tanto medioambiental como médico, como *Rhizobium* spp. o *Rickettsia* spp. Además, incluye bacterias de vida libre e intracelulares (Collier, 2016).

Los géneros bacterianos con más abundantes en el promedio de las muestras de agua residual fueron *Bacillus*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Isosphaera*, *Sphingobium*, *Prostheco bacter*, *Haliangium*, *Cellvibrio*, *Nitrospira*, *Pseudomonas*, *Nubsella*, *Bosea* y *Herbaspirillum*, los cuales representaron el 47,34 % de la abundancia relativa del promedio de las muestras (Figura 71).

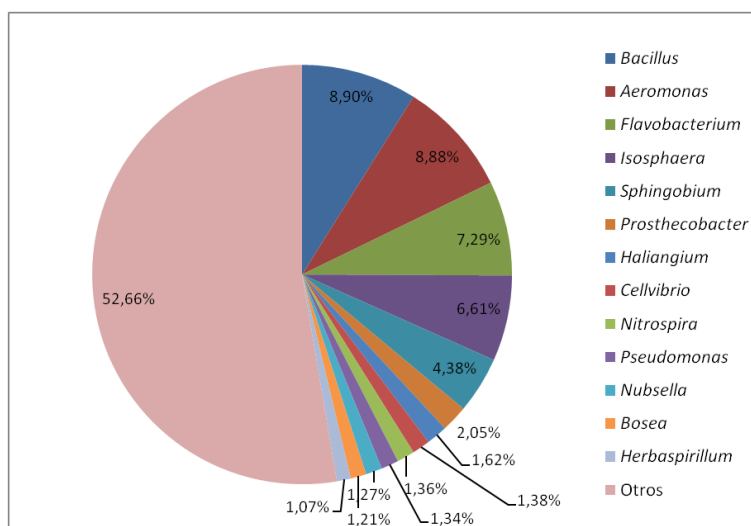


Figura 71: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes del promedio de las muestras de agua residual

Cabe destacar que entre las bacterias asociadas a FLA más abundantes en el promedio de las muestras de agua residual se encuentran *Bacillus*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*, bacterias patógenas humanas.

El género *Bacillus* comprende más de 200 especies, dos de las cuales, *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus*, son agentes especialmente importantes causantes de enfermedades en humanos (Prod'hom y Bille, 2017).

Las distintas especies de *Aeromonas* son causantes de un amplio espectro de enfermedades en el ser humano y en los animales (Ghenghesh *et al.*, 2008). Se han asociado con diarreas agudas en adultos inmunocompetentes, con diarreas crónicas en niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos y con la diarrea del viajero (Batra *et al.*, 2016). *Aeromonas* sp. ya había sido descrita como capaz de interactuar *in vitro* con *A. castellanii* Rahman *et al.*, 2008; Yousuf *et al.*, 2013).

Pseudomonas sp. formaba parte del microbioma de las FLA en todas las muestras de agua residual analizadas. El género *Pseudomonas* contiene cerca de 200 especies, entre las que destaca *P. aeruginosa*. Esta especie es un patógeno oportunista capaz de adaptarse a una gran diversidad de ambientes (Gellatly *et al.*, 2013). Las infecciones por esta bacteria suelen ser nosocomiales y casi todas están asociadas con las bajas defensas del hospedador (Lyczak *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* ya se había asociado previamente con FLA (Cengiz *et al.*, 2000; Maschio *et al.*, 2015b)

Las abundancias relativas de los géneros bacterianos presentes en cada una de las muestras se representan en la figura 72. Debido a la gran variabilidad de géneros y las distintas abundancias de los mismos en cada muestra, en este caso se representaron los gráficos de forma individualizada con los géneros bacterianos cuya abundancia relativa era superior al 2 % en cada una de las muestras. En los casos en los que no se pudo asignar taxonomía a nivel de género se nombró en el gráfico el nivel taxonómico más detallado al que se llegó.

El género *Bacillus* fue el más abundante en el promedio de las muestras, debido a que en una de ellas, en la muestra SR11 su abundancia fue próxima al 98 %. Sin embargo, en el resto de las muestras la abundancia relativa de este género fue inferior al 2 %. Delafont *et al.* (2013) también realizaron un estudio del microbioma de FLA, aunque aisladas de agua potable, y encontraron que el género *Bacillus* se asociaba a FLA en uno de los puntos muestreados. Otros géneros con presencia en las muestras analizadas en este estudio que Delafont *et al.* (2013) también detectaron asociados a FLA son *Bosea*, *Herbaspirillum*, *Legionella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Reyranella*, *Sphingobacterium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis* y *Stenotrophomonas*.

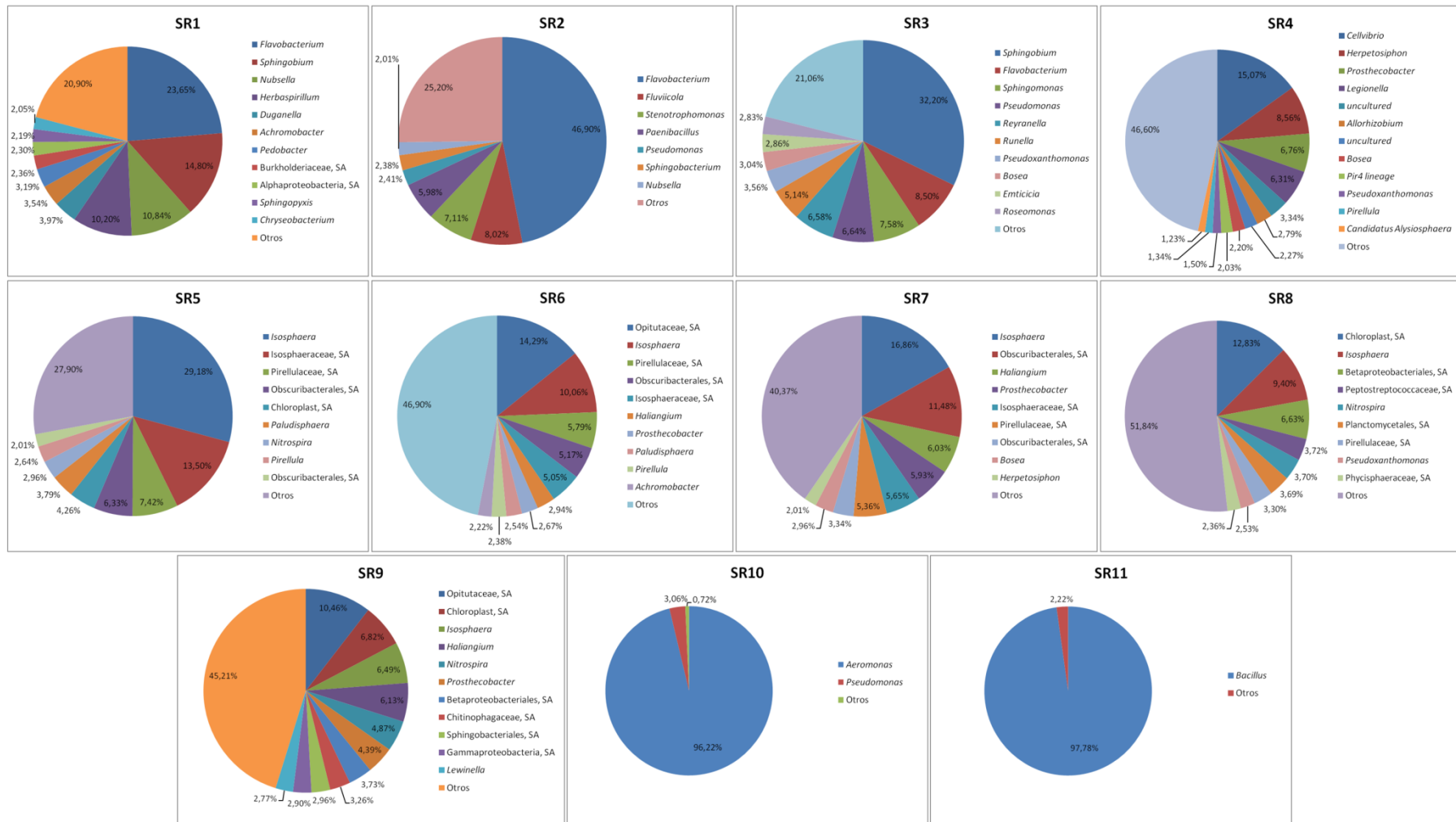


Figura 72: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes de cada muestra de agua residual (%). SA: sin asignar a nivel de género

Las bacterias asignadas al filo Epsilonbacteraeota y a la clase Campylobacteria se asignaron a los géneros *Arcobacter*, *Campylobacter* y *Helicobacter* (Tabla 24).

Tabla 24: Distribución de los géneros del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua residual (%)

GÉNERO	SR1	SR2	SR3	SR4	SR5	SR6	SR7	SR8	SR9	SR10	SR11
<i>Arcobacter</i>	1,702	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0,007
<i>Campylobacter</i>	0,218	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Helicobacter</i>	0,023	0,009	0	0,002	0,002	0	0	0,002	0	0,006	0

Debido a que la asignación taxonómica únicamente llegó hasta nivel de género, la secuencia de cada OTU de los géneros *Arcobacter*, *Campylobacter* y *Helicobacter* se enfrentó contra la base de datos NCBI mediante la herramienta blast (Tabla 25).

La taxonomía *Arcobacter* sp. fue asignada a cinco OTUs. La primera de ellas se correspondía con las especies *Arcobacter defluvii* y/o *Arcobacter cloacae* con un 99 % de identidad de secuencias y únicamente estaba presente en la muestra SR11. La segunda OTU se correspondía con *A. butzleri* y se encontró en las muestras SR1 y SR2. La tercera OTU también se correspondía con *A. butzleri* y únicamente estaba presente en la muestra SR1. La cuarta OTU fue *Arcobacter cibarius*, la cual estaba presente en la muestra SR1. Por último, la quinta OTU se correspondía con *Arcobacter skirrowii* y/o *A. cibarius*, y únicamente se encontró en la muestra SR1. De todas las especies del género *Arcobacter*, se ha demostrado que *A. butzleri* puede ser fagocitada por *A. castellanii* e incluso puede sobrevivir dentro de ella (Fernández *et al.*, 2012, Medina *et al.*, 2014; Villanueva *et al.*, 2016).

La taxonomía de *Campylobacter* sp. se asignó a una única OTU, la cual se correspondió a las especies *C. jejuni* o *Campylobacter coli*, presentes en la muestra SR1. *C. jejuni* también es capaz de ser fagocitada y de sobrevivir en el interior de *A. castellanii* y *A. polyphaga* (Snelling *et al.*, 2008; Axelsson-Olsson *et al.*, 2010; Bui *et al.*, 2012; Olofsson *et al.*, 2013).

La taxonomía de *Helicobacter* sp. se asignó a tres OTUs, dos de las cuales se correspondían con la especie *H. pylori*, presente en las muestras SR2, SR4, SR5, SR8 y SR10. La tercera OTU se correspondió con *H. pullorum*, la cual estaba presente en la

muestra SR1. En este trabajo ya se ha demostrado que *H. pylori* es capaz de internalizarse y sobrevivir en el interior de *A. castellanii*. Además, Smith y Ashbolt (2012) demostraron mediante PCR y FISH que *H. pylori* podía ser fagocitado por *A. polyphaga*. Hasta el momento se desconoce si otras especies de *Helicobacter*, como *H. pullorum*, pueden ser también ARB.

Tabla 25: Distribución de las especies del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua residual

MUESTRA	ESPECIE
SR1	<i>Arcobacter butzleri</i>
	<i>Arcobacter cibarius</i>
	<i>Arcobacter skirrowii</i> o <i>A. cibarius</i>
	<i>C. jejuni</i> o <i>Campylobacter coli</i>
	<i>Helicobacter pullorum</i>
SR2	<i>Arcobacter butzleri</i>
	<i>Helicobacter pylori</i>
SR3	-
SR4	<i>Helicobacter pylori</i>
SR5	<i>Helicobacter pylori</i>
SR6	-
SR7	-
SR8	<i>Helicobacter pylori</i>
SR9	-
SR10	<i>Helicobacter pylori</i>
SR11	<i>Arcobacter defluvii</i> o <i>Arcobacter</i>
	<i>cloacae</i>

Las abundancias relativas obtenidas para los géneros bacterianos de interés para la salud pública en las muestras de agua residual fueron bajas, a excepción de *Aeromonas* en la muestra SR10 (Tabla 26). Precisamente la muestra SR10 fue la que obtuvo una mayor abundancia relativa de estas bacterias, al presentar un 96,22 % de *Aeromonas*.

Tabla 26: Abundancia relativa de bacterias de interés para la salud pública presentes en las muestras de agua residual

FILO	CLASE	GÉNERO	SR1 (%)	SR2 (%)	SR3 (%)	SR4 (%)	SR5 (%)	SR6 (%)
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas</i>	0,364	1,022	0,005	0,006	0	0,008
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	<i>Arcobacter</i>	1,702	0,001	0	0	0	0
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	<i>Helicobacter</i>	0,023	0,009	0	0,002	0,002	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Klebsiella</i>	0	0,052	0	0	0	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Legionella</i>	0	1,744	0	6,310	0,008	0,310
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i>	0	0	0	0,383	0,130	0,137
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	1,431	2,406	6,643	0,043	0,277	0,132
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Salmonella</i>	0	0	0	0	0	0
TOTAL			3,519	5,233	6,648	6,744	0,417	0,586

Continuación

FILO	CLASE	GÉNERO	SR7 (%)	SR8 (%)	SR9 (%)	SR10 (%)	SR11 (%)	PROMEDIO (%)
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas</i>	0	0	0,023	96,217	0,022	8,879
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	<i>Arcobacter</i>	0	0	0	0	0,007	0,155
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	<i>Helicobacter</i>	0	0,002	0	0,006	0	0,004
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Klebsiella</i>	0	0,006	0,003	0,003	0	0,006
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Legionella</i>	0,030	0,090	0,027	0,001	0	0,774
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i>	0,090	0,262	0,116	0	0	0,102
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0,195	0,013	0,050	3,060	0,528	1,343
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Salmonella</i>	0	0	0,039	0	0	0,004
TOTAL			0,314	0,373	0,258	99,287	0,557	11,267

Cabe destacar que en la muestra SR4 se detectó un 6,31 % de *Legionella*. La relación de este género bacteriano con las FLA ha sido ampliamente estudiada. *Legionella* puede ser fagocitada por las FLA, sobrevivir dentro de ella e incluso multiplicarse (Rowbotham, 1980; García *et al.*, 2007; Ducret *et al.*, 2014; Buse *et al.*, 2017).

Otra de las bacterias de interés para la salud pública detectada en este trabajo en las muestras de agua residual, que ha demostrado interaccionar con las FLA y ser resistente a su fagocitosis, es *M. avium* (White *et al.*, 2010; Ovrutsky *et al.*, 2013).

Agua potable:

En el caso del agua potable, después de secuenciar las muestras se obtuvieron un total de 253.379 secuencias. Tras filtrarlas por calidad y eliminar las quimeras quedaron un total de 244.992 secuencias, las cuales se agruparon en 1.239 OTUs.

Los filos bacterianos más abundantes en el promedio de las muestras de agua potable fueron Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Chloroflexi, los cuales representaron el 99,94 % de la diversidad de las muestras (Figura 73). En un estudio llevado a cabo por Belila *et al.* (2016), en que estudiaban la comunidad bacteriana en una planta de producción de agua potable, los filos bacterianos más abundantes fueron Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Cyanobacteria. Los tres filos más abundantes de ese estudio coincidieron con los obtenidos en este trabajo.

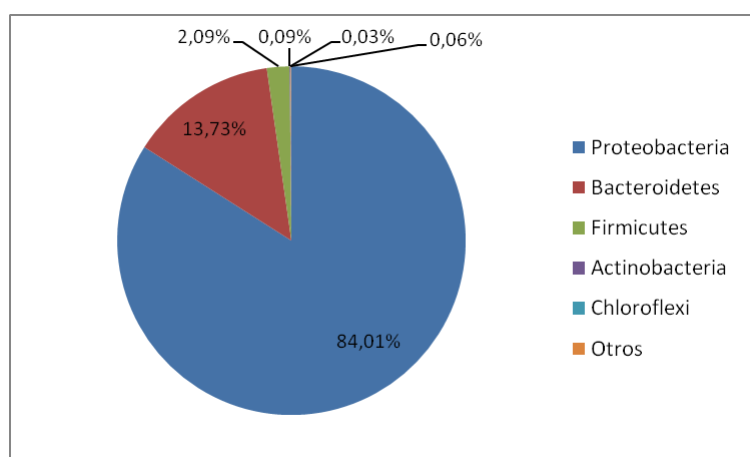


Figura 73: Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras de agua potable

Las abundancias relativas de cada uno de estos filos en cada muestra de agua potable analizada se representan en la figura 74. El filo Proteobacteria fue el dominante en las tres muestras (77,65 % - 91,55 %), seguido de los filos Bacteroidetes (5,81 % - 20,94 %) y Firmicutes (1,32 % - 2,56 %).

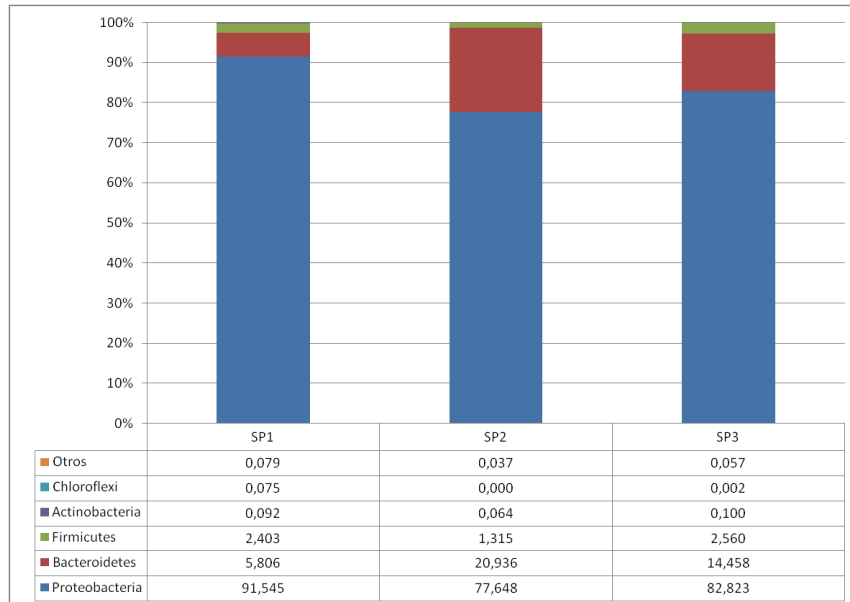


Figura 74: Distribución de filos en cada muestra de agua potable (%)

El filo Epsilonbacteraeota tuvo una abundancia relativa promedio del 0,011 % en las muestras de agua potable. Se detectaron bacterias pertenecientes a este filo en las tres muestras analizadas, SP1, SP2 y SP3 (Tabla 27).

