

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Determinación del riesgo para el consumidor de la
presencia de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp.
patógenos en aguas de consumo mediante técnicas
moleculares y metagenómica.**

TESIS DOCTORAL DE:

Irene Hortelano Martín

Dirigida por:

Dra. Yolanda Moreno Trigos

Prof. M^a Antonia Ferrús Pérez

Valencia, noviembre, 2021.

Primero encontramos el sendero, después caminamos y encontramos piedras, con las cuales a medida que avanzamos, tropezamos. La marcha se vuelve lenta y dura, pero siempre acompañado de personas que te ayudan y te motivan para alcanzar el final.

En primer lugar, agradecer a mis directoras de Tesis, M^a Antonia Ferrús y Yolanda Moreno, por cruzarse en mi camino y brindarme la oportunidad de trabajar con ellas. Por su apoyo y confianza depositada en mi trabajo desde el primer día. Por su capacidad para guiarme, no solo en la realización de la tesis, sino también en mi formación como investigadora. Por transmitirme y demostrarme que se puede ser cada vez mejor en lo que uno hace.

Gracias a los miembros del departamento de Química y Microbiología del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente, por aceptarme como un miembro más. A José Luíís por transmitirme sus conocimientos y su pasión. por el mundo de la investigación. En especial a Inma, una gran persona y compañera, gracias por estar en todo momento, por tu total disponibilidad para ayudarme tanto profesional como personalmente cada día.

También me gustaría agradecer a todos los que me han acompañado en el camino, todos ellos han hecho esto posible. A Rut, Fidson, Paula Barbarroja, Laura, Jorge, Irene Cañigral, Andrés, Julián, Paula Santiago y todos aquellos que habéis pasado por el IIAMA. Gracias por todo lo que he aprendido de cada uno de ellos, por su apoyo, cariño y comprensión. En especial a Rut, mi pequeña compañera y gran amiga.

Finalmente me gustaría agradecer a mi familia, por su apoyo incondicional, y estar siempre. En especial a mis padres y a mi hermano, por su paciencia y constancia, por enseñarme que el camino no siempre es fácil pero que con trabajo y esfuerzo se consiguen los objetivos propuestos. Por sus ánimos y motivación en todo momento, incluso en aquellos en los que no entendían lo que les explicaba, lo que hacía o porque un bichito podía provocarme tanta frustración. Gracias por creer en mí. Este trabajo no hubiera sido posible sin vosotros y por ello os lo dedico.

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las ayudas para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral:

“Ayuda de conselleria para la contratación de personal investigador en formación -Irene Hortelano Martin (determinación del riesgo para el consumidor de la presencia de *H. pylori* y otros helicobacters patógenos en aguas de consumo mediante técnicas moleculares y metagenómica) (ACIF/2016/150) Generalitat Valenciana (2016-2019).

Y a la financiación de los proyectos:

“*Helicobacter pylori* y otros helicobacters patógenos en aguas y alimento: Desarrollo y aplicación de herramientas moleculares dirigidas a la evaluación del riesgo para el consumidor (REF. AGL2014-53875-R)”. Ministerio de Economía y Competitividad, España.

“Determinación del riesgo para la salud pública debido a la presencia de *H. pylori* en agua y alimentos: Detección (AICO/2018/273)”. Generalitat Valenciana (2018-2020).

RESUMEN

El agua es un recurso natural vital, que comprende todas las funciones humanas, sociales, económicas y ambientales y cuya cantidad en la tierra es limitada. Sin embargo, su uso se incrementa en función del crecimiento poblacional y el desarrollo económico, convirtiéndole en un recurso cuya escasez afecta a gran parte de la población mundial y cuya calidad se ve afectada por el aumento de vertidos incontrolados de aguas negras sin tratar, la escorrentía agrícola y las aguas residuales tratadas de manera inadecuada.

Debido a al requerimiento de fuentes de agua utilizables, el aumento de la población mundial y la continua expansión de la industria, la reutilización de las aguas residuales urbanas se plantea como alternativa sostenible para tener en cuenta en la gestión de los recursos hídricos.

Cada vez son más los países que están reutilizando el agua residual para la agricultura de regadío, garantizando así su disponibilidad de manera continuada, evitando la presión sobre las fuentes de agua dulce en regiones con escasez de agua y la sobreexplotación de aguas subterráneas. Sin embargo, la reutilización de aguas residuales requiere medidas de protección de la Salud Pública, siendo necesario un correcto tratamiento de estas aguas para evitar la transmisión de enfermedades.

De entre los patógenos emergentes presentes en agua, las bacterias del género *Helicobacter* son de las más alarmantes, ya que se encuentran directamente relacionadas con el cáncer gástrico y hepatobiliar y su epidemiología aún no está clara. Siendo *Helicobacter pylori*, la especie más conocida de este género.

La infección por *H. pylori* puede conducir a trastornos gastrointestinales, entre los que destacan gastritis, úlcera péptica, úlcera duodenal, cánceres gástricos y linfoma asociado con tejido linfático de la mucosa (MALT). Clasificada como agente biológico carcinógeno para el ser humano de categoría 1.

Se ha planteado que *H. pylori* puede ser adquirida por diferentes vías de transmisión, entre las que se destaca el agua. Se ha demostrado su capacidad de supervivencia frente a los tratamientos comunes de desinfección de aguas. Además, *H. pylori* tiene la competencia de formar

biopelículas insolubles, lo que favorece su resistencia a los diferentes tratamientos de desinfección y potabilización. La formación de biopelículas o su paso a un estado viable no cultivable se han sugerido como forma de supervivencia a largo plazo de *H. pylori* en el medio ambiente.

Por todo ello, en esta tesis se ha investigado la presencia de células viables, y por tanto infectivas, de *H. pylori* en aguas potables y de riego, mediante la mejora y la optimización de técnicas de cultivo y moleculares.

Este trabajo se inició con la búsqueda de un medio de cultivo óptimo para la detección, identificación y aislamiento de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas. Se obtuvieron resultados muy positivos con el medio de cultivo Agar Dent con sulfato de polimixina B, independientemente del origen de la muestra.

Seguidamente, se desarrolló un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células de *H. pylori* viables, por PCR. Se confirmó que el PMA a una concentración de 50 µM y un periodo de incubación de 5 minutos sería la metodología óptima de tratamiento antes del análisis mediante qPCR.

A continuación, se analizaron 20 muestras de agua residual, recogidas asépticamente en la salida del reactor biológico y después del tratamiento de desinfección. Se examinaron para la detección y cuantificación de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp. patógenos, mediante las técnicas moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR), PCR, Hibridación *In Situ* con Sondas Fluorescentes (FISH), FISH Combinado con Direct Viable Count (DVC-FISH), Secuenciación Masiva Dirigida (DAS) y la técnica de cultivo en placa.

Mediante la técnica de cultivo, a pesar de la microbiota acompañante, fue posible la detección de 4 colonias sospechosas de *Helicobacter* spp. y *H. pylori*, cuya identificación fue confirmada mediante amplificación y posterior secuenciación.

La técnica DVC-FISH indicó la presencia de células viables de *Helicobacter* spp. en 15 (75%) de las muestras, sin la obligación de un paso previo de enriquecimiento. Respecto a la detección de células de *H. pylori*, mediante DVC-FISH y FISH, estos microorganismos se observaron en 10 (50%) y

11 (55%) de las 20 muestras analizadas, respectivamente. La técnica qPCR determinó la presencia de *H. pylori* en las muestras, con un porcentaje de detección del 60%.

Finalmente, mediante metagenómica de secuenciación dirigida, se analizó el microbioma de 16 muestras de aguas residuales. Para ello, se determinaron *in silico* e *in vitro* los iniciadores HSF/HS2R, y una vez comprobada su idoneidad, se emplearon para la secuenciación de las muestras. La clase bacteriana más abundante en todas las muestras fue la Epsilonproteobacteria, como era esperable. Los filos dominantes de las muestras analizadas fueron Proteobacteria, seguido de Bacteroidetes y Firmicutes. *H. pylori* se detectó en 6 muestras de aguas residuales. Además, se detectaron otras especies de *Helicobacter* spp., como *H. hepaticus*, *H. pullorum* y *H. suis*.

Igualmente se evaluó y desarrollo un método para la detección de marcadores de virulencia y resistencia frente al metronidazol y amoxicilina de *H. pylori* en muestras ambientales. Mediante PCR se identificó el gen *cagA* en 5 muestras de agua residual y una de agua potable. Respecto al genotipo *vacAs1*, se observó en 4 muestras de agua residual; el genotipo *vacAm1*, se identificó en una muestra de agua potable y 2 de agua de riego. En las biopelículas analizadas, 2 fueron positivas para el tipo *vacAm1*, y otros dos para el gen de resistencia *pbp1A*.

Del mismo modo se analizaron 45 muestras de heces, tanto de forma directa como tras un enriquecimiento previo. No se observaron colonias sospechosas en Agar Dent selectivo a partir de la siembra directa de las muestras. Mediante qPCR se evidenció *H. pylori* en 41 muestras (45,56%). Fue posible cuantificar 10 muestras directas y 18 enriquecidas, con concentraciones entre $3,39 \cdot 10^3$ y $2,61 \cdot 10^3$ unidades genómicas/mL, las restantes presentaban niveles superiores al umbral de fiabilidad (>35 ciclos). Por DVC-FISH se observaron células viables de *H. pylori* en 26 (57,78%) de las 45 muestras directas.

La identificación de mutaciones en el 23S rDNA, de la resistencia a la claritromicina, mostró que el 37,79% de las muestras de heces presentaban células de *H. pylori* potencialmente resistentes.

Mediante secuenciación dirigida y posterior análisis bioinformático se identificó *H. pylori* en 13 muestras directas y 13 muestras enriquecidas, y otras especies como *H. hepaticus* y *H. pullorum*.

Por último, se evaluó la capacidad de *H. pylori* para formar biopelículas y su resistencia frente a los tratamientos comunes de desinfección. Se observó que elementos como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y el oxígeno pueden influir sobre el crecimiento de *H. pylori* formando parte de biopelículas. Del mismo modo las biopelículas de *H. pylori* resultaron resistentes al tratamiento con radiación UV e hipoclorito de sodio.

También se analizaron 27 biopelículas procedentes del sistema de distribución de agua potable para detectar la presencia de *H. pylori* mediante qPCR. El porcentaje de detección fue del 23%, siendo posible la cuantificación en 5 muestras, con concentraciones entre $7,32 \cdot 10^1$ y $1,16 \cdot 10^1$ unidades genómicas/mL.

Los resultados obtenidos en esta Tesis confirman la existencia de células viables de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp. en aguas residuales tras su tratamiento, lo que significa un riesgo potencial para la Salud Pública. De igual forma se demuestra su presencia en muestras de heces, proporcionando un punto de partida para el estudio del riesgo que puede suponer para el ser humano la transmisión fecal-oral de estas especies.

Este trabajo también demuestra la capacidad de *H. pylori* de formar biopelículas y su resistencia frente a tratamientos comunes de desinfección y confirma su existencia en sistemas de distribución de agua potable.

RESUMEN

L'aigua dolça és un recurs natural vital, que compren totes les activitats humanes, socials, econòmiques i ambientals i la quantitat de la qual a la terra és limitada. No obstant això, el seu ús s'incrementa en funció del creixement poblacional i el desenvolupament econòmic, convertint-la en un recurs l'escassetat del qual afecta gran part de la població mundial i la qualitat de la qual es veu afectada per l'augment d'abocaments incontrolats d'aigües negres sense tractar, l'escorrentia agrícola i les aigües residuals tractades de manera inadequada.

A causa de la creixent demanda de fonts d'aigua utilitzables, degut a l'augment de la població i la contínua expansió de la indústria, la reutilització de les aigües residuals urbanes es planteja com a alternativa sostenible a tindre en compte en la gestió dels recursos hídrics.

Cada vegada són més els països que estan reutilitzant l'aigua residual per a l'agricultura de regadiu, garantint així la seua disponibilitat de manera continuada, evitant la pressió sobre les fonts d'aigua dolça en regions amb escassetat d'aigua i la sobreexplotació d'aigües subterrànies. No obstant això, la reutilització d'aigües residuals requereix mesures de protecció de la Salut Pública, sent necessari un correcte tractament d'aquestes aigües amb la finalitat d'evitar la transmissió de malalties.

D'entre tots els patògens emergents presents en aigua, els bacteris del gènere *Helicobacter* són dels més alarmants, ja que es troben directament relacionats amb el càncer gàstric i hepatobiliar i la seua epidemiologia encara no és clara. L'espècie més coneguda d'aquest gènere és *Helicobacter pylori*.

La infecció per *H. pylori* pot conduir a trastorns gastrointestinals, entre els quals destaquen gastritis, úlcera pèptica, úlcera duodenal, càncers gàstrics i limfoma associat a teixit limfàtic de la mucosa (MALT). Classificat com a agent biològic cancerígen de categoria 1, per a humans.

S'ha plantejat que *H. pylori* es pot transmetre per diferents vies de transmissió, entre les quals destaca l'aigua. S'ha demostrat la seua capacitat de supervivència enfront dels tractaments comuns de desinfecció d'aigües. A més, *H. pylori* té la capacitat de formar biopel·lícules insolubles, la qual cosa afavoreix la seua resistència enfront dels diferents tractaments de desinfecció i

potabilització. La formació de biopel·lícules o el seu pas a un estat viable no cultivable s'han suggerit com a forma de supervivència a llarg termini d' *H. pylori* en el medi ambient.

Per tant, en aquesta tesi s'ha investigat la presència de cèl·lules viables, i per tant infectives, d' *H. pylori* en aigües potables i de reg, mitjançant la millora i l'optimització de tècniques de cultiu i moleculars.

Aquest treball es va iniciar amb la cerca d'un cultiu òptim per a la detecció, identificació i aïllament d' *H. pylori* en mostres ambientals i clíniques. Es van obtenir resultats molt positius amb el mitjà de cultiu Agar Dent amb sulfat de polimixina B, independentment de l'origen de la mostra.

Seguidament, es va desenvolupar un mètode de pretractament amb Propidium Monoazide i PEMAX™ per a la detecció i quantificació exclusiva de cèl·lules d' *H. pylori* viables per PCR. Es va confirmar que el PMA a una concentració de 50 µM i un període d'incubació de 5 minuts seria la metodologia òptima de tractament abans de l'anàlisi mitjançant qPCR.

A continuació, es van analitzar 20 mostres d'aigua residual, recollides asèpticament en l'eixida del reactor biològic i després del tractament de desinfecció. Es van estudiar per a la detecció i quantificació d' *H. pylori* i altres *Helicobacter* spp. patògens, mitjançant les tècniques moleculars Reacció en Cadena de la Polimerasa Quantitativa (qPCR), PCR, Hibridació In situ amb Sondes Fluorescents (FISH), FISH Combinat amb Direct Viable Count (DVC-FISH), Seqüenciació Massiva Dirigida (DAS) i la tècnica tradicional de cultiu en placa.

Mitjançant la tècnica de cultiu, malgrat la microbiota acompanyant, va ser possible la detecció de 4 colònies sospitoses d' *Helicobacter* spp. i *H. pylori*, la identificació de la qual va ser confirmada mitjançant amplificació i posterior seqüenciació.

La tècnica DVC-FISH va demostrar la presència de cèl·lules viables d' *Helicobacter* spp. en 15 (75%) de les mostres, sense necessitat d'un pas previ d'enriquiment. Respecte a la detecció de cèl·lules d' *H. pylori*, mitjançant DVC-FISH i FISH, aquests microorganismes es van observar en 10 (50%) i 11 (55%) de les 20 mostres analitzades, respectivament. La tècnica qPCR determinà la presència d' *H. pylori* a les mostres amb un percentatge de detecció del 60%.

Finalment, mitjançant metagenòmica de seqüenciació dirigida, es va analitzar el microbioma de 16 mostres d'aigües residuals. Per això, es van evaluar *in silico* i *in vitro* els iniciadors HSF/HS2R i, una vegada comprovada la seua idoneïtat, es van emprar per a la seqüenciació de les mostres. La classe bacteriana més abundant en totes les mostres va ser l'Epsilonproteobacteria, com era esperable. Els talls dominants de les mostres analitzades van ser Proteobacteria, seguit de Bacteroidetes i Firmicutes. *H. pylori* es va detectar mitjançant aquesta tècnica en 6 mostres d'aigües residuals. A més, es van detectar altres espècies d' *Helicobacter* spp., com *H. hepaticus*, *H. pullorum* i *H. suis*.

Igualment es va avaluar i desenvolupar un mètode per a la detecció de marcadors de virulència i resistència al metronidazol i amoxicil·lina d' *H. pylori* en mostres ambientals. Mitjançant la tècnica de PCR es va identificar el gen *cagA* en 5 mostres d'aigua residual i una d'aigua potable. Respecte al genotip *vacAs1*, es va observar en 4 mostres d'aigua residual; el genotip *vacAm1*, es va identificar en una mostra d'aigua potable i 2 d'aigua de reg. En les biopel·lícules analitzades, 2 van ser positives per al tipus *vacAm1*, i altres dos per al gen de resistència *pbp1A*.

De la mateixa manera es van analitzar 45 mostres de femta, tant de manera directa com després d'un enriquiment previ. No es van observar colònies sospitoses en Agar Dent selectiu a partir de la sembra directa de les mostres. Mitjançant la tècnica qPCR es va demostrar la presència d'*H. pylori* en 41 mostres (45,56%). Va ser possible quantificar 10 mostres directes i 18 enriquides, amb concentracions d'entre $3,39 \cdot 10^3$ i $2,61 \cdot 10^3$ unitats genòmiques/ml, les restants presentaven nivells per damunt del llindar de fiabilitat (>35 cicles). Mitjançant DVC-FISH es van observar cèl·lules viables d' *H. pylori* en 26 (57,78%) de les 45 mostres directes.

La detecció de mutacions en el 23S rDNA, específiques de la resistència a la claritromicina, va indicar que el 37,79% de les mostres de femta presentaven cèl·lules d' *H. pylori* potencialment resistents.

Mitjançant seqüenciació dirigida i posterior anàlisi bioinformàtica es va identificar *H. pylori* en 13 mostres directes i 13 mostres enriquides, i altres espècies com *H. hepaticus* i *H. pullorum*.

Finalment, es va avaluar la capacitat d' *H. pylori* per a formar biopel·lícules i la seua resistència enfront dels tractaments comuns de desinfecció. Es va observar que factors com la

disponibilitat de nutrients, la temperatura i l'oxigen poden influir sobre el creixement d' *H. pylori* formant part de biopel·lícules. De la mateixa manera, les biopel·lícules d' *H. pylori* van resultar resistents per al tractament amb radiació UV i hipoclorit de sodi.

També es van analitzar 27 biopel·lícules procedents del sistema de distribució d'aigua potable per a detectar la presència d' *H. pylori* mitjançant qPCR. El percentatge de detecció va ser del 23%, sent possible la quantificació en 5 mostres corresponents a concentracions d'entre $7,32 \cdot 10^1$ i $1,16 \cdot 10^1$ unitats genòmiques/ml.

Els resultats obtinguts en aquesta Tesi confirmen la presència de cèl·lules viables d' *H. pylori* i altres *Helicobacter* spp. en aigües residuals després del seu tractament, la qual cosa suposa un risc potencial per a la Salut Pública. D'igual forma, s'evidencia la seua presència en mostres de femta, proporcionant un punt de partida per a l'estudi del risc que la transmissió fecal-oral d'aquestes espècies pugui suposar per als humans.

Aquest treball també demostra la capacitat d' *H. pylori* de formar biopel·lícules i la seua resistència enfront als tractaments comuns de desinfecció, i confirma la seua presència en sistemes de distribució d'aigua potable.

ABSTRACT

Fresh water is a vital natural resource, that involves all human, social, economic, and environmental activities and whose quantity on earth is limited. However, its use is increasing as a function of population growth and economic development, making it a resource whose scarcity affects a large part of the world's population and whose quality is affected by the increase in uncontrolled discharges of untreated sewage, agricultural runoff, and inadequately treated wastewater.

Due to the increasing demand for usable water sources, due to the growing world population and the continuous expansion of industry, the reuse of urban wastewater is emerging as a possible alternative to be considered in water resources management.

Increasing numbers of countries are reusing wastewater for irrigated agriculture, thus ensuring its continuous availability, avoiding pressure on freshwater sources in water-scarce regions and the overexploitation of groundwater. However, the reuse of wastewater requires measures to protect public health, being necessary a correct treatment of these waters to avoid the transmission of diseases.

Among all the emergent pathogens in water, bacteria of the *Helicobacter* genus are among the most disturbing, as they are directly related to gastric and hepatobiliary cancer and their epidemiology is still unclear. The best-known species of this genus is *Helicobacter pylori*.

H. pylori infection can induce gastrointestinal disorders, including gastritis, peptic ulcer, duodenal ulcer, gastric cancers, and lymphoma associated with mucosal lymphoid tissue (MALT).

This species is classified as a category 1 biological carcinogenic agent for human's beings. It has been suggested that *H. pylori* can be acquired through different transmission routes, among which water stands out. Its ability to survive against common water disinfection treatments has been demonstrated. In addition, *H. pylori* can form insoluble biofilms, which favors its resistance to the different disinfection and potabilization treatments. The formation of biofilms or their transformation to a viable but non-culturable state has been suggested as a means of long-term survival of *H. pylori* in the environment.

Therefore, in this thesis has investigated the presence of viable cells, and therefore potentially infective, of *H. pylori* in drinking and irrigation waters, through the improvement and optimization of culture and molecular techniques.

This work began with the development of an optimal culture medium for the detection, identification, and isolation of *H. pylori* in environmental and clinical samples. Positive results were obtained with the culture medium Agar Dent with polymyxin B sulfate, regardless of the origin of the sample.

Subsequently, a pretreatment method with Propidium Monoazide and PEMAX™ was developed for the exclusive detection and quantification of viable *H. pylori* cells by PCR. It was confirmed that PMA at a concentration of 50 µM and an incubation period of 5 minutes, would be the optimal treatment methodology before analysis by qPCR.

A total of 20 wastewater samples, aseptically collected at the outlet of the biological reactor and after disinfection treatment, were then analyzed. Samples were tested for the detection and quantification of *H. pylori* and others pathogenic *Helicobacter* spp. using the molecular techniques: Polymerase Chain Reaction (PCR), Quantitative PCR (qPCR), Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH), Direct Viable Count method combined with FISH (DVC-FISH) and Deep-amplicon sequencing (DAS); and the traditional plate culture technique.

Using the culture technique, despite the presence of the accompanying microbiota, it was possible to detect 4 suspicious colonies of *Helicobacter* spp. and *H. pylori*, whose identification was confirmed by amplification and subsequent sequencing.

DVC-FISH technique demonstrated the presence of viable *Helicobacter* spp. cells in 15 (75%) of the samples, without the need for a previous enrichment step. Regarding the detection of *H. pylori* cells, by DVC-FISH and FISH, these microorganisms were observed in 10 (50%) and 11 (55%) of the 20 samples analyzed, respectively. The qPCR technique determined the presence of *H. pylori* in the samples with a detection rate of 60%.

Finally, using deep-amplicon sequencing, the microbiome of 16 wastewater samples was analyzed. For this purpose, HSF/HS2R primers were evaluated *in silico* and *in vitro* and, once their suitability was verified, they were used for sequencing the samples. As expected, the most abundant bacterial class in all samples was Epsilonproteobacteria. The dominant phylum in the samples analyzed were Proteobacteria, followed by Bacteroidetes and Firmicutes. *H. pylori* was detected by this technique in 6 wastewater samples. In addition, others *Helicobacter* spp., such as *H. hepaticus*, *H. pullorum* and *H. suis* were detected.

A method for the detection of virulence and resistance markers against metronidazole and amoxicillin of *H. pylori* in environmental samples was also evaluated and developed. PCR technique was used to identify the *cagA* gene in 5 wastewater samples and one drinking water sample. Regarding the *vacAs1* genotype, it was observed in 4 samples of wastewater; the *vacAm1* genotype, was identified in one drinking water sample and 2 irrigation water samples. In the biofilms analyzed, 2 were positive for the *vacAm1* type, and two for the resistance gene *pbp1A*.

Likewise, 45 stool samples were analyzed, both directly and after a previous enrichment. No suspicious colonies were observed on selective Dent Agar from direct plating of the samples. The qPCR technique demonstrated the presence of *H. pylori* in 41 samples (45.56%). It was possible to quantify 10 direct samples and 18 enriched samples, with concentrations between $3.39 \cdot 10^3$ and $2.61 \cdot 10^3$ genomic units/mL, the remaining samples had levels above the reliability threshold (>35 cycles). DVC-FISH showed viable *H. pylori* cells in 26 (57.78%) of the 45 direct samples.

Detection of 23S rDNA mutations specific for clarithromycin resistance indicated that 37.79% of stool samples had potentially resistant *H. pylori* cells.

Through Deep-amplicon sequencing and subsequent bioinformatics analysis, *H. pylori* was identified in 13 direct samples and 13 enriched samples, as well as other species such as *H. hepaticus* and *H. pullorum*.

Finally, the ability of *H. pylori* to form biofilms and their resistance to common disinfection treatments was evaluated. It was observed that factors such as nutrient availability, temperature

Abstract

and oxygen can influence the growth of *H. pylori* forming part of biofilms. *H. pylori* biofilms were also resistant to treatment with UV radiation and sodium hypochlorite.

