

INDICE GENERAL

Abreviaturas	
Resumen	I
Abstract - Resumen en Inglés	II
Resum – Resumen en Valenciano	III
Capítulo 1. ALCANCE Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
Capítulo 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	5
2.1. Contaminación del agua por microorganismos patógenos	6
2.2. El agua como vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas	7
2.3. <i>Helicobacter pylori</i> , patógeno acuático emergente	11
2.3.1. Antecedentes históricos y situación taxonómica actual	11
2.3.2. Morfología y características fisiológicas del género <i>Helicobacter</i>	14
2.3.2.1. Características de <i>Helicobacter pylori</i>	14
2.3.2.2. Factores de Patogenicidad de <i>H. pylori</i>	17
2.3.2.3. Transmisión de <i>H. pylori</i>	21
2.3.2.4. El agua como una fuente de transmisión de la infección por <i>H. pylori</i>	23
2.3.3. Estrategias de concentración de <i>H. pylori</i>	24
2.3.3.1. Centrifugación	24
2.3.3.2. Filtración	25
2.3.3.3. Separación Inmunomagnética (SIM)	25
2.3.4. Técnicas para la detección e identificación de <i>H. pylori</i> en aguas	27
2.3.4.1. Detección y aislamiento por cultivo	27

2.3.4.2.	Técnicas Moleculares	30
2.3.4.2.1.	Reacción en cadena de la polimerasa - PCR	30
2.3.4.2.2.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa - qPCR	32
2.3.4.2.3.	Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	38
Capítulo 3. OBJETIVOS		41
Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS		43
4.1.	CEPAS BACTERIANAS	44
4.1.1.	Condiciones de cultivo de las cepas de referencia	45
4.2.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	45
4.2.1.	Estaciones de muestreo – Plantas de Tratamiento de Agua Potable (PTAP)	45
4.2.1.1.	PTAP 1	45
4.2.1.2.	PTAP 2	46
4.2.1.3.	PTAP 3	46
4.2.2.	Toma de muestra	46
4.2.2.1.	Toma de muestra de Agua Potable	47
4.2.2.1.1.	Toma de muestras de 1000 y 500 mL de agua potable para análisis de coliformes totales, <i>E. coli</i> y esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor	47
4.2.2.1.2.	Toma de la muestra de agua potable utilizando el método del “hisopo de Moore”, para el análisis de <i>H. pylori</i>	48
4.2.2.2.	Toma de muestra de agua cruda, para análisis de coliformes totales, <i>E. coli</i> , esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor y <i>H. pylori</i>	48
4.3.	CONCENTRACIÓN DE <i>H. pylori</i> A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA	50
4.3.1.	Centrifugación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda	50

4.3.2.	Recuperación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua potable	50
4.3.3.	Concentración de <i>H. pylori</i> por separación inmunomagnética – SIM	50
4.4.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> por CULTIVO A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA	52
4.4.1.	Puesta a punto del método de cultivo para detección y determinación de la viabilidad de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua	52
4.4.2.	Metodología del cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua	54
4.4.2.1.	Cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda	54
4.4.2.2.	Cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua potable	55
4.4.3.	Identificación molecular de las colonias de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua.	57
4.5.	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA CRUDA Y POTABLE MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES - PCR, qPCR y FISH	57
4.5.1.	Puesta a punto de los métodos moleculares para la detección y genotipificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua	57
4.5.1.1.	Aislamiento del ADN genómico bacteriano a partir de muestras de agua	57
4.5.1.2.	Puesta a punto de la PCR convencional para detección y genotipificación de <i>H. pylori</i> en muestras de agua	58
4.5.2.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda y potable mediante PCR, qPCR y FISH	59
4.5.2.1.	Extracción de ADN genómico a partir de las muestras de agua	59
4.5.2.2.	Detección y genotipificación de <i>H. pylori</i> presente en el agua por PCR convencional mediante la amplificación de los genes <i>ureA</i> , <i>cagA</i> , <i>glmM</i> y <i>vacA</i>	60
4.5.2.3.	Confirmación de la presencia de <i>H. pylori</i> mediante secuenciación de los productos de PCR del gen <i>vacA</i> y análisis bioinformático	61

4.5.2.4.	Detección y cuantificación de <i>H. pylori</i> presente en el agua mediante la amplificación del gen <i>vacA</i> por qPCR	63
4.5.2.5.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	66
4.5.2.5.1.	Fijación de las muestras	67
4.5.2.5.2.	Hibridación <i>In situ</i>	67
4.6.	ANÁLISIS DE INDICADORES BACTERIANOS DE ORIGEN FECAL EN AGUAS	68
4.6.1.	Técnica de filtración por membrana para la cuantificación de coliformes totales y <i>E. coli</i> en aguas potables y crudas - ISO 9308-1 (2014)	69
4.6.2.	Técnica de filtración por membrana para la cuantificación de esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor en aguas potables y crudas - ISO 6461-2 (1986)	69
4.7.	Análisis de parámetros fisicoquímicos en aguas	70
4.8.	Análisis estadístico	70
Capítulo 5. RESULTADOS		72
5.1.	DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE <i>Helicobacter pylori</i> A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA	73
5.1.1.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda por cultivo	74
5.1.1.1.	Puesta a punto de la PCR convencional para la detección y genotipificación de <i>H. pylori</i>	77
5.1.1.2.	Identificación genotípica de los cultivos presentes en el agua cruda	79
5.1.2.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua potable por cultivo	89
5.1.2.1.	Identificación genotípica de los cultivos presentes en el agua potable	90
5.2.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de agua cruda y potable mediante métodos moleculares	99

5.2.1.	Detección de <i>H. pylori</i> en aguas crudas y potables por PCR convencional	99
5.2.2.	Caracterización genotípica y secuenciación de <i>H. pylori</i> en las tres plantas de potabilización estudiadas	101
5.2.2.1.	Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> en la PTAP 1	101
5.2.2.2.	Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> en la PTAP 2	103
5.2.2.3.	Caracterización genotípica de <i>H. pylori</i> en la planta PTAP 3	104
5.2.3.	Detección y cuantificación de <i>H. pylori</i> por qPCR	106
5.3.	Cuantificación de indicadores bacterianos de origen fecal en aguas crudas y potables	111
5.3.1.	Cuantificación de los Indicadores de contaminación fecal en agua cruda	111
5.3.2.	Cuantificación de los Indicadores de contaminación fecal en agua potable	115
5.4.	Análisis de parámetros fisicoquímicos en aguas crudas y potables	116
Capítulo 6. DISCUSIÓN		119
Capítulo 7. CONCLUSIONES		138
Capítulo 8. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES		141
Publicaciones y presentaciones en congresos		142
Bibliografía		144
Anexos		171