Tabla 27: Distribución del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua potable

MUESTRA	Epsilonbacteraeota (%)
SP1	0,030
SP2	0,001
SP3	0,002

Las clases de bacterias más abundantes en el promedio de las muestras de agua potable fueron Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Alphaproteobacteria, Bacilli y Deltaproteobacteria, las cuales representaron el 99,64 % de la abundancia relativa del promedio de las muestras (Figura 75).

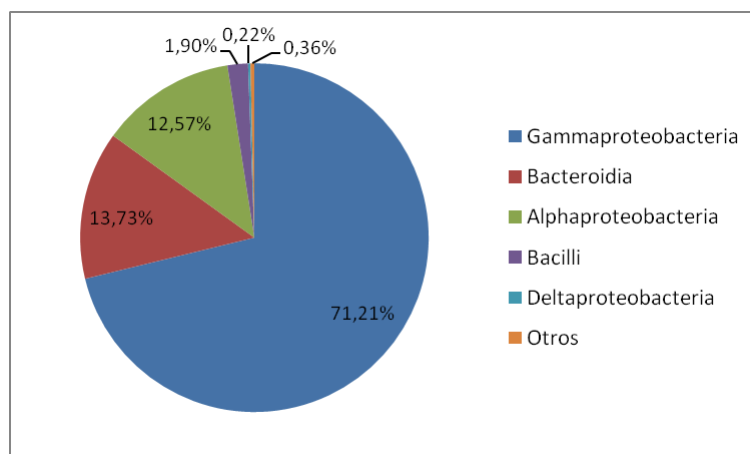


Figura 75: Distribución de las clases bacterianas más abundantes del promedio de las muestras de agua potable

La distribución de estas clases bacterianas en cada una de las muestras de agua potable puede visualizarse en la figura 76. La clase Gammaproteobacteria fue la más abundante en todas las muestras. La segunda clase bacteriana más abundante fue Bacteroidia en las muestras SP1 y SP3. En la muestra SP2, la segunda clase bacteriana más abundante fue Alphaproteobacteria.

Todas las bacterias amplificadas asignadas taxonómicamente al filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua potable fueron asignadas a la clase Campylobacteria.

Al igual que en el agua residual, la clase más abundante de las bacterias asociadas a FLA en agua potable fue Gammaproteobacteria. En el estudio llevado a cabo por Belila *et al.* (2016) la clase de Proteobacteria más abundante fue Betaproteobacteria, seguida de Alphaproteobacteria y Gammaproteobacter. Sin embargo, en las muestras analizadas en el presente trabajo ninguna bacteria asociada a FLA pertenecía a Betaproteobacteria.

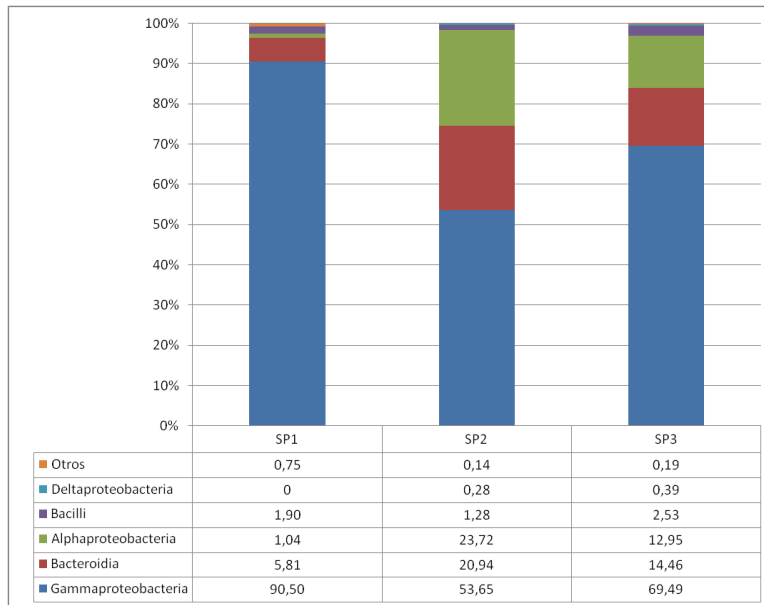


Figura 76: Distribución de clases bacterianas de cada muestra de agua potable (%)

Los géneros bacterianos más abundantes en el promedio de las muestras de agua potable fueron *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Nubsella*, *Flavobacterium*, *Sphingobium*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Rheinheimera* y *Delftia*, los cuales representaron el 47,34 % de la abundancia relativa del promedio de las muestras (Figura 77). Cabe destacar que *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* son bacterias patógenas humanas (De Bentzmann y Plésiat, 2011; Brooke, 2012)

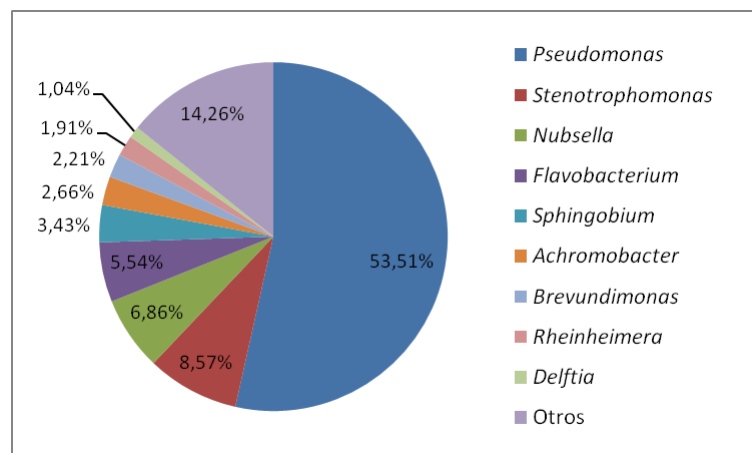


Figura 77: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes del promedio de las muestras de agua potable

Las abundancias relativas de los géneros bacterianos presentes en cada una de las muestras de agua potable se representan en la figura 78. Debido a la variabilidad de géneros y las distintas abundancias de los mismos en cada muestra, se representaron los gráficos de forma individualizada con los géneros bacterianos cuya abundancia relativa era superior al 1 % en cada una de las muestras. En los casos en los que no se pudo asignar taxonomía a nivel de género se nombró en el gráfico el nivel taxonómico más detallado al que se llegó.

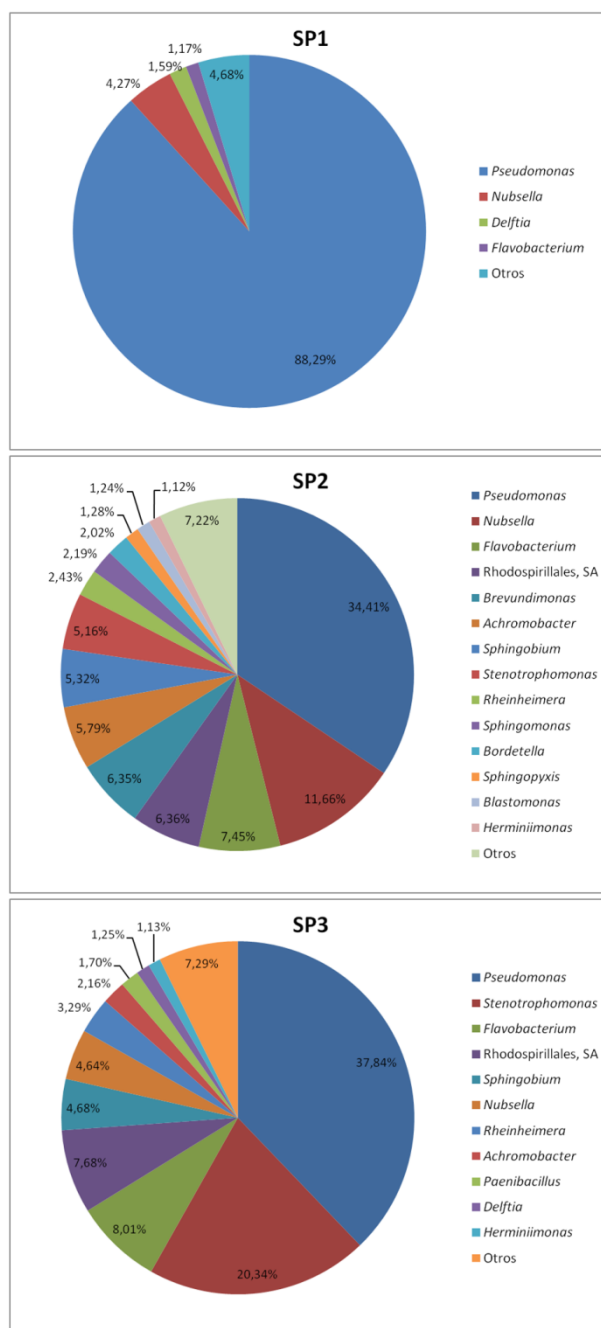


Figura 78: Distribución de géneros bacterianos de cada muestra de agua potable (%). SA: sin asignar a nivel de género

En el estudio llevado a cabo por Delafont *et al.* (2013), en el que analizaron el microbioma de FLA de aguas potables, también detectaron los siguientes géneros bacterianos: *Brevundimonas*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. De entre estas bacterias, la que obtuvo una mayor abundancia relativa en las tres muestras analizadas en el presente estudio fue *Pseudomonas*, que como ya se ha comentado anteriormente es un patógeno oportunista que se ha relacionado con FLA. Además, *Stenotrophomonas* también causa enfermedades nosocomiales (Brooke, 2012).

El género *Sphingomonas* se ha encontrado en un gran número de biopelículas de agua potable y se ha demostrado que es particularmente resistente al tratamiento con cloro (Hong *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012a).

Las bacterias del filo Epsilonbacteraeota y clase Campylobacteria se asignaron a los géneros *Arcobacter*, *Campylobacter* y *Helicobacter* (Tabla 28). Pese que en todas las muestras de agua potable se había detectado *H. pylori* dentro de FLA mediante PMA-qPCR, mediante metagenómica de secuenciación dirigida solo ha sido posible la detección de esta bacteria en la muestra SP1.

Tabla 28: Distribución de los géneros del filo Epsilonbacteraeota en las muestras de agua potable (%)

FILO	CLASE	GÉNERO	SP1	SP2	SP3
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	<i>Arcobacter</i>	0	0	0,002
		<i>Campylobacter</i>	0,020	0,001	0
		<i>Helicobacter</i>	0,010	0	0

Debido a que la asignación taxonómica únicamente llegó hasta nivel de género, la secuencia de cada OTU de los géneros *Arcobacter*, *Campylobacter* y *Helicobacter* se enfrentó contra la base de datos NCBI mediante la herramienta BLAST. En el caso de *Arcobacter*, la especie presente en la muestra SP3 fue *A. butzleri*. La taxonomía de *Campylobacter* sp. fue asignada a dos OTUs. Al enfrentarlos a la base de datos NCBI, el primero de ellos se correspondía con la especie *Campylobacter cuniculorum*, presente en la muestra SP1, y el segundo de ellos a las especies *C. jejuni* y/o *Campylobacter coli*,

ambas con un 99 % de identidad de secuencias y presentes en la muestra SP2. En el caso de *Helicobacter*, la especie presente en la muestra SP1 fue *H. pylori*.

Las abundancias relativas obtenidas para los géneros bacterianos de interés para la salud pública en las muestras de agua potable fueron bajas e incluso nulas para alguna bacteria excepto para *Pseudomonas* (Tabla 29). Las abundancias relativas de *Pseudomonas* sp. variaron entre un 34,41% (SP2) y un 88,29% (SP2). Esta bacteria ya había sido asociada previamente a FLA (Wang *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013; Maschio *et al.*, 2015b). En el estudio de Delafont *et al.* (2013) sobre el microbioma de FLA aisladas de agua potable mediante metagenómica de secuenciación dirigida, también detectaron *Pseudomonas*, aunque en una abundancia del 2,38%. Estos autores emplearon otros iniciadores para la amplificación de las bacterias y una plataforma de secuenciación distinta a la del presente trabajo.

Tabla 29: Abundancia relativa de bacterias de interés para la salud pública presentes en las muestras de agua potable

FILO	CLASE	GÉNERO	SP1 (%)	SP2 (%)	SP3 (%)	PROMEDIO (%)
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas</i>	0,120	0	0	0,040
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	<i>Arcobacter</i>	0	0	0,002	0,001
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	<i>Helicobacter</i>	0,010	0	0	0,003
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Klebsiella</i>	0	0	0	0,000
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Legionella</i>	0	0	0	0,000
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i>	0,004	0,009	0,014	0,009
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	88,291	34,413	37,840	53,515
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Salmonella</i>	0	0	0	0,000
TOTAL			88,424	34,423	37,855	53,567

Vegetales:

En el caso de las muestras de vegetales, se analizó el microbioma de FLA en 6 muestras de lechuga, SL1-SL6 (tabla 30).

Tabla 30: Relación de muestras de lechuga secuenciadas y resultados para la identificación de *H. pylori* del interior de FLA (Capítulo III)

Nº DE MUESTRA	ID MUESTRA	CORRESPONDENCIA CAPÍTULO III	<i>H. pylori</i>		
			PMA-qPCR	DVC-FISH	CULTIVO
15	SL1	L1	+	+	-
16	SL2	L2	+	-	-
17	SL3	L5	+	-	-
18	SL4	L8	+	+	-
19	SL5	L9	+	+	-
20	SL6	L10	+	-	-

Una vez secuenciadas las muestras, se obtuvieron un total de 237.266 secuencias. Tras filtrarlas por calidad y eliminar las quimeras quedaron un total de 201.740 secuencias, las cuales se agruparon en 2.165 OTUs.

En promedio, los filos bacterianos más abundantes presentes en las muestras de lechuga fueron Proteobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Patescibacteria y Cyanobacteria, los cuales representaban el 99,32 % de la diversidad de las muestras (Figura 79).

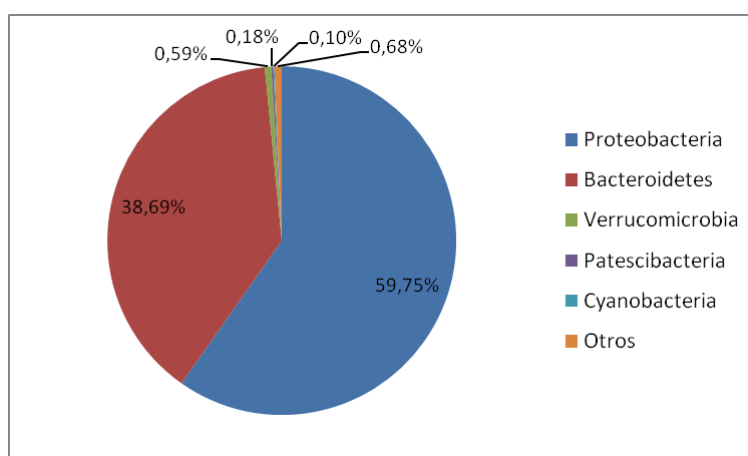


Figura 79: Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras de lechuga

Las abundancias relativas de cada uno de los filos en cada muestra de lechuga analizada son las representadas en la figura 80. Los dos filos más abundantes en todas las muestras, al igual que en los casos de las muestras de agua residual y potable, fueron Proteobacteria y Bacteroidetes, con abundancias relativas entre 18,55 % y 96,05 % en el caso de las Proteobacterias y entre 3,38 % y 79,94 % en el caso de Bacteroidetes.

El filo Epsilonbacteraeota tuvo una abundancia relativa promedio del 0,006 %. Únicamente en las muestras SL1 y SL4 se detectaron bacterias pertenecientes a este filo, cuyas abundancias relativas fueron del 0,003 % y 0,032 %, respectivamente.

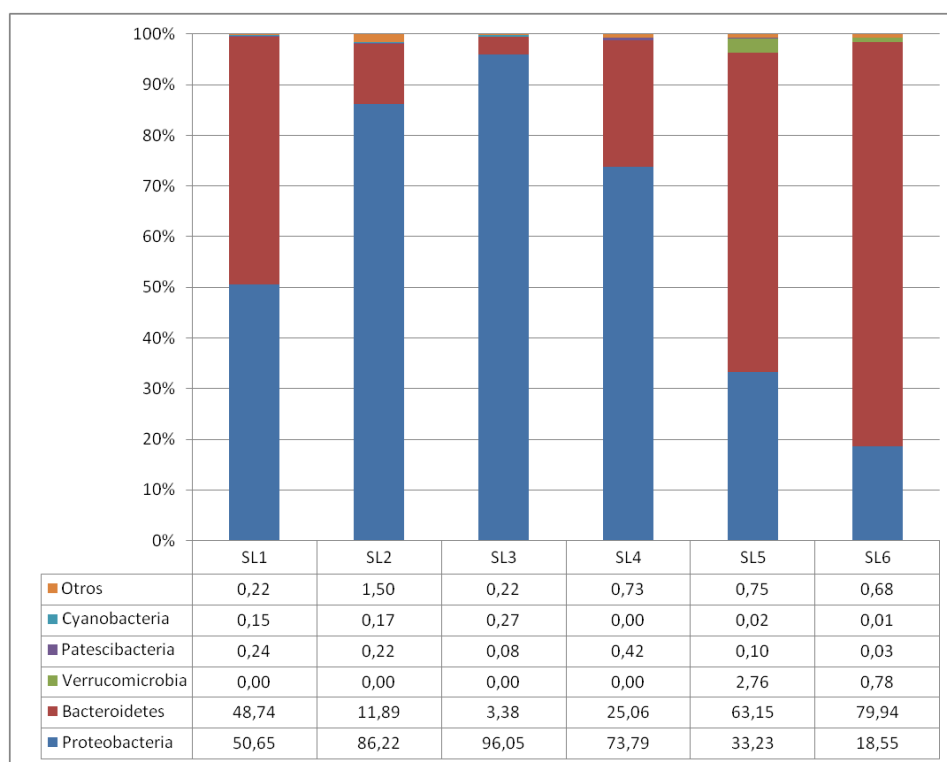


Figura 80: Distribución de los filos más abundantes de cada muestra de lechuga (%)

Las clases de bacterias más abundantes en el promedio de las muestras de lechuga fueron Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Alphaproteobacteria y Deltaproteobacteria, las cuales representaron al 98,42 % del promedio de las muestras (Figura 81).