Twenty-seven biofilms from the drinking water distribution system were also tested for the presence of *H. pylori* by qPCR. The detection rate was 23%, being possible the quantification in 5 samples corresponding to concentrations between $7.32 \cdot 10^1$ and $1.16 \cdot 10^1$ genomic units/mL.

The results obtained in this Thesis confirm the presence of viable cells of *H. pylori* and other *Helicobacter* spp. in wastewater after treatment, which poses a potential risk to public health. Likewise, their presence is evidenced in stool samples, providing a starting point for the study of the risk that the fecal-oral transmission of these species may pose to humans.

This work also demonstrates the ability of *H. pylori* to form biofilms and its resistance to common disinfection treatments and confirms its presence in drinking water distribution systems.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

ARTÍCULOS:

Irene Hortelano., Yolanda Moreno., Fidson Juarismi Vesga., María Antonia Ferrús. 2020. Evaluation of different culture media for detection and quantification of *H. pylori* in environmental and clinical samples. *Int Microbiol* 23: 481-487. Doi: 10.1007/s10123-020-00135-z.

Irene Hortelano., Yolanda Moreno., Laura Moreno-Mesonero., María Antonia Ferrús. 2020. Deep-amplicon sequencing (DAS) analysis to determine the presence of pathogenic *Helicobacter* species in wastewater reused for irrigation. *Environ Pollut* 264: 114768. Doi: 10.1016/j.envpol.2020.114768.

Irene Hortelano., Yolanda Moreno., Jorge García-Hernández., María Antonia Ferrús. 2021. Optimization of pre-treatments with Propidium Monoazide and PEMAX™ before real time quantitative PCR for detection and quantification of viable *Helicobacter pylori* cells. *J Microbiol Methods* 23. Doi: 10.1016/j.mimet.2021.106223.

CONGRESOS:

Hortelano, I., Moreno, Y., Pérez-Santoja, R., Ferrús, M.A. 2017. Evidence of *Helicobacter hepaticus* presence in wastewater by metagenomics. 7th Congress of European Microbiologists (FEMS). Valencia, Spain. 9-13 July 2017.

Moreno, Y., Hortelano, I., Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Alonso, J.L., Ferrús, M.A. 2018. Advanced metagenomic analysis to elucidate the role of reused water as a dissemination vehicle and possible reservoir of the emergent pathogen *Helicobacter*. Water JPI 2018 Conference. Helsinki, Finland. 6-7 June 2018.

Moreno, Y., Hortelano, I., Moreno-Mesonero, L., Ferrús, M.A. 2020. Study of *Helicobacter pylori* presence in drinking water systems biofilms. FEMS Online Conference on Microbiology 2020, October 28-31, 2020.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	47
1 ANTECEDENTES	1
2 CONTAMINACIÓN MICROBIANA DEL AGUA Y SALUD PÚBLICA	3
2.1 TRATAMIENTO DEL AGUA POTABLE	4
2.2 REUTILIZACIÓN DE AGUAS RESIDUALES TRATADAS	7
3 <i>Helicobacter pylori</i>	11
3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	12
3.2 SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL.....	13
3.3 MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>Helicobacter</i>	14
3.4 MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE <i>Helicobacter pylori</i>	15
3.5 ETIOPATOGENIA.....	16
3.6 FACTORES IMPLICADOS EN LA PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR <i>Helicobacter pylori</i>	18
3.6 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i>	23
3.7 TRATAMIENTO DE LA DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i> Y DESARROLLO DE RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS	24
3.8 EPIDEMIOLOGÍA.....	25
3.9 MODO DE TRANSMISIÓN	28
3.10 ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE (VBNC)	31

4	BIOPELICULAS.....	34
5	OTRAS ESPECIES PATÓGENAS DEL GÉNERO <i>Helicobacter</i>	38
6	METODOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i>	39
6.1	DETECCIÓN Y AISLAMIENTO POR CULTIVO.....	41
6.2	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	43
6.3	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR)	44
6.4	MODIFICACION DE LA TÉCNICA EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR) PARA DETECTAR ÚNICAMENTE DNA DE CÉLULAS VIABLES	46
6.5	HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS FLUORESCENTES: FISH Y DVC-FISH	48
6.6	ASOCIACIÓN DE LA TÉCNICA DIRECT VIABLE COUNT (DVC) A LA TÉCNICA FISH PARA DETECTAR ÚNICAMENTE DNA DE CÉLULAS VIABLES	51
6.7	METAGENÓMICA DE SECUENCIACIÓN DIRIGIDA.....	51
	OBJETIVOS	61
	CAPÍTULO I.....	65
	OPTIMIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>H. PYLORI</i> EN MUESTRAS AMBIENTALES Y CLÍNICAS.	65
1.1	OBJETIVO.....	67
1.2	MATERIALES Y MÉTODOS	68
1.2.1	CEPA DE REFERENCIA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO	68
1.2.2	MEDIOS DE CULTIVO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE <i>H. pylori</i>	68

1.2.3	EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	72
1.2.3.1	Tinción de <i>H. pylori</i> con SYTO9-PI	73
1.2.3.2	Inoculación de muestras ambientales y clínicas	73
1.3	RESULTADOS	77
1.4	DISCUSIÓN	81
CAPÍTULO 2.....		87
DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PRE-TRATAMIENTO CON PROPIDIUM MONOAZIDE Y PEMAX™ PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>.....		87
2.1	OBJETIVO.....	89
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
2.2.1	CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO	91
2.2.2	ESTUDIO DE VIABILIDAD, RECUENTO CELULAR Y ESTADO MORFOLÓGICO	91
2.2.3	PRE-TRATAMIENTO CON PMA Y PEMAX™	91
2.2.4	OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PRE-TRATAMIENTO CON PMA Y PEMAX™	92
2.2.5	EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE PMA, PEMAX™ Y UN TAMPÓN ESPECÍFICO COMBINADO CON PEMAX™ DESPUÉS DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	92
2.2.6	ESTUDIO DE LA EFICACIA DE PMA PARA DETECTAR DIFERENTES ESTADOS MORFOLÓGICOS VIABLES DE <i>H. pylori</i>	96
2.2.7	EXTRACCIÓN DE DNA	97

2.2.8	DETECCION E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR).....	97
2.2.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	99
2.3	RESULTADOS	100
2.3.1.	OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PRE-TRATAMIENTO CON PMA y PEMAX™	100
2.3.1.1	Determinación de la concentración óptima de ambos intercalantes.	100
2.3.2.	EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON PMA, PEMAX™ Y UN TAMPÓN ESPECÍFICO EN COMBINACIÓN CON PEMAX™ DESPUÉS DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	104
2.3.2.1	Exposición de <i>H. pylori</i> a etanol al 70%.....	104
2.3.2.2	Inactivación de las células de <i>H. pylori</i> con 100 ppm de hipoclorito de sodio.....	105
2.3.2.3	Tratamiento de <i>H. pylori</i> con peróxido de hidrógeno al 5%.	105
2.1	ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PMA EN LA AMPLIFICACIÓN DE DNA DE DIFERENTES ESTADOS MORFOLÓGICOS Y DE VIABILIDAD DE <i>Helicobacter pylori</i>	107
2.4	DISCUSIÓN	110
CAPÍTULO 3.....		115
OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA LA CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE <i>H. PYLORI</i> Y OTROS <i>HELICOBACTER</i> SPP. PATÓGENOS EN AGUAS RESIDUALES.		115
3.1	OBJETIVO.....	117
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	119
3.2.1	CEPAS DE REFERENCIA Y CONDICIONES DE CULTIVO	119

3.2.2	ORIGEN DE LAS MUESTRAS.....	120
3.2.3	PROCESADO DE LAS MUESTRAS	120
3.2.4	CULTIVO DE <i>Helicobacter</i> spp.	122
3.2.5	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. y <i>H. pylori</i> MEDIANTE FISH y DVC-FISH	122
3.2.5.1	Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)	122
3.2.5.2	Detección de Células Viables mediante DVC-FISH	125
3.2.6	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	125
3.2.6.1	Extracción de DNA.....	125
3.2.6.2	Condiciones de amplificación.....	125
3.2.7	ANÁLISIS POR METAGENÓMICA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp.	126
3.2.7.1	Evaluación de iniciadores	126
3.2.7.2	Secuenciación de una comunidad artificial.....	128
3.2.7.3	Identificación de <i>Helicobacter</i> spp. y <i>H. pylori</i> en muestras ambientales	128
3.2.7.4	Análisis bioinformático.....	129
3.3	RESULTADOS	131
3.3.1	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. Y <i>H. pylori</i> POR CULTIVO.....	131
3.3.2	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. Y <i>H. pylori</i> MEDIANTE FISH y DVC-FISH	133
3.3.3	DETECCIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR	134

3.3.4	DETECCIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRIGIDA DAS.....	138
3.3.4.1	Evaluación de iniciadores para la amplificación de <i>Helicobacter</i> spp.....	138
3.3.4.2	Identificación de <i>Helicobacter</i> spp. en muestras de aguas residuales tratadas	142
3.4	DISCUSIÓN	148
CAPÍTULO 4.....		155
OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE <i>H. PYLORI</i>		155
4.1	OBJETIVO.....	164
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	165
4.2.1	CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	165
4.2.2	EXTRACCIÓN DEL DNA	166
4.2.3	OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE <i>H. pylori</i>	166
4.2.3.1	Condiciones de amplificación.....	167
4.2.4	DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE <i>H. pylori</i> EN MUESTRAS AMBIENTALES	169
4.3	RESULTADOS	170
4.3.1	OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE <i>H. pylori</i>	170
4.3.2	DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE <i>H. pylori</i> EN MUESTRAS AMBIENTALES	172

4.4 DISCUSIÓN	174
CAPÍTULO 5.....	178
DETECCIÓN DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> EN MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO Y MOLECULARES.....	178
5.1 OBJETIVO.....	179
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	181
5.2.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS.....	181
5.2.2 PROCESADO DE LAS MUESTRAS	181
5.2.3 CULTIVO DE <i>H. pylori</i>	183
5.2.4 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR	183
5.2.4.1 Extracción de DNA.....	183
5.2.4.2 qPCR específica de <i>H. pylori</i>	183
5.2.5 IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. EN HECES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA (DAS).....	183
5.2.6 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH).....	184
5.2.7 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> VIABLE MEDIANTE DVC-FISH	185
5.3 RESULTADOS	186
5.3.1 DETECCIÓN MEDIANTE CULTIVO	186
5.3.2 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR	186

5.3.3 IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. EN HECES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA (DAS).....	188
5.3.4 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE FISH y DVC-FISH.....	188
5.3.5 DETECCIÓN DE <i>H. pylori</i> RESISTENTE A LA CLARITROMICINA MEDIANTE FISH Y DVC-FISH.....	188
5.4 DISCUSIÓN	193
CAPÍTULO 6.....	199
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR <i>H. PYLORI</i>: RESISTENCIA A LA DESINFECCIÓN Y DETECCIÓN EN MUESTRAS DE UN SISTEMA DE DISTRIBUCIÓN DE AGUA POTABLE MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.	199
6.1 OBJETIVOS.....	201
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	202
6.2.1 FORMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS	202
6.2.1.1 Cepa de referencia y Condiciones de Cultivo	202
203	
6.2.1.2 Formación de Biopelículas en microplacas	203
6.2.1.3 Cuantificación de biopelículas con Cristal Violeta (CV)	204
6.2.2 TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	207
6.2.2.1 Crecimiento bacteriano y formación de biopelículas.....	207
6.2.2.2 Tratamiento con radiación UV	208
6.2.2.3 Tratamiento con hipoclorito de sodio.....	213

6.2.2.4	Análisis y modelización de los resultados	217
6.2.3	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR.....	217
6.2.1	Extracción de DNA genómico	217
6.2.2	qPCR Específica de <i>H. pylori</i>	217
6.2.3	Detección e identificación de células viables de <i>H. pylori</i> mediante PMA-qPCR	219
6.2.4	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> EN BIOPELÍCULAS MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR).....	220
6.2.4.1	Toma de muestras.....	220
6.2.4.2	Tratamiento de las muestras	220
6.2.4.3	qPCR	221
6.3	RESULTADOS	222
6.3.1	FORMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS	222
6.3.2	TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN	227
6.1	Tratamiento con UV	227
6.2	Tratamiento con hipoclorito de sodio.....	233
6.3	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR EN MUESTRAS DE BIOPELÍCULAS	240
6.4	DISCUSIÓN	244
	CONCLUSIONES.....	253
	BIBLIOGRAFÍA.....	259

ANEXOS..... 301

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía del género <i>Helicobacter</i> . Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001).	14
Tabla 2: Principales factores de virulencia de <i>H. pylori</i> asociados con la enfermedad.....	22
Tabla 3: Tasa de recuperación de <i>H. pylori</i> de todos los medios de cultivo para cada una de las matrices y diluciones ensayadas.	80
Tabla 4: Condiciones de qPCR para la detección de <i>H. pylori</i>	98
Tabla 5: Efectos de las concentraciones de PMA y PEMAX™ en los resultados de qPCR en muestras de células de <i>H. pylori</i> muertas por calor.....	101
Tabla 6: Efectos del PMA, PEMAX™ y el Tampón específico en combinación con el PEMAX™ en células viables de <i>H. pylori</i>	103
Tabla 7: Reducción en los recuentos de qPCR de una suspensión de células no viables de <i>H. pylori</i> , considerando diferentes tratamientos desinfectantes utilizados para provocar la muerte celular.	106
Tabla 8: Efectos del pre-tratamiento con PMA en los recuentos de qPCR de muestras de <i>H. pylori</i> considerando sus diferentes estados morfológicos y la temperatura de incubación del colorante.....	109
Tabla 9: Bacterias utilizadas para determinar la especificidad de los iniciadores in vitro.	119
Tabla 10: Secuencias de los iniciadores HSF y HS2R.	126
Tabla 11: Condiciones de la PCR para la detección de <i>Helicobacter</i> spp.	127
Tabla 12: Condiciones de la PCR establecidas para el secuenciador Illumina MiSeq.	129
Tabla 13: Detección de <i>Helicobacter</i> spp. y <i>H. pylori</i> en muestras de aguas residuales destinadas para riego, mediante técnicas moleculares y DAS.	136

Tabla 14: Secuencias recuperadas mediante el análisis informático de una muestra de agua residual, de la comunidad artificial de bacterias y la muestra inoculada con la comunidad artificial, después de la secuenciación con la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq.....	141
Tabla 15: Número de secuencias del género <i>Helicobacter</i> identificadas en las aguas residuales. Especie asignada según la base de datos NCIB mediante la herramienta BLAST.....	147
Tabla 16: Cepas utilizadas en el estudio.....	165
Tabla 17: Secuencias de los iniciadores para la amplificación de los genes de virulencia y resistencia de <i>H. pylori</i>	167
Tabla 18: Condiciones de la PCR para la amplificación del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i>	167
Tabla 19: Condiciones de amplificación de PCR para el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i>	168
Tabla 20: Condiciones de la PCR para la amplificación del gen de resistencia <i>pbp1A</i> de <i>H. pylori</i>	168
Tabla 21: Condiciones de amplificación para el gen de resistencia <i>rdxA</i> de <i>H. pylori</i>	169
Tabla 22: Condiciones óptimas de la reacción de PCR para amplificación de los genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> (formas alélicas <i>s1</i> y <i>m1</i>), <i>pbp1A</i> y <i>rdxA</i> de <i>H. pylori</i>	170
Tabla 23: Resultados de los análisis para la detección de <i>H. pylori</i> en agua residual, potable y de riego.....	173
Tabla 24: Resultados de la detección directa y tras enriquecimiento de <i>H. pylori</i> en muestras de heces según las técnicas empleadas en el presente capítulo.	189
Tabla 25: Detección de <i>H. pylori</i> mediante qPCR, FISH, DVC-FISH, Secuenciación, y DAS en muestras clínicas.	189
Tabla 26: Tiempo de exposición de las células planctónicas, calculado a partir de la dosis de radiación UV.	210
Tabla 27: Tiempo de exposición de células sésiles, calculado a partir de la dosis de radiación UV.	212

Tabla 28: Características del agua desionizada autoclavada, utilizada para los experimentos con Cloro. *DQO: demanda química de oxígeno.	214
Tabla 29: Condiciones de qPCR para la detección de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i>	218
Tabla 30: Densidad óptima alcanzada por las células de <i>H. pylori</i> , suspendidas en el medio de cultivo en las microplacas.	222
Tabla 31: Análisis cuantitativo de las células planctónicas (OD450nm), células sésiles (OD570nm “biofilm”), cantidad de CV (OD570nm “basic”) e índice de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i>	223
Tabla 32: Análisis cuantitativo de las células planctónicas (OD450nm), células sésiles (OD570nm “biofilm”), cantidad de CV (OD570nm “basic”) e índice de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> . Los resultados corresponden a la media \pm SD, calculados a partir de los valores obtenidos mediante el software Thermo Scientific Skanlt. I. Incubación bajo condiciones anaeróbicas y limitación nutricional.	224
Tabla 33: Análisis cuantitativo de las células planctónicas (OD450nm), células sésiles (OD570nm “biofilm”), cantidad de CV (OD570nm “basic”) e índice de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> . Los resultados corresponden a la media \pm SD, calculados a partir de los valores obtenidos mediante el software Thermo Scientific Skanlt. Incubación bajo condiciones aeróbicas y limitación nutricional.	225
Tabla 34: Análisis cuantitativo de las células planctónicas (OD450nm), células sésiles (OD570nm “biofilm”), cantidad de CV (OD570nm “basic”) e índice de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> . Los resultados corresponden a la media \pm SD, calculados a partir de los valores obtenidos mediante el software Thermo Scientific Skanlt. Placas incubadas a 15 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.	226
Tabla 35: Análisis cuantitativo de las células planctónicas (OD450nm), células sésiles (OD570nm “biofilm”), cantidad de CV (OD570nm “basic”) e índice de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> . Los resultados corresponden a la media \pm SD, calculados a partir de los valores obtenidos mediante el software Thermo Scientific Skanlt. Placas incubadas a 5 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.	227

Tabla 36: Parámetros de la distribución de Weibull para células planctónicas de *H. pylori* expuestas a diferentes influencias de radiación UV..... 229

Tabla 37: Parámetros estadísticos de la inactivación de células planctónicas de *H. pylori* con radiación UV..... 230

Tabla 38: Parámetros de la distribución de Weibull para Biopelículas de *H. pylori* expuestas a diferentes dosis de radiación UV..... 232

Tabla 39: Parámetros estadísticos de la inactivación de formación biopelículas de *H. pylori* con radiación UV..... 232

Tabla 40: Inactivación de *H. pylori* con Hipoclorito de sodio a 1,2 mg/mL y temperatura de incubación de 15 °C..... 234

Tabla 41: Parámetros estadísticos de la inactivación de células planctónicas de *H. pylori* con radiación Hipoclorito de sodio 1,2 mg/mL y una temperatura de incubación de 15 °C..... 235

Tabla 42: Inactivación de *H. pylori* con una concentración de hipoclorito de sodio de 1,2 mg/mL a 25 °C..... 238

Tabla 43: Parámetros estadísticos de la inactivación de células planctónicas de *H. pylori* con radiación Hipoclorito de sodio 1,2 mg/mL y una temperatura de incubación de 25 °C..... 239

Tabla 44: Detección de *H. pylori* en Biopelículas mediante qPCR..... 241

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Índices de riesgo de la calidad del agua de las principales cuencas fluviales durante el período de 2000-2005 en comparación con el año 2050 (WAAP, 2018). 3

Figura 2: Proceso de una Planta de Tratamiento de Agua Potable Convencional PTAP (SPENA Group). 6

Figura 3: Diagrama de bloques del proceso de depuración de una EDAR (EPSAR; <http://www.epsar.gva.es/sanejament/instalaciones/buscador-edar.aspx>). 11

índice

Figura 4: Micrografía electrónica de <i>Helicobacter pylori</i> (ASM MicrobeLibrary.org).....	15
Figura 5: Historia natural de la infección por <i>H. pylori</i> (Romo <i>et al.</i> , 2010).....	17
Figura 6: Representación esquemática del gen <i>vacA</i>	21
Figura 7: Prevalencia de <i>H. pylori</i> . https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html	26
Figura 8: Prevalencia de <i>H. pylori</i> en Europa. https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html	27
Figura 9: Micrografía electrónica de barrido que muestra la forma cocoide de <i>Helicobacter pylori</i> (Azevedo <i>et al.</i> , 2007).....	34
Figura 10: Formación de biopelículas (Campuzano <i>et al.</i> , 2018).	35
Figura 11: Métodos de detección de la qPCR: TaqMan y SyBr Green (Seminago <i>et al.</i> , 2015).....	45
Figura 12: Cinética de amplificación de la PCR.....	46
Figura 13: Mecanismo de amplificación de DNA, usando los colorantes intercalantes PMA/EMA en combinación con la q PCR. Penetran en las células comprometidas uniéndose mediante enlace covalentes al DNA tras su fotoactivación y se detiene la amplificación del ADN de células no viables.	47
Figura 14: Diagrama de Flujo de un típico procedimiento de FISH (Rodríguez <i>et al.</i> , 2013).....	49
Figura 15: Estructura del monómero de LNA y su conformación especial (Wengel <i>et al.</i> , 2003).	50
Figura 16: Diagrama del protocolo básico de un estudio metagenómico. Esquema general de las dos principales estrategias empleadas en los estudios metagenómicos secuenciación de genomas completos y secuenciación dirigida). Adaptado de http://medicalplanzone.com/bacterial-artificial-chromosome/	53

Figura 17: Representación gráfica del gen 16S rRNA, indicando las regiones variables (V1-V9), las conservadas (C1-C9) y la invariable, comunes a todas las bacterias. Adaptado del trabajo realizado por Izquierdo, (2015).	54
Figura 18: Descripción general de la plataforma illumina NGS, que incluye cuatro fases: (A) Preparación de la biblioteca, (B) generación de clúster, (C) secuenciación y (D) análisis de datos. Adaptado de www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html .	57
Figura 19: Esquema de trabajo en Qiime (Caporaso <i>et al.</i> , 2010).	59
Figura 20: Recuento de células vivas de <i>H. pylori</i> en muestras inoculadas.	73
Figura 21: Tinción GRAM de <i>H. pylori</i> cultivado en el medio de cultivo HPA ₁ .	74
Figura 22: Protocolo de cultivo para la detección e identificación de <i>H. pylori</i> en diferentes matrices inoculadas.	76
Figura 23: Recuperación de células de <i>Helicobacter pylori</i> en los medios de cultivo ADPB (A) y CM ₃ (B) a partir del inóculo de 10 ³ UFC/mL.	77
Figura 24: Recuperación de células de <i>Helicobacter pylori</i> en medio de cultivo AD a partir del inóculo de 10 ² UFC/mL.	78
Figura 25: Protocolo de pre-tratamiento con PMA, PEMAX TM y un tampón específico combinado con PEMAX TM para la detección de células viables de <i>H. pylori</i> .	95
Figura 26: Células no viables de <i>H. pylori</i> , tratadas a 85 °C durante 30 minutos, observadas bajo el microscopio de epifluorescencia utilizando la prueba LIVE/DEAD. Observación 100X.	100
Figura 27: Prueba LIVE/DEAD utilizada para determinar los diferentes estados morfológicos de <i>H. pylori</i> tras su exposición a diferentes condiciones de estrés. (A) Espiral viable (inóculo control). (B) Espiral no viable (Tratada con peróxido de hidrógeno al 5%). (C) Forma espiral viable pero no cultivable (VBNC) (Incubada durante dos meses a 4°C). Forma cocoide viable pero no cultivable (VBNC) (Incubada durante 2 meses a 25 °C). (E) Forma cocoide no viable (Tratada con 100 ppm de hipoclorito de sodio).	108

Figura 28: Protocolo para la detección e identificación de <i>H. pylori</i> y <i>Helicobacter</i> spp., en aguas residuales.	121
Figura 29: Tinción Gram de las colonias sospechosas de <i>Helicobacter</i> spp.	131
Figura 30: Colonias sospechosas de <i>Helicobacter</i> spp. (A) en Agar selectivo Dent. Purificación de las posibles colonias en Agar Sangre Piruvato(B).	132
Figura 31: Identificación de colonias sospechosas de <i>Helicobacter</i> spp. por PCR. 1: Control positivo <i>H. pylori</i> NCTC 11637; 2, 3 y 4: colonia sospechosa. 5: Control negativo; M: marcador.....	133
Figura 32: Detección de <i>H. pylori</i> en muestras tras el tratamiento secundario, por electroforesis en gel de agarosa. 1 y 2: control positivo. 3: MS2E; 4: M3SD; 5: M3SE; 6: M5SE; 7: M7SE; 8: control negativo. M: marcador de pesos moleculares 100pb.	135
Figura 33: Gradiente de temperatura para la optimización de PCR para la detección de <i>Helicobacter</i> spp. por electroforesis en gel de agarosa. 1, 6, 11 y 16: <i>H. pylori</i> 10242; 2, 7, 12 y 17: <i>H. cinaedi</i> 5359; 3, 8, 13 y 18: <i>H. suis</i> 19735; 4, 9, 14 y 19: <i>A. cibarius</i> ; 5, 10, 15 y 20: <i>A. cryarophilus</i> . 21: control negativo. M: marcador de pesos moleculares 100pb.	139
Figura 34: Gradiente de temperatura para la optimización de PCR para la detección de <i>Helicobacter</i> spp. por electroforesis en gel de agarosa. 1, 6, 11 y 16: <i>H. pylori</i> 10242; 2, 7, 12 y 17: <i>H. cinaedi</i> 5359; 3, 8, 13 u 18: <i>H. suis</i> 19735; 4, 9, 14 y 19: <i>A. cibarius</i> ; 5, 10, 15 y 20: <i>A. cryarophilus</i> . 21: control negativo. M: marcador de pesos moleculares 100pb.	139
Figura 35: Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras de aguas residuales (%).	142
Figura 36: Distribución de filos presentes en las muestras de aguas residuales analizadas (%).	143
Figura 37: Distribución de las clases bacterianas más abundante del promedio de las muestras de aguas residuales.	144
Figura 38: Distribución de las clases bacterianas más abundantes en las aguas residuales (%).	145

