

INTRODUCCIÓN	2
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