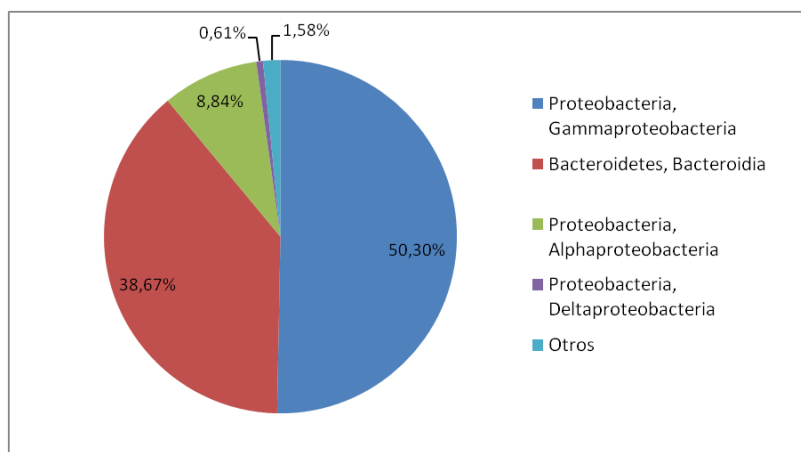


Figura 81: Distribución de las clases bacterianas más abundantes del promedio de las muestras de lechuga

Las abundancias relativas de cada una de las clases bacterianas en cada muestra de lechuga analizada fueron las representadas en la figura 82. En el caso de las muestras SL1, SL2, SL3 y SL4, las dos clases más abundantes fueron Gammaproteobacteria y Bacteroidia, siendo las abundancias de Gammaproteobacteria y Bacteroidia muy similares en la muestra SL1, y mayores las de Gammaproteobacteria en las muestras SL2, SL3 y SL4. En las muestras SL5 y SL6, las clases bacterianas más abundantes fueron Bacteroidia y Alphaproteobacteria.

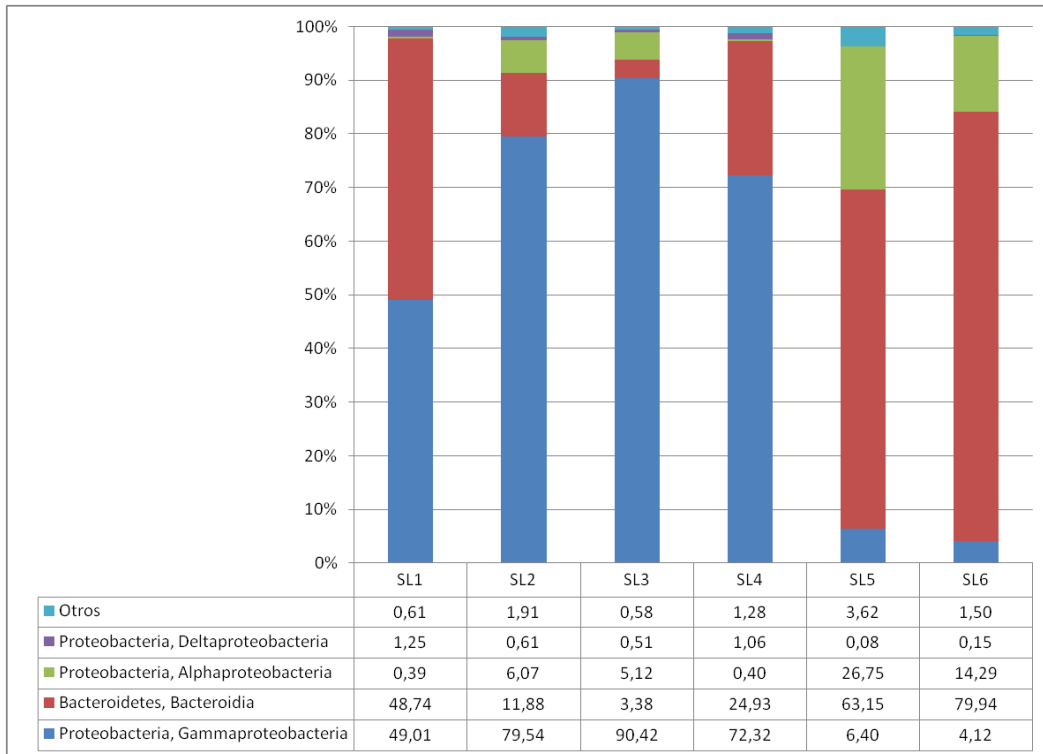


Figura 82: Distribución de las clases bacterianas más abundantes de cada muestra de lechuga (%)

Los géneros bacterianos más abundantes en el promedio de las muestras de lechuga fueron *Massilia*, *Fluviicola*, *Flavobacterium*, *Siphonobacter*, *Pseudorhodoferax*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Delftia* y *Pseudoxanthomonas*, que representaron el 66,96 % del promedio de las muestras (Figura 83).

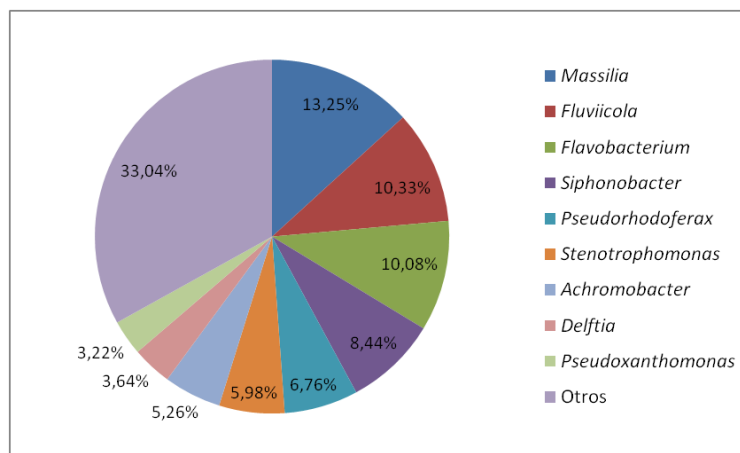


Figura 83: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes del promedio de las muestras de lechuga

Las abundancias de estos géneros bacterianos en cada una de las muestras de lechuga analizadas se representan a la figura 84. En la muestra SL1, el género bacteriano más abundante fue *Siphonobacter*; en las muestra SL2, SL3 y SL4, *Massilia*; en la muestra SL5, *Flavobacterium* y en la muestra SL6, *Fluviicola*.

Las abundancias relativas obtenidas para los géneros bacterianos de interés para la salud pública fueron bajas (Tabla 30). Además, no todas estas bacterias estaban presentes en todas las muestras. La muestra SL6 fue la que presentó una mayor abundancia de dichas bacterias (0,94 %), seguida de la muestra SL5 (0,82 %).

Cabe destacar que el género *Helicobacter* sólo se detectó en las muestras SL1 y SL4, aunque en muy poca abundancia, pese a que mediante qPCR había sido detectado en todas las muestras.

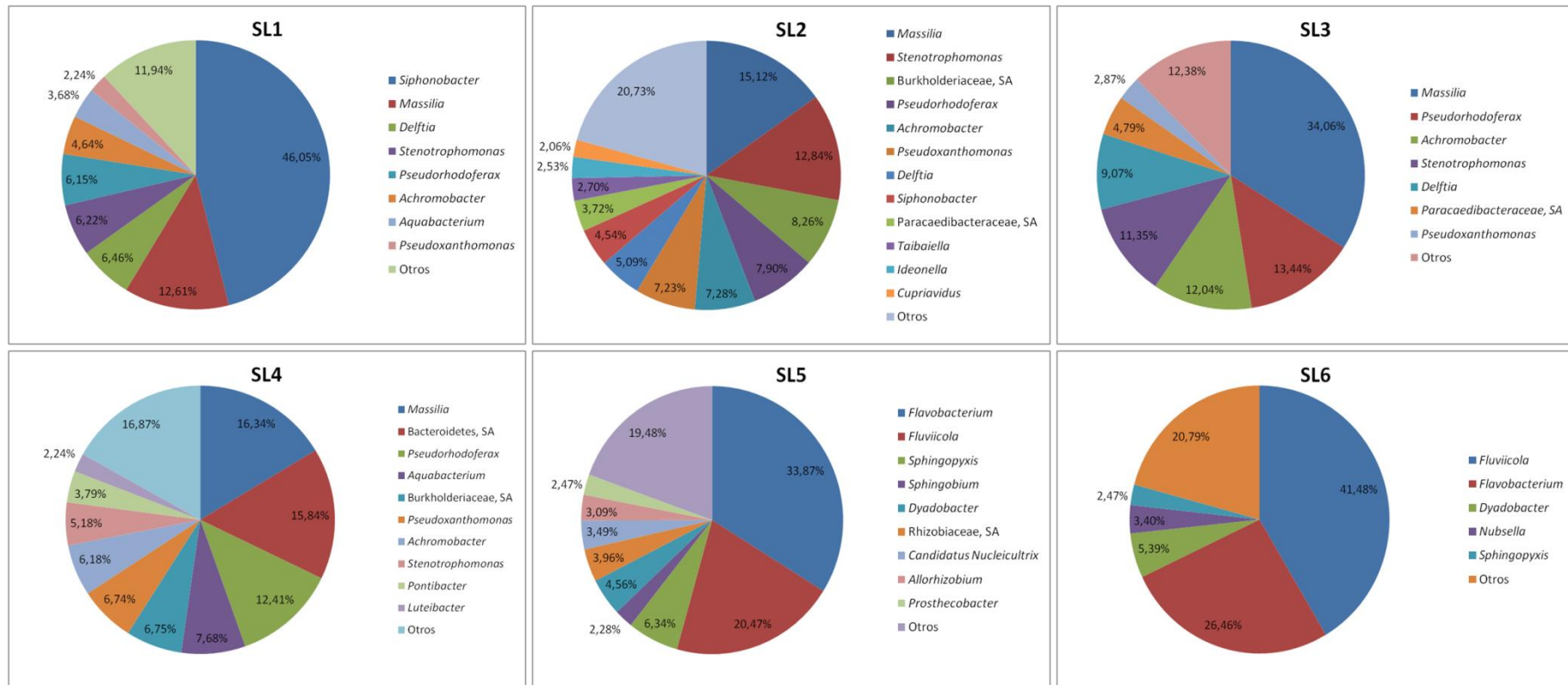


Figura 84: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes de cada muestra de lechuga (%). SA: sin asignar a nivel de género

Tabla 31: Abundancia relativa de bacterias de interés para la salud pública presentes en las muestras de lechugas

FILO	CLASE	GÉNERO	SL1 (%)	SL2 (%)	SL3 (%)	SL4 (%)	SL5 (%)	SL6 (%)	PROMEDIO (%)
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas</i>	0	0	0	0	0,005	0,003	0,001
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	<i>Arcobacter</i>	0	0	0	0,021	0	0	0,004
Epsilonbacteraeota	Campylobacteria	<i>Helicobacter</i>	0,003	0	0	0,011	0	0	0,002
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Klebsiella</i>	0	0	0	0	0,003	0,003	0,001
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Legionella</i>	0	0	0	0	0,015	0	0,003
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i>	0	0	0,002	0	0,003	0,006	0,002
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0,006	0,020	0,029	0,011	0,773	0,924	0,294
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Salmonella</i>	0	0	0	0	0,018	0,003	0,004
TOTAL			0,009	0,020	0,031	0,043	0,817	0,939	0,310

Estos resultados son una primera aproximación a la determinación del microbioma de FLA de distintos tipos de muestras. Para caracterizar el microbioma de las FLA según el tipo de muestra habría que analizar una mayor cantidad de las mismas para poder ofrecer unos resultados más aproximados.

Por otra parte, en todas las muestras analizadas en este capítulo se recogieron las FLA de las placas de NNAP, se realizó un tratamiento con hipoclorito sódico, se trataron las muestras con PMA para eliminar el DNA extracelular y de las células muertas, se extrajo el DNA, se realizó una secuenciación mediante metagenómica de amplificación dirigida y las secuencias resultantes se clasificaron taxonómicamente mediante herramientas bioinformáticas. Por tanto, es razonable inferir que las bacterias identificadas no sólo están presentes en las muestras junto a las FLA, sino que probablemente formen parte del microbioma de las mismas. Sin embargo, al estar detectando el DNA de las bacterias procedentes del interior de las FLA, también se estaría identificando DNA residual de bacterias digeridas por estas.

En este trabajo se ha querido determinar el microbioma de las FLA procedente de muestras ya analizadas para la detección de *H. pylori* viable procedente del interior de FLA con unos iniciadores y condiciones que eran capaces de detectar la bacteria. Sin embargo, pese a que mediante qPCR y/o DVC-FISH se había podido detectar *H. pylori* en la gran mayoría de las muestras analizadas, mediante metagenómica de secuenciación dirigida no se ha llegado a poder detectar esta bacteria en algunos casos. Esto podría ser debido a que la abundancia relativa de esta bacteria es muy baja en las muestras y cuando se produce la amplificación, otros DNAs más abundantes enmascaran el DNA de *H. pylori*, por lo que pudo darse una amplificación preferencial de estas en detrimento de *Helicobacter*.

Hasta donde se sabe, este es el primer trabajo que estudia el microbioma de FLA aisladas a partir de vegetales.

Por tanto, para estudiar los grupos de bacterias más abundantes asociados con las FLA en diversos tipos de muestras, la estrategia de metagenómica de secuenciación dirigida empleada en este trabajo es una muy buena herramienta. Sin embargo, si se desea estudiar la presencia de una bacteria concreta con abundancias bajas, la metagenómica de secuenciación dirigida no parece ser la mejor técnica a emplear.

IV.4. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

ARTÍCULOS:

- Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Ferrús, M.A. 2018-2019. Analysis of the microbiome of free-living amoebae isolated from water and vegetable sources. En fase de redacción.

CONGRESOS:

- Moreno-Mesonero, L., Ferrús, M.A., Amorós, I., Alonso, J.L., Moreno, Y. 2016. Amplicon-based metagenomic analysis of Free-Living Amoebae microbiome in water samples. Microbiology & Immunology 2016 Labroots virtual event. 7-8 September 2016.
- Moreno-Mesonero, L., Ferrús, M.A., Amorós, I., Alonso, J.L. Moreno, Y. 2016. 16S rDNA metagenomics approach to identify *Helicobacter pylori* inside Free-living amoebae in water samples. XXIXth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer. Magdeburg, Germany. 15-17 September 2016
- Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J.L., Amorós, I., Ferrús, M.A. 2017. Identification of pathogenic bacteria associated to free-living amoebae in wastewater samples by 16S rRNA amplicon-based metagenomics. VII International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology–BMW2017. 18-20 October 2017.

CONCLUSIONES

1. *Helicobacter pylori* actúa como una bacteria resistente a las amebas (ARB), tanto en condiciones experimentales como en muestras ambientales.
2. La técnica qPCR con un tratamiento previo de PMA (PMA-qPCR) permite detectar exclusivamente las células de *H. pylori* del interior de *Acanthamoeba castellanii*, ya que elimina tanto el DNA exógeno como las bacterias del medio, inactivadas mediante un tratamiento con hipoclorito sódico, tanto en cocultivo experimental como en muestras ambientales.
3. La técnica FISH combinada con la incubación previa en DVC (DVC-FISH) permite comprobar la presencia de células viables (elongadas) de *H. pylori* procedentes del interior de *A. castellanii*, tanto en cocultivo experimental como en muestras ambientales.
4. Mediante las técnicas PMA-qPCR y DVC-FISH se ha detectado la presencia de células viables de *H. pylori* procedentes del interior de FLA en muestras ambientales y vegetales: agua residual, agua potable y lechugas.
5. Se han detectado células viables cultivables de *H. pylori* procedente del interior de FLA en muestras de agua residual.
6. La identificación de FLA en aguas potables y residuales mediante PCR múltiple no resulta suficientemente específica para su aplicación a muestras ambientales. La FLA-PCR y la posterior secuenciación de los amplicones generados resulta un método más específico, aunque largo y laborioso.
7. La identificación de *Acanthamoeba* spp. y *Vermamoeba vermiformis* mediante sus respectivas qPCRs resulta efectiva en muestras ambientales, no siendo necesario conseguir cultivos puros de cada FLA para obtener una identificación precisa.
8. Los iniciadores 341F y 802R, seleccionados y evaluados en este trabajo son adecuados para la amplificación de bacterias asociadas a FLA mediante metagenómica de secuenciación dirigida.
9. Se ha detectado la presencia de especies patógenas de FLA en aguas utilizadas para el riego, aguas potables y en vegetales.
10. Se han detectado bacterias potencialmente patógenas como parte del microbioma de FLA aisladas a partir de muestras ambientales: agua residual, agua potable y lechugas

11. Se ha demostrado, por primera vez en este trabajo, la presencia de células de *H. pylori* viables y viables cultivables procedentes del interior de FLA de agua y vegetales, lo que evidencia que las FLA podrían ser un vehículo de transmisión para la bacteria a los humanos a través del agua y los vegetales. Sería necesario determinar el poder infectivo de estas células viables de *H. pylori* para determinar el riesgo real para el consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abdulhalim, B.E., Wagih, M.M., Gad, A.A., Boghdadi, G., Nagy, R.R. 2015. Amniotic membrane graft to conjunctival flap in treatment of non-viral resistant infectious keratitis: a randomised clinical study. *Br J Ophthalmol*, 99: 59-63.
- Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., Fields, B. 1996. *Legionella*-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis*, 2: 225-230.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*, 59: 429-493.
- Agustí, G., Codony, F., Fitipaldi, M., Adrados, B., Morató, J. 2010. Viability determination of *Helicobacter pylori* using propidium monoazide quantitative PCR. *Helicobacter*, 15: 472-476.
- Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y., Alizadeh, H. 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. *J Parasitol*, 88: 621-623.
- Akya, A., Pointon, A., Thomas, C. 2009a. Mechanism involved in phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by *Acanthamoeba polyphaga*. *Parasitol Res*, 105: 1375-1383.
- Akya, A., Pointon, A., Thomas, C. 2009b. Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp. *FEMS Microbiol Ecol*, 70: 20-29.
- Alexandratos, N., Bruinsma, J. 2012. World Agriculture Towards 2030/2050: The 2012 Revision. ESA Working Paper No. 12-03. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
- Al-Sulami, A.A., Al-Edani, T.A., Al-Abdula, A.A. 2012. Culture method and PCR for the detection of *Helicobacter pylori* in drinking water in Basrah Governorate Iraq. *Gastroenterol Res Pract*, 2012: 245167.
- Al-Sulami, A.A., Al-Tae, A.M. Juma'a, M.G. 2010. Isolation and identification of *Helicobacter pylori* from drinking water in Basra governorate, Iraq. *East Mediterr Health*, 16: 920-925.
- Alves de Matos, A.P., Vale, F.F., Vitor, M.B. 2012. *Helicobacter pylori* association with amoeba: a natural reservoir of the bacteria? *Microsc Microanal*, 55: 27-28.
- Amann, R., Fuchs, B.M., Beherens, S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Curr Opin Biotechnol*, 12: 231-236.

- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Fluorescent-oligo-nucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol*, 172: 762–770.
- Amaral-Zettler, L.A., Nerad, T.A., O'Kelly, C.J., Peglar, M.T., Gillevet, P.M., Silberman, J.D., Sogin, M.L. 2000. A molecular reassessment of the Leptomyxid amoebae. *Protist*, 151: 275-282.
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., Vakhlu, J. 2016. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian J Microbiol*, 56: 394-404.
- Amirhooshang, A., Ramin, A., Ehsan, A., Mansour, R., Shahram, B. 2014. High frequency of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Kermanshah, Iran, during June-November 2012. *J Water Health*, 12: 504-512.
- Amplicon P.C.R. 2013. 16S metagenomic sequencing library preparation. Preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf (consultado el 05/04/2018).
- Andersen, A.P., Elliott, D.A., Lawson, M., Barland, P., Hatcher, V.B., Puszkin, E.G. 1997. Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media. *J Clin Microbiol*, 35: 2918-2922.
- Andersen, L.P., Rasmussen, L. 2009. *Helicobacter pylori*-coccioid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 56: 112-115.
- Anderson, O.R. 2000. Abundance of terrestrial gymnamoebae at northeastern U.S. site: a four-year study, including the El Niño winter of 1997-1998. *J Eukaryot Microbiol*, 47: 148-155.
- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality-control tool for high-throughput sequence data. Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (consultado el 05/04/2018)
- Anh, V.T., Tram, N.T., Klank, L.T., Cam, P.D., Dalsgaard, A. 2007. Faecal and protozoan parasite contamination of water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated in urban wastewater in Phnom Penh, Cambodia. *Trop Med Int Health*, 12: 73-81.
- Aqeel, Y., Siddiqui, R., Ateeq, M., Raza-Shah, M., Kulsoom, H., Khan, N.A. 2015. Atomic force microscopic imaging of *Acanthamoeba castellanii* and *Balamuthia mandrillaris* trophozoites and cysts. *J Eukaryot Microbiol*, 62: 85-94.
- Asakura, H., Kawamoto, K., Haishima, Y., Igimi, S., Yamamoto, S., Makino, S.I. 2008. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress

response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Res Microbiol*, 159: 709–717.

Astorga, B., Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C.M., Alarcón, V., Moreno, J., González, A.C., Navarrete, E., Piñero, J.E., Valladares, B. 2011. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. *J Eukaryot Microbiol*, 58: 542-544.

Atapoor, S., Dehkordi F.S., Rahimi, E. 2014. Detection of *Helicobacter pylori* in various types of vegetables and salads. *Jundishapur J Microbiol*, 7: e10013.

Axelsson-Olsson, D., Svensson, L., Olofsson, J., Salomon, P., Waldenström, J., Ellström, P., Olsen, B. 2010. Increase in acid tolerance of *Campylobacter jejuni* through coinubation with amoebae. *Appl Environ Microbiol*, 76: 4194-4200.

Azevedo, N.F., Pacheco, A.P., Keevil, C.W., Vieira, M.J. 2004. Nutrient shock and incubation atmosphere influence recovery of culturable *Helicobacter pylori* from water. *Appl Environ Microbiol*, 70: 490-493.

B

Badirzadeh, A., Niyayati, M., Babaei, Z., Amini, H., Badirzadeh, H., Rezaeian, M. 2011. Isolation of free-living amoebae from Sarein hot springs in Ardebil province, Iran. *Iran J Parasitol*, 6: 1-8.

Baele, M., Decostere, A., Vandamme, P., Ceelen, L., Hellemans, A., Mast, J., Chiers, K., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. 2008a. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 1350-1358.

Baele, M., Decostere, A., Vandamme, P., Van den Bulck, K., Gruntar, I., Mehle, J., Mast, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. 2008b. *Helicobacter baculiformis* sp. nov., isolated from feline stomach mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 357-364.

Bai, X., Xi, C., Wu, J. 2016. Survival of *Helicobacter pylori* in the wastewater treatment process and the receiving river in Michigan, USA. *J Water Health*, 14: 692-698.

Baker, K.H., Hegarty, J.P., Redmond, B., Reed, N.A., Herson, D.S. 2002. Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, 68: 981-984.

Balczun, C., Scheid, P.L. 2017. Free-Living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses*, 9: 15.

Baquero, R.A., Reyes-Batlle, M., Nicola, G.G., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Guillermo-Esteban, J., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J. 2014. Presence of potentially pathogenic free-living

- amoebae strains from well water samples in Guinea-Bissau. *Pathog Glob Health*, 108: 206-211.
- Barbeau, J., Buhler, T. 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol*, 152: 753-760.
- Barcina, I., Arana, I., Santorum, P., Iriberrri, J., Egea, I. 1995. Direct viable count of Gram-positive and Gram-negative bacteria using ciprofloxacin as inhibitor of cellular division. *J Microbiol Meth*, 22: 139-150.
- Barker, J., Brown, M. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, 140: 1253-1259.
- Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., Gilbert, P. 1992. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol*, 58: 2420-2425.
- Bass, P., Bischoff, P.J. 2001. Seasonal variability in abundance and diversity of soil gymnamoebae a short transect in southeastern USA. *J Eukaryot Microbiol*, 48: 475-479.
- Batra, P., Mathur, P., Misra, M.C. 2016. *Aeromonas* spp.: an emerging nosocomial pathogen. *J Lab Physicians*, 8: 1-4.
- Behniafar, H., Niyiyati, M., Lasjerdi, Z. 2015. Molecular characterization of pathogenic *Acanthamoeba* isolated from drinking and recreational water in East Azerbaijan, Northwest Iran. *Environ Health Insights*, 29: 7-12.
- Belila, A., El-Chakhtoura, J., Otaibi, N., Muyzer, G., Gonzalez-Gil, G., Saikaly, P.E., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S. 2016. Bacterial community structure and variation in a full-scale seawater desalination plant for drinking water production. *Water Res*, 94: 62-72.
- Benson, J.A., Fode-Vaughan, K.A., Collins, M.L.P. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. *Lett Appl Microbiol*, 39: 221-225.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2001. Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. David R. Boone, Richard W. Castenholz, George Garrity. Springer-Verlag; New York.
- Berglund, E.C., Kiialainen, A., Syvänen, A.C. 2011. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. *Investig Genet*, 2: 23.
- Berk, S.G., Gunderson, J.H., Newsome, A.L., Farone, A.L., Hayes, B.J., Redding, K.S., Uddin, N., Williams, E.L., Johnson, R.A., Farsian, M., Reid, A., Skimmyhorn, J., Farone, M.B. 2006. Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared

- with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ Sci Technol* 40: 7440–7444.
- Berney, C., Fahrni, J., Pawlowski, J. 2004. How many novel eukaryotic ‘kingdoms’? Pitfalls and limitations of environmental DNA surveys. *BMC Biol*, 2: 13.
- Besnard, V., Federighi, M., Declercq, E., Jugiau, F., Cappelier, J.M. 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet Res*, 33: 359–370.
- Bhattacharjee, A.S., Wu, S., Lawson, C.E., Jetten, M.S.M., Kapoor, V., Domingo, J.W.S., McMahon, K.D., Noguera, D.R., Goel, R. 2017. Whole-community metagenomics in two different anammox configurations: process performance and community structure. *Environ Sci Technol*, 51: 4317-4327.
- Bode, G., Mauch, F., Malfertheiner, P. 1993. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infec*, 111: 483-490.
- BOE-A-2003-3596. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. <https://www.boe.es/buscar/pdf/2003/BOE-A-2003-3596-consolidado.pdf> (consultado el 24/03/2018).
- BOE-A-2007-21092. REAL DECRETO 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. <https://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf> (consultado el 04/04/2018).
- Boehnke, K.F., Eaton, K.A., Fontaine, C., Brewster, R., Wu, J., Eisenberg, J.N.S., Valdivieso, M., Baker, L.H., Xi, C. 2017. Reduced infectivity of waterborne viable but nonculturable *Helicobacter pylori* strain SS1 in mice. *Helicobacter*, 22: doi: 10.1111/hel.12391.
- Boehnke, K.F., Eaton, K.A., Valdivieso, M., Baker, L.H., Xi, C. 2015. Animal model reveals potential waterborne transmission of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 20: 326-333.
- Bonilla-Lemus, P., Ramírez-Bautista, G.A., Zamora-Muñoz, C., Ibarra-Montes, M.R., Ramírez-Flores, E., Hernández-Martínez, M.D. 2010. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Exp Parasitol*, 126: 54-58.
- Booton, G.C., Carmichael, J.R., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Fuerst, P.A. 2003. Genotyping of *Balamuthia mandrillaris* based on nuclear 18S and mitochondrial 16S rRNA genes. *Am J Trop Med Hyg*, 68: 65-69.
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., Neviani, E. 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73: 485-494.

- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J.A., Valdezate, S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29: 601-608.
- Bragança, S.M., Azevedo, N.F., Simoes, L.C., Keevil, C.W., Vieira, M.J. 2007. Use of fluorescent *in situ* hybridisation for the visualisation of *Helicobacter pylori* in real drinking water biofilms. *Water Sci Technol*; 55: 387–393.
- Bravo, F.C., Alvares, P.J., Gotuzzo, E. 2011. *Balamuthia mandrillaris* infection of the skin and central nervous system: an emerging disease of concern to many specialties in medicine. *Curr Opin Infect Dis*, 24: 112-117.
- Bravo, F.C., Seas, C. 2012. *Balamuthia mandrillaris* amoebic encephalitis: an emerging parasitic infection. *Curr Infect Dis Rep*, 14: 391-396.
- Bronsdon, M.A., Goodwin, C.S., Sly, L.I., Chilvers, T., Schoenknecht, F.D. 1991. *Helicobacter nemestrinae* sp. nov., a spiral bacterium found in the stomach of a pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). *Int J Syst Bacteriol*, 41: 148-153.
- Brooke, J.S. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 25: 2-41.
- Bui, X.T., Winding, A., Qvortrup, K., Wolff, A., Bang, D.D., Creuzenet, C. 2012. Survival of *Campylobacter jejuni* in co-culture with *Acanthamoeba castellanii*: role of amoeba-mediated depletion of dissolved oxygen. *Environ Microbiol*, 14: 2034-2047.
- Bunn, J., MacKay, W.G., Thomas, J.E., Reid, D.C., Weaver, L.T. 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 450-454.
- Buse, H.Y., Ji, P., Gomez-Alvarez, V., Pruden, A., Edwards, M.A., Ashbolt, N.J. 2017. Effect of temperature and colonization of *Legionella pneumophila* and *Vermamoeba vermiformis* on bacterial community composition of copper drinking water biofilms. *Microb Biotechnol*, 10: 773–788.
- Buse, H.Y., Lu, J., Struewing, I.T., Ashbolt, N.J. 2013. Eukaryotic diversity in premise drinking water using 18S rDNA sequencing: implications for health risks. *Environ Sci Pollut Res Int*, 20: 6351-6366.

C

- Calduch-Broseta, J.V., Segarra-Soria, M.M., Colomina-Avilés, J., Llorca-Ferrandiz, C., Pascual-Pérez, R. 2003. Sepsis por *Vibrio cholerae* no-01 en paciente inmunodeprimida. *An Med Interna (Madrid)*, 20: 630-632.

- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7: 335-336.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*, 6: 1621-1624.
- Cappelier, J.M., Besnard, V., Roche, S.M., Velge, P., Federighi, M. 2007. Avirulent viable but non-culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Vet Res*, 38: 573-583.
- Cardenas, V.M., Mulla, Z.D., Ortiz, M., Graham, D.Y. 2006. Iron deficiency and *Helicobacter pylori* infection in the United States. *Am J Epidemiol*, 163: 127-134.
- Carini, P., Marsden, P.J., Leff, J.W., Morgan, E.E., Strickland, M.S., Fierer, N. 2016. Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nat Microbiol*, 2: 16242.
- Casper, T., Basset, D., Leclercq, C., Fabre, J., Peyron-Raison, N., Reynes, J. 1999. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a patient with AIDS: response to 5-fluorocytosine therapy. *Clin Infect Dis*, 29: 944-945.
- Cellini, L. 2014. *Helicobacter pylori*: a chameleon-like approach to life. *World J Gastroenterol*, 20: 5575-5582.
- Cellini, L., Grande, R., Artese, L., Marzio, L. 2010. Detection of *Helicobacter pylori* in saliva and esophagus. *New Microbiol*, 33: 351-357.
- Cellini, L., Robuffo, I., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Taraborelli, T., Dainelli, B. 1998. Recovery of *Helicobacter pylori* ATCC43504 from a viable but non culturable state: regrowth or resuscitation?. *APMIS*, 106: 571-579.
- Cengiz, A.M., Harmis, N., Stapleton, F. 2000. Co-incubation of *Acanthamoeba castellanii* with strains of *Pseudomonas aeruginosa* alters the survival of amoeba. *Clin Exp Ophthalmol*, 28: 191-193.
- Chavatte, N., Lambrecht, E., Van Damme, I., Sabbe, K., Houf, K. 2016. Abundance, diversity and community composition of free-living protozoa on vegetable sprouts. *Food Microbiol*, 55: 55-63.
- Chey, W.D., Leontiadis, G.I., Howden, C.W., Moss, S.F. 2017. ACG clinical guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, 112: 212-239.

- Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun*, 65: 3759–3767.
- Clesceri, L., Greeneberg, A., Trussell, R. 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 1ª edición. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid, España.
- Codony, F., Pérez, L.M., Adrados, B., Agustí, G., Fittipaldi, M., Morató, J. 2012. Amoeba-related health risk in drinking water systems: could monitoring of amoebae be a complementary approach to current quality control strategies? *Future Microbiol*, 7: 25-31.
- Collado, L., Jara, R., González, S. 2014. Description of *Helicobacter valdiviensis* sp. nov., an Epsilonproteobacteria isolated from wild bird faecal samples. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64:, 1913-1919.
- Collier, J. 2016. Cell cycle control in Alphaproteobacteria. *Curr Opin Microbiol*, 30: 107-113.
- Comeau, A.M., Douglas, G.M., Langille, M.G. 2017. Microbiome Helper: a custom and streamlined workflow for microbiome research. *mSystems*, 2: pii: e00127-16.
- Cook, K.L., Bolster, C.H. 2007. Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *J Appl Microbiol*, 103: 573–583.
- Correa, P., Piazuolo, M.B. 2008. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis*, 40: 490-496.
- Corsaro, D., Feroldi, V., Saucedo, G., Ribas, F., Loret, J.F., Greub, G. 2009. Novel Chlamydiales strains isolated from a water treatment plant. *Environ Microbiol*, 11: 188-200.
- Corsaro, D., Pages, G.S., Catalan, V., Loret, J.F., Greub, G. 2010. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int J Hyg Environ Health*, 213: 158-166.
- Costa, K., Bacher, G., Allmaier, G., Domínguez-Bello, M.G., Engstrand, L., Falk, P., de Pedro, M.A., García-del Portillo, F. 1999. The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall. *J Bacteriol*, 181: 3710-3715.
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielińska, M. 2016. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World J Microbiol Biotechnol*, 32: 66.

D

- Da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H.B., Marciano-Cabral, F. 2009. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009: 251406.
- Danon, S.J., Lee, A. 2001. Other gastric Helicobacters and spiral organisms. En Mobley, H.L.T., Mendz, G.L., Hazell, S.L. (Eds). *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. Washington, D.C., EE.UU: ASM Press.
- De Bentzmann, S., Plésiat, P. 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol*, 13: 1655-1665.
- De Jonckheere, J. F. 2014. What do we know by now about the genus Naegleria?. *Exp Parasitol*, 145 Suppl: S2-S9.
- Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., Héchard, Y. 2013. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res*, 47: 6958-6965.
- Denet, E., Coupat-Goutaland, B., Nazaret, S., Pélandakis, M., Favre-Bonté, S. 2017. Diversity of free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. *Parasitol Res*, 116: 3151-3162.
- Denoncourt, A.M., Paquet, V.E., Charette, S.J. 2014. Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Front Microbiol*, 5: 240.
- Dewhirst, F.E., Seymour, C., Fraser, G.J., Paster, B.J., Fox, J.G. 1994. Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 44: 553-560.
- Di Rienzi, S.C., Sharon, I., Wrighton, K.C., Koren, O., Hug, L.A., Thomas, B.C., Goodrich, J.K., Bell, J.T., Spector, T.D., Banfield, J.F., Ley, R.E. 2013. The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to Cyanobacteria. *Elife*, 2: e01102.
- Dobrowsky, P.H., Khan, S., Cloete, T.E., Khan, W 2016. Molecular detection of *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* and *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis* as vectors for *Legionella* spp. in untreated and solar pasteurized harvested rainwater. *Parasit Vectors*, 9: 539.
- Dolan, B., Burkitt-Gray, L., Shovelin, S., Bourke, B., Drumm, B., Rowland, M., Clyne, M. 2018. The use of stool specimens reveals *Helicobacter pylori* strain diversity in a cohort of adolescents and their family members in a developed country.
- Dominici, P., Bellentani, S., Biase, A.R., Saccoccio, G., Le Rose, A., Masutti, F., Viola, L., Balli, F., Tiribelli, C., Grilli, R., Fusillo, M., Grossi, E. 1999. Familial clustering of *Helicobacter pylori* infection: population based study. *BMJ*, 319: 537-540.

- Dore, M.P., Sepúlveda, A.R., Osato, M.S., Realdi, G., Graham, D.Y. 1999. *Helicobacter pylori* in sheep milk. *Lancet*, 354: 132.
- DOUE-L-1998-82174. DIRECTIVA 98/83/CE del consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. pp 32-54. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1998-82174> (consultado el 24/03/2018).
- Ducret, A., Chabaliere, M., Dukan, S. 2014. Characterization and resuscitation of “non-culturable” cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiology*, 14: 3.
- Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*, 10: 720-741.
- Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P., Ménard-Szczebara, F., Oberti, S., Rodier, M.H., Soreau, S., Wallet, F., Héchar, Y. 2011. Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res*, 45: 1087-1094.

E

- Eaton, K.A., Dewhirst, F.E., Radin, M.J., Fox, J.G., Paster, B.J., Krakowka, S., Morgan, D.R. 1993. *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. *Int J Syst Bacteriol*, 43: 99-106.
- El-Sharouny, E., El-Shazli, H., Olama, Z. 2015. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in some Egyptian water systems and its incidence of transmission to individuals. *Iran J Public Health*, 44: 203-210.
- Emerson, J.B., Adams, R.I., Román, C.M.B., Brooks, B., Coil, D.A., Dahlhausen, K., Ganz, H.H., Hartmann, E.M., Hsu, T., Justice, N.B., Paulino-Lima, I.G., Luongo, J.C., Lymperopoulou, D.S., Gomez-Silvan, C., Rothschild-Mancinelli, B., Balk, M., Huttenhower, C., Nocker, A., Vaishampayan, P., Rothschild, L.J. 2017. Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems.
- EPA. 2009. Fact Sheet: Final Third Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL 3) https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-09/documents/fact_sheet_final_third_ccl.pdf. (consultado el 07/07/2018).
- Epstein, S., López-García, P. 2008. “Missing” protists: a molecular prospective. *Biodivers Conserv*, 17: 261-276.
- Escobar, M.L., Kawakami, E. 2004. Evidence of mother-child transmission of *Helicobacter pylori* infection. *Arq Gastroenterol*, 41: 239-244.

- Espigares, M., Pérez, J.A. 1985. Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. Capítulo 1. Aguas Residuales, su composición. Ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada.
- Ettinger, M.R., Webb, S.R., Harris, S.A., McIninch, S.P., Garman, G.C., Brown, B.L. 2003. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol Res*, 89: 6-15.
- Eusebi, L.H., Zagari, R.M., Bazzoli, F. 2014. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter, Suppl 1*: 1-5.
- Everhart, J.E., Kruszon-Moran, D., Pérez-Pérez, G.I., Tralka, T.S., McQuillan, G. 2000. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States *J Infect Dis*, 181: 1359-1363.