Figura 39: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes del promedio de las muestras de aguas residuales (%).	145
Figura 40: Temperatura de 62°C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> . M: marcador 100 pb; 1: <i>H. pylori</i> 10242; 2: <i>A. cryarophilus</i> 11885; 3: <i>A. skirrowii</i> 12713; 4: <i>A. butzleri</i> 12481; 5: Control -	171
Figura 41: Temperatura de 57 °C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen <i>vacA</i> (forma alélica <i>s1/s2</i>) de <i>H. pylori</i> . M: marcador 100 pb; 1: <i>H. pylori</i> 10242; 2: <i>A. cryarophilus</i> 11885; 3: <i>A. skirrowii</i> 12713; 4: <i>A. butzleri</i> 12481; 5: Control -	171
Figura 42: Temperatura de 57°C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen <i>vacA</i> (forma alélica <i>m1/m2</i>) de <i>H. pylori</i> . 1: <i>H. pylori</i> 10242; 2: <i>A. cryarophilus</i> 11885; 3: <i>A. skirrowii</i> 12713; 4: <i>A. butzleri</i> 12481; 5: Control -; M: marcador 100 pb	171
Figura 43: Temperatura de 57 °C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen <i>pbp1A</i> de <i>H. pylori</i> . 1: <i>H. hepaticus</i> 22904; 2: <i>H. fennelliae</i> 749; 3: <i>H. suis</i> 19735; 4: <i>H. pylori</i> 10242 5: <i>A. butzleri</i> 12481; 6: <i>A. skirrowii</i> 12713; 7: Control -. M: marcador 100 pb	172
Figura 44: Temperatura de 57 °C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen <i>rdxA</i> de <i>H. pylori</i> . M: marcador 100 pb.1: <i>H. hepaticus</i> 22904; 2: <i>H. pylori</i> 10242; 3: <i>H. fennelliae</i> 749; 4: <i>A. butzleri</i> 12481; 5: <i>A. skirrowii</i> 12713; 6: Control -	172
Figura 45: Temperatura de 57 °C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen <i>rdxA</i> de <i>H. pylori</i> . M: marcador 100 pb.1: <i>H. hepaticus</i> 22904; 2: <i>H. pylori</i> 10242; 3: <i>H. fennelliae</i> 749; 4: <i>A. butzleri</i> 12481; 5: <i>A. skirrowii</i> 12713; 6: Control -	172
Figura 46: Protocolo de detección de <i>H. pylori</i> en heces mediante técnicas moleculares y cultivo	182
Figura 47: Tm: 84,5-86,5 °C de muestras de heces positivas para el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> .	187
Figura 48: Curva de amplificación del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> , en muestras de heces	187
Figura 49: Protocolo de preparación de suspensiones celulares estandarizadas.	203
Figura 50: Protocolo experimental para estudiar la formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> .	204

Figura 51: Protocolo de medición de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i>	206
Figura 52: Protocolo de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> sobre filtro de celulosa de 0,45 μm	208
Figura 53: Descripción esquemática del dispositivo utilizado para llevar a cabo la exposición a radiación UV de <i>H. pylori</i>	209
Figura 54: Protocolo de tratamiento de células planctónicas de <i>H. pylori</i> con UV-C.....	211
Figura 55: Protocolo de tratamiento de biopelículas de <i>H. pylori</i> con UV-C.....	213
Figura 56: Protocolo de tratamiento de células planctónicas de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio.....	215
Figura 57: Protocolo de tratamiento de biopelículas de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio.....	217
Figura 58: Curva patrón de <i>H. pylori</i>	219
Figura 59: Tratamiento con PMA de biopelículas de <i>H. pylori</i> expuestas a tratamientos de desinfección.....	220
Figura 60: Formación de Biopelículas (FB) de <i>H. pylori</i> . Placas incubadas con limitación nutricional a 37 °C, en condiciones anaeróbicas.....	224
Figura 61: Formación de Biopelículas (FB) de <i>H. pylori</i> . Placas incubadas con limitación nutricional 37°C, en condiciones aeróbicas.....	225
Figura 62: Formación de Biopelículas (FB) de <i>H. pylori</i> . Placas incubadas a 15 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.....	226
Figura 63: Formación de Biopelículas (FB) de <i>H. pylori</i> . Placas incubadas a 5 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.....	227
Figura 64: Curva de inactivación de células planctónicas de <i>H. pylori</i> a diferentes influencias de dosis de radiación UV.....	228

Figura 65: Efecto de la radiación UV en la supervivencia de células planctónicas de <i>H. pylori</i> . LOD: 2,54 y LOQ: 4,02.	230
Figura 66: Curva de inactivación de Biopelículas de <i>H. pylori</i> a diferentes dosis de radiación UV.	231
Figura 67: Efecto de la radiación UV en la supervivencia de biopelículas de <i>H. pylori</i> . LOD: 2,64 y LOQ:4,02.....	233
Figura 68: Inactivación de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio a 1,2 mg/mL y temperatura de incubación de 15 °C.....	234
Figura 69: Inactivación de células plantónicas de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio (1,2 mg/mL) y una temperatura de incubación de 15 °C. LOQ: 4,02 y LOD: 2,77.	236
Figura 70: Inactivación de Biopelículas de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio (1,2 mg/mL) y una temperatura de incubación de 15 °C. LOQ: 4,02 y LOD: 2,77.	237
Figura 71: Inactivación de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio a 1,2 mg/mL y temperatura de incubación de 25 °C.....	238
Figura 72: Inactivación de células plantónicas de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio (1,2mg/mL) y una temperatura de incubación de 25 °C. LOQ: 4,02 y LOD: 2,97.	239
Figura 73: una temperatura de incubación de 25 °C. LOQ: 4,02 y LOD: 2,97.	240
Figura 74: Curvas de amplificación del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de Biopelículas.	242
Figura 75: Tm de los iniciadores <i>vacA</i> en muestras de Biopelículas.	242
Figura 76: Detección de <i>H. pylori</i> en Biopelículas por electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Control positivo (+): <i>H. pylori</i> NCTC 11637; Control negativo (-); Marcador de 100pb.....	243

ABREVIATURAS

AD: Agar Dent

ADP: Agar Dent con pomilixina B

AP: Agar Pylori® (BioMérieux, Francia)

ASC: Agar Sangre de Caballo

ASP: Agar Sangre Piruvato

BB: caldo Brucella

Cq: Ciclo de cuantificación (Quantification Cycle)

CV: Cristal Violeta

DAS: Deep Amplicon sequencing

DSM: Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

DVC: Direct Viable Count

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

EMA: bromuro de monoazida de etidio

ETAP: Estación de Tratamiento de Agua Potable

FB: Formación de Biopelículas

fg: Femtogramo

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

g: Gramo

NHPH: Non-*H. pylori*-Helicobacters, NHPH

l: Litro

ml: Mililitro

mM: Milimolar

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

NGS: Secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing)

OD: densidad óptica

OTU: Unidad taxonómica operacional (Operational Taxonomic Unit)

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)

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

RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)

rpm: Revoluciones por minuto

SFB: suero fetal bovino utilizado

TBE: Tampón Tris-Borato EDTA

Tm: Temperatura de fusión (Melting Temperature)

ufc: Unidades formadoras de colonia

UG: Unidades Genómicas

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 dulce es un recurso natural indispensable para el sostenimiento y reproducción de la vida en el planeta, por lo que su contaminación y escasez supone una amenaza para la salud humana y la vida de todos los ecosistemas.

El uso de agua comprende todas las actividades sociales, económicas y ambientales humanas. La cantidad de agua dulce del planeta es limitada y su uso se incrementa principalmente en función del crecimiento poblacional y el desarrollo económico. La agricultura representa aproximadamente el 70% de las extracciones de agua a nivel mundial (Eslamian *et al.*, 2016). El sector industrial representa el 20% de las extracciones, destinadas a la producción de energía y el 10% restante se utiliza para fines domésticos (WWAP, UNESCO, 2018).

En los últimos 100 años el uso del agua a nivel global se ha multiplicado por seis, y sigue aumentando de manera constante a una tasa aproximada del 1% anual. Entre 2017-2050, se espera que la población aumente entre 9400 y 10200 millones de habitantes (UNESCO, 2018). Como consecuencia de ello, se prevé que la demanda mundial de agua para 2050 aumente entre un 20% y un 30% (Burke *et al.*, 2016) y que una de cada cuatro personas habite en un país afectado por la escasez de agua. Asimismo, se espera que antes de 2025 la demanda mundial para la producción agrícola e industrial aumente entre un 60% y un 80% (Alexandratos y Bruisma, 2012; OCDR, 2012).

Por otro lado, el cambio climático implica desviaciones espaciales y temporales en la dinámica del ciclo del agua que inciden directamente en el aumento de la desigualdad que genera la oferta y la demanda en su consumo. En la actualidad, cerca de 500 millones de personas viven en áreas en las que el consumo del agua duplica los recursos renovables del lugar (WWAP, 2018).

La disponibilidad de recursos hídricos está relacionada directamente con la calidad del agua, que depende de la densidad poblacional y el crecimiento económico (Figura 1). La calidad del agua se ve afectada por el aumento de vertidos de aguas negras sin tratar, por la escorrentía agrícola y las aguas residuales industriales tratadas de manera inadecuada. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura sobre el desarrollo de los recursos hídricos (WWAP, 2018), el 80% del total de aguas residuales industriales y municipales se liberan al medio ambiente sin ningún tratamiento previo, provocando un deterioro continuo en la calidad general el

agua y poniendo en peligro la salud humana, el medio ambiente y el desarrollo sostenible (IFPRI, 2015). Se calcula que el 32% de la población mundial no tiene acceso a servicios adecuados de saneamiento básicos, el 10% consume alimentos regados con aguas residuales sin tratar y unos 663 millones de personas en todo el mundo no tiene acceso a fuentes de agua potable adecuadas. Las muertes anuales asociadas a enfermedades de carácter hídrico (OMS, 2017) rondan las 842.000, principalmente en países de bajos ingresos, y son debidas fundamentalmente a la ausencia de agua salubre y a un saneamiento y una higiene deficientes. De ellas, 361.000 fallecimientos corresponden a menores de 5 años. En estos momentos, alrededor del 58% del total de muertes en el mundo se encuentran relacionadas con la calidad del agua, su higiene y saneamiento.

En cuanto al desarrollo sostenible, una gestión adecuada del agua es fundamental para el fortalecimiento de los sistemas sociales, económicos y ambientales frente a los cambios rápidos e impredecibles. En el 2018, la ONU (WAAP, 2018) propuso asegurar el agua para todos de forma sostenible, para garantizar personas sanas, aumento de la prosperidad, sociedades equitativas, ecosistemas protegidos y comunidad resistentes.

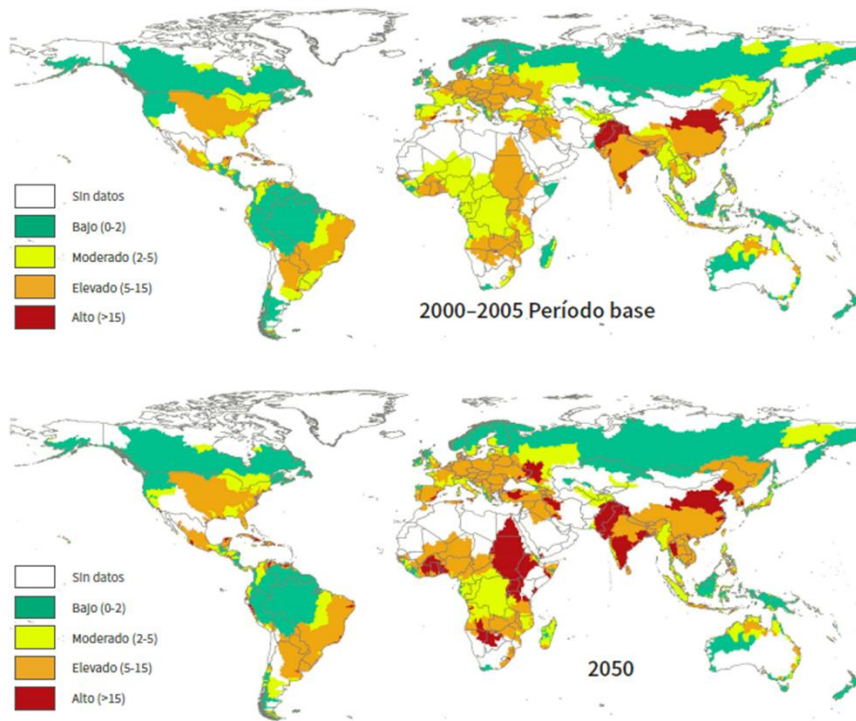


Figura 1: Índices de riesgo de la calidad del agua de las principales cuencas fluviales durante el período de 2000-2005 en comparación con el año 2050 (WAAP, 2018).

2 CONTAMINACIÓN MICROBIANA DEL AGUA Y SALUD PÚBLICA

La disponibilidad de agua con unas condiciones sanitarias adecuadas es un tema clave en salud pública. Implica que esté libre de cualquier contaminante nocivo y hace necesaria una protección legal desde la captación del recurso hasta que el agua es suministrada a los consumidores. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017), el agua de consumo, que incluye el agua para beber, para la preparación de alimentos y para la higiene personal, no debe ocasionar ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume a lo largo de toda una vida.

Las medidas destinadas a la mejora de la calidad del agua de consumo son un objetivo prioritario de salud pública. La OMS publica unas guías orientativas de calidad de agua de consumo para el desarrollo de normativas internas de cada país. En el caso de la Unión Europea, actualmente está en vigor la Directiva 98/83/CE, que fija normas de calidad según dichas recomendaciones. En España, la Directiva 98/83/CE, se implementó a través del Real Decreto 140/2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo.

Toda esta legislación está destinada a asegurar que el agua de consumo sea saludable y limpia, eliminando o reduciendo la concentración de contaminantes microbiológicos y fisicoquímicos que puedan afectar a la salud del consumidor. Sin embargo, a pesar de los planes de control y prevención del agua, en ocasiones el agua de consumo puede encontrarse contaminada, bien por el fallo o insuficiencia de estos tratamientos, bien por la existencia de patógenos resistentes a los tratamientos de desinfección, independientemente de los avances en las tecnologías de saneamiento, convirtiéndose en una fuente de infección para el ser humano.

Así, en estos momentos, a nivel mundial siguen siendo numerosos los brotes de infección producidos directa o indirectamente por el agua (Benedict *et al.*, 2017). Este número está, además, subestimado, ya que no se suelen tener en cuenta los casos derivados de los alimentos contaminados con aguas contaminadas o las enfermedades crónicas asociadas a los sistemas de aguas municipales. Además, cuando se trata de brotes esporádicos que afectan a poca gente, no se reflejan en las estadísticas.

Las enfermedades transmitidas por el agua también suponen costes económicos importantes. En 1993, un brote de *Cryptosporidium* en Wisconsin, supuso un gasto de aproximadamente 50 millones de dólares (Gharpure *et al.*, 2019). La contaminación de agua con *Escherichia coli* O157: H7 en Walkerton Ontario, en el año 2000, resultó en pérdidas económicas de más de 150 millones de dólares (Ingerson-Mahar y Reid, 2012).

Por todo ello, establecer modelos de evaluación y gestión integral que garanticen la calidad del agua es un objetivo crucial para el desarrollo de modelos sostenibles de desarrollo económico y gestión medioambiental.

2.1 TRATAMIENTO DEL AGUA POTABLE

Las aguas potables se definen como las aguas adecuadas para el consumo humano y para todo uso doméstico habitual, incluida la higiene personal, que se encuentran libres de microorganismos causantes de enfermedades (Ormerod *et al.*, 2019).

El agua potable se obtiene después de mejorar la calidad del agua cruda, captada de los ríos, lagos o pozos, mediante una serie de procesos que eliminan bacterias, virus, protozoos, polen o

productos químicos nocivos para las personas. Una Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) es el conjunto de instalaciones en las que se lleva a cabo el tratamiento del agua, convirtiéndola mediante diferentes procesos en apta para el consumo humano (Mateo *et al.*, 2019).

Se define como proceso de potabilización a la eliminación de materias en suspensión y en disolución que alteran las características fisicoquímicas y organolépticas, así como la eliminación de bacterias y otros microorganismos que pueden alterar gravemente la salud de las personas. El objetivo final de las ETAP es suministrar agua de una calidad sanitaria garantizada para el consumo de la población (Santiago, 2020).

El proceso de potabilización de agua tiene distintas fases, desde la captación de agua cruda hasta su salida de la ETAP, mediante el sistema de bombeo, a la red de distribución.

Existen diferentes tipos de ETAP, en función de los procesos de potabilización que lleven a cabo:

- ETAP de tecnología convencional: incluye los procesos de decantación, filtración, coagulación y floculación.
- ETAP de filtración directa: incluye los procesos de coagulación-decantación y filtración rápida.
- ETAP de filtración en múltiples etapas: incluye los procesos de filtración gruesa dinámica, filtración gruesa ascendente y filtración lenta en arena.

En la ETAP, el proceso fisicoquímico de potabilización del agua consta de los siguientes pasos (Figura 2):

- **Coagulación:** Proceso en el que se utilizan coagulantes para desestabilizar la carga exterior de las partículas coloidales, evitando la repulsión entre ellas y acelerando su precipitación. Esta fase depende de la calidad del agua bruta, agitación de la mezcla, dosis y tipo de coagulantes empleados (sales de hierro y aluminio).
- **Floculación:** Proceso en el que se emplean reactivos floculantes con el objetivo de eliminar sustancias que se encuentran presentes en las aguas en forma coloidal. La adición de dichos

reactivos hace que los flocúlos resultantes sean más voluminosos y pesados, incrementando su velocidad de sedimentación y favoreciendo su precipitación.

- **Decantación:** Proceso por el que se eliminan los sólidos presentes en el agua por la acción de la gravedad.
- **Filtración:** Proceso donde tiene lugar la clarificación del agua. Para ello, se hace pasar el agua a través de un lecho filtrante, de arena, grava de distinta granulometría o carbón activado. Mediante este proceso se retiene la materia que queda en suspensión en el agua, después de los procesos de decantación. También se adsorben partículas que podrían producir olores y sabores en el agua.
- **Cloración o Desinfección:** El objetivo de la fase de desinfección es la eliminación de los organismos patógenos, garantizando así sanitariamente su consumo. La eficacia de determinados desinfectantes depende de factores como tiempo de contacto, calidad del agua, instalaciones y recursos disponibles. El más utilizado para potabilizar el agua, es el cloro y sus derivados (dióxido de cloro, hipocloritos, etc.). También puede utilizarse el ozono, aunque su producción y aplicación requiere de una tecnología más costosa de instalar, explotar y mantener. Por ello su aplicación en las ETAP es mucho menor. En la Reglamentación Técnica Sanitaria (Real Decreto 140/2003) se establece que “las aguas potables de consumo público deberán contener a lo largo de toda la red de distribución, y en todo momento, cloro residual libre o combinado, u otros agentes desinfectantes, en las concentraciones que determine la Administración Pública” (concentración de cloro libre residual entre 0,2 y 0,6 ppm en la red de distribución).

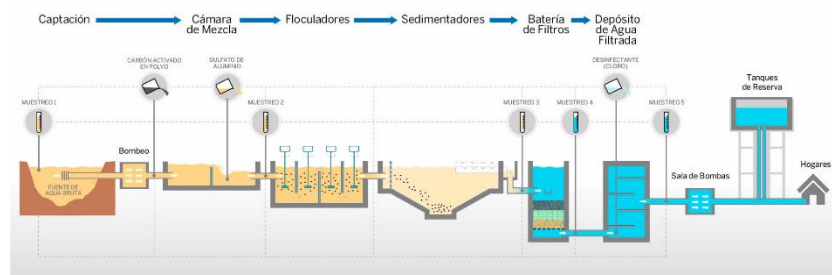


Figura 2: Proceso de una Planta de Tratamiento de Agua Potable Convencional PTAP (SPENA Group).

2.2 REUTILIZACIÓN DE AGUAS RESIDUALES TRATADAS

El agua residual se define como el agua que se encuentra contaminada con elementos tóxicos, como materia fecal y orina de los seres humanos y animales, así como otras sustancias residuales procedentes del ámbito doméstico, industrial, comercial o agrícola, escorrentía superficial o aguas pluviales (Gallego-Schmid y Zepon, 2019).

Según la Directiva 91/271 CEE, sobre el tratamiento de aguas residuales, estas se clasifican en domésticas, industriales o urbanas, en función de su origen. Las aguas domésticas son aquellas producidas principalmente por el metabolismo humano y las actividades que se llevan a cabo en los hogares. La contaminación se debe a la gran cantidad de materia orgánica, tanto en suspensión como en disolución, la presencia de microorganismos y cantidades importante de nitrógeno, fósforo y sales minerales procedentes de jabones, detergentes, lejía y grasas. Las aguas residuales industriales son todas aquellas aguas locales vertidas donde se desempeña cualquier actividad comercial o industrial, y no son aguas residuales domesticas ni aguas de escorrentía pluvial. Su incidencia en la calidad final de las aguas residuales globales dependerá del grado de industrialización, de la aglomeración urbana y de la cantidad y características de los vertidos que las industrias realicen a la red de colectores municipales. Dentro de las aguas residuales urbanas se incluyen las aguas residuales domésticas o la mezcla de estas con aguas residuales y/o aguas de escorrentía pluvia. Estas últimas tendrán mayor influencia en las zonas con redes de saneamiento unitarias y en los momentos en los que se registren grandes llluvias.

Como consecuencia del constante aumento en la demanda del agua dulce por la escasez en los recursos hídricos, cada vez más afectados por le excesiva captación, la contaminación y el cambio climático, la utilización de las aguas residuales para el riego agrícola representa una práctica alternativa que garantiza la disponibilidad de agua de manera continuada y mejora el reciclaje de nutrientes, reduciendo de este modo la presión sobre las fuentes de agua dulce y aumentando la producción agrícola en regiones con escasez de agua (FAO, 2015). Otro beneficio asociado a la reutilización de aguas residuales con fines agrícolas es la prevención de la extracción de aguas subterráneas (Corcoran *et al.*, 2010), la presencia de nutrientes que reducen el uso de fertilizantes artificiales (Pedrero *et al.*, 2013b; Vicente- Sánchez *et al.*, 2014; Lyu *et al.*, 2016) y un mayor

rendimiento en la actividad de riego (Vivaldi *et al.*, 2015). Por esta razón, las aguas residuales se han convertido en una opción de agua muy atractiva para la agricultura (Drechsel *et al.*, 2015).

A este respecto, cada vez son más los países que utilizan las aguas residuales para regar, y en los países en desarrollo representa el 7% de las tierras de regadío (OMS, 2017). Países como Francia, Italia, España, Chipre, Israel, Jordania y EE. UU, han adaptado prácticas de reutilización de aguas residuales tratadas como fuente continua de riego agrícola (Aquarec, 2006; Ndèye *et al.*, 2008; Pedrero *et al.*, 2010; Kalavrouziotis *et al.*, 2013), convirtiéndose en un recurso muy valioso.

Sin embargo, una infraestructura deficiente y un tratamiento inadecuado de las aguas residuales puede provocar impactos negativos en el medio ambiente como es la presencia de microorganismos patógenos. De esta forma, a pesar de los importantes progresos en las tecnologías de tratamiento de aguas residuales, los agentes patógenos transmitidos por el agua (virus, patógenos y protozoos) que causan enfermedades humanas pueden estar presentes en el efluente final y alcanzar al consumidor final a través de los alimentos irrigados (Lazarova *et al.*, 2013).

Los patógenos en las aguas residuales proceden fundamentalmente de material fecal. En este ambiente suele darse un aumento de la contaminación inicial, ya que las aguas residuales brutas contienen grandes cantidades de materia orgánica que sirve como fuente de nutrientes para las bacterias y otros microorganismos (Kirs *et al.*, 2011). Por tanto, la reutilización de aguas residuales requiere medidas de protección de la Salud Pública y, en particular, unos sistemas de desinfección eficientes.