F

- Fallone, C.A., Chiba, N., van Zanten, S.V., Fischbach, L., Gisbert, J.P., Hunt R.H., Jones, N.L., Render, C., Leontiadis, G.I., Moayyedi, P., Marshall, J.K. 2016. The Toronto consensus for the treatment of *Helicobacter pylori* Infection in adults. *Gastroenterology*. 151: 51-69.
- Falsafi, T. Valizadeh, N., Najafi, M., Ehsani, A., Khani, A., Landarani, Z., Falahi, Z. 2007. Culture of *Helicobacter pylori* from stool samples in children. *Can J Microbiol*, 53: 411-416.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2011. El estado de los recursos de tierras y aguas del mundo para la alimentación y la agricultura. La gestión de los sistemas en situación de riesgo. Londres/Roma, Earthscan/FAO.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Fernández, H., Villanueva, M.P., Medina, G. 2012. Endosimbiosis de *Arcobacter butzleri* en *Acanthamoeba castellanii*. *Rev Argent Microbiol*, 44: 133
- Fernández-Delgado, M., Giarrizzo, J.G., García-Amado, M.A., Contreras, M., Salazar, V., Barton, H., Suárez, P. 2016. Evidence of *Helicobacter* spp. in freshwaters from Roraima Tepui, Guayana Shield, South America. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109: 529-542.
- Fernández-Tilapa, G., Axinecuilteco-Hilera, J., Giono-Cerezo, S., Martínez-Carrillo D.N., Illades-Aguilar, B., Román-Román, A. 2011. vacA genotypes in oral cavity and

- Helicobacter pylori* seropositivity among adults without dyspepsia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 16: 175-180.
- Fittipaldi, M., Nocker, A., Codony, F. 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods*, 91: 276-289.
- Ford, A.C., Axon, A.T. 2010. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter*, 15 (Suppl. 1): 1-6.
- Fouque, E., Trouilhé, M.C, Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.H., Héchard, Y. 2012. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoeba. *Eukariotic Cell*, 11: 382-387.
- Fox, J.G., Boutin, S.R., Handt, L.K., Taylor, N.S., Xu, S., Rickman, B., Marini, R.P., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Motzel, S., Klein, H.J. 2007. Isolation and characterization of a novel *Helicobacter* species, "*Helicobacter macacae*," from rhesus monkeys with and without chronic idiopathic colitis. *J Clin Microbiol*, 45: 4061-4063.
- Fox, J.G., Chien, C.C., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Shen Z., Melito, P.L., Woodward, D.L. Rodgers, F.G. 2000. *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an exemple of an emerging pathogen. *J Clin Microbiol*, 38: 2546-2549.
- Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Tully, J.G., Paster, B.J., Yan, L., Taylor, N.S., Collins Jr., M.J., Gorelick, P.L., Ward, J.M. 1994. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol*, 32: 1238-1245.
- Fox, J.G., Shen, Z., Xu, S., Feng, Y., Dangler, C.A., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Cullen, J.M. 2002. *Helicobacter marmotae* sp. nov. isolated from livers of woodchucks and intestines of cats. *J Clin Microbiol*, 40: 2513-2519.
- Fox, J.G., Taylor, N.S., Howe, S., Tidd, M., Xu, S., Paster, B.J., Dewhirst, F.E. 2006. *Helicobacter anseris* sp. nov. and *Helicobacter brantae* sp. nov., isolated from feces of resident Canada geese in the greater Boston area. *Appl Environ Microbiol*, 72: 4633-4637.
- Fox, J.G., Yan, L.L., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Shames, B., Murphy, J.C., Hayward, A., Belcher, J.C., Mendes, E.N. 1995. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *J Clin Microbiol*, 33: 445-454.
- Franklin, C.L., Beckwith, C.S., Livingston, R.S., Riley, L.K., Gibson, S.V., Besch-Williford, C.L. Hook Jr., R.R. 1996. Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. *J Clin Microbiol*, 34: 2952-2958.

- Franklin, C.L., Gorelick, P.L., Riley, L.K., Dewhirst, F.E., Livingston, R.S., Ward, J.M., Beckwith, C.S., Fox, J.G. 2001. *Helicobacter typhlonius* sp. nov., a novel murine urease-negative *Helicobacter* species. *J Clin Microbiol*, 39: 3920-3926.
- Friedland, L.R., Raphael, S.A., Deutsch, E.S., Johal, J., Martyn, L.J., Visvesvara, G.S., Lischner, H.W. 1992. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J*, 11: 404-407.
- Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Seyedirashti, S., Bergeron, D.L., Lindquist, T.D. 1993. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol* 31: 1122–1126.
- Fritzinger, A.E., Marciano-Cabral, F. 2004. Modulation of a "CD59-like" protein in *Naegleria fowleri* amoebae by bacteria. *J Eukaryot Microbiol*, 51: 522-528.
- Fuchs, B.M., Syutsubo, K., Ludwig, W., Amann, R. 2001. *In situ* accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 67: 961-968.
- Fuerst, P.A., Booton, G.C., Crary, M. 2015. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol*, 62: 69-84.

G

- Gad, A.H. 2017. Cataloguing the bacterial community of the Great Salt Plains, Oklahoma using 16S rRNA based metagenomics pyrosequencing. *Genom Data*, 12: 54-57.
- García, A., Goñi, P., Cieloszyk, J., Fernández, M.T., Calvo-Beguería, L., Rubio, E., Fillat, M.F., Peleato, M.L., Clavel, A. 2013. Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ Sci Technol*, 47: 3132-3140.
- García, A., Goñi, P., Clavel, A., Lobez, S., Fernandez, M.T., Ormad, M.P. 2011. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. *Environ Microbiol Rep*, 3: 622-626.
- García, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., Abu Kwait, Y. 2007. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol*, 9: 1267-1277.

- Gautam, P.L., Sharma, S., Puri, S., Kumar, R., Midha, V., Bansal, R. 2012. A rare case of survival from primary amebic meningoencephalitis. *Indian J Crit Care Med*, 16: 34-36.
- Gaze, W.H., Burroughs, N., Gallagher, M.P., Wellington, E.M. 2003. Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microb Ecol*, 46: 358-369.
- Gellatly, S.L., Hancock, R.E. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*, 67: 159-173.
- Gelman, B.B., Popov V, Chaljub, G., Nader, R., Rauf, S.J., Nauta, H.W., Visvesvara, G.S. 2003. Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62: 990-998.
- Gelman, B.B., Rauf, S.J., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., Nauta, H.W., Visvesvara, G.S. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA*: 285: 2450-2451.
- Ghenghesh, K.S., Ahmed, S.F., El-Khalek, R.A., Al-Gendy, A., Klena, J. 2008. *Aeromonas*-associated infections in developing countries. *J Infect Dev Ctries*, 2: 81-98.
- Gisbert, J.P., Molina-Infante, J., Amador, J., Bermejo, F., Bujanda, L., Calvet, X., Castro-Fernández, M., Cuadrado-Lavín, A., Elizalde, J.I, Gene, E., Gomollón, F., Llanas, Á., Martín de Argila, C., Mearin, F., Montoro, M., Pérez-Aisa, Á., Pérez-Trallero, E., McNicholl, A.C. 2016. IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Hepatol*. *Gastroenterol Hepatol*, 39: 697-721.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25: 386-401.
- Gomes, T.d.S., Magnet, A., Izquierdo, F., Vaccaro, L., Redondo, F., Bueno, S., Sánchez, M.L., Angulo, S., Fenoy, S., Hurtado, C., Del Aguila, C. 2016. *Acanthamoeba* spp. in contact lenses from healthy individuals from Madrid, Spain. *PLoS One*, 11: e0154246. doi:10.1371/journal.pone.0154246
- Goodwin, C., Armstrong, A.J. 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol*, 9: 1-13.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnell, W., Harper, W.E.S. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. *Int J Syst Bacteriol*, 39: 397-405.

- Gordon, A. 2009. FASTX-Toolkit: FASTQ/A short-reads pre-processing tools. Cold spring harbor laboratory, cold spring harbor, NY. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/ (consultado el 05/04/2018).
- Gordon, G., Adam, L., Bubnis, B. 1995. Minimizing chlorate ion formation. *J Am Water Work Ass*, 87: 97-106.
- Gourabathini P., Brandl, M.T., Redding, K.S., Gunderson, J.H., Berk, S.G. 2008. Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol*, 74: 2518-2525.
- Gourmelon, M., Cillard, J., Pommepuy, M. 1994. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J Appl Bacteriol*, 77: 105–112.
- Graham, D.Y., Lu, H., Yamaoka, Y. 2009. African, Asian or Indian enigma, the East Asian *Helicobacter pylori*: facts or medical myths. *J Dig Dis*, 10: 77-84
- Graham, D.Y., Malaty, H.M., Evans, D.G., Evans Jr., D.J., Klein, P.D., Adam, E. 1991. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. *Gastroenterology*, 100: 1495-1501.
- Greub, G., Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*, 17: 413-433.
- Griffin, J.I. 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecologic interactions and flagellate-empty habitat hypothesis. *J Protozool*, 30: 403-409.

H

- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E.M., Troedsson, C. 2014. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS One*, 9: e87624.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68: 669–685.
- Hänninen, M.L., Happonen, I., Saari, S., Jalava, K. 1996. Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *Int J Syst Bacteriol*, 46: 160-166.
- Harper, C.G., Feng, Y., Xu, S., Taylor, N.S., Kinsel, M., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Greenwell, M., Levine, G., Rogers, A., Fox, J.G. 2002. *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *J Clin Microbiol*, 40: 4536-4543.

- Heggie, T.W. 2010. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med Infect Dis*, 8: 201-206.
- Heinz, E., Kolarov, I., Kastner, C., Toenshoff, E.R., Wagner, M., Horn, M. 2007. An *Acanthamoeba* sp. containing two phylogenetically different bacterial endosymbionts. *Environ Microbiol* 9: 1604–1609.
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F. 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J*, 5: 1571-1579.
- Höcker, M., Hohenberger, P. 2003. *Helicobacter pylori* virulence factors – one part of a big picture. *Lancet*, 362: 1231-1233.
- Hong, P.Y., Hwang, C., Ling, F., Andersen, G.L., LeChevallier, M.W., Liu, W.T. 2010. Pyrosequencing analysis of bacterial biofilm communities in water meters of a drinking water distribution system. *Appl Environ Microbiol*, 76: 5631-5635.
- Hong, S., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S., Epstein, S.S. 2009. Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME J*, 3: 1365–1373.
- Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y., Underwood, F.E., Tanyngoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D.Y., Wong, V.W.S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., Ng, S.C. 2017. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 153: 420-429.
- Howe, A.T., Bass, D., Scoble, J.M., Lewis, R., Vickerman, K., Arndt, H., Cavalier-Smith, T. 2011. Novel cultured protists identify deep-branching environmental DNA clades of cercozoa: New Genera *Tremula*, *Micrometopion*, *Minimassisteria*, *Nudifila*, *Peregrinia*. *Protist*, 162: 332-372.
- Hsueh, T.Y., Gibson, K.E. 2015. Transfer of *Acanthamoeba* spp. to fresh produce from water and environmental surfaces. *Lett Appl Microbiol*, 61: 192-198.
- Hu, M., Wang, X., Wen, X., Xia, Y. 2012. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresour Technol*, 117: 72-79.
- Hu, S., Jin, D., Lu, S., Liu, S., Zhang, J., Wang, Y., Bai, X., Xiong, Y., Huang, Y., Xu, H., Wang, Y., Du, X., Ye, C., Hanninen, M. L., Xu, J. 2015. *Helicobacter himalayensis* sp. nov. isolated from gastric mucosa of *Marmota himalayana*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65: 1719-1725.
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., HERNSDORF, A.W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D.A., Finstad, K.M., Amundson, R., Thomas, B.C., Banfield, J.F. 2016. A new view of the tree of life. *Nat Microbiol*, 1: 16048.

- Hugenholtz, P., Pace, N.R. 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol*, 14: 190–197.
- Hultén, K., Enroth, H., Nyström, T., Engstrand, L. 1998. Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *J Appl Microbiol*, 85: 282-286.

I

- IARC *Helicobacter pylori* Working Group. 2014. *Helicobacter pylori* Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC Working Group Reports, No. 8).
- Illumina, Inc. 2017. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- Ingerson-Mahar, M., Reid, A. 2012. MIP. Microbes in pipes. The microbiology of water distribution system. A report on an American academy of microbiology colloquium. Boulder, Colorado.
- Itahashi, M., Higaki, S., Fukuda, M., Mishima, H., Shimomura, Y. 2011. Utility of real-time polymerase chain reaction in diagnosing and treating *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*, 30: 1233-1237.

J

- Jalava, K., Kaartinen, M., Utriainen, M., Happonen, I., Hänninen, M.L. 1997. *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. *Int J Syst Bacteriol*, 47: 975-982.
- Jeon, K.W., Jeon, M.S. 1976. Endosymbiosis in amoebae: recently established endosymbionts have become required cytoplasmic components. *J Cell Physiol*, 89: 337-344.
- Jeon, K.W., Lorch, I.J. 1967. Unusual intra-cellular bacterial infection in large, free-living amoebae. *Exp Cell Res*, 48: 236–240.
- Jiang, X., Doyle, M.P. 2000. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 38: 1984-1987.
- Johnson, C.H., Rice, E.W., Reasoner, D.J. 1997. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Appl Environ Microbiol*, 63: 4969-4970.

- Joosten, M., Lindén, S., Rossi, M., Tay, A.C.Y., Skoog, E., Padra, M., Peters, F., Perkins, T., Vandamme, P., Van Nieuwerburgh, F., D'Herde, K., Van den Broeck, W., Flahou, B., Deforce, D., Ducatelle, R., Marshall, B., Haesebrouck, F., Smet, A. 2016. Divergence between the highly virulent zoonotic pathogen *Helicobacter heilmannii* and its closest relative, the low-virulence "*Helicobacter ailurogastricus*" sp. nov. *Infect Immun*, 84: 293–306.
- Josephson, K.L., Gerba, C.P., Pepper, I.L. 1993. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 9: 3513–3515.
- Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group. 2012. Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research. *PLoS One*, 7: e39315.

K

- Kalyuzhnaya, M.G., Lapidus, A., Ivanova, N., Copeland, A.C., McHardy, A.C., Szeto, E., Salamov, A., Grigoriev, I.V., Suciú, D., Levine, S.R., Markowitz, V.M., Rigoutsos, I., Tringe, S.G., Bruce, D.C., Richardson, P.M., Lidstrom, M.E., Chistoserdova, L. 2008. High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities. *Nat Biotechnol*, 26: 1029-1034.
- Kana, B.D., Gordhan, B.G., Downing, K.J. Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E.E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G. Mizrahi, V. 2008. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol Microbiol*, 67: 672–684.
- Kawaguchi, K., Matsuo, J., Osaki, T., Kamiya, S., Yamaguchi, H. 2009. Prevalence of *Helicobacter* and *Acanthamoeba* in natural environment. *Lett Appl Microbiol*, 48: 465-471.
- Kawamura, Y., Tomida, J., Miyoshi-Akiyama, T., Okamoto, T., Narita, M., Hashimoto, K., Cnockaert, M., Vandamme, P., Morita, Y., Sawa, T., Akaike, T. 2016. Proposal of *Helicobacter canicola* sp. nov., previously identified as *Helicobacter cinaedi*, isolated from canines. *Syst Appl Microbiol*, 39: 307-312.
- Kelly, S.M., Pitcher, M.C., Farmery, S.M., Gibson, G.R. 1994 Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology*, 107: 1671–1674.
- Khan, A., Farooqui, A., Kazmi, S.U. 2012. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water of Karachi, Pakistan. *J Infect Dev Ctries*, 12: 251-255.

- Khan, N.A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev*, 30: 564-595.
- Khan, N.A. 2009. *Acanthamoeba*: biology and pathogenesis. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Khan, N.A. 2015. *Acanthamoeba*: biology and pathogenesis. Norfolk, Reino Unido. Caister Academic Press.
- Kiderlen, A.F., Laube, U. 2004. *Balamuthia mandrillaris*, an opportunistic agent of granulomatous amebic encephalitis, infects the brain via the olfactory nerve pathway. *Parasitol Res*, 94: 49-52.
- Kim, J., Lim, J., Lee, C. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol Adv*, 31: 1358-1373.
- Kimura, N. 2006. Metagenomics: access to unculturable microbes in the environment. *Microbes Environment*, 21: 201-215.
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., Schmidt, T.M. 2001. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res*, 29: 181-184.
- Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*, 8: 257-260.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acid Res*, 41: e1.
- Kogure, K., Simidu, U., Taga, H. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol*, 25: 415-420.
- Kong, H.H. 2009. Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol*, 47 (Suppl): S21-S28.
- Konturek, J.W. 2003. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J Physiol Pharmacol*, 54 (Suppl 3): 23-41.
- Kopylova, E., Noé, L., Touzet, H. 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28: 3211-3217.
- Köster, W., Egli, T., Ashbolt, N., Botzenhart, K., Burlion, N., Endo, T., Grimont, P., Guillot, E., Mabilat, C., Newport, L., Niemi, M., Payment, P., Prescott, A., Renaud, P., Rust, A. 2003. Analytical methods for microbiological water quality testing. Editado por: Dufour, A., Snozzi, M., Koster, W., Bartram, J., Ronchi, E., Fewtrell, L. Microbial safety of drinking water: Improving approaches and methods. Geneva: World Health Organization. IWA Publishing, London. 237-292.

- Krebs, S.J., Taylor, R.K. 2011. Nutrient-dependent, rapid transition of *Vibrio cholera* to coccoid morphology and expression of the toxin co-regulated pilus in this form. *Microbiology*, 157: 2942-2953.
- Król-Turmińska, K., Olender, A. 2017. Human infections caused by free-living amoebae. *Ann Agric Environ Med*, 24: 254-260.
- Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H., Harada, H. 2006. Improved *in situ* hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes. *Appl Environ Microbiol*, 72: 5311-5317.
- Kuiper, M.W., Valster, R.M., Wullings, B.A., Boonstra, H., Smidt, H., van der Kooij, D. 2006. Quantitative detection of the Free-Living Amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 72: 5750-5756.
- Kurokawa, M., Nukina, M., Nakanishi, H., Tomita, S., Tamura, T., Shimoyama, T. 1999. Resuscitation from the viable but nonculturable state of *Helicobacter pylori*. *Kansenshogaku Zasshi* 73: 15-19.

L

- Lasjerdi, Z., Niyayati, M., Haghighi, A., Zaeri, F., Nazemalhosseini-Mojarad E. 2011. First report of vannellidae amoebae (*Vannella* spp.) isolated from biofilm source. *Iran J Parasitol*, 6: 84-89.
- Lasken, R.S., McLean, J.S. 2014. Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. *Nat Rev Genet*, 15: 577-584.
- Lázaro, B., Cárcamo, J., Audicana, A., Perales, I., Fernández-Astorga, A. 1999. Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 65: 4677-4681.
- Le Calvez, T., Trouilhé, M.C., Humeau, P., Moletta-Denat, M., Frère, J., Héchard, Y. 2012. Detection of free-living amoebae by using multiplex quantitative PCR. *Mol Cel Probes*, 26: 116-120.
- Lee, A., Phillips, M.W., O'Rourke, J.L., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Fraser, G.J., Fox, J.G., Sly, L.I., Romaniuk, P.J., Trust, T.J., Kouprach, S. 1992. *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int J Syst Bacteriol*, 42: 27-36.
- Lee, X., Reimann, C., Greub, G., Sufrin, J., Croxatto, A. 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* toxin L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid inhibits growth and induces encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbes Infect*, 14: 268-272.

- Leung, W.K., Siu, K.L.K., Kwok, C.K.L., Chan, S.Y., Sung, R., Sung, J.J.Y. 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *Am J Gastroenterol*, 94: 2881-2884.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol*, 5: 258.
- Lienard, J., Croxatto, A., Prod'homme, G., Greub, G. 2011. *Estrella lausannensis*, a new star in the Chlamydiales order. *Microbes Infect*, 13: 1232-1241.
- Lim, J., Shin, S.G., Lee, S., Hwang, S. 2011. Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Front Environ Sci Eng China*, 5: 28-39.
- Liu, H., Rahman, A., Semino-Mora, C., Doi, S.Q., Dubois, A. 2008. Specific and sensitive detection of *H. pylori* in biological specimens by real-time RT-PCR and *in situ* hybridization. *PLoS ONE*, 3: e2689.
- Lleó, M.M., Benedetti, D., Tafi, M.C., Signoretto, C., Canepari, P. 2007. Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ Microbiol*, 9: 2313-2320.
- Logares, R., Sunagawa, S., Salazar, G., Cornejo-Castillo, F.M., Ferrera, I., Sarmiento, H., Hingamp, P., Ogata, H., de Vargas, C., Lima-Mendez, G., Raes, J., Poulain, J., Jaillon, O., Wincker, P., Kandels-Lewis, S., Karsenti, E., Bork, P., Acinas, S.G. 2014. Metagenomic 16S rDNA illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environ Microbiol*. 16: 2659-2671.
- Lorenzo-Morales, J., Cabello-Vílchez, A.M., Martín-Navarro, C.M., Martínez-Carretero, E., Piñero, J.E., Valladares, B. 2013a. Is *Balamuthia mandrillaris* a public health concern worldwide?. *Trends Parasitol*, 29: 483-488.
- Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Piñero, J.E., Valladares, B. 2013b. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide?. *Trends Parasitol*, 29: 181-187.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martínez, E., Valladares, B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water resources. *Parasitol Res*, 95: 273-277.
- Loret, J.F., Greub, G. 2010. Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health*, 213: 167-175.
- Luzza, F., Mancuso, M., Imeneo, M., Contaldo, A., Giancotti, L., Pensabene, L., Doldo, P., Liberto, M.C., Strisciuglio, P., Focà, A., Guandalini, S., Pallone, F. 2000. Evidence favoring the gastro-oral route in the transmission of *Helicobacter pylori* infection in children. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 12: 623-627.

Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*, 2: 1051-1060.

M

Magnet, A., Fenoy, S., Galván, A.L., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez-Vadillo, C., Del Aguila, C. 2013. A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Res*, 47: 6966-6972.

Magnet, A., Galván, A.L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez-Vadillo, C., Pérez-Irezábal, J., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G.S., da Silva, A.J., del Aguila, C. 2012. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Res*, 111: 383-392.

Mahmoudi, M.R., Taghipour, N., Eftekhar, M., Haghghi, A., Karanis, P. 2012. Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitol Res*, 110: 473-477.

Malinen, E., Kassinen, A., Rinttila, T., Palva, A. 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of detected faecal bacteria. *Microbiology*, 149: 269-277.

Marciano-Cabral, F., Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbio Rev*, 16: 272-307.

Marshall B.J., Warren R.J. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1: 1311-1315.

Marshall, B. 2002. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin Med*, 2: 147-152.

Marshall, B.J. 2001. One hundred years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease. En Mobley, H.L.T., Mendz, G.L., Hazell, S.L. (Eds). *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. Washington, D.C., EE.UU: ASM Press.

Marshall, B.J., Barrett, L.J., Prakash, C., McCallum, R.W., Guerrant, R.L. 1990. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, 99: 697-702.

Martínez, A.J., García, C.A., Halks-Miller, M., Arce-Vela, R. 1980B. Granulomatous amebic encephalitis presenting as a cerebral mass lesion. *Acta Neuropathol*, 51: 85-91.

Martínez, A.J., Visvesvara, G.S. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol*, 7: 583-598.

- Martín-Navarro, C.M., Lorenzo-Morales, J., Cabrera-Serra, M.G., Rancel, F., Coronado-Alvarez, N.M., Piñero, J.E., Valladares, B. 2008. The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *J Med Microbiol*, 57: 1399-1404.
- Maschio, V.J., Chies, F., Carlesso, A.M., Carvalho, A., Rosa, S.P., Van Der Sand, S.T., Rott, M.B. 2015a. *Acanthamoeba* T4, T5 and T11 isolated from mineral water bottles in southern Brazil. *Curr Microbiol*, 70: 6-9.
- Maschio, V.J., Corção, G., Rott, M.B. 2015b. Identification of *Pseudomonas* spp. as amoeba-resistant microorganisms in isolates of *Acanthamoeba*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 57: 81-83.
- Matin, A., Siddiqui, R., Jung, S.Y., Kim, K.S., Stins, M., Khan, N.A. 2007. *Balamuthia mandrillaris* interactions with human brain microvascular endothelial cells *in vitro*. *J Med Microbiol*, 56: 1110-1115.
- Mazari-Hiriart, M., Ponce-de-León, S, López-Vidal, Y., Islas-Macías, P., Amieva-Fernández, R.I., Quiñones-Falconi, F. 2008. Microbiological implications of periurban agriculture and water reuse in Mexico City. *PLoS One*, 3: e2305.
- McDaniels, A.E., Wymer, L., Rankin, C., Haugland, R. 2005. Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water. *Water Res*, 39: 4808-4816.
- McKillip, J.L., Jaykus, L.A., Drake, M. 1998. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 64: 4264-4268.
- McLean, J.S., Lombardo, M.J., Badger, J.H., Edlund, A., Novotny, M., Yee-Greenbaum, J., Vyahhi, N., Hall, A.P., Yang, Y., Dupont, C.L., Ziegler, M.G., Chitsaz, H., Allen, A.E., Yooshef, S., Tesler, G., Pevzner, P.A., Friedman, R.M., Nealson, K.H., Venter, J.C., Lasken, R.S. 2013. Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 110: E2390-2399.
- Medina, G., Flores-Martin, S., Fonseca, B., Otth, C., Fernandez, H. 2014. Mechanisms associated with phagocytosis of *Arcobacter butzleri* by *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res*, 113: 1933–1942.
- Mendes, E.N., Queiroz, D.M.M., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Moura, S.B., Fox, J.G. 1996. *Helicobacter trogontum* sp. nov., isolated from the rat intestine. *Int J Syst Bacteriol*, 46: 916-921.
- Mercier, C., Boyer, F., Bonin, A., Coissac, E., 2013. SUMATRA and SUMACLUSt: Fast and exact comparison and clustering of sequences. <http://metabarcoding.org/sumatra/> (consultado el 05/04/2018).

- Metcalf y Eddy, Inc. 2003. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4th Edition, McGraw-Hill, New York.
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11: 31-46.
- Michel, R., Müller, K.D., Hauröder, B., Zöller, L. 2006. Isolation of *Saccamoeba limax* simultaneously harboring both a *Chlamydia*-like endoparasite and a rod-shaped bacterium as endosymbionts. *Endocyt Cell Res* 17: 171–179.
- Mitchell, H.M., Rocha, G.A., Kaakoush, N.O., O'Rourke, J.L., Queiroz, D.M.M. 2014. The Family Helicobacteraceae. En: Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg
- Mladenova, I., Durazzo, M., Pellicano, R. 2006. Transmission of *Helicobacter pylori*: are there evidences for a fecal-oral route? *Minerva Med*, 97: 15–18.
- Momtaz, H., Dabiri, H., Souod, N., Gholami, M. 2014. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in cows, sheep, goats and human beings. *BMC Gastroenterol*, 14: 61.
- Montalbano Di Filippo, M., Santoro, M., Lovreglio, P., Monno, R., Capolongo, C., Calia, C., Fumarola, L., D'Alfonso, R., Berrilli, F., Di Cave, D. 2015. Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. *Int J Environ Res Public Health*, 12: 3417-3427.
- Moreno, Y., Ferrús, M.A. 2012. Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter*, 17: 327-332.
- Moreno, Y., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Jiménez, A., Hernández, J. 2003. Use of fluorescent *in situ* hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Res*, 37: 2251-2256.
- Moreno, Y., Ferrús, M.A., Medina, E., Jiménez, A., Martínez, M. Hernández, J. 2001. Direct detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples by *in situ* hybridization. *Clin Microbiol Infec*, 7: 1537.
- Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J.L., Jiménez, A., González, A., Ferrús, M.A. 2007. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res*, 41: 3490-3496.
- Mosteo, R., Ormad, M.P., Goñi, P., Rodríguez-Chueca, J., García, A., Clavel, A. 2013. Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities. *Water Sci Technol*, 68: 575-583.
- Moter, A., Göbel, U.B. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods*, 41: 85–112.

- Mousavi, S., Dehkordi, F.S., Rahimi, E. 2014. Virulence factors and antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from raw milk and unpasteurized dairy products in Iran. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 20: 51.
- Moyaert, H., Decostere, A., Vandamme, P., Debruyne, L., Mast, J., Baele, M., Ceelen, L., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. 2007. *Helicobacter equorum* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from horse faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57: 213-218.
- Murakawa, G.J., McCalmont, T., Altman, J., Telang, G.H., Hoffman, M.D., Kantor, G.R., Berger, T.G. 1995. Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature. *Arch Dermatol*, 131: 1291-1296.
- Murti, C.R., Shukla, O.P. 1984. Differentiation of pathogenic amoebae: encystation and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni*-a model. *J Biosci*, 6: 475-489.

N

- Napolitano, J.J., Colletti-Eggolt, C. 1984. Occurrence of amoebae on oak leaf lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*) and Boston lettuce (*L. sativa* var. *capitata*). *J Protozool*, 31: 454-455.
- Navas-Molina, J.A., Peralta-Sánchez, J.M., González, A., McMurdie, P.J., Vázquez-Baeza, Y., Xu, Z., Ursell, L.K., Lauber, C., Zhou, H., Song, S.J., Huntley, J., Ackermann, G.L., Berg-Lyons, D., Holmes, S., Caporaso, J.G., Knight, R. 2013. Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods Enzymol*, 531: 371-444.
- Nguyen, H.T., Le, V.Q., Hansen, A.A., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H. 2011. High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems. *FEMS Microbiol Ecol*, 76: 256-267.
- Nielsen, P.H., Mielczarek, A.T., Kragelund, C., Nielsen, J.L., Saunders, A.M., Kong, Y., Hansen, A.A., Vollertsen, J. 2010. A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Res*, 44: 5070-5088.
- Nilsson, H.O., Blom, J., Abu-Al-Soud, W., Ljungh, A.A., Andersen, L.P., Wadström, T. 2002. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, 68: 11-19.
- Niyayati, M., Lasjerdi, Z., Nazar, M., Haghighi, A., Nazemalhosseini-Mojarad, E. 2012. Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. *J Water Health*, 10: 140-146.

Nocker, A., Camper, A.K. 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol*, 72: 1997-2004.

O

Oliver, J.D. 2000a. The public health significance of viable but nonculturable bacteria, p. 277-299. En Colwell, R.R. y Grimes, D.J. (eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.

Oliver, J.D. 2000b. The viable but nonculturable state and cellular resuscitation, p. 723-730. Editado por Bell, C.R, Brylinsky, M., Johnson-Green, P. *Microbial biosystems: new frontiers*. Atlantic Canada Soc. *Microb Ecol*, Halifax, Canada.

Oliver, J.D. 2005a. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*, 43: 93-100.

Oliver, J.D. 2005b. Viable but nonculturable bacteria in food environments, p. 99-112. En Fratamico, P.M., Bhunia, A.K. y Smith, J.L. (eds.), *Food Borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press, Norfolk, U.K. (in press).

Oliver, J.D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 34: 415-425.

Olofsson, J., Axelsson-Olsson, D., Brudin, L., Olsen, B., Ellström, P. 2013. *Campylobacter jejuni* actively invades the amoeba *Acanthamoeba polyphaga* and survives within non digestive vacuoles. *PLoS One*, 8: e78873.

OMS. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf (consultado el 07/07/2018).

Oulas, A., Pavloudi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G.A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C., Iliopoulos, I. 2015. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform Biol Insights*, 9: 75-88.

Ovrutsky, A.R., Chan, E.D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., Falkinham, J.O., Iseman, M.D., Reynolds, P.R., McDonnell, G., Thomas, V. 2013. Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous *Mycobacteria* in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl Environ Microbiol*, 79: 3185-3192.

Owen, R.J. 1998. *Helicobacter*-species classification and identification. *Br Med Bull*, 54: 17-30.

P

- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv Microb Ecol*, 9: 1–55.
- Page, F.C. 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside, UK.
- Pammi, M., Liang, R., Hicks, J., Mistretta, T.A, Versalovic, J. 2013. Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*. *BMC Microbiol*: 13: 257.
- Papież, D., Konturek, P.C., Bielanski, W., Plonka, M., Dobrzanska, M., Kaminska, A., Szczyrk, U., Bochenek, A., Wierzchos, E. 2003. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Polish shepherds and their families. *Dig Liver Dis*, 35: 10-15.
- Park, M., Yun, S.T., Kim, M.S., Chun, J., Ahn, T.I. 2004. Phylogenetic characterization of *Legionella*-like endosymbiotic X-bacteria in *Amoeba proteus*: a proposal for 'Candidatus *Legionella jeonii*' sp. nov. *Environ Microbiol* 6: 1252–1263.
- Parkinson, A.J., Gold, B.D., Bulkow, L., Wainwright, R.B., Swaminathan, B., Khanna, B., Petersen, K.M., Fitzgerald, M.A. 2000. High prevalence of *Helicobacter pylori* in the Alaska native population and association with low serum ferritin levels in young adults. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 885-888.
- Parte, A.C. 2013. LPSN — list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 42 (Database issue): D613–D616.
- Paster, B.J., Lee, A., Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Tordoff, L.A., Fraser, G.J., O'Rourke, J.L., Taylor, N.S., Ferrero, R. 1991. Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol*, 41: 31-38.
- Patterson, M.M., Schrenzel, M.D., Feng, Y., Xu, S., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Thibodeau, S.A., Versalovic, J., Fox, J.G. 2000. *Helicobacter aurati* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species cultured from gastrointestinal tissues of Syrian hamsters. *J Clin Microbiol*, 38: 3722-3728.
- Peralta, M.L., Ayala, J.J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos (Free-living amoebae in humans). *Salud Uninorte. Barranquilla (Col)*, 25: 280-292.
- Percival, R., Chalmers, M., Embrey, M., Hunter, P.R., Sellwood, J., Wyn-Jones, P. 2004. Microbiology of waterborne disease. Elsevier, San Diego, CA.
- Percival, S.L., Thomas, J.G. 2009. Transmission of *Helicobacter pylori* and the role of water and biofilms. *J Water Health*, 7: 469-477.
- Pernin, P., Pélandakis, M., Rouby, Y., Faure, A., Siclet, F. 1998. Comparative recoveries of *Naegleria fowleri* amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol*, 64: 955-959.

- Phillips, C.A. 2001. Arcobacters as emerging human pathogens. *Food Control*, 12: 1-6.
- Pinto, D., Santos, M.A., Chambel, L. 2015. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Crit Rev Microbiol*, 41: 61-76.
- Piqueres, P., Moreno, Y., Alonso, J.L., Ferrús, M.A. 2006. A combination of direct viable count and fluorescent *in situ* hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability. *Res Microbiol*, 157: 345-349.
- Plonka, M., Bielanski, W., Konturek, S.J., Targosz, A., Sliwowski, Z., Dobrzanska, M., Kaminska, A., Sito, E., Konturek, P.C., Brzozowski, T. 2006. *Helicobacter pylori* infection and serum gastrin, ghrelin and leptin in children of Polish shepherds. *Dig Liver Dis*, 38: 91-97.
- PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). 2011. El enverdecimiento del derecho de aguas: La gestión de los recursos hídricos para los seres humanos y el medio ambiente. Nairobi, PNUMA.
- Prod'hom, G., Bille, J. 2017. Clinical conditions where precise identification of Coryneform bacteria is recommended. En *Infectious Diseases*. Eds Cohen, J., Powderly, W.G., Opal, S.M. Cuarta Edición. Elsevier Ltd.

Q

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41 (Database issue): D590-D596.
- Queralt, N., Araujo, R. 2007. Analysis of the survival of *H. pylori* within a laboratory-based aquatic model system using molecular and classical techniques. *Microbiol Ecol*, 54: 771-777.
- Qvarnstrom, Y., da Silva, A.J., Schuster, F.L., Gelman, B.B., Visvesvara, G.S. 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis*, 15: 1139-1142.
- Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G.S., Sriram, R., da Silva, A.J. 2006. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol*, 44:3589-3595.

R

- Rahman, M., Abd, H., Romling, U., Sandstrom, G., Möllby, R. 2008. *Aeromonas-Acanthamoeba* interaction and early shift to a viable but nonculturable state of *Aeromonas* by *Acanthamoeba*. *J Appl Microbiol*, 104: 1449-1457.
- Rasmussen, L.T., Labio, R.W., Gatti, L.L., Silva, L.C., Queiroz, V.F., Smith, M.A, Payão, S.L. 2010. *Helicobacter pylori* detection in gastric biopsies, saliva and dental plaque of Brazilian dyspeptic patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105: 326-330.
- Reyes-Batlle, M, Todd, C.D., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Cabello-Vilchez, A.M., González A.C., Córdoba-Lanús, E., Lindo, J.F., Valladares, B., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J. 2014. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res*, 113: 1383-1388.
- Reyes-Batlle, M., Wagner, C., López-Arencibia, A., Sifaoui, I., Martínez-Carretero, E., Valladares, B., Piñero J.E., Lorenzo-Morales, J. 2017. Isolation and molecular characterization of a *Naegleria* strain from a recreational water fountain in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Acta Parasitol*, 62: 265-268.
- Reyes-Batlle, M., Wagner, C., Zamora-Herrera, J., Vargas-Mesa, A., Sifaoui, I., González, A.C., López-Arencibia, A., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J. 2016a. Isolation of thermotolerant *Vermamoeba vermiformis* strains from water sources in Lanzarote Island, Canary Islands, Spain. *Acta Parasitol*, 61: 650-653.
- Reyes-Batlle, M., Wagner, C., Zamora-Herrera, J., Vargas-Mesa, A., Sifaoui, I., González, A.C., López-Arencibia, A., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J. 2016b. Isolation and molecular identification of *Vermamoeba vermiformis* strains from soil sources in El Hierro island, Canary Islands, Spain. *Curr Microbiol*, 73: 104-107.
- Richards, C.L., Buchholz, B.J., Ford, T.E., Broadaway, S.C., Pyle, B.H., Camper, A.K. 2011. Optimizing the growth of stressed *Helicobacter pylori*. *J Microbiol Methods*, 84: 174-182.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B.K., Gies, E.A., Dodsworth, J.A., Hedlund, B.P., Tsiamis, G., Sievert, S.M., Liu, W.T., Eisen, J.A., Hallam, S.J., Kyrpides, N.C., Stepanauskas, R., Rubin, E.M., Hugenholtz, P., Woyke, T. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499: 431-437.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 245: 154-160.