Actualmente, la determinación de la calidad microbiológica del agua se basa en la presencia de indicadores bacterianos, como enterobacterias fermentadoras de la lactosa (coliformes) y *E. coli*. Pero no hay evidencias de que exista una correlación entre los indicadores bacterianos utilizados para determinar la calidad de las aguas con la presencia de otros patógenos humanos. Algunos microorganismos, como *H. pylori*, parecen ser más resistentes a los tratamientos de desinfección que *E. coli* (Johnson *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 2012), lo que podría explicar su supervivencia en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

En España, la reutilización de las aguas residuales 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 los mecanismos legales que permiten disponer del agua residual depurada como recurso alternativo, los planes de reutilización y el uso eficiente del recurso hídrico. Además, define el concepto de reutilización, incluye la clasificación de aguas regeneradas, define los requisitos para llevar a cabo la actividad de utilización de aguas regeneradas y los recursos necesarios para obtener la concesión requerida en la Ley, e incluye las condiciones de uso y exigencia de calidad necesaria en cada caso. También contempla los criterios mínimos de calidad obligatorios para la utilización de aguas regeneradas según su función.

Para el posterior uso directo o indirecto de las aguas residuales de forma segura, las plantas de tratamiento tienen como reto principal la optimización de la eficiencia de eliminación de agentes patógenos, bacterias, virus, protozoos o helmintos, junto con la eliminación de malos olores u otras sustancias. Esto se lleva a cabo a través de un conjunto de operaciones físicas, biológicas y químicas cuyo objetivo es eliminar la mayor cantidad de contaminantes antes de su vertido, de modo que los niveles de contaminación de los efluentes tratados cumplan los límites legales existentes.

Una Planta de Tratamiento de Agua Residual (PTAR) o Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) se define como la instalación en la que se realiza el conjunto de técnicas y procedimientos encargados de la depuración de las aguas residuales, mediante la combinación de diversos tratamientos físicos, químicos y/o biológicos para reducir la contaminación de las aguas residuales hasta límites aceptables antes de ser vertidas a el cauce receptor (Metcalf y Eddy, 2003).

El tratamiento de aguas residuales se divide en cuatro etapas (Figura 3): pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario (Metcalf y Eddy, 2003), cuyas características principales son:

- **Pretratamiento:** Es el proceso por el que tiene lugar la eliminación, mediante operaciones físicas y mecánicas, de sólidos, arenas y grasas que, debido a su naturaleza o tamaño, pueden originar problemas en los tratamientos posteriores. Las operaciones que comprende el pretratamiento generalmente son: desbaste, desarenado y desgrasado.

- **Tratamiento primario:** En esta fase se elimina, por gravedad, la mayor parte de los sólidos orgánicos e inorgánicos suspendidos en las aguas residuales. Se consigue de manera libre, o con sustancias químicas que actúan como floculantes favoreciendo la unión de las partículas, para que ganen peso y decanten con mayor velocidad. Los sólidos suspendidos eliminados son materia orgánica, lo que implica una reducción importante en la concentración de DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) del efluente. Las operaciones empleadas en el tratamiento primario son: decantadores, tamices y unidades de decantación asistida químicamente.
- **Tratamiento secundario:** Es el proceso adicional de los efluentes primarios para eliminar los compuestos orgánicos residuales y los sólidos en suspensión. También tiene lugar la eliminación de la materia orgánica disuelta y coloidal biodegradable mediante procesos de tratamiento biológico aeróbico. La eliminación de la materia orgánica consiste en la eliminación de compuestos de nitrógeno, fósforo y microorganismos patógenos. El tratamiento se puede realizar mecánicamente con filtros de goteo, fangos activos, contactores biológicos rotativos (RBC) o no mecánicos como tratamiento anaeróbico, zanjas de oxidación, estanques de estabilización, etc. Tiene como objetivo la reducción de contaminación orgánica, coagulación y eliminación de sólidos coloidales no decantables. Las técnicas se realizan con ayuda de microorganismos (bacterias), que en condiciones aerobias actúan sobre la materia orgánica presente en las aguas residuales. El oxígeno necesario para el mantenimiento de las reacciones biológicas (oxidación, síntesis y respiración endógena) se proporciona introduciendo aire en los recipientes donde se desempeñan estas reacciones. Estos recipientes, se conocen como Reactores Biológicos o Cubas de Aireación. Los métodos más comunes para el aporte de oxígeno son los aireadores mecánicos o de difusores.
- **El tratamiento terciario:** Se trata de un proceso más avanzado, donde se eliminan componentes específicos que no pueden eliminarse mediante el tratamiento secundario. Tiene lugar la eliminación de cantidades significativas de nitrógeno, fósforo, metales pesados, compuestos orgánicos biodegradables, bacterias y virus. Se pueden usar dos métodos para filtrar efluentes secundarios: el filtro tradicional de arena y los nuevos materiales de membrana. Ambos procedimientos son capaces de eliminar los helmintos. También tiene lugar la desinfección mediante inyección de cloro, ozono y radiación ultravioleta, con el fin de garantizar que el agua cumpla las normas internacionales actuales para su reutilización en actividades agrícolas y urbanas.

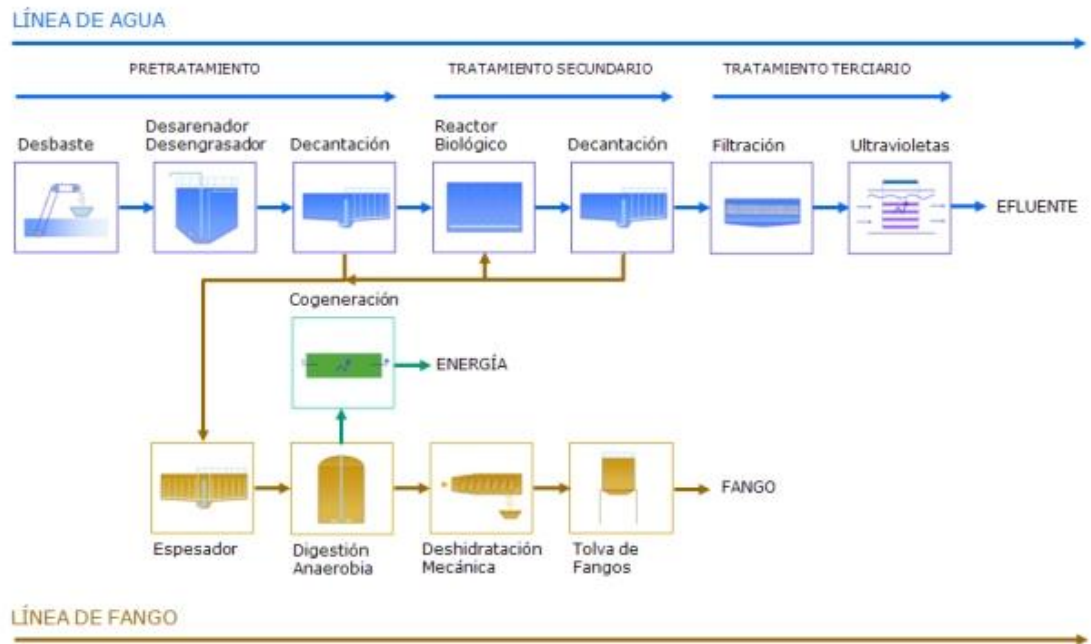


Figura 3: Diagrama de bloques del proceso de depuración de una EDAR (EPSAR; <http://www.epsar.gva.es/sanejament/instalaciones/buscador-edar.aspx>).

3 *Helicobacter pylori*

Actualmente, uno de los patógenos emergentes de mayor trascendencia en Salud Pública es *H. pylori*. Este microorganismo es el principal causante de úlcera y cáncer gástrico (Sjomina *et al.*, 2018) y está clasificado por la OMS como agente carcinogénico de Categoría 1 (IARC, 2014). Debido al aumento de nuevas enfermedades gástricas y extra-gástricas asociados con esta bacteria, existe un creciente interés por entender su epidemiología. Conocer cómo puede sobrevivir en el ambiente y transmitirse al hombre es imprescindible para determinar, por una parte, el riesgo que existe para el ser humano por exposición a fuentes ambientales y, por otra, poder tomar medidas efectivas para disminuir dicho riesgo.

3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A finales del siglo XIX, tuvieron lugar las primeras visualizaciones y descripciones de bacterias espirales en animales. Rappin en 1881, mencionó durante una ponencia que había observado una bacteria espiral en el estómago canino, que denominó *Spirochaeta rappini*.

Posteriormente en 1893, Bizzozero identificó bacterias en forma espiral en la mucosa gástrica de perros, que actualmente se clasifican como *Helicobacter canis*, *Helicobacter felis* (Lee *et al.*, 1988) o *Helicobacter heilmannii* (Heilmann *et al.*, 1991). El trabajo de Bizzozero fue ampliado por Salomon, quien tres años después consiguió propagar estos microorganismos en los estómagos de ratones después de alimentarlos con mucosa gástrica de gatos y perros (Salomon, 1896). En 1899 Jaworski, describió bacterias alargadas con morfología espiral en la mucosa gástrica humana, que denominó *Vibrio regula*, siendo el primero en informar sobre su implicación en enfermedades gástricas.

En 1938, Doenges encontró en monos macacos unos microorganismos espirales que asoció con la inflamación gástrica. Posteriormente, Freedberg y Baron (1950) relacionaron estos microorganismos helicoidales con úlceras gástricas, al identificarlos en un 40% de los estómagos humanos estudiados en necropsias.

En los años siguientes, Lockard *et al.* (1970) publicaron micrografías electrónicas de este tipo de microorganismos encontrados en el estómago de gatos y perros. También Steer y Colin (1975) estudiaron muestras de pacientes con úlceras gástricas y observaron con microscopia electrónica la existencia de microorganismos espirales en la mucosa gástrica, asociados a respuesta inflamatoria.

Sin embargo, fue en 1982 cuando Marshall y Warren (Marshall y Warren, 1984) consiguieron por primera vez cultivar una bacteria helicoidal en muestras de biopsias de pacientes con gastritis, siguiendo la metodología descrita por Skirrow para el aislamiento de *Campylobacter* spp. (Skirrow, 1977). En un principio Marshall sugirió que podrían pertenecer al género *Spirillum* spp., proponiendo posteriormente el nombre de *Campylobacter pyloridis* y más tarde *Campylobacter pylori* (Marshall *et al.*, 1987).

Posteriormente, mediante estudios basados en la secuenciación de la región 16S del rRNA, se demostró que la especie *Campylobacter pylori* era distinta de las especies de *Campylobacter* spp., descritas hasta el momento y en 1989 se adoptó la nueva denominación de *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1989). Las principales características para clasificar a microorganismos en el género *Helicobacter* spp. fueron: morfología curvada, Gram negativas, con capacidad de movimiento gracias a un flagelo envainado, microaerofílicas, quimiorganotrofas, 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, *H. pylori* es considerado como el agente infeccioso más frecuente en humanos, distribuido a lo largo de todo el mundo, y se estima que más de la mitad de la población humana está infectada por dicho patógeno (Javed *et al.*, 2019; Šterbenc, *et al.*, 2019).

3.2 SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL

Actualmente, 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).

El género *Helicobacter* contiene 57 especies, descritas y validadas, clasificadas en dos grupos, en función de si su reservorio es principalmente el estómago o el tracto intestinal (<http://www.bacterio.net/helicobacter.html>).

Tabla 1: Taxonomía del género *Helicobacter* (Mitchell et al., 2014).

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

3.3 MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DEL GÉNERO *Helicobacter*

Las especies pertenecientes al 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. No forman esporas. Las células cultivadas durante largos periodos 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 (García, 2006) o bipolares (*H. pylori* y *H. mustelae*), con una protuberancia terminal, de 2,5 µm de longitud y 30 nm de grosor. Los flagelos están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que les protege de su degradación por el ácido del estómago (Owen, 1998). Su contenido en G+C varía entre el 35% y el 44% (Vandamme *et al.*, 1991).

Son microorganismos microaerófilos, con metabolismo de tipo respiratorio y no utilizan carbohidratos. *Helicobacter* crece a 37 °C en medios de cultivo tras un periodo medio de incubación de 2 a 5 días. Originan colonias no pigmentadas, translúcidas y de 1-2 mm de diámetro. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C, aunque pueden crecer a 30 °C, pero no a 25 °C. Tienen actividad catalasa y oxidasa. No producen H₂S y tampoco son capaces de hidrolizar el piruvato. Las especies gástricas sintetizan la enzima ureasa.

3.4 MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE *Helicobacter pylori*.

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 presenta una morfología de 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. Presenta de 4 a 6 flagelos polares envainados (Figura 4). Adquiere forma cocoide en medios de cultivo viejos (Bode *et al.*, 1993). Es inactivo frente a la mayoría de las pruebas bioquímicas, no utiliza carbohidratos ni por la vía fermentativa ni oxidativa. Produce catalasa y citocromo oxidasa, pero en mucha mayor cantidad, ureasa y fosfatasa alcalina (Goodwing y Armstrong, 1990).



Figura 4: Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori* (ASM MicrobeLibrary.org).

El nicho ecológico de *H. pylori* es la mucosa gástrica, que 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 estómago es mucho más bajo, con valores de

entre 1 y 4, condiciones que desnaturalizan la mayoría de las proteínas. Pero *H. pylori* sobrevive gracias a su capacidad de tamponar el pH mediante la síntesis de la enzima ureasa. Esta enzima convierte la urea en dióxido de carbono y amoníaco, aumentando el pH alrededor de la bacteria, y permitiendo que el microorganismo sea capaz de sobrevivir en la mucosa gástrica a pesar de la acidez del lumen (Marshall *et al.*, 2001).

3.5 ETIOPATOGENIA

H. pylori produce gastritis de tipo inflamatorio, aunque en muchos casos su presencia resulta asintomática (Dunn *et al.*, 1997; Correa y Piazuelo, 2008). En algunos pacientes puede desarrollarse una gastritis crónica de tipo superficial y/o úlcera gástrica. Las manifestaciones clínicas como náuseas, dolor abdominal, acidez o sangrado son las más comunes y los síntomas desaparecen tras la erradicación de la bacteria mediante terapias con antibióticos.

Se desconoce por qué en unos pacientes la enfermedad es casi asintomática mientras que en otros se producen enfermedades digestivas de diferente gravedad. Pero se cree 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). En el año 1994, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer 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 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 5).

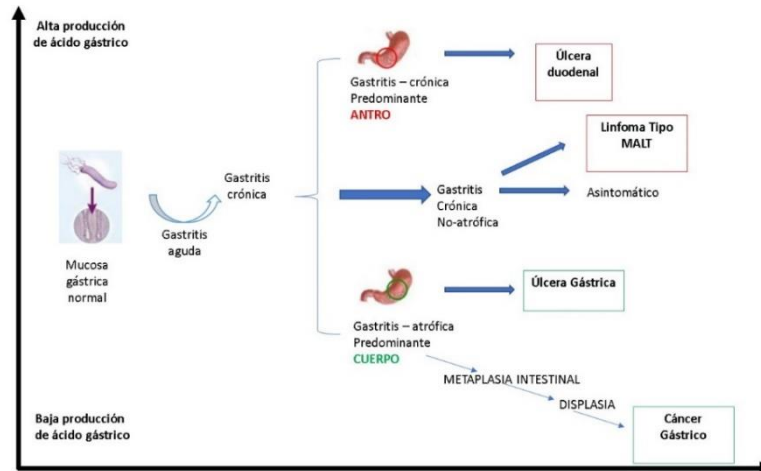


Figura 5: Historia natural de la infección por *H. pylori* (Romo *et al.*, 2010).

Actualmente el cáncer gástrico es la tercera causa de mortalidad por cáncer en el mundo. Un informe llevado a cabo en 2012 (GLOBOCAN, Ferlay *et al.*, 2013) indica 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. Aproximadamente el 89% de los casos de cáncer gástrico no relacionados con el cardias estomacal, que representan el 78% de todos los casos de cáncer gástrico, se atribuyen a una infección crónica por *H. pylori* (IARC *Helicobacter pylori* Working Group, 2014).

En 2014, la IARC señaló la necesidad 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, con valoración previa de los impactos económicos y humanos actuales y futuros, así como del valor potencial de las estrategias de prevención. Del mismo modo IARC señala que, debido principalmente al desconocimiento existente sobre la epidemiología de *H. pylori*, ningún país ha implementado ningún tipo de estrategia de prevención que incluya el control de *H. pylori* en el ambiente (IARC, 2014).

Por otro lado, 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), a la espera de obtener un método estándar para su detección.

3.6 FACTORES IMPLICADOS EN LA PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*

Uno de los principales desafíos del estudio de *H. pylori* es la identificación de los factores de virulencia determinantes en el proceso de infección. *H. pylori* tiene la capacidad de colonizar el estómago, donde persiste durante largos periodos de tiempo (Delahay *et al.*, 2012). Parece que tanto esta persistencia como la capacidad para ocasionar daños en el tejido del hospedador dependen de la interacción de distintos factores de virulencia, la mayoría de los cuales no son comunes a toda la especie, sino que existe una gran heterogeneidad genética entre las cepas (Dunne *et al.*, 2014). Estos factores se dividen principalmente en dos: aquellos que permiten a la bacteria colonizar el hospedador y mantenerse durante largos periodos en el tiempo, y los que contribuyen a los efectos patogénicos de la bacteria.

Los principales factores que intervienen en la capacidad del microorganismo para colonizar la mucosa gástrica y adaptarse al medio ácido son su motilidad, las actividades ureasa y catalasa y su habilidad de adhesión a las células epiteliales gástricas. La motilidad de *H. pylori* es debida a su morfología espiral o helicoidal y a la presencia de flagelos en uno de sus extremos. Su estructura flagelar se encuentra codificada por los genes *ftbA*, *flgE*, *flgK*, *flgD*, *motA*, *motB* o *fljS* (Cervantes-García, 2016).

La ureasa es la enzima más abundante producida por *H. pylori*. Se trata de una metaloenzima localizada en el citosol y la membrana bacteriana, que confiere a *H. pylori* la capacidad de generar amoníaco y ácido carbónico a partir de la hidrólisis de la urea. El amoníaco liberado rodea la bacteria y neutraliza el ácido produciendo un aumento del pH del moco gástrico y la resultante erosión de la barrera mucosa (Schmalstig *et al.*, 2018). El aumento de pH neutraliza el ácido clorhídrico del estómago, proporcionando un medio relativamente alcalino que permite la supervivencia del microorganismo mientras se desplaza para llegar al epitelio gástrico, en un entorno de pH aproximadamente 2. Además, determinados estudios demuestran que la ureasa, al generar amonio, participa directamente en el desarrollo de la gastritis atrófica crónica y favorece el incremento de infecciones virales y carcinogénesis (Gutierrez *et al.*, 2011).

La enzima ureasa está formada por dos subunidades, *ureA* y *ureB*. El gen *ureA* se encuentra presente en todas las cepas de *H. pylori*, por lo que ha sido utilizado en numerosos estudios para su

detección en muestras clínicas (Queralt *et al.*, 2004) y ambientales, como aguas potables (Castillo *et al.*, 2019) y residuales (Vesga *et al.*, 2018).

Acerca de la actividad catalasa, presente en todas las cepas de *H. pylori*, le proporciona protección frente a la acción de los radicales libres de oxígeno producidos por procesos oxidativos de defensa de macrófagos y neutrófilos (Cervantes-García, 2016).

La adherencia a la mucosa gástrica depende de moléculas como BabA, SabA, y OipA entre otras (Cover, 2006; Shiota *et al.*, 2013). BabA es una adhesina que interactúa directamente con las células epiteliales a través de los antígenos de Lewis B (Le^b); se han identificado tres alelos bab (babA1, babA2 y babB). Solo el gen *babA2* es funcionalmente activo y se encuentra asociada a enfermedad de úlcera duodenal y cáncer gástrico (Ishijama *et al.*, 2011). La segunda adhesina más estudiadas es SabA, que se encuentra asociada con el desarrollo de metaplasia intestinal, atrofia y cáncer gástricos (Yamaoka, 2008). Con respecto a la proteína de membrana externa inflamatoria OipA, se encuentra presente en todas las cepas de *H. pylori*, pero solo algunas lo expresan y dicha expresión se encuentra asociada al desarrollo de inflamación gástrica y a una mayor producción de citocina IL-8 (Barragan *et al.*, 2014).

Otro factor que interviene en la colonización de la bacteria es la enzima fosfoglucoamina mutasa, codificada por el gen *glmM*, llamado inicialmente *ureC*, que participa directamente en la síntesis de la pared celular (De Reuse *et al.*, 1997) y está presente en todas las cepas de *H. pylori* (Bamford *et al.*, 1998). Parece que la identificación de *H. pylori* en muestras con un alto contenido de microbiota acompañante e interferentes orgánicos, se ve favorecida por la elección de este gen como diana, presentando la PCR una elevada sensibilidad y especificidad (Quaglia *et al.*, 2009; Safaei *et al.*, 2011). Por esta razón, se ha utilizado en numerosos estudios para la detección de *H. pylori* en muestras clínicas (Espinosa *et al.*, 2011), así como en muestras de aguas potables (Bahrami *et al.*, 2013) y aguas residuales (Farhadkhani *et al.*, 2019).

También se han identificado marcadores de patogenicidad de *H. pylori* que se encuentran relacionados de manera directa con enfermedad en el hospedador. Actualmente uno de los factores de patogenicidad de *H. pylori* mejor caracterizados es la citotoxina vacuolizante VacA. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que solo un 50 o 60% de las cepas de *H. pylori* expresan la

actividad de dicha citotoxina, aunque el gen *vacA* se encuentre presentes en todas ellas. La toxina induce la vacuolización, así como otras lesiones celulares, incluyendo la formación de canales en la membrana y la liberación del citocromo C de la mitocondria, lo que induce apoptosis. También se une a los receptores de las células de membrana iniciando una respuesta proinflamatoria (Jaff *et al.*, 2011).

Tombola *et al.* (2001) demostraron que la presencia del gen *vacA* también aumenta la disponibilidad de urea, permitiendo a *H. pylori* adaptarse a su microambiente. Esto ocurre como consecuencia del aumento de la permeabilidad de las células huésped a la urea, creando canales transmembrana que permiten la difusión pasiva. Además, *vacA* bloquea vías de presentación antigénica (Molinari *et al.*, 1998) e inhibe la activación linfocitaria (Gebert *et al.*, 2003).

Se han descrito variantes alélicas del gen del gen *vacA* que afectan al péptido señal (*s1a*, *s1b* y *s2*) y a la región central de la proteína (*m1* y *m2*) (Figura 6) (Rhead *et al.*, 2007). Cada gen *vacA* posee un alelo *s* y uno *m*, y la diversidad de la secuencia afecta a la actividad vacuolizante de la citotóxina (Martínez-Carrillo *et al.*, 2014). Se ha observado que el genotipo *s1/m1* es más agresivo; que el *s1/m2* es menos tóxico que el anterior y que *s2/m2* no posee actividad tóxica (Hemmatinezhad *et al.*, 2016). Desde que se conoce que las cepas que tienen la región *m1* tienen más actividad que las cepas que tienen la *m2*, se ha podido asociar la presencia de cepas *VacA s1/m1* con las manifestaciones patológicas gástricas más severas.

Igualmente, se ha descrito una nueva región del gen *vacA*, denominado región intermedia, con varias posibles formas de presentación, *i1* e *i2* (Olczak *et al.*, 2003). Las cepas con la presentación *i1* son más citotóxicas y se encuentran asociadas con la estructura alélicas *s1/m1*; mientras que las cepas con *i2* se encuentran relacionadas con la variante *s2/m2*.

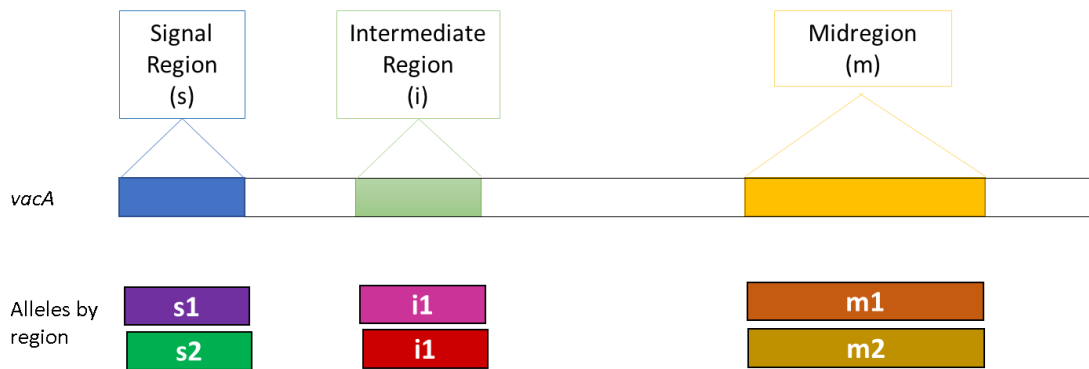


Figura 6: Representación esquemática del gen *vacA*.

Otro de los factores de virulencia más relevantes para la patogénesis de la bacteria es la denominada isla de patogenicidad *cagPAI*. Contiene 27 ORFs (marco abierto de lectura), entre los cuales se encuentra *cagA*. Los genes *cagPAI*, responden a señales ambientales e intervienen en la secreción de proteínas de tipo IV que incorporan la proteína *cagA* y peptidoglucanos a las células epiteliales del hospedador (Tegtmeyer *et al.*, 2011).

El gen *cagA*, localizado al final de la isla de patogenicidad *cagPAI*, se encuentra en aproximadamente el 60% de los aislamientos de *H. pylori* y se utiliza como marcador de virulencia. Las cepas *cagA+* producen la citotoxina asociada al gen A (CagA), son las más virulentas y su presencia se asocia al desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico (Figueiredo *et al.*, 2001). La expresión de la citotoxina CagA se ha relacionado también con valores elevados de IL-8, citocina que tiene un papel fundamental en los fenómenos inflamatorios (Arévalo *et al.*, 2009; Keilberg y Ottermann, 2016).

Un estudio realizado por Citty *et al.* (2002) demostró que los genes *cagA+* y *vacA* pueden ser utilizados como marcadores de virulencia y de riesgo de desarrollar enfermedad gástrica severa, aunque no pueden ser utilizadas para diferenciar entre cepas con potencial carcinogénico o potencial ulcerogénico. El gen *cagA* ha sido utilizado para la detección de cepas de *H. pylori* especialmente virulentas en muestras de biopsia (Smith *et al.*, 2004) y en muestras de aguas residuales y potables (Chomvarin *et al.*, 2017, Vesga *et al.*, 2018).

Otros genes han sido propuestos como marcadores de virulencia: El gen *cagE*, que forma parte de la isla de patogenicidad *cagPAI* tiene un papel fundamental en el incremento de expresión de IL-8 en el epitelio gástrico (Ranjbar *et al.*, 2016). El gen *oipA*, localizado fuera de PAI, también tiene la capacidad de inducir la liberación de IL-8 en la mucosa (Quiroga *et al.*, 2005; Hemmatinezhad *et al.*, 2016).

Varios factores de virulencia como *cagA*, *vacA* y *babA*, entre otros, han sido asociados con un mayor riesgo de enfermedad ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT, pero ninguno de ellos por sí mismo implica una enfermedad en concreto, ya que en el desarrollo de patologías gástricas están involucrados además otros factores genéticos del huésped, ambientales y otros factores de virulencia de la bacteria (Wen y Moss., 2009).

En la tabla 2 se recogen los principales factores de virulencia de *H. pylori* y las enfermedades con las que se encuentran relacionados.

Tabla 2: Principales factores de virulencia de *H. pylori* asociados con la enfermedad.

Gen	Función	Características	Asociación con enfermedad
<i>vacA</i>	Toxina	Presente en todas las cepas. Variación genética en la región <i>s</i> y <i>m</i> , el 50% de las cepas expresan la toxina (genotipo <i>s1/m1</i> asociado con niveles altos de toxina). En células epiteliales gástricas (provoca vacuolización e induce apoptosis) y linfocitos (inhibe proliferación Tho y presentación de Ag por linfocito B).	Úlcera duodenal y cáncer gástrico.
<i>CagPAI</i>	Algunos genes codifican para un sistema de secreción de Tipo IV (TFSS)	Presencia completa o incompleta en las cepas Asociación con alta inducción de IL-8 en células gástricas. Trasloca a CagA a la célula epitelial.	Úlcera duodenal y cáncer gástrico.
<i>cagA</i>	Produce respuesta similar a los factores de crecimiento (proliferación celular)	Forma parte de la PAI. Presenta diversidad genética en la región 3´. La proteína se trasloca a la célula epitelial gástrica, es fosforilada y modifica el citoesqueleto (<i>hummingbirf</i>).	Úlcera duodenal y cáncer gástrico.
<i>BabA</i>	Adhesina	Presenta dos alelos <i>babA1</i> y <i>baba2</i> ; <i>babA2</i> .	Úlcera duodenal y cáncer gástrico.

<i>oipA</i>	Adhesina	Presente en cepas <i>cagA</i> positivas. Asociación con inducción de IL-8.	Gastritis crónica y ulcera duodenal.
-------------	----------	---	---

3.6 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*

Helicobacter pylori puede detectarse mediante métodos invasivos y no invasivos en muestras clínicas. Habitualmente se utilizan técnicas invasivas como la endoscopia y posterior obtención de biopsias gástricas para el cultivo, la histología y la prueba rápida de la ureasa (RUT, Rapid Urease Test). El método de referencia para su determinación es el cultivo junto con RUT (Da Costa *et al.*, 2018 Corral *et al.*, 2019).

Entre los métodos no invasivos más frecuentes se encuentran la prueba del aliento (Urea Breath Test, UBT), que consiste en la medida del CO₂ exhalado mediante el marcaje del ¹³C; la serología, que se basa en la detección de anticuerpos específicos contra *H. pylori* en muestras de suero; y el análisis de detección de antígeno en heces, saliva y orina (Yamamoto *et al.*, 2000; Krogfelt *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015). La técnica UBT es altamente sensible y específica, pero requiere instrumentos caros, como el espectrómetro de masas, que no se encuentra siempre disponible en los laboratorios clínicos rutinarios (Bazzoli *et al.*, 2000). Respecto a la detección de anticuerpos de *H. pylori* en suero, son ensayos más económicos y simples y por tanto muy utilizados (Guarner *et al.*, 2010). Las muestras fecales pueden obtenerse fácilmente, y la precisión de la detección de antígenos fecales por inmunoensayo enzimático monoclonal (EIA) es alta (Korkmaz *et al.*, 2013). No obstante, estas técnicas presentan desventajas, ya que no permiten evaluar la existencia de una infección activa ni aislar la bacteria (Wang *et al.*, 2015), impidiendo la realización de pruebas de resistencia frente antibióticos o ensayos de caracterización genética.

Técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la detección de antígenos de *H. pylori* (HpSA) y la qPCR se han utilizado para detectar la presencia de *H. pylori* en muestras de heces (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2004; Hirai *et al.*, 2009; Momtaz *et al.*, 2012). Una de sus limitaciones es que pueden obtenerse falsos negativos, como resultado de la inhibición de la PCR por compuestos presentes en las heces o disminución de la eficacia de la técnica HpSA debido a una hemorragia digestiva alta (Gisbert *et al.*, 2004). Además, un resultado positivo obtenido mediante estas técnicas no implica la viabilidad del patógeno.

El cultivo podría ser la técnica más apropiada para la detección de *H. pylori* en heces, ya que permite una estimación numérica del organismo y conocer su susceptibilidad a los antibióticos. Sin embargo, las heces son muestras complejas, que contienen una gran cantidad de microorganismos, así como sales biliares, polisacáridos y enzimas degradativas (Delgado *et al.*, 2004; van Tongeren *et al.*, 2005), que pueden obstaculizar el crecimiento o supervivencia de microorganismos fastidiosos como es *H. pylori*. También puede ser que la bacteria sea viable pero no cultivable (VBNC) debido a las condiciones ambientales estresantes durante su recorrido por el tracto gastrointestinal. Debido a las desventajas que ofrecen las técnicas de cultivo, los métodos moleculares, como la PCR o la hibridación *in situ* (FISH) se consideran una alternativa a los métodos de diagnóstico invasivos para la detección de *H. pylori* (Moreno *et al.*, 2015).

3.7 TRATAMIENTO DE LA DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori* Y DESARROLLO DE RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS

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/12 h), junto con claritromicina (500 mg/12 h) y amoxicilina (1 g/24 h) durante un periodo de tiempo de 7 a 10 días. A los pacientes alérgicos a la amoxicilina se les suministra metronidazol (500 mg/12 h). Dos tratamientos alternativos son la terapia cuádruple: inhibidor de la bomba de protones, claritromicina, amoxicilina y metronidazol durante 14 días; o la terapia cuádruple con bismuto durante 10 días (Fallone *et al.*, 2016). Tras el fracaso de los tratamientos que incluyen claritromicina, se recomienda su sustitución por levofloxacino (500 mg/24 h) o subcitrate de bismuto (240 mg/12 h) (Crowe, 2017). Tras el fracaso de un tercer tratamiento, las pautas recomendadas en pacientes con incidencia muy clara de úlceras, especialmente con hemorragia o linfoma MALT, incluye rifabutina (150 mg/12 h). En caso de pacientes alérgicos a la penicilina se recomienda un tratamiento cuádruple con bismuto (240 mg/12 h), omeprazol (20 mg/ h), doxiciclina (100 mg/12 h) y metronidazol (500 mg/8 h) (Malfertheiner *et al.*, 2017). Sin embargo, hay numerosos fallos en todos los regímenes terapéuticos, debido a la aparición de cepas de resistencia.

La Organización Mundial de la Salud publicó en 2017 una lista con las 12 bacterias que suponen mayor riesgo para la salud humana por su resistencia a distintos antibióticos. Entre ellas, *H. pylori* se encuentra 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). Aun así, no dejan de detectarse cepas resistentes a la mayoría de los antibióticos usados en estas terapias alternativas (Avalos *et al.*, 2019).

Determinados estudios han mostrado la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina, debido a una mutación puntual en el 23S rRNA (Gerrits *et al.*, 2006), así como la resistencia al metronidazol debido a la inactivación del gen *rdxA* (Yang *et al.*, 2004). Actualmente, además, cada vez está siendo más frecuente la resistencia de *H. pylori* a la amoxicilina, debido a mutaciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBP) (Jaka *et al.*, 2018; Kageyama *et al.*, 2019). En algunas publicaciones se ha demostrado que la sustitución de aminoácidos en PBP1 confiere resistencia a la amoxicilina (Gerrits *et al.*, 2006) y este fenotipo es transmitido a otras cepas mediante transformación genética (Okamoto *et al.*, 2002), permitiendo la expansión de *H. pylori*. Estos genes de resistencia han sido utilizados para caracterizar aislados de muestras clínicas (Jeong *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2017).

3.8 EPIDEMIOLOGÍA

La infección por *H. pylori* es una de las infecciones crónicas más comunes en la humanidad. Desde que en 1983 tuvo lugar el descubrimiento de la existencia de esta infección en los seres humanos se han llevado a cabo numerosos estudios epidemiológicos. Todos los trabajos han tenido como objetivo determinar su prevalencia, identificar los 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 (Figura 7). Sin embargo, existe una amplia variabilidad en la prevalencia de *H. pylori* entre regiones y países. La edad, etnia, género, geografía y condiciones socioeconómicas son los factores que influyen en la incidencia y prevalencia de la infección por *H. pylori* (Chachúan *et al.*, 2020).

La prevalencia general es alta en los países en desarrollo como África (79,1%), América Latina, el Caribe (63,4%) y Asia (54,7%), siendo más baja en los países desarrollados, como América del Norte (37,1%) y Oceanía (24,4%). El país con menos prevalencia es Suiza (18,9%). España tiene una prevalencia del 54,9% (Figura 8). 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 (Lanas-Gimeno *et al.*, 2020).

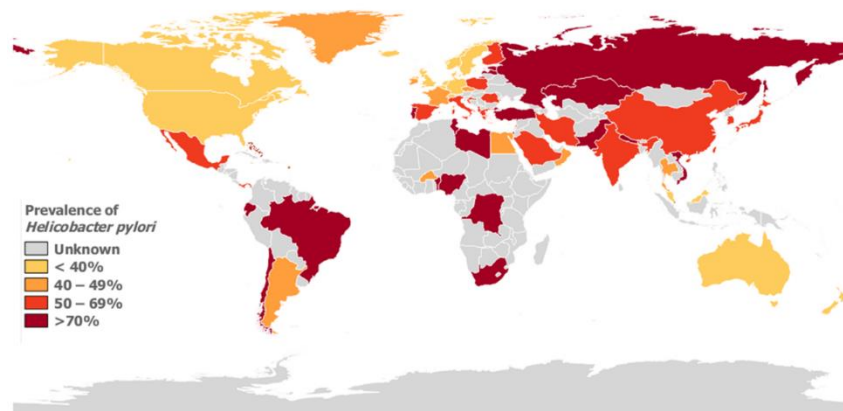


Figura 7: Prevalencia de *H. pylori*. <https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html>

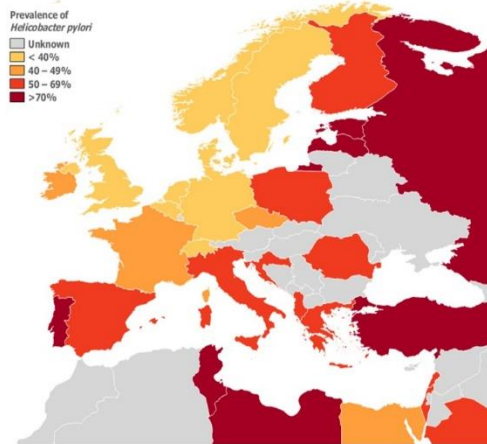


Figura 8: Prevalencia de *H. pylori* en Europa.
<https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html>.

Esta diferencia en la prevalencia de *H. pylori* refleja el nivel de urbanización, sanidad, acceso a agua limpia y estatus socioeconómico de la población (Hooi *et al.*, 2017). Dentro de un mismo país puede haber diferencias entre las poblaciones urbanas de mayor nivel económico y las poblaciones rurales.

Es probable que la verdadera prevalencia de *H. pylori* esté subestimada, debido a que no se incluye rutinariamente en revisiones de salud, lo que reduce la posibilidad de identificar su presencia en la población general. También 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. Esto podría explicar la estabilidad de su prevalencia en partes de Asia, América Latina y el Caribe cuando se compara con áreas desarrolladas de Europa, América del Norte y Oceanía (Hooi *et al.*, 2017).

Por otro lado, para explicar el caso de África donde la prevalencia de *H. pylori* es alta pero la tasa de cáncer gástrico es baja en comparación con China o Japón, se han propuesto factores relacionados con la virulencia de diferentes cepas, el polimorfismo genético humano o el tipo de dieta (Graham *et al.*, 2009).

3.9 MODO DE TRANSMISIÓN

A pesar de los numerosos esfuerzos, todavía no se ha determinado con exactitud el modo de transmisión de *H. pylori*. No obstante, existen evidencias que indican que *H. pylori* puede ser adquirido por múltiples vías.

- **Transmisión persona-persona:**

El contacto directo persona-persona se sugiere como una de las rutas más probables, siendo las posibles vías de propagación de la bacteria: fecal-oral, oral-oral y la gastro-oral. Las evidencias que apoyan la ruta fecal-oral incluyen determinados estudios donde se demuestra mediante cultivo la presencia de *H. pylori* en heces (Frost *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2021). Sin embargo, esta ruta sigue siendo cuestionada, debido a la baja concentración en heces en comparación con otros patógenos fecales de importancia en salud pública (Dolan *et al.*, 2018). Además, el cultivo de *H. pylori* a partir de heces se ha conseguido en muy pocas ocasiones, aunque sea común la presencia de sus antígenos y su DNA (Ford y Axon, 2010).

Determinados estudios muestran evidencias que apoyan la transmisión vía oral-oral. Se ha detectado *H. pylori* en muestras de saliva, placa dental y cavidad oral (Cellini *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2010; Fernández-Tilapa *et al.*, 2011). Un estudio realizado por Zou y Li (2011) mostró que la prevalencia de *H. pylori* en la cavidad oral de pacientes infectados era significativamente superior a la de los pacientes no infectados. Los autores demostraron 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, no fue posible el aislamiento de *H. pylori* mediante técnicas de cultivos, planteando ciertas dudas sobre esta hipótesis, ya que la detección de DNA de la bacteria no implica que el microorganismo esté vivo y sea infectivo.

La ruta de transmisión gastro-oral surge como consecuencia de que una infección aguda por *H. pylori* puede causar vómitos, lo que facilitaría la diseminación y supervivencia de la bacteria. Leung *et al.* (1999) confirmaron la posibilidad de aislar mediante cultivo *H. pylori* procedente del vómito de niños con gastroenteritis, apoyando la existencia de la ruta gastro-ora como medio de

transmisión. Además, Lizza *et al.* (2000), en un estudio realizado en cien niños y adolescentes en Italia, encontraron una relación directa entre la aparición de vómitos y la infección entre hermanos, sugiriendo que la importancia de esta vía de transmisión en niños es mucho mayor en comparación con la fecal-oral o la oral-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. La prevalencia de la infección por *H. pylori* muestra una relación directa con el acceso a agua limpia. Por tanto, la transmisión de *H. pylori* a través del agua puede ser de gran importancia en regiones del mundo donde la calidad de esta es baja, pudiendo ser un motivo de las diferencias observadas en la prevalencia de *H. pylori* entre países desarrollados y en vías de desarrollo (Bunn *et al.*, 2002).

Moreno y Ferrús (2012) analizaron 45 muestras de agua residual y cultivaron *H. pylori* en 6 de ellas. Además, Bai *et al.* (2016) detectaron *H. pylori* mediante PCR y qPCR y cultivaron la bacteria a partir de muestras de agua residual tratada, demostrando la presencia de *H. pylori* en plantas de depuración de aguas residuales, tanto en el afluente como en el efluente.

Igualmente, *H. pylori* ha sido detectado en agua potable 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) y qPCR (Liu *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2015). Sin embargo, la presencia de DNA no implica que la bacteria sea viable y por lo tanto potencialmente infecciosa. Su viabilidad únicamente puede ser demostrada 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 de viabilidad DVC-FISH y PMA-qPCR, que 6 de las 16 muestras de agua potable analizadas en las que se había detectado presencia de DNA de *H. pylori*, contenían formas viables de la bacteria, apoyando de este modo la hipótesis del agua como posible de transmisión para *H. pylori*.

En los sistemas de distribución de agua que utilizan cloro en la fase de desinfección a concentraciones entre 0,1 y 0,3 mg/L, puede que no se lleve a cabo una inactivación adecuada de *H. pylori*, como consecuencia de tratamientos inadecuados, interrumpidos o intermitentes, suponiendo un importante riesgo de infección para los individuos que consuman estas aguas tratadas de forma deficiente (Baker *et al.*, 2002). Algunos estudios confirman, además, que esta bacteria tiene mejor capacidad para tolerar los tratamientos de desinfección que los indicadores fecales básicos (Johnson *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 2004). Como consecuencias de ello, *H. pylori* puede estar presente en aguas cuando la enumeración de coliformes en medios selectivos indique que el agua es potable. Además, *H. pylori* tiene la capacidad de permanecer durante largos periodos de tiempo en sistemas de distribución de agua que contengan bajos niveles de cloro residual. Moreno *et al.* (2007) expusieron a *H. pylori* a una concentración de cloro libre de 0,96 mg/L, demostrando, mediante técnicas moleculares indicadoras de viabilidad, que *H. pylori* puede sobrevivir a los tratamientos de desinfección normalmente aplicados en las aguas potables.

Por otro lado, 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 depredación por protozoos (Watson *et al.*, 2004), como se comentará posteriormente.

Algunas amebas de vida libre (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. Moreno-Mesonero *et al.* (2017) detectaron *H. pylori* dentro de FLA a partir del análisis de 69 muestras de aguas residuales y 31 muestras de agua potable analizadas mediante técnicas de cultivo y técnicas moleculares de viabilidad, PMA-qPCR y DVC-FISH. Las autoras detectaron *H. pylori* en 39 (58,2%) de las muestras positivas para FLA mediante PMA-qPCR y 21 (31,3%) de las muestras resultaron positivas mediante DVC-FISH. Además, aislaron *H. pylori* a partir de 10 muestras de aguas residuales mediante técnicas de cultivo, demostrando por primera vez la capacidad de supervivencia de *H. pylori* dentro de FLA en agua potable y aguas residuales, lo que apoya

firmemente la hipótesis de que FLA podría desempeñar un papel importante en la transmisión de *H. pylori*.

- **Transmisión por alimentos:**

Existen estudios que apoyan la hipótesis de la transmisión de *H. pylori* a través de los alimentos, especialmente la leche y las verduras. Se ha detectado el DNA de *H. pylori* en leche sin tratar (Dore *et al.*, 1999; Momtaz *et al.*, 2014). Sin embargo, otros estudios no han encontrado *H. pylori* en este tipo de muestras, lo que podría explicarse por una desigual distribución geográfica de la bacteria (Turutoglu y Mudul, 2002; Tabatabaei, 2012). Un estudio realizado por Mousavi *et al.* (2014) en el que procesaron muestras de productos que habían sido producidos usando leche sin pasteurizar, demostró 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.

En relación con los vegetales, Atapoor *et al.* (2014) estudiaron 460 hortalizas (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) demostraron mediante cultivo y posterior confirmación por PCR, que el 13,68% de las 380 muestras de verduras y el 14% de las 50 muestras de ensalada comercial analizadas en Isfahan, Irán, contenían *H. pylori*. Estos resultados sugieren que las verduras podrían ser una posible ruta 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).

3.10 ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE (VBNC)

El concepto de estado Viable No Cultivable ha sido utilizado para indicar la incapacidad de reproducción de las bacterias ante ciertas situaciones estresantes. Se conocen un gran número de microorganismos, tanto patógenos como no patógenos, que entran en este estado de latencia, manteniendo su capacidad metabólica pero incapaces de crecer en los medios de cultivo habituales (Oliver, 2000a). Entre ellos, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori* (Sörberg *et al.*, 1996; Pinto *et al.*, 2015). Este hecho es de gran

importancia, ya que el estado VBNC podría constituir un reservorio importante de patógenos en el medio ambiente (Lleò *et al.*, 2007). Por otra parte, la mayoría de los estudios microbiológicos emplean técnicas de cultivo como único indicador de viabilidad, lo que supone que podría estar infravalorándose el potencial de estos microorganismos como agentes infecciosos (Oliver, 2005a).

Las bacterias entran en estado VBNC en entornos desfavorables en respuesta a factores como la escasez de nutrientes (Cook y Bolster, 2007), alteraciones en la temperatura óptima de incubación (Besnard *et al.*, 2002; Wong y Wang, 2004), elevadas o bajas concentraciones osmóticas (Asakura *et al.*, 2008), escasez o exceso de oxígeno (Kana *et al.*, 2008), aumento de la temperatura (Phillips, 2001), exposición a la luz (Gourmelon *et al.*, 1994) o cultivo prolongado, por lo que se considera como una estrategia de supervivencia en el ambiente.

La conversión a este estado se relaciona con cambios morfológicos: las bacterias suelen adquirir una forma esférica o cocoide y/o reducir su tamaño. Esta disminución les confiere una mayor superficie para la captación de nutrientes, mientras mantienen la menor cantidad de masa celular (Krebs y Taylor, 2011). No obstante, y aunque lo habitual es observar un cambio a morfología cocoide, Lázaro *et al.* (1999) demostraron la existencia de células en estado VBNC que conservan su morfología bacilar. Sato *et al.* (2003) demostraron la existencia de otras modificaciones ultraestructurales de la forma cocoide que a su vez clasificaron en 2 tipos: A y B. El tipo A hace referencia a una forma cocoide que presenta bordes irregulares y superficie rugosa, que se consideran una célula muerta; por otro lado, el tipo B con superficie más suave, de menor tamaño, se considera una célula viva.

Asimismo, en estado VBNC las células reducen la tasa de transporte de nutrientes, 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 mantiene altos niveles de ATP y potencial de membrana (Oliver, 2010; Li *et al.*, 2014).

Aunque se considera que mantienen la viabilidad y patogenicidad (Signoretto *et al.*, 2000), no todos los investigadores consideran que los patógenos sean capaces de iniciar un proceso de infección cuando se encuentran en el estado VBNC. Cappelier *et al.* (2007) demostraron que se

requieren ciertas condiciones para observar la virulencia de células VBNC de *Listeria monocytogenes* y confirmaron que la infección solo puede ser iniciada después de su reversión al estado cultivable y metabólicamente activo y no es su estado VBNC. También Figueroa *et al.* (2002) confirmaron que los microorganismos en forma VBNC pueden “resucitar” y adquirir de nuevo su estado activo o, de lo contrario, degenerar, en función de las condiciones ambientales.

Con respecto a *H. pylori* se han observado cambios morfológicos, metabólicos y en el crecimiento, (Nilius *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 2002) al entrar en un estado VBNC. Estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que condiciones desfavorables como temperatura alta (Mizoguchi *et al.*, 1999), pH alcalino (Hua *et al.*, 1996; Tominaga *et al.*, 1999), aerobiosis (Catrenich *et al.*, 1991), incubación prolongada en agua (Shahamat *et al.*, 1993) o tratamiento con antibiótico (Berry *et al.*, 1995), causan que *H. pylori* adquiera un fenotipo cocoide. Se ha demostrado que expresa genes presentes en su forma bacilar, lo que le permite mantener cierta actividad metabólica (Sisto *et al.*, 2000), tales como la actividad ureasa (Wang *et al.*, 1997). Mizoguchi *et al.* (1999), demostraron que en la forma cocoide *H. pylori* continúa sintetizando proteínas, aunque en mínimas cantidades (menos del 1% de la cantidad de proteínas sintetizadas por la forma bacilar) y también tiene la capacidad de producir pequeñas cantidades de DNA.

Actualmente se describen 3 morfologías diferentes de *H. pylori*: la forma bacilar viable y cultivable, considerada la más virulenta, la forma cocoide VBNC, menos virulenta que la primera, y la forma cocoide degenerativa no viable (Andersen *et al.*, 2009; Percival *et al.*, 2014 y Cellini *et al.*, 2014) en la que se pierde la cultivabilidad. Parece, además, que el cambio de la forma bacilar al estado cocoide (Figura 9) ocurre a través de una fase intermedia en forma de “U” (Citterio *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2007) en la que se mantienen intactas estructuras celulares como el citoplasma y la membrana celular (Sato *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2010) y podría por tanto considerarse una cuarta forma bacilar VBNC.