- Rivera, F., Bonilla, P., Ramirez, E., Calderon, A., Gallegos, E., Rodriguez, S., Ortiz, R., Hernandez, D. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in México City and its suburbs. *Water Air Soil Poll*, 74: 65-87.
- Robertson, B.R., O'Rourke, J.L., Vandamme, P., On, S.L.W., Lee, A. 2001. *Helicobacter ganmani* sp. nov., a urease-negative anaerobe isolated from the intestines of laboratory mice. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 1881-1889.
- Rodriguez, R. 2011. Use of fluorescence *in situ* hybridization technique to visualize microorganisms. *Salud UIS*, 43: 307-316.
- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol*, 20: 225-241.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4: e2584.
- Roszak, D.B., Grimes, D.J., Colwell, R.R. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can J Microbiol*, 30: 334-338.
- Rowbotham, T.J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*, 33: 1179-1183.
- Rude, R.A., Jackson, G.J., Bier, J.W., Sawyer, T.K., Risty, N.G. 1984. Survey of fresh vegetables for nematodes, amoebae, and *Salmonella*. *J Assoc Off Anal Chem*, 67: 613-615.
- Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J.E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J.F., Utterback, T., Rogers, Y.H., Falcón, L.I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguarte, L.E., Karl, D.M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M.R., Strausberg, R.L., Neilson, K., Friedman, R., Frazier, M., Venter, J.C. 2007. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biol*, 5: e77.
- Ryan, M., Hamilton, K., Hamilton, M., Haas, C.N. 2014. Evaluating the potential for a *Helicobacter pylori* drinking water guideline. *Risk Anal*, 34: 1651: 1662.

S

- Sandström, G., Saeed, A., Abd, H. 2010. *Acanthamoeba polyphaga* is a possible host for *Vibrio cholerae* in aquatic environments. *Exp Parasitol*, 126: 65-68.
- Santiago, P., Moreno, Y., Ferrús, M.A. 2015. Identification of viable *Helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques. *Helicobacter*, 20: 252-259.

- Sarma, K., Levasseur, P., Aristarkhov, A., Lee, J.T. 2010. Locked nucleic acids (LNAs) reveal sequence requirements and kinetics of Xist RNA localization to the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 22196-22201.
- Scheid, P. 2007. Mechanism of intrusion of a microsporidian-like organism into the nucleus of host amoebae (*Vannella* sp.) isolated from a keratitis patient. *Parasitol Res*, 101: 1097-1102.
- Scheikl, U., Sommer, R., Kirschner, A., Rameder, A., Schrammel, B., Zweimüller, I., Wesner, W., Hinker, M., Walochnik, J. 2014. Free-living amoebae (FLA) co-occurring with legionellae in industrial waters. *Eur J Protistol*, 50:422-429.
- Schuster, F.L., Dunnebacke, T.H., Booton, G.C., Yagi S., Kohlmeier, C.K., Glaser, C., Vugia, D., Bakardjiev, A., Azimi, P., Maddux-Gonzalez, M., Martinez, A.J., Visvesvara, G.S. 2003. Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. *J Clin Microbiol*, 41: 3175-3180.
- Schuster, F.L., Visvesvara, G.S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*, 34: 1001-1027.
- Sharpton, T.J. 2014. An introduction to the analysis of shotgun metagenómica data. *Front Plant Sci*, 16: 209.
- Sharpton, T.J., Riesenfeld, S.J., Kembel, S.W., Ladau, J., O'Dwyer, J.P., Green, J.L., Eisen, J.A., Pollard, K.S. 2011. PhylOTU: a high-throughput procedure quantifies microbial community diversity and resolves novel taxa from metagenomic data. *PLoS Comput Biol*, 7: e1001061.
- Shen, Z., Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Foltz, C.J., Yan, L., Shames, B., Perry, L. 1997. *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. *Int J Syst Bacteriol*, 47: 627-634.
- Shen, Z., Xu, S., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Pena, J.A., Modlin, I.M., Kidd, M., Fox, J.G. 2005. A novel enterohepatic *Helicobacter* species '*Helicobacter mastomyrinus*' isolated from the liver and intestine of rodents. *Helicobacter*, 10: 59-70.
- Siddiqui, R., Khan, N.A. 2008. *Balamuthia* amoebic encephalitis: an emerging disease with fatal consequences. *Microb Pathog*, 44: 89-97.
- Siddiqui, R., Khan, N.A. 2012. War of the microbial worlds: Who is the beneficiary in *Acanthamoeba*-bacterial interactions?. *Exp Parasitol*, 130: 311-313.
- Sifuentes, L.Y., Choate, B.L., Gerba, C.P., Bright, K.R. 2014. The occurrence of *Naegleria fowleri* in recreational waters in Arizona. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subs Environ Eng*, 49: 1322-1330.
- Signoretto, C., Lleò, M.M. Tafi, M.C., Canepari, P. 2000. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1953-1959.

- Simmons, J.H., Riley, L.K., Besch-Williford, C.L. Franklin, C.L. 2000. *Helicobacter mesocricetorum* sp. nov., a novel *Helicobacter* isolated from the feces of Syrian hamsters. *J Clin Microbiol*, 38: 1811-1817.
- Singer, E., Bushnell, B., Coleman-Derr, D., Bowman, B., Bowers, R.M., Levy, A., Gies, E.A., Cheng, J.F., Copeland, A., Klenk, H.P., Hallam, S.J., Hugenholtz, P., Tringe, S.G., Woyke, T. 2016. High-resolution phylogenetic microbial community profiling. *ISME J*, 10: 2020-2032.
- Smet, A., Flahou, B., D'Herde, K., Vandamme, P., Cleenwerck, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F. 2012. *Helicobacter heilmannii* sp. nov., isolated from feline gastric mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62: 299-306.
- Smith, C.D., 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: 805-812.
- Snelling, W.J., Stern, N.J., Lowery, C.J., Moore, J.E., Gibbons, E., Baker, C., Dooley, J.S. 2008. Colonization of broilers by *Campylobacter jejuni* internalized within *Acanthamoeba castellanii*. *Arch Microbiol*, 189: 175-179.
- Souaze, F., Ntodou-Thome, A., Tran, C.Y., Rostene, W, Forgez, P. 1996. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques*, 21: 280-285.
- Stanley, J., Linton, D., Burnens, A.P., Dewhirst, F.E., On, S.L.W., Porter, A., Owen, R.J., Costas, M. 1994. *Helicobacter pullorum* sp. nov.—genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology*, 140: 3441-3449.
- Stanley, J., Linton, D., Burnens, A.P., Dewhirst, F.E., Owens, R.J., Porter, A., On, S.L.W. Costas, M. 1993. *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J Gen Microbiol*, 139: 2495-2504.
- Stark, R.M., Gerwig, G.J., Pitman, R.S., Potts, L.F., Williams, N.A., Greenman, I.P., Hirst, T.R., Millar, M.R. 1999. Biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Lett Appl Microbiol*, 28: 121-126.
- Stratford, P., Griffiths. A.J. 1978. Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *J Gen Microbiol*, 108: 33-37.

T

- Tabatabaei, M. 2012. Application of molecular and cultural methods for identification of *Helicobacter* spp. in different animal sources. *Glob Vet*, 8: 292-297.
- Thomas, J.E., Gibson, B.R., Darboe, M.K., Dale, A., Weaver, L.T. 1992 *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet*, 340: 1194–1195

- Thomas, J.M., Ashbolt, N.J. 2011. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ Sci Technol*, 45: 860-869.
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., Lévi Y. 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol*, 97: 950-963.
- Thomas, V., Casson, N., Greub, G. 2006a. *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular *Chlamydiales* isolated from Seine river water using amoebal co-culture. *Environ Microbiol*, 8: 2125-2135.
- Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., Greub, G. 2006b. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol*, 72: 2428-2438.
- Thomas, V., Loret, J.F., Jousset, M., Greub, G. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol*, 10: 2728-2745.
- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.Y. 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev*, 34: 231-259.
- Thomsen, R., Nielsen, P.S., Jensen, T.H. 2005. Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes. *RNA*, 11: 1745-1748.
- Tirodimos, I., Bobos, M., Kazakos, E., Haidich, A.B., Dardavessis, T., Kostopoulos, I., Arvanitidou, M. 2014. Molecular detection of *Helicobacter pylori* in a large Mediterranean river, by direct viable count fluorescent *in situ* hybridization (DVC-FISH). *J Water Health*, 12: 868-873.
- Torno, M.S.Jr., Babapour, R., Gurevitch, A., Witt, M.D. 2000. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J Am Acad Dermatol*, 42: 351-354.
- Torres, J., Pérez-Pérez, G., Goodman, K.J., Atherton, J.C., Gold, B.D., Harris, P.R., Madrazo-de la Garza, A., Guarner, J., Muñoz, O. 2000. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res*, 31: 431-469.
- Torti, A., Lever, M.A., Jørgensen, B.B. 2015. Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Mar Genomics*, 24: 185-196.
- Tosetti, N., Croxatto, A., Greub, G. 2014. Amoebae as a tool to isolate new bacterial species, to discover new virulence factors and to study the host-pathogen interactions. *Microb Pathog*, 77: 125-130.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)*, 60: 399-405.

Tringe, S.G., Rubin, E.M. 2005. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nat Rev Genet*. 2005 Nov; 6: 805-814.

Turutoglu, H., Mudul, S. 2002. Investigation of *Helicobacter pylori* in raw sheep milk samples. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 49: 308-309.

U

UN DESA (Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas). 2011. World Urbanization Prospects: The 2011 Revision. Nueva York, Naciones Unidas.

V

Vaerewijck, M.J., Sabbe, K., Baré, J., Houf, K. 2011. Occurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce. *Int J Food Microbiol*, 147: 105-111.

Vaerewijck, M.J., Sabbe, K., Van Hende, J., Baré, J., Houf, K. 2010. Sampling strategy, occurrence and diversity of free-living protozoa in domestic refrigerators. *J Appl Microbiol*, 109: 1566-1578.

Vaerewijck, M.J.M., Baré, J., Lambrecht, E., Sabbe, K., Houf, K. 2014. Interactions of foodborne pathogens with free-living protozoa: potential consequences for food safety. *Compr Rev Food Sci F*, 13: 924-944.

Valasek, M.A., Repa, J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 29: 151-159.

Van den Bulck, K., Decostere, A., Baele, M., Vandamme, P., Mast, J., Ducatelle, R. Haesebrouck, F. 2006. *Helicobacter cynogastricus* sp. nov., isolated from the canine gastric mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56: 1559-1564.

Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C., Blokesch, M. 2016. An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *ISME J*, 10: 897-910.

Van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, 30: 418-426.

Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., de Ley, J. 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 41: 88-103.

- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Ho, D.P., Batstone, D.J., Tyson, G.W. 2014. Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Curr Opin Biotechnol*, 27: 55-64.
- Varela, A.R., Manaia, C.M. 2013. Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. *Environ Sci Pollut Res Int*, 20: 3550-3569.
- Villanueva, M.P., Medina, G., Fernández, H. 2016. *Arcobacter butzleri* survives within trophozoite of *Acanthamoeba castellanii*. *Rev Argent Microbiol*, 48: 105-109.
- Visvesvara, G.S., Martínez, A.J., Schuster, F.L., Leitch, G.J., Wallace, S.V., Sawyer, T.K., Anderson, M. 1990. Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J Clin Microbiol*, 28: 2750–2756.
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 50: 1-26.
- Visvesvara, G.S., Schuster, F.L., Martínez A.J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol*, 40: 504–514.

W

- Waite, D.W., Vanwonterghem, I., Rinke, C., Parks, D.H., Zhang, Y., Takai, K., Sievert, S.M., Simon, J., Campbell, B.J., Hanson, T.E., Woyke, T., Klotz, M.G., Hugenholtz, P. 2017. Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). *Front Microbiol*, 24: 8: 682.
- Walochnik, J., Wylezich, C., Michel, R. 2010. The genus *Sappinia*: history, phylogeny and medical relevance. *Exp Parasitol*, 126: 4-13.
- Wan, C.Y., De Wever, H., Diels, L., Thoeve, C., Liang, J.B., Huang, L.N. 2011. Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Res*, 45: 1129-1138.
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X., Ding, K. 2012. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Appl Environ Microbiol*, 78: 7042-7047.
- Wang, X.F., Wang, K.X. 2004. Cloning and expression of *vacA* gene fragment of *Helicobacter pylori* with coccoid form. *J Chin Med Assoc*, 67: 549-556.
- Watson, C.L., Owen, R.J., Said, B., Lai, S., Lee, J.V., Surman-Lee, S., Nichols, G. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *J Appl Microbiol*, 97: 690-698.

- Wengel, J., Petersen, M., Frieden, M., Koch, T. 2003. Chemistry of locked nucleic acids (LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties. *Lett Pept Sci*, 10: 237-253.
- White, C.I., Birtles, R.J., Wigley, P., Jones, P.H. 2010. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing. *Vet Rec*, 166: 401–402.
- Williams, K.P., Gillespie, J.J., Sobral, B.W., Nordberg, E.K., Snyder, E.E., Shallom, J.M., Dickerman, A.W. 2010. Phylogeny of gammaproteobacteria. *J Bacteriol*, 192: 2305-2314.
- Wingender, J., Flemming, H.C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ*, 214: 417-423.
- Winiiecka-Kusnell, J., Wreiber, K., von Euler, A., Engstrand, L., Linder, E. 2002. Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis*, 34: 253-256.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22: 130-138.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 51: 221-271.
- Wong, H.C, Wang, P. 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J Appl Microbiol*, 96: 359–366.
- Wong, M.L., Medrano, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39: 75-85.
- Wroblewski, L.E., Peek, Jr., R.M., Wilson, K.T. 2010. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*, 23: 713, 739.
- Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N.N., Kunin, V., Goodwin, L., Wu, M., Tindall, B.J., Hooper, S.D., Pati, A., Lykidis, A., Spring, S., Anderson, I.J., D'haeseleer, P., Zemla, A., Singer, M., Lapidus, A., Nolan, M., Copeland, A., Han, C., Chen, F., Cheng, J.F., Lucas, S., Kerfeld, C., Lang, E., Gronow, S., Chain, P., Bruce, D., Rubin, E.M., Kyrpides, N.C., Klenk, H.P., Eisen, J.A. 2009. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature*, 462: 1056-1060.
- WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas). 2016. Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo 2016: Agua y Empleo. París, UNESCO.
- WWAP (World Water Assessment Programme). 2012. The United Nations World Water Development Report 4: Managing Water under Uncertainty and Risk. París, UNESCO.

Wylie, K.M., Truty, R.M., Sharpton, T.J., Mihindukulasuriya, K.A., Zhou, Y., Gao, H., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Pollard, K.S. 2012. Novel bacterial taxa in the human microbiome. *PLoS One* 7: e35294.

X

Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., Colwell, R.R. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol*, 8: 313-323.

Y

Yahaghi, E., Khamesipour, F., Mashayekhi, F., Dehkordi, F.S., Sakhaei, M.H., Masoudimanesh, M., Khameneie, M.K. 2014. *Helicobacter pylori* in vegetables and salads: genotyping and antimicrobial resistance properties. *Biomed Res Int*, 2014: 757941.

Yang, B., Wang, Y., Qian, P.Y. 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17: 135.

Yang, Q, Zwick, M.G., Paule M.R. 1994. Sequence organization of the *Acanthamoeba* rRNA intergenic spacer: identification of transcriptional enhancers. *Nucleic Acids Res*, 22: 4798–4805.

Yáñez, M.A., Barberá, V.M., Soria, E., Catalán, V. 2009. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the *cag* pathogenicity island gene, *cagE*. *J Appl Microbiol*, 107: 416-424.

Yeoh, Y.K., Sekiguchi, Y., Parks, D.H., Hugenholtz, P. 2016. Comparative genomics of candidate phylum TM6 suggests that parasitism is widespread and ancestral in this lineage. *Mol Biol Evol*, 33: 915-927.

Yousuf, F.A., Siddiqui, R., Khan, N.A. 2013. *Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Parasit Vectors*, 6: 169.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*, 89: 670-679.

Z

- Zamora, A., Henderson, H., Swiatlo, E. 2014. *Acanthamoeba* encephalitis: a case report and review of therapy. *Surg Neurol Int*, 5: 68.
- Zanoni, R.G., Piva, S., Florio, D., Bassi, P., Mion, D., Cnockaert, M., Luchetti, A., Vandamme, P. 2016. *Helicobacter apri* sp. nov., isolated from wild boars *Int J Syst Evol Microbiol*, 66: 2876-2882.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A. 2014a. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30: 614-620.
- Zhang, M., Liu, W., Nie, X., Li, C., Gu, J., Zhang, C. 2012a. Molecular analysis of bacterial communities in biofilms of a drinking water clearwell. *Microbes Environ*, 27: 443-448.
- Zhang, Y., Riley, L.K., Lin, M., Hu, Z. 2012b. Determination of low-density *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* suspensions in water. *Water Res*, 46: 2140-2148.
- Zhang, Y., Sievert, S.M. 2014b. Pan-genome analyses identify lineage- and niche-specific markers of evolution and adaptation in Epsilonproteobacteria. *Front Microbiol*, 5: 110.
- Zhou, X., Elmoose, J., Call, D.R. 2007. Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*). *Environ Microbiol*, 9: 913-922.
- Zou, Q.H., Li, R.Q. 2011. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric mucosa: a meta-analysis. *J Oral Pathol Med*, 40: 317-324.

ANEXOS

ANEXO A: MEDIOS DE CULTIVO

ANEXO A.1: MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS

Agar Sangre de Caballo (ASC)

- Base de Agar Selectivo para *Campylobacter* exento de sangre (Merk Millipore, ref. 100070)

Composición (g/l):

Agar Selectivo para *Campylobacter* 40

- 10% de Sangre Desfibrinada de Caballo (Oxoid, ref. SR0050C)

Agar Sangre Piruvato (ASP)

- Base de Agar Selectivo para *Campylobacter* exento de sangre (Merk Millipore, ref. 100070)

Composición (g/l):

Agar Selectivo para *Campylobacter* 40

- 10% de Sangre Desfibrinada de Caballo (Oxoid, ref. SR0050C)
- 0,025% de Piruvato de Sodio (Fisher, ref. BP356-100)

Agar Dent (ADent)

- Base de BBL™ Brucella Broth (BD, ref. 211088)

Composición (g/l):

Agar Selectivo para *Campylobacter* 40

- 10% de Sangre Desfibrinada de Caballo (Oxoid, ref. SR0050C)
- *Helicobacter pylori* Suplemento Selectivo "Dent" (Oxoid, ref. SR0147E)

Cada vial suplementa 500 ml de medio.