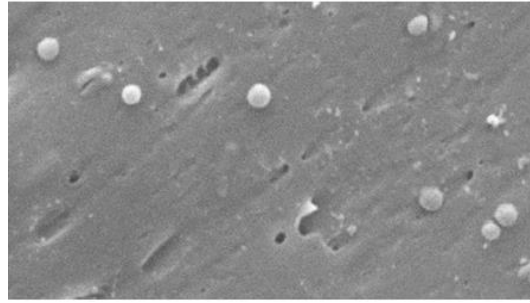


Figura 9: Micrografía electrónica de barrido que muestra la forma cocoide de *Helicobacter pylori* (Azevedo et al., 2007).

4 BIOPELICULAS

Las biopelículas son poblaciones microbianas que se concentran en una interfaz sólido-líquida, rodeadas de sustancias extracelulares poliméricas constituidas por polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Wingender y Flemming, 2011). Dichas sustancias extracelulares protegen a las bacterias, haciéndolas más resistentes frente a agresiones ambientales, como podrían ser los antibióticos o los desinfectantes químicos utilizados en las estaciones de aguas residuales y potabilizadoras.

La formación de biopelículas comienza con la unión reversible a una superficie, a través de interacciones específicas entre la pared bacteriana y el sustrato. Dicho contacto provoca que el microorganismo fortalezca los enlaces reversibles célula-sustrato y sintetice y libere componentes de la matriz extracelular. A medida que la colonia crece y adquiere una arquitectura similar a un hongo, la matriz permite que otras especies se unan a la colonia en desarrollo. En el estado de madurez, la biopelícula es capaz de liberar parte de sus colonias en el medio ambiente, para colonizar superficies distantes (Figura 10).

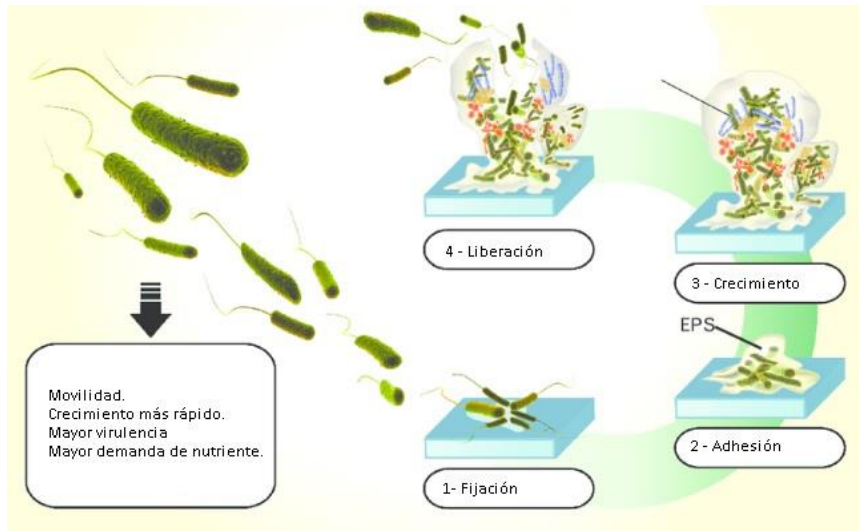


Figura 10: Formación de biopelículas (Campuzano *et al.*, 2018).

Las biopelículas proporcionan protección contra agresiones ambientales y antimicrobianas (Dorr *et al.*, 2010; Lebeaux *et al.*, 2014; Hathroubi *et al.*, 2016). Se ha demostrado que las bacterias adheridas son mucho más resistentes que las que se encuentran en suspensión. Esta resistencia es proporcionada por la misma biopelícula, formada por diferentes especies de microorganismos y por la producción de sustancias poliméricas extracelulares (González, 2005).

Flemming (2002) afirmó que las biopelículas son la forma de vida más exitosa en el planeta. Las biopelículas están implicadas en más del 80% de las infecciones crónicas causadas por bacterias, entre las que se incluye otitis, endocarditis, infecciones del tracto urinario e infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (Hall-Stoodly *et al.*, 2004).

Las biopelículas representan el 95% de la biomasa total en los sistemas de distribución de agua potable, y constituyen un ecosistema que influye en la calidad del agua, alterando el gusto, el color o el olor. Además, alteran su microbiología, ya que pueden originar desprendimientos bacterianos, principalmente de patógenos oportunistas, produciendo la contaminación en el agua potable distribuida.

Durante más de 15 años se ha estudiado la capacidad de *H. pylori* para formar biopelículas y su crecimiento óptimo en entornos compuestos por altas cantidades de Carbono:Nitrógeno (C:N) (Stark *et al.*, 1999; Vincent, 1995). La capacidad de *H. pylori* para desarrollar biopelículas ha sido demostrada en numerosos estudios (Cole *et al.*, 2004; Cellini *et al.*, 2008; Yonezawa *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2008; Di Campli *et al.*, 2010). Percival *et al.* (2004) demostraron que *H. pylori* tiene la capacidad de sobrevivir en biopelículas cuando crece en altas condiciones de C:N. Por su parte, Stark *et al.* (1999) demostraron que *H. pylori* es capaz de formar biopelículas insolubles al agua.

Cellini *et al.* (2005) demostraron que la capacidad de formar biopelículas está modulada por un mecanismo de *quorum sensing* en el que las proteínas LuxS actúan como autoinductores. Parsek *et al.* (2005) demostraron que *H. pylori* expresa un homólogo del gen *luxS*, y que, además, dicho gen está implicado en la unión bacteriana. Por otro lado, Cole *et al.* (2004) demostraron un aumento de dos veces en la formación de biopelículas de *H. pylori* mutantes *luxS* en comparación con el control. Posteriormente Rader *et al.* (2007) señalaron la movilidad defectuosa de mutantes *luxS* y destacaron la importancia de AI-2, molécula reguladora de genes asociados a los flagelos de *H. pylori*, demostrando que la liberación de AI-2 puede hacer que *H. pylori* se separe de estas biopelículas, evitando nichos de competencia y favoreciendo su dispersión.

Carron (2009), demostró la presencia de bacterias asociadas a biopelículas en la superficie de la mucosa gástrica de pacientes positivos en *H. pylori*. En ambientes extragástricos, Andersen *et al.* (2009) demostraron la presencia de biopelículas de *H. pylori* en placas dentales, pero no su capacidad para formar dichas estructuras tridimensionales. Por último, Atapoor *et al.* (2014), Yahaghi *et al.* (2014) y Ng *et al.* (2017), mostraron la presencia de *H. pylori* en biopelículas asociadas con vegetales.

La asociación de *H. pylori* a biopelículas en los sistemas de agua potable explicaría su supervivencia y la hipótesis del agua como vía de transmisión de la bacteria (Azevedo *et al.*, 2006; Bellack *et al.*, 2006; Linke *et al.*, 2010). Se ha demostrado su presencia en biopelículas presentes en las tuberías de los sistemas de distribución de agua potable, así como su capacidad de adherirse a distintos materiales como cobre y acero inoxidable (Azevedo *et al.*, 2006; Nicoletta *et al.*, 2018). También se ha demostrado mediante técnicas moleculares, la presencia de *H. pylori* en biopelículas

de pozos, ríos y muestras de tuberías en sistemas de agua potable (Park *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2004; Gião *et al.*, 2008).

Un elevado porcentaje de bacterias formadoras de biopelículas o que forman parte de ellas se encuentran en estado viable no cultivable (VBNC) (Lewis, 2007; Bessa *et al.*, 2013). Así, en muestras de agua tratadas con sistemas de potabilización adecuados, la falta de aislamiento mediante cultivo puede deberse, tanto a la capacidad de *H. pylori* para formar biopelículas como al paso de la bacteria a un estado viable no cultivable (VBNC) (Yufei *et al.*, 2018; Rafik *et al.*, 2020).

El principal objetivo del control microbiano y la eliminación de biopelículas en los sistemas de distribución de agua potable son prevenir el deterioro de las instalaciones y asegurar que se cumplen las especificaciones de calidad y seguridad establecidas. El tratamiento de desinfección de las biopelículas implica normalmente un tratamiento químico con biocidas (Otter *et al.*, 2015). Uno de los biocidas más comunes en el tratamiento de las aguas potables y residuales es el cloro. Es el desinfectante más efectivo y menos caro. Elimina las bacterias de biopelículas y también destruye el polímero extracelular. Las concentraciones necesarias para eliminar las biopelículas son más elevadas que las utilizadas para las bacterias libres. Altas concentraciones de cloro durante cortos periodos de tiempo son más efectivos que bajas concentraciones durante un tiempo prolongado (Diomedi *et al.*, 2017). Sin embargo, existe una limitación en su uso y su concentración en los sistemas de distribución de agua potable, ya que los niveles de cloro utilizados para la potabilización deben oscilar entre 0,1 y 0,3 mg/L. Mediante técnicas moleculares de viabilidad, Moreno *et al.* (2007) confirmaron que *H. pylori* puede sobrevivir a bajas concentraciones de cloro en estado VBNC. Sin embargo, en este estudio no tuvieron en cuenta la capacidad de supervivencia y la formación de biopelículas de *H. pylori*. Solo un estudio realizado por Gião *et al.* (2010) demostró que *H. pylori* tiene la capacidad de persistir en biopelículas de agua potable, después de su exposición a concentraciones de cloro entre 0,2 y 2 mg/mL, apoyando la hipótesis de que *H. pylori* sobreviva en los sistemas acuáticos dentro de biopelículas y no en su estado planctónico. Sin embargo, esta investigación solo se desarrolló con células sésiles y no se consideraron importantes parámetros que pueden afectar a la eficacia del proceso de cloración, como son la temperatura, la luz y las características fisicoquímicas del agua.

Existen diferentes alternativas al cloro como desinfectante, tales como la radiación UV-C ($\lambda=254$ nm). Hay que tener en cuenta que con esta técnica solo se desinfecta la parte expuesta de los objetos donde inciden los rayos de forma perpendicular y aunque el tiempo de exposición de forma generalizada oscila entre 3 y 5 minutos, éste varía en función de la estructura de la superficie (lisa o rugosa) y presenta limitaciones debido al efecto de sombra (Koutchma *et al.*, 2008). Por lo que se refiere a *H. pylori*, un estudio realizado por Hayes *et al.* (2006) demostró su inactivación celular con luz UV. Sin embargo, se realizó con cepas de referencia, sin considerarse la capacidad de supervivencia de *H. pylori* en suministros de distribución de agua y su capacidad para formar biopelículas.

Por consiguiente, sería de gran interés conocer si *H. pylori* tiene la capacidad, por sí mismo, de formar biopelículas o únicamente se integra en ellas participando de forma no activa. Del mismo modo la evaluación de estrategias de erradicación del patógeno en biopelículas mediante técnicas de viabilidad sería de gran utilidad para la prevención y el control de *H. pylori* en los sistemas de distribución de agua.

5 OTRAS ESPECIES PATÓGENAS DEL GÉNERO *Helicobacter*

Varios estudios han demostrado que determinadas especies pertenecientes al género *Helicobacter* están relacionadas con enteritis, hepatitis y colecistitis en pacientes inmunodeprimidos (Boutin, 2005). Casswall *et al.* (2010) detectaron especies de *Helicobacter* asociadas con colitis ulcerosa y enfermedades hepáticas en niños y adolescentes con enfermedad crónica de hígado. Además, las especies pertenecientes a dicho género tienen la habilidad de coexistir en la misma muestra con otras proteobacterias patógenas como *Campylobacter* y *Arcobacter* (Petersen *et al.*, 2007).

Otras especies patógenas del género *Helicobacter* (Non-*H. pylori*-Helicobacters, NHPH), como *H. hepaticus*, *H. pullorum* o *H. bilis* se han vinculado con enfermedades como hepatitis autoinmune, hepatocarcinoma, enfermedad hepática crónica, enfermedad hepatobiliar autoinmune, cáncer pancreático en animales y humanos (Mateos-Muñoz *et al.*, 2013). Por tanto, identificar su posible presencia en el ambiente también resultaría de suma importancia y aportaría una información muy valiosa acerca de la transmisión de estos NHPH.

H. pullorum es un comensal del intestino de aves, presente en heces y biopsias de pacientes con gastroenteritis, hepatopatía crónica y enfermedad inflamatoria intestinal. Se ha detectado en un 30% de las canales y en carne de pollo procesada y existe consenso en considerarlo un patógeno emergente transmitido por alimentos. Estudios previos de nuestro grupo lo han detectado por PCR en carne y hamburguesas de pollo comerciales. Sin embargo, no existen más datos sobre su incidencia en España (Abd El-Ghany, 2020).

Helicobacter suis coloniza el estómago de los cerdos, produciendo gastritis crónica, úlceras y erosiones de la mucosa gástrica. *H. suis* es considerada como la especie de *Helicobacter* causante de gastritis recurrentes en humano más frecuente después de *H. pylori*. Este potencial papel zoonótico es muy importante y está siendo estudiado actualmente en profundidad (Nurgaliev, 2020).

Parece que el agua también podría ser una posible vía de transmisión de otras especies del género *Helicobacter*, como *H. mustelae*, *H. muridarum*, *H. felix*, *H. canadensis*, *H. pullorum*, *H. canis* (Azevedo *et al.*, 2008) y *H. cetorum* (Goldman *et al.*, 2009), aunque no hay muchos estudios al respecto. El cultivo y aislamiento de *Helicobacter* spp. a partir de muestras ambientales es extremadamente complicado, ya que no existen métodos adecuados y específicos para el cultivo de NHPH (Øverby *et al.*, 2016), y únicamente se ha aislado *H. suis* de biopsia porcina de forma ocasional. Por ello, para su detección se utilizan habitualmente técnicas moleculares (Cunachi *et al.*, 2016; Fernández-Delgado *et al.*, 2016).

6 METODOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter*

El aislamiento mediante cultivo es la técnica más utilizada para la identificación de cualquier microorganismo patógeno, ya que la cultivabilidad prueba la capacidad infectiva de las bacterias, al mismo tiempo que permite caracterizar las cepas y hacer estudios de sensibilidad a los antibióticos. Actualmente, el método de cultivo continúa siendo el “Gold-standard” para la validación de cualquier otra metodología utilizada para la identificación de microorganismos (EPA, 2015). La infectividad de una muestra contaminada por un microorganismo solo se considera aprobada si este es capaz de crecer en un medio de cultivo (Madiga *et al.*, 2004).

Sin embargo, existen diversos problemas derivados de la utilización del cultivo para la detección de diversos microorganismos, como son la elección de un medio de cultivo apropiado, los requerimientos gaseosos, el tiempo de crecimiento o la pérdida de cultivabilidad debido a las condiciones de estrés. Kimura (2006) estimó que sólo un 1% de los microorganismos pueden ser cultivados en medios de cultivo, mientras que el otro 99% no es cultivable *in vitro*.

Igualmente, como ya se ha comentado, las formas VBNC podrían ser infectivas, pero no son detectadas mediante métodos convencionales de cultivo, lo que puede plantear un riesgo de salud pública significativo. Como consecuencia de ello, se necesitan métodos alternativos para demostrar si las células no cultivables son viables y por lo tanto potencialmente perjudiciales para la salud humana (Oliver, 2010).

Por último, hay que considerar que en las muestras ambientales las concentraciones de un patógeno son mucho menores que en las muestras clínicas, y que en ellas coexiste una gran cantidad de microbiota competitiva que puede interferir con el crecimiento del microorganismo a detectar.

Para evitar este tipo de limitaciones se han desarrollado metodologías alternativas, basadas en el análisis de ácidos nucleicos, como la Reacción en Cadena de la Polimeras (PCR), de extrema sensibilidad y versatilidad, o la técnica de Hibridación *in situ* con Sondas Fluorescentes (FISH) que permite el análisis de los ácidos nucleicos dentro de las células sin necesidad de alterar su morfología.

Son numerosos los estudios 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). Igualmente, se han utilizado métodos más sensibles como la qPCR (Zhang *et al.*, 2012b), que han demostrado la presencia de este patógeno de agua. Y la técnica FISH que ha sido empleada para detectar *H. pylori* en aguas residuales (Vesga *et al.*, 2018), en biopelículas en agua potable (Bragança *et al.*, 2007) y en agua dulce (Fernández-Delgado *et al.*, 2016).

A pesar de su eficacia, dichas metodologías no pueden diferenciar entre células vivas y muertas, por lo tanto, no determinan la viabilidad del microorganismo patógeno. El DNA puede persistir en el medio ambiente como DNA extracelular o de células muertas, indistinguible del de

células vivas (Josephson *et al.*, 1993; Pammi *et al.*, 2013; Torti *et al.*, 2015; Carini *et al.*, 2016). Sin una identificación selectiva es probable que las técnicas moleculares sobreestimen los tipos y el número de microorganismos patógenos presentes en un ecosistema (Carini *et al.*, 2016).

6.1 DETECCIÓN Y AISLAMIENTO POR CULTIVO

El cultivo es el método utilizado para la detección e identificación de microorganismos mediante la observación de su crecimiento. La recuperación bacteriana de una muestra clínica o ambiental depende principalmente de la técnica empleada, la naturaleza de la muestra, el número de microorganismos presentes en ella y el estado fisiológico de las células presentes (Bonnet *et al.*, 2020). Las muestras ambientales o de alimentos están altamente contaminadas, por lo que se hace necesario el uso de medios selectivos que contengan una combinación de antibióticos capaz de inhibir el crecimiento de la microbiota acompañante, y nutrientes específicos para estimular el crecimiento del microorganismo a detectar.

Por otra parte, dada la escasa concentración a la que suelen encontrarse en el ambiente, para el aislamiento de determinados microorganismos, se requiere una primera fase de enriquecimiento, que consiste en incubar la muestra en un medio líquido selectivo, con la finalidad de eliminar parte de la microbiota acompañante, durante un periodo de 24-48 horas, en condiciones óptimas según el microorganismo.

Para el aislamiento de *Helicobacter pylori* se han empleado una gran variedad de medios de cultivos sólidos o líquidos, selectivos y no selectivos. Entre los medios de cultivo sólidos se han utilizado BHI, Brucella, Columbia, DNase agar, Muller Hinton, Trypticase de soya (TSA), agar Wilkins–Chalgren (Stevenson *et al.*, 2000; Poms y Tatini, 2001), Agar Base, Medio HPSPA (agar *H. pylori* peptona especial) (Degnan *et al.*, 2003) o Agar RA2 (Park *et al.*, 2001). Respecto a los medios líquidos, los más empleados han sido Caldo Brucella (Walsh y Moran, 1997), caldo infusión cerebro corazón, caldo tripticase de soja, caldo Mueller-Hinton (Shahamat *et al.*, 1991; Walsh y Moran, 1997), Caldo Andersen' (Andersen *et al.*, 1997), y Caldo Columbia (Shahamat *et al.*, 1991). Para su enriquecimiento se han usado múltiples suplementos, tales como sangre pura, suero, eritrocitos lisados, hemina (Shahamat *et al.*, 1991), extracto de levadura (Walsh y Moran, 1997; Westblom *et*

al., 1999), peptona (Walsh y Moran, 1997), IsoVitaleX (Westblom *et al.*, 1999), Vitox (Morgan *et al.*, 1990), almidón (Coudron y Stratton, 1995), y ciclodextrinas (Walsh y Mora, 1997).

Para que un medio sea selectivo se utiliza una combinación de antibióticos a los que *H. pylori* es resistente. Los más frecuentes son vancomicina, trimetoprim, cefsulodina y anfotericina B. También existen medios comerciales para su aislamiento selectivo, como el Agar Pylori® (Biomerieux, Francia). Sin embargo, estos medios están diseñados para su detección a partir de muestras clínicas, mucho menos contaminadas y con altas concentraciones del patógeno.

Determinados estudios han buscado desarrollar un medio de cultivo específico y selectivo para el aislamiento de *H. pylori* en muestras altamente contaminadas, como es el caso de aguas o alimento. Duque-Jamaica *et al.* (2012) evaluaron medios de cultivo como BHI, Brucella, y Mueller-Hinton, así como diversos suplementos a diferentes concentraciones (sangre de cordero, suero fetal bovino y sangre de caballo desfibrinada, suplemento antibiótico DENT, suplemento antibiótico Preston, IsoVitaleX y Vitox). Como resultado obtuvieron que los medios y condiciones de cultivo óptimos eran: Infusión Cerebro corazón, agar sangre (1,5% w/v), sangre de cordero (3,18% v/v), DENT (0,11% v/v), y Vitox (0,52% v/v) a 37 °C con CO₂ filtrado (5% v/v).

Con respecto al aislamiento de *H. pylori* a partir de muestras de agua, se han utilizado diferentes medios de cultivo, entre los cuales cabe destacar el Agar Columbia suplementado con 10% de sangre de caballo, Agar Brucella con 5% de sangre de oveja desfibrinada, 10 mg/L vancomicina, 5 mg/L trimetoprima, y 2500 U/L sulfato de polimixina B, 7,5 mg/L de anfotericina B, y 5 mg/L cefsulodina o Agar RA2 (0,05% de extracto de levadura, 0,025% peptona; 0,025% de triptona; 0,05% de casaminoácidos; 0,05% de dextrosa; 0,05% de almidón soluble; 0,03% de piruvato de sodio; 0,03% de fosfato dipotásico; 0,005% de sulfato de magnesio y 1,5% de Agar) (Park *et al.*, 2001; Queralt y Araujo, 2007; Gião *et al.*, 2008; Buck y Oliver, 2010; Moreno y Ferrús, 2012).

A pesar de todas las combinaciones y alternativas probadas, actualmente no existe ningún medio de cultivo óptimo para el aislamiento de *Helicobacter pylori* en muestras ambientales, debido a que la microbiota acompañante dificulta su crecimiento. Para favorecer la eliminación de la microbiota se han empleado técnicas alternativas, previas al cultivo sólido, como la separación inmunomagnética (IMS) y el tratamiento ácido. Lu *et al.* (2002) utilizaron una combinación de SIM

y técnica de cultivo, logrando aislar *H. pylori* en muestras de aguas residuales. Moreno y Ferrús (2012) utilizaron la técnica de filtración por membrana, inoculando los filtros en caldo Columbia para un pre-enriquecimiento y posteriormente colocando el filtro sobre Agar pylori y Agar Columbia suplementado con 10% de sangre de caballo desfibrilada y suplemento Dent. Sin embargo, no consiguieron obtener colonias aisladas y solo pudieron detectar el crecimiento de *H. pylori* en las placas mediante técnicas moleculares como PCR y FISH.

6.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos, pudiéndose obtener millones de copias de la secuencia blanco. Sus principales ventajas son su sencillez, rapidez y sensibilidad, por lo que numerosos laboratorios la utilizan para la detección de microorganismos.

Un aspecto importante para su uso adecuado es el diseño de los iniciadores. Son moléculas de DNA monocatenario de entre 15 y 30 nucleótidos que la DNA polimerasa emplea para iniciar su polimerización de forma que el punto de inicio de la síntesis de nuevas moléculas de DNA lo establece la posición del iniciador. Los iniciadores tienen que ser específicos del DNA que se desee amplificar (Galluzzi *et al.*, 2018).

Uno de los principales inconvenientes de la PCR es que no puede diferenciar entre células vivas y muertas ya que puede amplificar material genético procedente de células inactivas (Tamay de Dios *et al.*, 2013) y ADN extracelular (Pathak *et al.*, 2012). Respecto a la metodología, su principal dificultad es eliminar los inhibidores de la reacción presente en matrices complejas (Wilson, 1997). Por lo que respecta a *H. pylori*, se le añade el inconveniente de presentarse en su estado VBNC, cuya pared celular es menos accesible, lo que dificulta la extracción de DNA para su posterior análisis (Orta De Velásquez *et al.*, 2016; Boehnke *et al.*, 2018).

La PCR se ha propuesto como el método más eficaz para la detección de *H. pylori* en muestras clínicas y muestras con alto contenido de microbiota acompañante e interferentes orgánicos, y se ha utilizado para su detección en diferentes muestras: placa dental y saliva (Song *et al.*, 2001); heces (Lu *et al.*, 2002); leche cruda (Rahimi y Kheirabadi, 2012; Jiang y Doyle, 2002);

vegetales (Atapoor *et al.*, 2014); moluscos (Nocker *et al.*, 2007); aguas superficiales y residuales (Horiuchi *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2003a; Krumbiegel *et al.*, 2004; Moreno y Ferrús 2012).

La PCR, además, permite la amplificación de genes específicos de *H. pylori*, como *ureA* (Cuervo *et al.*, 2017); *hpaA* (Janzon *et al.*, 2009); *cagA* (Chomvarin *et al.*, 2017); *vacA* (Moreno y Ferrús, 2012) y *glmM* (Bahrami *et al.*, 2013). Lu *et al.* (2002) utilizaron secuencias de iniciadores para el gen 16S rRNA y las formas alélicas del gen *vacA* (*vacA s1a*, *vacA s1b*, *vacA s2*, *vacA m1* y *vacA m2*) para verificar los aislamientos de *H. pylori* obtenido a partir de aguas residuales. Moreno y Ferrús (2012) utilizaron secuencias de oligonucleótidos que codifican para el gen *vacA* y mediante PCR obtuvieron resultados positivos para la detección de *H. pylori* en aguas residuales tomadas después de los tratamientos biológicos y de desinfección. Montero-Campo *et al.* (2015), por su parte, utilizaron el gen *glmM* para determinar la presencia de *H. pylori* en muestras de agua potable en Costa Rica, de las cuales el 79,5% resultaron positivas.