Composición por vial (mg/0,5l):

Vancomicina	5
Lactato de trimetoprin	2,5
Cefsulodín	2,5
Anfotericina	2,5

Non Nutrient Agar Page (NNAP)

- Agar Bacteriológico Europeo (Conda, ref, 1800)

Composición (g/l):

Agar 15

Se disuelve el Agar Bacteriológico Europeo en PAGE, previamente preparado.

Plate Count

- Plate Count Agar (Sigma-Aldrich, ref, 70152)

Composición (g/l):

Agar 17,5

Se disuelve el Plate Count Agar en agua destilada

ANEXO A.2: CALDOS DE CULTIVO

Solución salina amébrica de Page (PAGE)

Composición (g/l):

Cloruro de calcio (NaCl)	1,2
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0,04
Hidrogenofosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄)	1,42
Dihidrogenofosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	1,36
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0,04

Caldo Peptone-Yeast Extract-Glucose (PYG)

- Peptone-Yeast Extract-Glucose para *Acanthamoeba* spp.

Composición (g/l):

Triptosa	20
Extracto de levadura (Difco)	2
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0,479
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0,059
Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O)	1
Sulfato férrico amónico (Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O)	0,0258
Fosfato de potasio, monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,34
Fosfato sódico, dibásico (Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O)	0,188
Glucosa	18

Se disuelven todos los ingredientes en un volumen de 1000ml a excepción del cloruro de calcio, que se añade mientras la solución se remueve con un agitador magnético.

Caldo Peptone-Yeast Extract-Glucose con antibióticos (PYG+A)

- Peptone-Yeast Extract-Glucose para *Acanthamoeba* spp.

Composición (g/l):

Triptosa	20
Extracto de levadura (Difco)	2
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0,479
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0,059
Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O)	1
Sulfato férrico amónico (Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O)	0,0258
Fosfato de potasio, monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,34

Fosfato sódico, dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,188
Glucosa	18
• Antibióticos ($\mu\text{g/ml}$):	
Ampicilina	200
Estreptomina	200

Se disuelven todos los ingredientes en un volumen de 1000 ml a excepción del cloruro de calcio, que se añade mientras la solución se remueve con un agitador magnético.

Caldo DVC (DVC)

- Caldo BBL™ Brucella Broth (BD, ref. 211088)

Composición (g/l):

BBL™ Brucella Broth	28
---------------------	----

- 5% de Suero Fetal Bovino (PAA Laboratories)
- Novobiocina

Composición (mg/l):

Novobiocina	0,5
-------------	-----

ANEXO B: REACTIVOS Y SOLUCIONES

ANEXO B.1: GENERACIÓN DE MICROAEROFILIA

Sobres con mezclas generadoras de microaerofilia (CampyGen™, Oxoid ref. CN35)

Cuando se coloca un sobre en una jarra de 3,5 l y ésta se cierra, el oxígeno contenido en la misma es absorbido con rapidez mientras que simultáneamente se genera dióxido de carbono, produciendo las condiciones microaerófilas apropiadas. El componente activo de cada sobre es el ácido ascórbico.

ANEXO B.2: AISLAMIENTO

PBS 3X

Composición:

NaCl	22,8 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	4,1 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	5,3 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7,2	

PBS 1X: Diluir 3 veces el tampón PBS 3X en agua destilada. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO B.3: HIBRIDACIÓN *IN SITU* (FISH)

Fijación de las muestras

- PBS 1X
- Paraformaldehído (PFA): Calentar 65 ml de agua destilada hasta 60°C. Añadir 4 g de Paraformaldehído (Panreac, ref. 141451). Adicionar unas gotas de NaOH 5 M para ayudar a la disolución del polvo. Quitar de la fuente de calor y añadir 33 ml de PBS 3X. Ajustar el pH a 7,2 con ClH. Eliminar los posibles cristales mediante filtración y conservar a 4°C durante un máximo de 48 horas, o a -20°C durante varias semanas.
- Etanol absoluto

Gelatinización de los portaobjetos

Gelatina bacteriológica (Panreac, ref. 403902) 0,1%

Sulfato potásico cromato (Sigma ref. C-5926) 0,01%

Calentar previamente el agua destilada hasta 60°C. Añadir la gelatina y la sal de cromato y mantener calentando en agitación hasta la completa disolución. Atemperar la solución a unos 45°C y sumergir en ella los portaobjetos cubiertos con teflón (Marienfeld, ref. 9782100). Escurrir los portaobjetos y dejar secar al aire.

Deshidratación de las muestras

- **Etanol 50%:** 100 ml Etanol absoluto + 100 ml agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- **Etanol 80%:** 160 ml Etanol absoluto + 40 ml agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- **Etanol 100 %:** Reactivo etanol absoluto grado PRS. Guardar a temperatura ambiente y a 4°C para fijación.

Tampón de hibridación

NaCl 5M	360 µl (0,9M)
HCl-Tris 1M	40 µl (20 mM)
SDS 10%	2 µl (0,01%)
Formamida (SIGMA F-7503)	X µl (0-50%)
Agua milliQ	completar hasta 2 ml

Mezclar todos los componentes y añadir en último lugar el SDS 10%. Completar hasta 2 ml con agua milliQ y agitar.

Sondas (50 ng/µl)

Sonda para *Eubacterias*: **EUB338-I, EUB338-II, EUB338-III** (Tib Molbiol[®])

Sonda para *Helicobacter pylori*: **HPY-LNA** (Exiqon, EE.UU.)

Solución de lavado

NaCl 5M*	(9000-100 µl)
HCl-Tris 1M	1000 µl
SDS 10%	50 µl
EDTA 0.5M**	500 µl
Agua milliQ	completar hasta 50 ml

- * La concentración de NaCl depende de la concentración de formamida en el tampón de hibridación.

%Formamida (Tampón de hibridación)	µl de NaCl 0.5M (Tampón de lavado)
0	9000
10	4500
20	2150
30	1020
35	700
40	460

- ** Sólo se añade en caso de que el tampón de hibridación contenga un 20% de formamida o más.

1- NaCl 5M

Cloruro de sodio (NaCl)	292,2 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver el NaCl en 800 ml de agua destilada y ajustar el volumen hasta 1 litro. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración.

2- Tris-HCl 1M pH 8.0

Tris Base	121,1g
HCl	42 ml de HCl concentrado
Agua destilada	Hasta 1000 ml

Pesar el Tris Base y añadir a 800 ml de agua destilada. Añadir 42 ml de HCl concentrado y completar hasta 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y filtrar posteriormente.

3- SDS 10%

SDS	10 g
Agua destilada	Hasta 100 ml

Esterilizar por filtración.

4- EDTA 0.5M

EDTA·2H ₂ O	186,1 g
Agua destilada	Hasta 1000 ml

Pesar el EDTA y añadir a 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 con NaOH. Completar hasta 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y filtrar posteriormente.

Visualización al microscopio de epifluorescencia

- Antirrefractante (FluoroGuard™ Antifade Reagent, Bio-Rad)

ANEXO B.4: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**Reacción de amplificación**

- **dNTPs** (PCR Nucleotide Mix, Bioline ref. BIO-39028)
- **Taq polimerasa, 5U/μl** (BIOTAQ DNA Polymerase, Bioline ref. 21039)
- **Tampón de reacción 10X:** (BIOTAQ DNA Polymerase, Bioline ref. 21039)

(NH ₄) ₂ SO ₄	160 mM
Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C)	670 mM
Estabilizador	0,1%

- **MgCl₂, 50mM** (BIOTAQ DNA Polymerase, Bionline ref. 21039)

- **Iniciadores**

- Iniciadores para *Helicobacter pylori*:

NOMBRE	CASA COMERCIAL
VacAF / VacAR	Tib Molbiol®

- Iniciadores para amebas:

NOMBRE	CASA COMERCIAL
Ami6F / Ami9R	Eurofins MWG Operon®
VahI560F / VahI730R	Tib Molbiol®
Amo1400F / Amo1540R	Tib Molbiol®

Electroforesis de DNA en gel de agarosa

- **Agarosa** (Agarose D-1 Medium EEO, Pronadisa ref. 8067)
- **Tampón TBE 1X** (Diluir 10 veces en agua destilada el Tampón TBE 10X Fisher, Spain ref. BP1333-1)
- **GelRed™** (Biotium, EEUU ref. 41002)

Pesar la cantidad deseada de agarosa según el tamaño del gel y disolver en el tampón TBE 1X. Llevar a ebullición, agitar y atemperar a 50°C. Seguidamente, adicionar el 0,01% de GelRed™, según el tamaño del gel empleado. Una vez solidificado, colocar en el tanque electroforético.

- **Tampón de carga** (6X Loading Dye Solution, Fermentas ref. R0611)

Azul de bromofenol 1%	2,5 ml
Ficoll	2,5 g
EDTA 0,5M	1 ml
H ₂ O	4 ml
pH 8	

- **Marcador de pesos moleculares** (M100-1000, Blirt, Polonia)

ANEXO C: TABLA DE RESULTADOS DE AISLAMIENTO DE FLA E IDENTIFICACIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* DENTRO DE FLA EN AGUAS RESIDUALES, AGUAS POTABLES Y LECHUGAS

Resultados de las muestras de agua residual

Nº DE MUESTRA	ID DE MUESTRA	LUGAR DE MUESTREO	PRESENCIA DE FLA	<i>H. pylori</i> PMA-qPCR	<i>H. pylori</i> DVC-FISH	<i>H. pylori</i> CULTIVO
1	R1	2º	+	+	-	-
2	R2	3º	+	-	+	-
3	R3	2º	+	+	+	-
4	R4	3º	+	-	-	-
5	R5	2º	-	N/A	N/A	N/A
6	R6	3º	+	-	-	-
7	R7	2º	+	-	-	-
8	R8	3º	+	-	-	-
9	R9	2º	+	-	-	-
10	R10	3º	-	N/A	N/A	N/A
11	R11	2º	+	-	-	-
12	R12	3º	-	N/A	N/A	N/A
13	R13	2º	+	+	+	-
14	R14	3º	+	+	+	-
15	R15	2º	+	-	+	+
16	R16	3º	+	+	-	-
17	R17	2º	-	N/A	N/A	N/A
18	R18	3º	+	+	-	-
19	R19	2º	-	N/A	N/A	N/A
20	R20	3º	+	+	-	-

Nº DE MUESTRA	ID DE MUESTRA	LUGAR DE MUESTREO	PRESENCIA DE FLA	<i>H. pylori</i> PMA-qPCR	<i>H. pylori</i> DVC-FISH	<i>H. pylori</i> CULTIVO
21	R21	2º	+	+	-	-
22	R22	3º	+	+	+	-
23	R23	2º	+	+	+	-
24	R24	3º	+	+	-	+
25	R25	2º	+	+	+	+
26	R26	3º	+	+	-	+
27	R27	2º	-	N/A	N/A	N/A
28	R28	3º	+	+	-	-
29	R29	2º	+	-	-	-
30	R30	3º	+	+	+	-
31	R31	2º	-	N/A	N/A	N/A
32	R32	3º	-	N/A	N/A	N/A
33	R33	2º	+	-	-	-
34	R34	3º	+	+	+	-
35	R35	2º	+	-	-	-
36	R36	3º	+	+	-	-
37	R37	2º	+	+	-	-
38	R38	3º	+	-	-	-
39	R39	2º	+	-	-	-
40	R40	3º	+	-	-	-
41	R41	2º	+	+	+	+
42	R42	3º	+	-	+	+
43	R43	2º	+	-	-	+
44	R44	3º	+	-	+	+
45	R45	2º	+	-	-	-
46	R46	3º	+	-	-	-

Nº DE MUESTRA	ID DE MUESTRA	LUGAR DE MUESTREO	PRESENCIA DE FLA	<i>H. pylori</i> PMA-qPCR	<i>H. pylori</i> DVC-FISH	<i>H. pylori</i> CULTIVO
47	R47	2º	+	+	-	-
48	R48	3º	+	+	-	-
49	R49	2º	-	N/A	N/A	N/A
50	R50	2º	+	-	-	-
51	R51	2º	-	N/A	N/A	N/A
52	R52	2º	+	-	-	-
53	R53	2º	+	+	-	+
54	R54	2º	+	-	-	-
55	R55	2º	+	-	-	-
56	R56	2º	-	N/A	N/A	N/A
57	R57	2º	+	+	-	-
58	R58	2º	+	-	+	-
59	R59	2º	+	-	-	-
60	R60	2º	+	-	-	-
61	R61	2º	-	N/A	N/A	N/A
62	R62	2º	-	N/A	N/A	N/A
63	R63	2º	+	+	-	+
64	R64	2º	-	N/A	N/A	N/A
65	R65	2º	+	+	-	-
66	R66	2º	+	+	+	-
67	R67	2º	+	+	-	-
68	R68	2º	+	+	+	-
69	R69	2º	+	+	-	-

Resultados de las muestras de agua potable

Nº DE MUESTRA	ID DE MUESTRA	PRESENCIA DE FLA	<i>H. pylori</i> PMA-qPCR	<i>H. pylori</i> DVC-FISH	<i>H. pylori</i> CULTIVO
70	P1	-	N/A	N/A	N/A
71	P2	-	N/A	N/A	N/A
72	P3	-	N/A	N/A	N/A
73	P4	+	+	+	-
74	P5	+	-	+	-
75	P6	-	N/A	N/A	N/A
76	P7	-	N/A	N/A	N/A
77	P8	-	N/A	N/A	N/A
78	P9	-	N/A	N/A	N/A
79	P10	-	N/A	N/A	N/A
80	P11	-	N/A	N/A	N/A
81	P12	-	N/A	N/A	N/A
82	P13	-	N/A	N/A	N/A
83	P14	+	+	-	-
84	P15	-	N/A	N/A	N/A
85	P16	+	+	-	-
86	P17	-	N/A	N/A	N/A
87	P18	+	+	-	-
88	P19	-	N/A	N/A	N/A
89	P20	-	N/A	N/A	N/A
90	P21	+	+	+	-
91	P22	+	+	-	-
92	P23	+	+	+	-
93	P24	-	N/A	N/A	N/A

Nº DE MUESTRA	ID DE MUESTRA	PRESENCIA DE FLA	<i>H. pylori</i> PMA-qPCR	<i>H. pylori</i> DVC-FISH	<i>H. pylori</i> CULTIVO
94	P25	+	+	+	-
95	P26	+	+	-	-
96	P27	+	+	-	-
97	P28	-	N/A	N/A	N/A
98	P29	-	N/A	N/A	N/A
99	P30	-	N/A	N/A	N/A
100	P31	+	+	-	-

Resultados de las muestras de lechugas

Nº DE MUESTRA	ID DE MUESTRA	PRESENCIA DE FLA	<i>Acanthamoeba</i> spp. qPCR	<i>Vermamoeba vermiformis</i> qPCR	<i>H. pylori</i> PMA-qPCR	<i>H. pylori</i> DVC-FISH
1	L1	+	-	-	+	+
2	L2	+	-	-	+	-
3	L3	+	-	-	+	-
4	L4	+	-	-	-	-
5	L5	+	+	-	+	-
6	L6	+	+	-	+	-
7	L7	+	+	+	-	-
8	L8	+	+	-	+	+
9	L9	+	+	+	+	+
10	L10	+	+	+	+	-
11	L11	+	+	+	+	-
12	L12	+	-	+	+	+
13	L13	+	-	+	-	-
14	L14	+	+	+	+	+
15	L15	+	+	-	-	-
16	L16	+	+	+	-	-
17	L17	+	-	+	-	-
18	L18	+	+	+	-	-
19	L19	+	-	+	-	-
20	L20	+	+	+	-	-

ANEXO D: TABLA DE RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE FLA EN AGUAS RESIDUALES Y AGUAS POTABLES

AMEBA PURIFICADA	TIPO DE AGUA	IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PCR MÚLTIPLE	IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PCR 18S + SECUENCIACIÓN (homology %)
1	Agua residual	-	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (99%)
2	Agua residual	-	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (99%)
3	Agua residual	-	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (99%)
4	Agua residual	Mezcla de <i>Acanthamoeba</i> spp + Vahlkampfiidae	-
5	Agua residual	Mezcla de <i>Acanthamoeba</i> spp + Vahlkampfiidae	-
6	Agua residual	Vahlkampfiidae	-
7	Agua residual	-	<i>Cercozoa</i> spp. (98%)
8	Agua residual	-	<i>Naegleria</i> spp.(99%)
9	Agua residual	Vahlkampfiidae	-
10	Agua residual	Vahlkampfiidae	-
11	Agua residual	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-
12	Agua residual	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-
13	Agua residual	-	<i>Vannellidae</i> spp. (99%)
14	Agua residual	Fragmento de 100 pb sin identificar	-
15	Agua residual	Mezcla de <i>Acanthamoeba</i> spp + Vahlkampfiidae + fragmento de 100 pb sin identificar	-
16	Agua residual	-	<i>Acanthamoeba</i> spp. (80%)
17	Agua residual	Vahlkampfiidae	-
18	Agua residual	-	<i>Acanthamoeba tubiashi</i> (97%)
19	Agua residual	Mezcla de <i>Acanthamoeba</i> spp + Vahlkampfiidae	-
20	Agua residual	Mezcla de <i>Acanthamoeba</i> spp + Vahlkampfiidae	-
21	Agua residual	Mezcla de Vahlkampfiidae + unidentified fragment	-
22	Agua residual	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-
23	Agua residual	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-
24	Agua residual	-	<i>Acanthamoeba castellanii</i> (80%)
25	Agua residual	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-
26	Agua residual	Mezcla de <i>Acanthamoeba</i> spp + Vahlkampfiidae	-
27	Agua residual	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-
28	Agua residual	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-
29	Agua residual	-	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> (97%)
30	Agua residual	-	<i>Acanthamoeba tubiashi</i> (91%)
31	Agua residual	-	<i>Acanthamoeba tubiashi</i> (91%)
32	Agua potable	-	<i>Acanthamoeba</i> spp. (100%)
33	Agua potable	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-
34	Agua potable	-	<i>Acanthamoeba</i> spp. (99%) <i>Acanthamoeba mauritaniensis</i> (98%)
35	Agua potable	Sin amplificación	Sin amplificación
36	Agua potable	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-
37	Agua potable	<i>Echinamoeba</i> y/o <i>Vermamoeba</i>	-
38	Agua potable	<i>Echinamoeba</i> y/o <i>Vermamoeba</i>	-
39	Agua potable	<i>Acanthamoeba</i> spp.	-