6.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR)

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa, utilizada para amplificar y cuantificar de forma absoluta el producto de amplificación (DNA). Se caracteriza por su alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10⁷ equivalentes genómicos de la secuencia blanco) (Brechtbuehl *et al.*, 2001), rapidez en la visualización del producto, ya que no es necesario la electroforesis posterior. Mayor sensibilidad que la PCR convencional (McDaniels *et al.*, 2005).

La reacción de qPCR utilizan los mismos componentes químicos 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. Para la detección de los amplicones, existen varias metodologías, entre las que 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). Cada una de las metodologías tiene sus propias características; sin embargo, en todas se emite una fluorescencia que es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de DNA de doble cadena obtenidas en cada ciclo de PCR.

Entre los distintos métodos no específicos de detección, los más usados en los estudios de microbiología ambiental son los que utilizan SYBR Green I y sondas TaqMan (Kim *et al.*, 2013) (Figura 11).

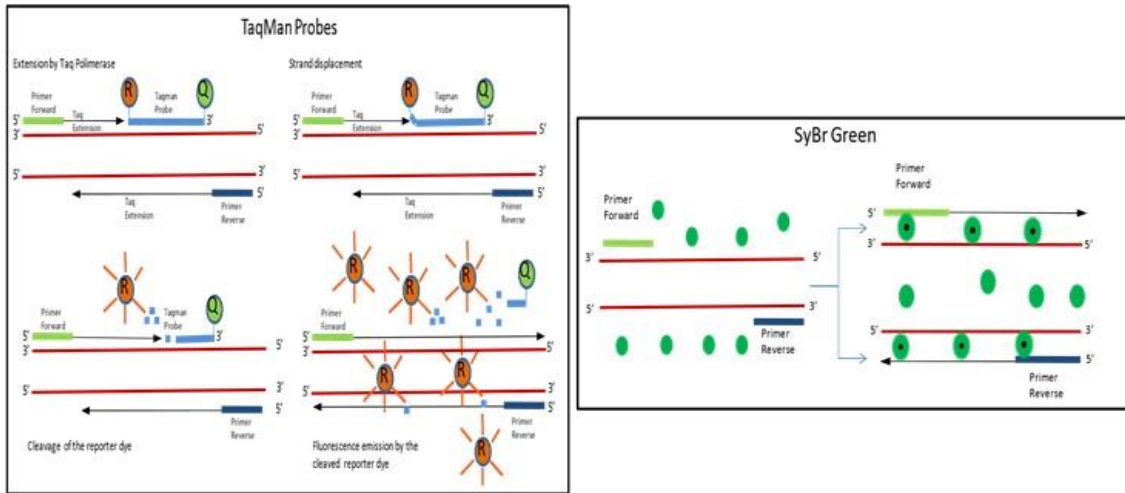


Figura 11: Métodos de detección de la qPCR: TaqMan y SyBr Green (Seminago *et al.*, 2015).

SYBR Green es una molécula cargada positivamente que, mientras no se une al DNA, prácticamente no emite fluorescencia, pero cuando se une al surco menor de la doble hélice del DNA de forma inespecífica incrementa su fluorescencia hasta 1000 veces (Wittwer *et al.*, 1997). A medida que se van generando amplicones aumenta, por tanto, la señal de fluorescencia. Es uno de los marcadores fluorescentes más utilizados por los investigadores debido a su bajo coste, simplicidad y flexibilidad de aplicación comparada con otras opciones (Malinen *et al.*, 2003). Sin embargo, una de sus principales desventajas es que pueden formarse dímeros de DNA, dando falsos resultados positivos, por lo que la especificidad en este tipo de análisis se encuentra determinada por los iniciadores. Para evitar este inconveniente, se optimiza su reacción realizando una "curva de disociación" (*melting curve*) al final de la reacción, con el fin de estimar la composición y tamaño adecuados de los fragmentos de DNA en función de sus temperaturas de fusión (T_m , *melting temperature*) (Ririe *et al.*, 1997).

Por otro lado, el método TaqMan incluye el uso de un oligonucleótido adicional (la sonda TaqMan), además de los dos iniciadores. La especificidad de este tipo de qPCR es mayor que la que usa SYBR Green I, porque además del uso de los iniciadores específicos se utiliza una sonda Taqman, permitiendo la reducción de falsos positivos (Yu *et al.*, 2005).

El principal objetivo, de la qPCR es la cuantificación de los microorganismos de interés. En una muestra con una concentración más alta de las secuencias diana, llegar a cierto nivel de concentración del DNA diana le llevará menos ciclos de amplificación. Esto quiere decir que la cantidad inicial de una secuencia diana en una muestra es inversamente proporcional al valor del ciclo umbral (Ct), también conocido como ciclo de cuantificación (Cq), que es el número de ciclos necesarios para que la concentración del DNA diana de interés exceda un valor umbral sobre la señal de fluorescencia basal durante la fase exponencial de amplificación (Valasek y Repa, 2005) (Figura 12).

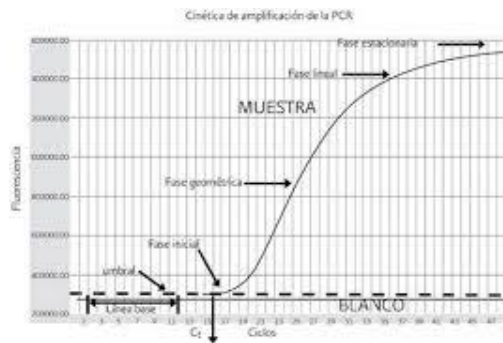


Figura 12: Cinética de amplificación de la PCR.

Como ya se ha comentado, los métodos de cultivo infravaloran la presencia de *H. pylori* ambientales, mientras que la qPCR la sobreestiman. Por ello, los métodos moleculares de detección de células viables parecen ser actualmente los únicos que pueden demostrar la presencia de células viables de *H. pylori* en agua y la gravedad de su presencia para la salud pública.

6.4 MODIFICACION DE LA TÉCNICA EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR) PARA DETECTAR ÚNICAMENTE DNA DE CÉLULAS VIABLES

Diversos estudios se han centrado en el uso de colorantes intercalantes con el DNA, como el yoduro de monoazida de propidio (PMA) y el bromuro de monoazida de etidio (EMA), que inhiben

la amplificación por PCR del DNA derivado de células no viables (Pan y Breidt., 2007; Nocker *et al.*, 2006). EMA y PMA, derivados del bromuro de etidio y el yoduro de propidio respectivamente, son tintes impermeables a la membrana que pueden penetrar solo en células bacterianas con membrana comprometida. Una vez dentro de las células, EMA o PMA se unen al DNA, intercalándose entre bases y formando enlaces covalentes estables cuando se exponen a la luz brillante, estabilizando la doble hebra de DNA y evitando su amplificación (Figura 13).

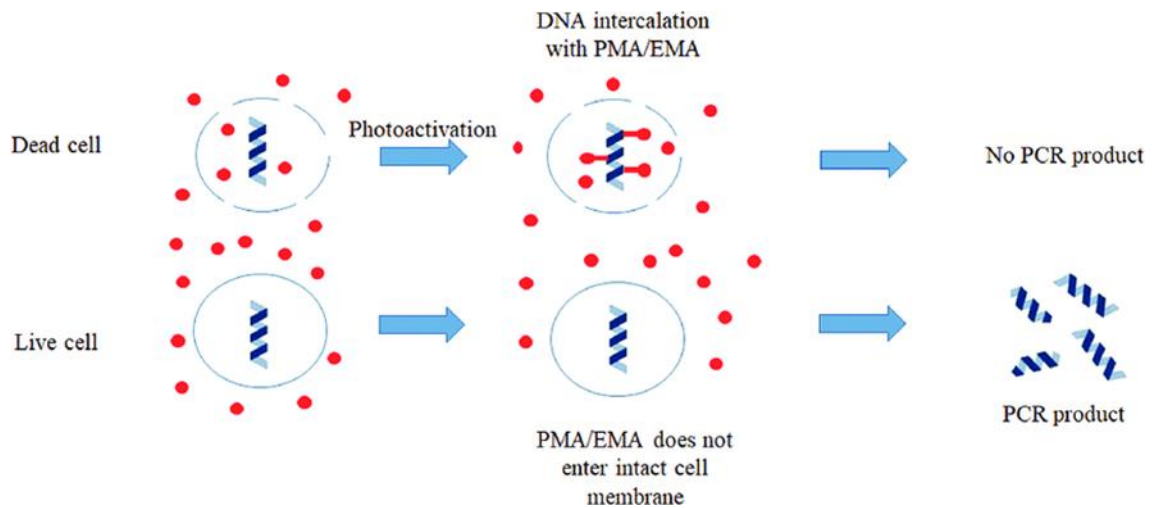


Figura 13: Mecanismo de amplificación de DNA, usando los colorantes intercalantes PMA/EMA en combinación con la qPCR. Penetran en las células comprometidas uniéndose mediante enlace covalentes al DNA tras su fotoactivación y se detiene la amplificación del ADN de células no viables.

Actualmente se ha propuesto otra metodología alternativa, basada en el uso de un colorante comercial doble fotoactivable, PEMAX™, desarrollada por GenIUL, S.L (Barcelona, España). Combina dos formas de fenuro de azida fotoactivas con diferente carga y tamaño. La molécula más pequeña puede cruzar la pared celular, revirtiéndose por medio de bombas de eflujo activas. De esta forma, solo el DNA de las células sin actividad de estas bombas se verán afectadas por el intercalante. La otra molécula es necesaria para neutralizar el DNA de las células muertas en muestras en las que la cantidad de células no viables sea elevada. Combinando ambos colorantes y el uso específico de un tampón (que permite a las células preservar su homeostasis), la qPCR solo detectará el DNA de las células vivas (Agustí *et al.*, 2017; Lizana *et al.*, 2017).

6.5 HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS FLUORESCENTES: FISH Y 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, y combina la precisión de la genética molecular con la información visual de la microscopía, permitiendo la identificación y visualización de la de las células microbianas (Amann *et al.*, 1995; Cequeira *et al.*, 2008).

La técnica FISH detecta secuencias de ácidos nucleicos mediante una sonda marcada con fluorocromos, que específicamente hibrida con la secuencia complementaria del rRNA bacteriano sin dañar la morfología de la célula. Un protocolo típico para FISH, incluye 4 pasos: fijación y permeabilización de la muestra, hibridación, lavado y la detección de las células marcadas mediante el uso del microscopio de epifluorescencia o confocal (Figura 14).

Antes de la hibridación, las muestras deben ser fijadas, con el fin de estabilizar las macromoléculas y estructuras del citoesqueleto, evitando de este modo la lisis durante la hibridación. Este paso favorece, además, la permeabilización de las membranas celulares, facilitando la penetración de la sonda fluorescente, y protege al RNA de la degradación por ribonucleasas endógenas (Moter y Göbel, 2000). La hibridación debe realizarse bajo condiciones estrictas, ya que es la etapa donde la sonda de DNA tiene la capacidad para aparearse, unirse y formar moléculas de cadena doble.

En microbiología la molécula diana más usada para FISH es el rRNA 16S, ya que puede encontrarse en todos los organismos vivos, es estable, presenta un elevado número de copias (generalmente algunos miles por célula) y contiene regiones tanto variables como conservadas (Woese, 1987).



Figura 14: Diagrama de Flujo de un típico procedimiento de FISH (Rodríguez *et al.*, 2013).

La fase más delicada y crítica de esta técnica es el diseño de las sondas. Deben ser suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria objeto de estudio en presencia de otras, en algunos casos con moléculas de rRNA muy homólogos. 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).

Los parámetros que determinan la especificidad de la sonda son, además de su secuencia, la temperatura y la concentración de formamida en el tampón de hibridación. La función de la formamida es debilitar las uniones de hidrógeno de los duplex DNA-DNA y DNA-RNA (Rodríguez, 2011).

La hibridación se realiza bajo condiciones de oscuridad, a temperatura que oscila entre 37 °C a 50 °C, con tiempos que varían entre 30 minutos y varias horas. El nivel de astringencia se puede ajustar modificando la concentración de formamida o la temperatura de hibridación (Fuchs *et al.*, 2001).

La técnica FISH presenta ventajas frente a otras metodologías, como la PCR o la detección de anticuerpos, ya que no requiere de un cultivo previo, ni de extracción de ácidos nucleicos. Su principal limitación es su sensibilidad, que depende de la propia sonda y de la matriz analizada. Otros factores que ejercen una importante influencia en la intensidad de la señal son el medio usado para

el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra previos a su visualización (Fuchs *et al.*, 2001).

El uso de sondas FISH modificadas tipo 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. Esta modificación consiste en la formación de un puente que conecta el oxígeno 2' con el carbono 4' de dicho anillo (Figura 15), aumentando su estabilidad térmica y especificidad (Sharma *et al.*, 2007). 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, proporcionando mayor estabilidad en condiciones de hibridación más restrictivas y por tanto más selectivas. Su uso hace posible que la temperatura de fusión pueda alcanzar valores elevados, incluso con 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). Moreno-Mesonero *et al.* (2017) demostraron la presencia de *H. pylori* en amebas de vida libre (FLA) mediante la técnica FISH, utilizando la sonda LNA-HPY (5'-CTG GAG AGA C1 TA AGC CC1 T CC-3').

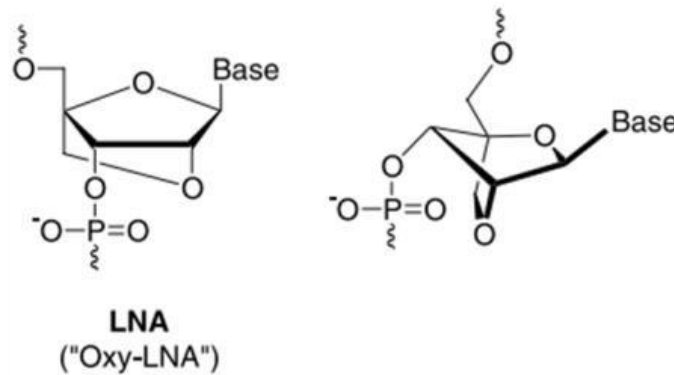


Figura 15: Estructura del monómero de LNA y su conformación especial (Wengel *et al.*, 2003).

6.6 ASOCIACIÓN DE LA TÉCNICA DIRECT VIABLE COUNT (DVC) A LA TÉCNICA FISH PARA DETECTAR ÚNICAMENTE DNA DE CÉLULAS VIABLES

Mediante la técnica FISH se detectan células viables y no viables, siendo una metodología incapaz de discriminar entre ambas. Nocker y Camper (2006) detectaron rRNA en muestras que contenían células muertas expuestas al calor e isopropanol, mediante PCR. Otros investigadores como Mckillip *et al.* (1998) y Moreno *et al.* (2007), detectaron rRNA 16S y DNA después de la muerte celular, demostrando que la detección de un patógeno en muestras ambientales utilizando estos marcadores no demuestra la viabilidad celular. Para evitar este inconveniente, la combinación del método DVC con la técnica FISH descrita previamente, permite la detección específica del microorganismo a detectar junto con la diferenciación entre las células viables y no viables, por la diferente elongación de estas.

Kogure *et al.* propusieron en 1979 un método para la enumeración de las bacterias viables, al que denominaron Direct Viable Count (DVC). Consiste 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).

Ambas técnicas han sido utilizadas para la detección de células de *H. pylori*. Por FISH se ha detectado *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 viables de *H. pylori* en agua potable (Santiago *et al.*, 2015), agua residual (Moreno y Ferrús, 2012) y agua de río (Tirodimos *et al.*, 2014).

6.7 METAGENÓMICA DE SECUENCIACIÓN DIRIGIDA

Todas las técnicas de análisis molecular descritas hasta ahora se basan en la identificación, detección o cuantificación de patógenos en una muestra, por lo que no proporcionan información sobre la abundancia y diversidad de los microorganismos significativos presentes en la comunidad microbiana total (Ye y Zhang, 2011). Para conocer la ecología del patógeno en el medio ambiente,

es de gran utilidad estudiar simultáneamente todo el microbioma presente en la muestra. La única técnica que permite este estudio es la metagenómica mediante secuenciación masiva de alto rendimiento o secuenciación de nueva generación (NGS).

Mediante la selección de iniciadores específicos, esta técnica permite el análisis filogenético de grupos o especies (Sharpton, 2014), así como la detección y tipificación de microorganismos no cultivables, ya que discrimina polimorfismo de un solo nucleótido. Recientemente, se ha utilizado esta técnica para estudiar la diversidad de diferentes medios acuáticos, como aguas residuales (Cai y Zhang, 2013; Lu *et al.*, 2015), aguas potables (Vierheilig *et al.*, 2015) y cuencas hidrográficas (Ibekwe *et al.*, 2013).

La secuenciación de genomas completos o metagenómica se basa en la fragmentación aleatoria del DNA de una muestra y la secuenciación de estos fragmentos. Las secuencias resultantes se ensamblan informáticamente para reconstruir los distintos genomas, obteniéndose generalmente genomas parciales (Yoon *et al.*, 2017). La principal ventaja de esta metodología es la gran cantidad de información que se puede obtener de los resultados generados, aunque también presenta varias limitaciones, como la cobertura de la secuenciación, que puede resultar insuficiente para detectar las especies menos representadas en la población (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008). Por otra parte, las abundancias relativas de los distintos filos que se obtienen se ven altamente influenciadas por los protocolos de extracción y secuenciación del DNA (Morgan *et al.*, 2010). También son menores la calidad y la longitud de las secuencias obtenidas mediante técnicas de secuenciación masiva en comparación con el método de secuenciación Sanger, resultando un inconveniente en los estudios donde se desconocen *a priori* las especies que se están secuenciando. Los errores de secuenciación pueden llevar al incorrecto ensamblaje de ciertas secuencias y complicar la identificación de los organismos presentes, mientras que la limitación en la longitud de las secuencias supone una dificultad a la hora de ensamblarlas informáticamente y realizar una anotación precisa (Oulas *et al.*, 2015).

El estudio metagenómico puede abordarse de dos formas diferentes: secuenciación dirigida a un gen concreto (normalmente un gen marcador de taxonomía que es amplificado por PCR) o la

secuenciación de genomas completos (*Whole Genome Sequencing* o WGS), tal y como se representan en la Figura 16.

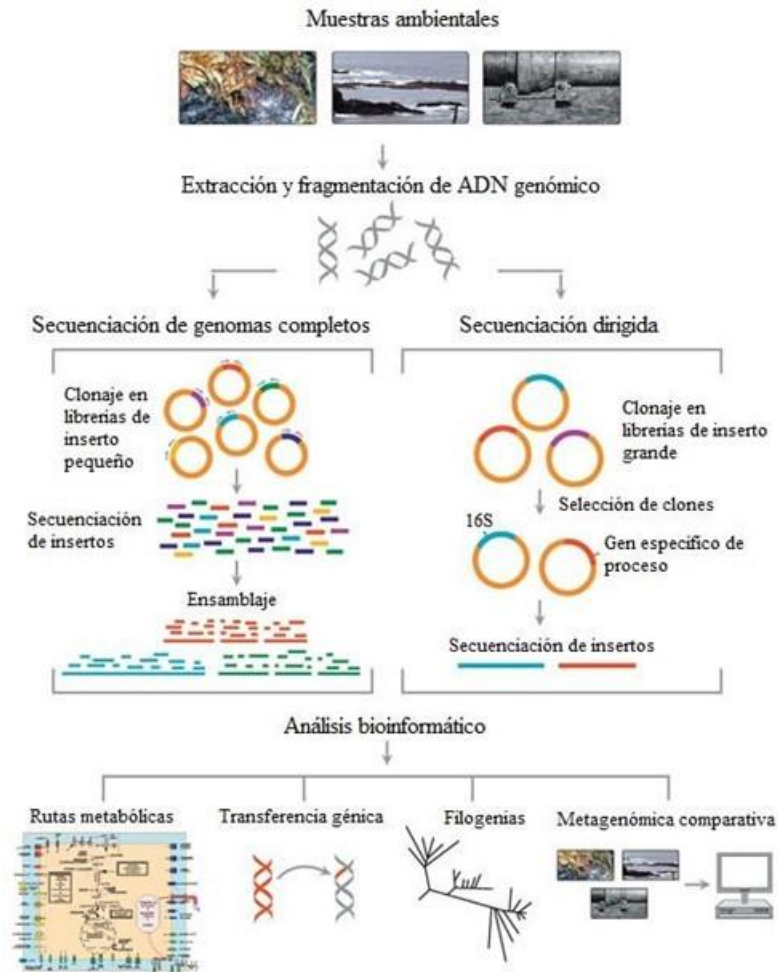


Figura 16: Diagrama del protocolo básico de un estudio metagenómico. Esquema general de las dos principales estrategias empleadas en los estudios metagenómicos (secuenciación de genomas completos y secuenciación dirigida). Adaptado de <http://medicalplanzone.com/bacterial-artificial-chromosome/>

La secuenciación basada en genes marcadores, o secuenciación masiva dirigida (DAS), es la técnica más usada, desde mediados de la década de los noventa, para determinar la diversidad microbiana presente en muestras ambientales complejas. En este método, inicialmente se extrae el DNA de la muestra que se quiere caracterizar y se amplifica mediante PCR con un gen 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, los estudios metagenómicos suelen optar por secuenciar las regiones hipervariables del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosómico (16S rRNA) (Yoon *et al.*, 2017) (Figura 17). Es un marcador informativo, tanto taxonómica como filogenéticamente (Pace *et al.*, 1986; Hugenholtz y Pace, 1996), ya que el gen 16S rRNA refleja la evolución bacteriana (Woese, 1987). El gen candidato en el caso de los microorganismos eucariotas suele ser el 18S rRNA o la región ITS (Hadziavdic *et al.*, 2014) (Figura 17).

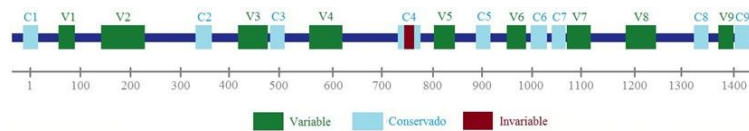


Figura 17: Representación gráfica del gen 16S rRNA, indicando las regiones variables (V1-V9), las conservadas (C1-C9) y la invariable, comunes a todas las bacterias. Adaptado del trabajo realizado por Izquierdo, (2015).

Este método se caracteriza por su rapidez analítica, mayor facilidad computacional debido al menor número de secuencias que se obtienen, y mayor eficiencia en la reacción, gracias a la posibilidad de combinar muestras usando *barcodes* o “código de barras”. En este aspecto, las bases de datos como *SILVA* (Quast *et al.*, 2013) o *Greengenes* (Desantis *et al.*, 2006) permiten el estudio de la diversidad y abundancia bacteriana de manera rápida y con una alta resolución taxonómica (Yoon *et al.*, 2017).

Sin embargo, sus inconvenientes residen en la necesidad de amplificar previamente la región a estudiar mediante PCR (Hong *et al.*, 2009; Sharpton *et al.*, 2011; Logares *et al.*, 2014); el hecho de que 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) y que pueden producirse quimeras (secuencias artificiales difíciles de identificar) como consecuencia de los errores de secuenciación (Wylie *et al.*, 2012, Oulas *et al.*, 2015).

En cuanto a sus limitaciones, se trata de una técnica que permite determinar la composición taxonómica de una comunidad microbiana, pero no puede describir sus funciones biológicas asociadas. (Sharpton, 2014). Por otra parte, 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).

Uno de los pilares fundamentales de la metagenómica es la secuenciación del DNA. En este sentido, las técnicas de *next generation sequencing* (NGS) ha supuesto una gran revolución, ya que permite secuenciar a bajo coste el DNA de una muestra procedente de cualquier ambiente (Ruppert *et al.*, 2019; Garlapati *et al.*, 2019; Allwood *et al.*, 2020). Actualmente, una de las plataformas de secuenciación masiva más utilizada para el estudio de las comunidades microbianas es Illumina®. Genera más del 90% de los datos de secuenciación del mundo y se caracteriza porque ofrece una alta precisión, alto rendimiento de lecturas sin errores y un alto porcentaje de llamadas base por encima de Q30 (Ross *et al.*, 2013).

La plataforma Illumina®, consta de cuatro pasos básicos:

A. Preparación de la biblioteca: se prepara mediante fragmentación aleatoria de la muestra de DNA o cDNA. A continuación, el adaptador se une de 5' a 3' (Figura 18). Alternativamente, la "etiquetación" combina las reacciones de fragmentación y ligadura en un solo paso, aumentando la preparación de la biblioteca de secuenciación (Illumina, 2014).

B. Los fragmentos ligados al adaptador se obtienen mediante la amplificación por PCR y son purificados en un gel.

C. Generación de clúster: la biblioteca inicialmente creada se carga en una celda de flujo, donde fragmentos son capturados por oligonucleótidos unidos a la superficie, complementarios a los adaptadores de la biblioteca. Posteriormente cada fragmento se amplifica

en grupos clonales distintos a través de la amplificación de puente (Figura 18). Una vez completado la generación de clúster, las plantillas están listas para ser secuenciadas.

D. Secuenciación: la tecnología Illumina®, utiliza un método basado en un terminador reversible que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las cadenas de plantilla de DNA (Figura 18). Se obtiene como resultado una secuencia altamente precisa sin errores específicos, incluso dentro de regiones de secuencia repetitiva y homopolímeros. (Ross *et al.*, 2013).

E. Análisis de datos: durante el análisis y alineación de datos, las lecturas de las secuencias recién identificadas se alinean con una referencia genoma (Figura 18). Posteriormente a la alineación, puede tener lugar diferentes análisis, como el polimorfismo de un solo nucleótido, conteo de lecturas para métodos de RNA, análisis filogenéticos o metagenómicos, entre otros.

La plataforma de secuenciación de Illumina permite la secuenciación del amplicón por ambos extremos, permitiendo una mayor cobertura que otros métodos, mayor número de secuencias y la secuenciación de ampliciones 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). Las lecturas obtenidas, “lecturas crudas”, son procesadas a través de varias herramientas: con licencia comercial, en la nube y *open source*. 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 (Caporaso *et al.*, 2010).

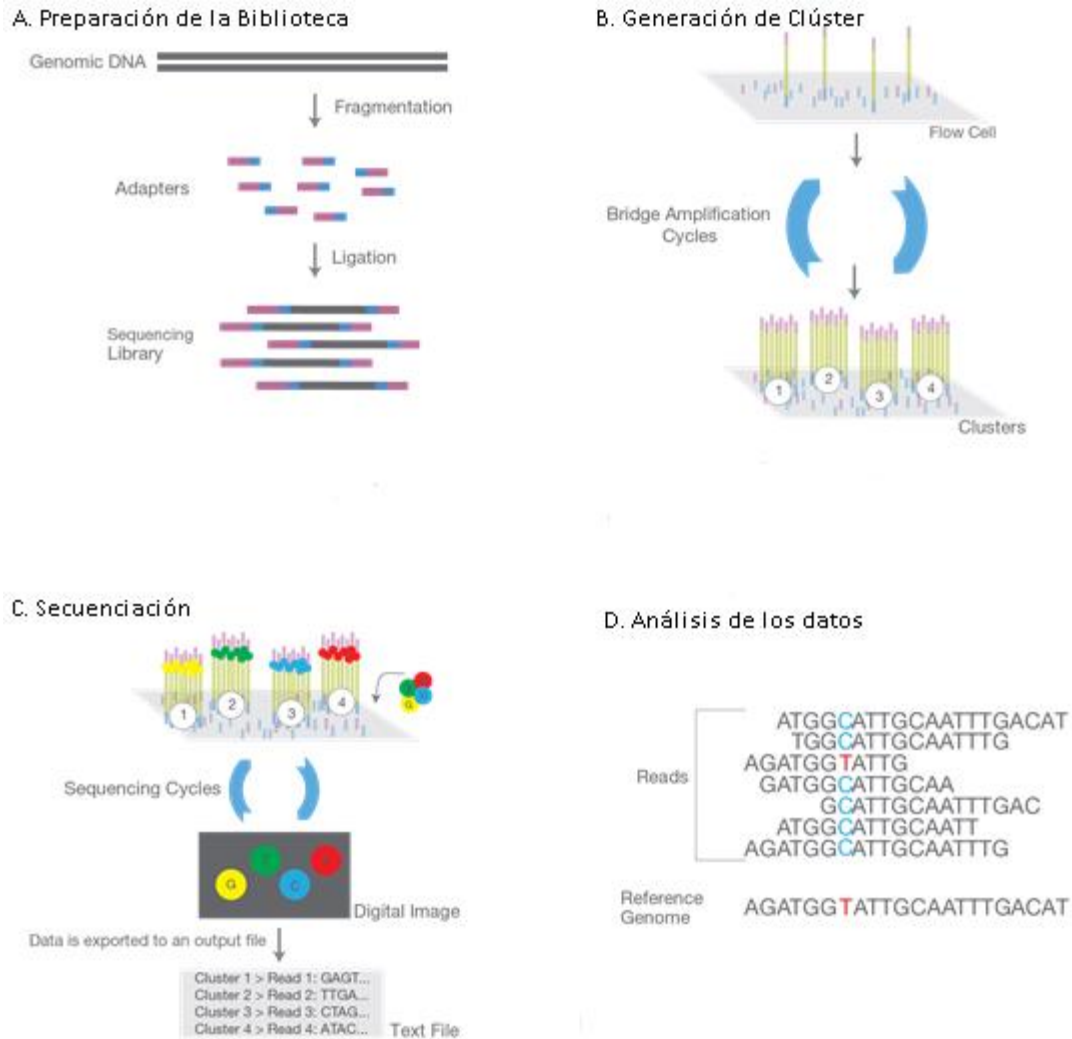


Figura 18: Descripción general de la plataforma illumina NGS, que incluye cuatro fases: (A) Preparación de la biblioteca, (B) generación de clúster, (C) secuenciación y (D) análisis de datos. Adaptado de www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html.

La obtención de la información de las lecturas crudas usando la herramienta QIIME, se produce en dos fases (Figura 19). La primera consiste en la elaboración de un archivo, denominado *mapping file*, que contiene la información de las muestras que se van a analizar. A continuación, se identifican y eliminan secuencias químéricas. En esta fase también tiene lugar la formación OTUs (Operational Taxonomic Unit), agrupaciones de secuencias que guardan cierto grado de similitud entre sí y que permiten clasificarlas por la taxonomía de los individuos en las muestras. Finalmente se construye la tabla de OTUs, 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 parte se inicia una vez generado la tabla de OTUs. Se puede obtener la abundancia relativa de cada OTU a diferentes niveles taxonómicos (filo, clase, orden, familia, género y especie) para identificar rápidamente las especies predominantes en las muestras analizadas (Navas-Molina *et al.*, 2015).

En comparación con la secuenciación de genes concretos, con la metagenómica se obtiene una gran cantidad de información, taxonómica, funcional y metabólica, lo que puede ayudar a comprender el contexto ecológico en el que se desarrollan los microorganismos (Hugenholtz y Tyson, 2008).

Respecto a *Helicobacter pylori*, son numerosos las investigaciones que han utilizado la metodología de secuenciación dirigida para la detección de mutaciones de resistencia a fármacos en *H. pylori* y su correlación con la resistencia fenotípica (Lauener *et al.*, 2019; Miftahussurur *et al.*, 2019). La técnica DAS también ha sido empleada para detectar nuevas mutaciones asociadas a la resistencia al metronidazol en genes como *dapF*, *dppA*, *dppB*, *fdxA* y *fdxB* (Miftahussurur *et al.*, 2017). Sin embargo, son pocos los estudios realizados en muestras no clínicas. Un estudio realizado por Moreno-Mesonero *et al.* (2020) identificó mediante secuenciación dirigida 21 géneros bacteriano que formaban parte del microbioma de la FLA en muestras de lechugas, detectando en dos de ellas el género *Helicobacter*. Ji *et al.* (2020) detectaron *H. pylori* en la cavidad oral de sujetos infectados (12/34), no infectados (11/24) y erradicado (15/22), mediante secuenciación de alto rendimiento.

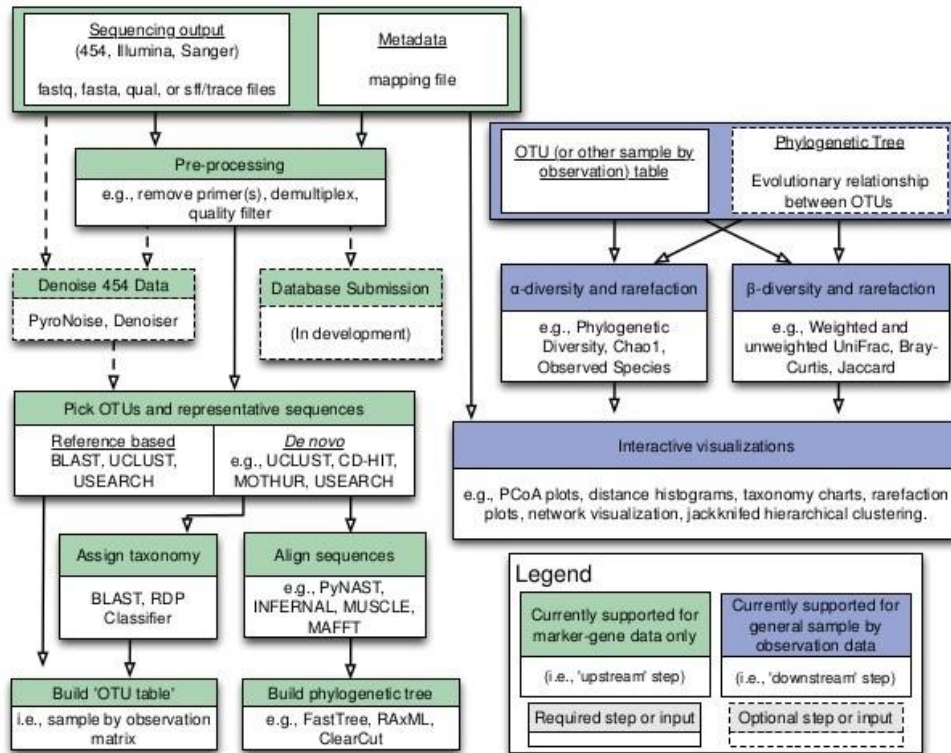


Figura 19: Esquema de trabajo en Qiime (Caporaso *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

A pesar de los avances en las tecnologías utilizadas en el tratamiento de aguas residuales y las metodologías para la identificación y detección de patógenos, la reutilización de las aguas residuales exige la adopción de medidas de protección de la salud pública, por el riesgo de exposición a agentes infecciosos.

De entre todos los patógenos emergentes en aguas, las bacterias del género *Helicobacter* spp. son una de las más alarmantes, ya que se encuentran directamente relacionadas con el cáncer gástrico y hepatobiliar. La especie más conocida de este género es *Helicobacter pylori*, productora de cáncer gástrico y úlcera péptica, y clasificada como carcinógena humana de Clase I por la Organización Mundial de la Salud. Su modo de transmisión no se ha determinado con exactitud todavía, y se plantean múltiples vías, entre las cuales se encuentran la ruta fecal-oral a través del agua. Sin embargo, el riesgo real de su presencia en aguas actualmente se desconoce, lo que impide la implementación de políticas preventivas.

Actualmente diversos estudios confirman la presencia de *H. pylori* en aguas. Sin embargo, en condiciones ambientales desfavorables *H. pylori*, adquiere la forma viable no cultivable (VBNC), impidiendo su aislamiento e identificación en muestras ambientales mediante técnicas de cultivo, debido a su lento crecimiento y microbiota acompañante. Por ello, el uso de técnicas moleculares que permitan diferenciar entre células viables y no viables es imprescindible para determinar el riesgo que supone la presencia del patógeno en aguas.

Por otro lado, algunos estudios sugieren que *H. pylori* es capaz de formar biopelículas insolubles al agua, lo que favorecería su resistencia frente a factores ambientales desfavorables, facilitando su crecimiento y supervivencia. 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 los diferentes tratamientos de desinfección y a la predación por protozoos.

Teniendo en cuenta lo expuesto, en esta Tesis se propone como OBJETIVO GENERAL:

DETERMINAR EL RIESGO PARA EL CONSUMIDOR DEBIDO A LA PRESENCIA DE *H. pylori* Y OTRAS ESPECIES PATÓGENAS DEL GÉNERO *Helicobacter* spp. EN AGUAS POTABLES Y AGUAS RESIDUALES DESTINADAS AL RIEGO, ASÍ COMO EVALUAR Y DESARROLLAR NUEVAS HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR.

Para ello se plantean los siguientes estudios:

1. Optimizar y desarrollar un medio de cultivo óptimo para la detección, identificación y aislamiento de *H. pylori* en muestra ambientales y clínicas.
2. Optimizar un método de pre-tratamiento con PMA o PEMAX™ que permita la detección y cuantificación exclusiva de células viables de *H. pylori* por PCR.
3. Determinar, mediante métodos moleculares desarrollados u optimizados en este trabajo (PCR, qPCR, FISH, DVC-FISH, y DAS), la presencia de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales tratadas destinadas al riego.
4. Utilizar métodos moleculares para identificar los genes de virulencia y resistencia de las cepas de *H. pylori* detectadas en las muestras analizadas, con el fin de obtener información epidemiológica sobre su riesgo para la Salud Pública.
5. Determinar la presencia de *H. pylori* y otros *Helicobacters* patógenos en muestras de heces a partir de cultivo y las técnicas moleculares (qPCR, FISH, DVC-FISH, y DAS) desarrolladas en este trabajo.
6. Comprobar *in vitro* la capacidad de *H. pylori* para formar biopelículas.
7. Evaluar la efectividad de los tratamientos de desinfección con cloro y UV en biopelículas formadas por *H. pylori*.
8. Determinar la presencia de *H. pylori* en biopelículas de sistemas de distribución de agua potable.

CAPÍTULO I

Optimización y Evaluación de diferentes métodos de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

1.1 OBJETIVO

Numerosos estudios confirman que la técnica de cultivo no es la metodología más apropiada para la detección, identificación y aislamiento de este patógeno, debido a su baja concentración en las muestras, la falta de medios de transporte adecuados, sus exigencias nutricionales, su lento crecimiento y su capacidad de adquirir una morfología viable no cultivable (VBNC) (Quaglia y Dambrosio, 2018).

El aislamiento de *H. pylori* a partir de muestras ambientales es aún más difícil que en muestras clínicas (biopsias y heces) ya que, a todo lo anteriormente mencionado, se añade que las muestras ambientales contienen grandes cantidades de microbiota acompañante, inhibidora del crecimiento del patógeno. Además, la dificultad en su detección, identificación y aislamiento aumenta después de un tiempo sometido a condiciones ambientales estresantes.

A pesar de ello, el cultivo es la técnica estándar, y la única que permite detectar células potencialmente infecciosas de *H. pylori*. Asimismo, el aislamiento de la bacteria es fundamental para estudios epidemiológicos y de sensibilidad antimicrobiana.

Partiendo de esta premisa, el principal objetivo del presente capítulo es:

- DISEÑAR UN MEDIO DE CULTIVO ÓPTIMO PARA LA DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO SELECTIVO DE *H. pylori* A DE PARTIR MUESTRAS AMBIENTALES Y CLÍNICAS.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 CEPA DE REFERENCIA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para el desarrollo de este estudio se empleó una cepa de referencia de *Helicobacter pylori* procedente de la National Collection of Type Cultures, Reino Unido (NCTC 11637). Para su cultivo se utilizó el medio de Agar Sangre Piruvato (ASP). Las placas se incubaron en condiciones de 90-95% de humedad y microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂), a 37 °C durante 24-48 h.

1.2.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE *H. pylori*.

Para conseguir el objetivo propuesto se evaluaron 10 medios de cultivo con diferentes componentes nutricionales:

Medio de Agar Sangre Piruvato (ASP):

- Base de Agar Sangre (Pronadisa, España), composición (g/L):
 - Digerido pancreático de caseína 10
 - Proteasa-Peptona 3,5
 - Extracto de levadura 5
 - Digerido de corazón de vacuno 3
 - Almidón 1
 - Cloruro sódico 5
 - Agar 15
- 10% (v/v) de Sangre Desfibrinada de caballo (Oxoid, Reino Unido).
- 0,025% (v/v) de Piruvato de Sodio (Fisher, Estados Unidos).

Agar Dent (AD):

- Base de Agar Sangre.
- 10% (v/v) de Sangre Desfibrinada de caballo.
- 0,025% (v/v) de Piruvato de Sodio.
- *Helicobacter pylori* Suplemento Selectivo “Dent” (Oxoid, Reino Unido). Cada vial suplementa 500 mL de medio. Composición por vial (mg/0,5L):

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

- Vancomicina 5
- Trimetoprin 2,5
- Cefsulodina 2,5
- Amfotericina 2,5

Agar Dent con sulfato de polimixina B (ADPB):

- Base de Agar Sangre.
- Sangre Desfibrinada de caballo.
- 0,025% (v/v) de Piruvato de Sodio.
- Suplemento Selectivo “Dent” para *H. pylori*.
- 2,5 µg/mL de sulfato de polimixina B.

Medio de cultivo 1 (MC₁), descrito originariamente por Iwamoto *et al.* (2014) y compuesto por:

- Base de Brucella Broth (BBL™ BD, Estados Unidos), que incluye (g/L):
- Digerido pancreático de caseína 10
 - Cloruro de sodio 5
 - Peptamina 10
 - Bisulfito de sodio 0,1
 - Extracto de levadura 2
 - Dextrosa 1
- 15 g/l de Agar Bacteriológico (Conda Pronadisa, España).
- 10% de Suero Fetal Bovino (PAA Laboratories GmbH, EE. UU).

Este medio fue modificado añadiendo *Helicobacter pylori* Suplemento Selectivo “Dent”.

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

Medio de cultivo 2 (MC₂): CM₁ con la adición de:

- Sangre Desfibrinada de Caballo al 10% (v/v)
- 96,7 µg/mL de Sulfato de Polimixina B.

Medio de cultivo 3 (MC₃), definido por Ranjbar *et al.* (2016), con la composición:

- Base de Brucella Broth (BBL™ BD, Estados Unidos).
- 5% (v/v) de Sangre Desfibrinada de Caballo.
- Suero Fetal Bovino al 7% (PAA Laboratories GmbH, EE. UU).
- 5 mg/L de Trimetoprin
- 30 mg/L de Ácido Nalidíxico.
- 30 mg/L de Sulfato de Colistina.

Modificado con la adición de Suplemento Dent y 250 µg/mL de Sulfato de Polimixina B.

Medio de Cultivo BBLs:

- Brucella Agar (BBL™, BD, Estados Unidos), contiene (g/L):
 - Digerido pancreático de caseína 10
 - Cloruro de sodio 5
 - Peptamina 10
 - Bisulfito de sodio 0,1
 - Extracto de levadura 2
 - Dextrosa
 - Agar 15
- 5% de Sangre Desfibrinada de Caballo.
- *Helicobacter pylori* Suplemento Selectivo “Dent”.
- 0,4% de Isovitalax™ (BD, Estados Unidos), incluye (g/L):
 - Vitamina B₁₂ 0,01

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

○ L-glutamina	10
○ Adenina	1
○ Clorhidrato de Guanina	0,03
○ Ácido <i>p</i> - Aminobenzoico	0,013
○ Dinucleótido de Nicotinamida Adenina	0,25
○ Pirofosfato de Tiamina	0,1
○ Nitrato Férrico	0,02
○ Clorhidrato de Tiamina	0,003
○ Clorhidrato de L-cisteína	25,9
○ L-Cistina	1,1
○ Dextrosa	100

HPA₁. Medio de cultivo Agar HP, diseñado por Degnan *et al.* (2003), que incluye:

• Agar Bacteriológico	15 g/L
• Peptona de Proteasa	10 g/L
• Extracto de Levadura (Difco, Estados Unidos)	5 g/L
• Cloruro de Sodio	5 g/L
• Fenol Rojo	100 mg/L
• Urea	600 mg/L
• Ácido Clorhídrico (1N)	0,8 mL/L
• Sulfato de Polimixina B	580,03 µg/mL
• <i>H. pylori</i> Suplemento Selectivo “Dent”	

HPA₂: Medio de cultivo HPA₁ suplementado, para favorecer la inhibición de microbiota acompañante, con:

• Ácido Nalidíxico	25 mg/L
• Sulfato de Estreptomina	25 mg/L
• Kanamicina	25 mg/L

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

Medio de cultivo comercial Agar Pylori® (AP) (BioMérieux, Francia), compuesto por (mg/L):

- | | |
|----------------------|-------|
| ○ Peptona de Caseína | 16 |
| ○ Peptona de Soja | 7 |
| ○ Extracto de carne | 0,15 |
| ○ NaCl | 6 |
| ○ Agar | 15 |
| ○ Plasma de Caballo | 10 mL |
- 10 mL de Polyvitalex™, incluye (g/L):

○ Vitamina B ₁₂	0,01
○ L-Glutamina	10
○ Adenina	1
○ Clorhidrato de Guanina	0,03
○ Ácido <i>p</i> -Aminobenzoico	0,013
○ Nicotinamida Adenina Dinucleótida	0,25
○ L-Cistina (1,1), Cocarboxilasa	0,1
○ Nitrato Férrico	0,02
○ Tiamina	0,003
○ Clorhidrato de Cisteina	25,9
○ Glucosa	0,1
○ Mezcla de antibióticos no especificados por el fabricante	

1.2.3 EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La capacidad de los medios descritos para el cultivo de *H. pylori* se evaluó mediante la siembra de diluciones seriadas, entre 10⁵ UFC/mL y 10 UFC/mL, de un cultivo puro de *H. pylori* NCTC 11637.

Para preparar el inóculo inicial, la cepa de referencia se cultivó en Agar Sangre Piruvato, a 37 °C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente, se recogió el crecimiento

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

de toda la placa con un asa de siembra estéril y se inoculó en 1 mL de PBS 1X (Anexo B.2), para obtener una concentración final de 10^7 UFC/ mL.

1.2.3.1 Tinción de *H. pylori* con SYTO9-PI

Para determinar la concentración del inóculo, se hizo un recuento de las células vivas y muertas presentes, mediante la técnica LIVE/DEAD Cell Viability Assay (Molecular Probes, USA), basado en la tinción diferencial de las células con dos fluorocromos, SYTO9 y yoduro de propidio (PI). Para ello, se siguió el protocolo Film Tracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit (Molecular Probes, USA), establecido por el fabricante (Figura 20):

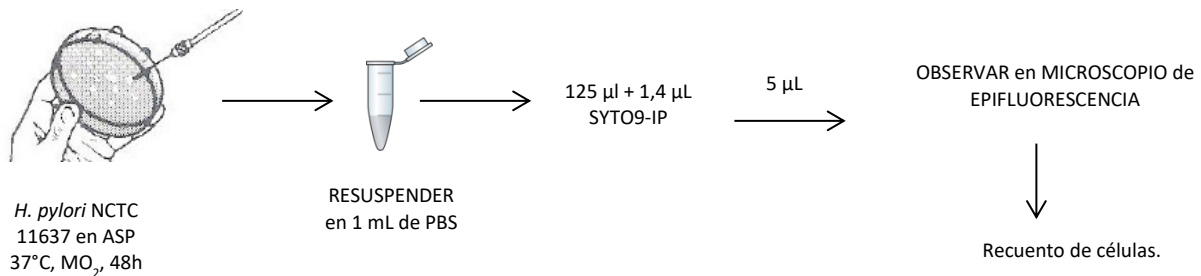


Figura 20: Recuento de células vivas de *H. pylori* en muestras inoculadas.

Se añadieron 0,4 μ L de la solución de reactivos del kit SYTO9-PI en proporción 1:1, a 125 μ L de la suspensión de *H. pylori*. La mezcla se re-suspendió e incubó en condiciones de oscuridad y en constante agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se colocó una alícuota de 5 μ L en un portaobjetos recubierto de poli-L-lisina (Menzel-Glaser, Thermo Scientific). El recuento total de células se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus (BX50) con filtro U-MWB.

1.2.3.2 Inoculación de muestras ambientales y clínicas

Diferentes concentraciones del cultivo de referencia de *H. pylori* NCTC 11637 se inocularon en 1 mL de agua potable, 1 mL de agua residual y 1 g de heces. Las muestras de agua potable se inocularon a concentraciones finales de 10^4 UFC/mL y 10^3 células vivas/mL de *H. pylori*. Las muestras

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

de aguas residuales fueron inoculadas con una concentración final de 10^3 y 10^2 células vivas/mL, mientras que en las muestras de heces se inocularon concentraciones finales de 10^4 y 10^3 células vivas/mL. Previamente a la inoculación, las matrices de agua potable y agua residual se esterilizaron para garantizar la ausencia del patógeno en estudio. Respecto a la matriz de heces, se verificó la ausencia de *H. pylori* mediante qPCR (Capítulo 2, apartado 2.2.8).

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, alícuotas de 100 μ L de cada una de las muestras inoculadas se extendieron en los 10 medios de cultivo descritos en el apartado 1.2.2. Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante un periodo de tiempo comprendido entre siete y 15 días y se examinaron diariamente para detectar la presencia de colonias presuntivas de *H. pylori* (Figura 21). Las posibles colonias fueron confirmadas mediante tinción Gram y pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa y ureasa).

Todos los ensayos (Figura 22) se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron como la media aritmética de los recuentos totales.

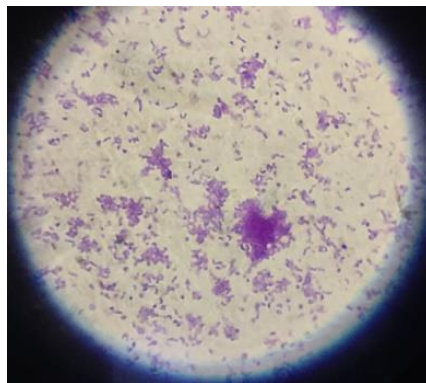
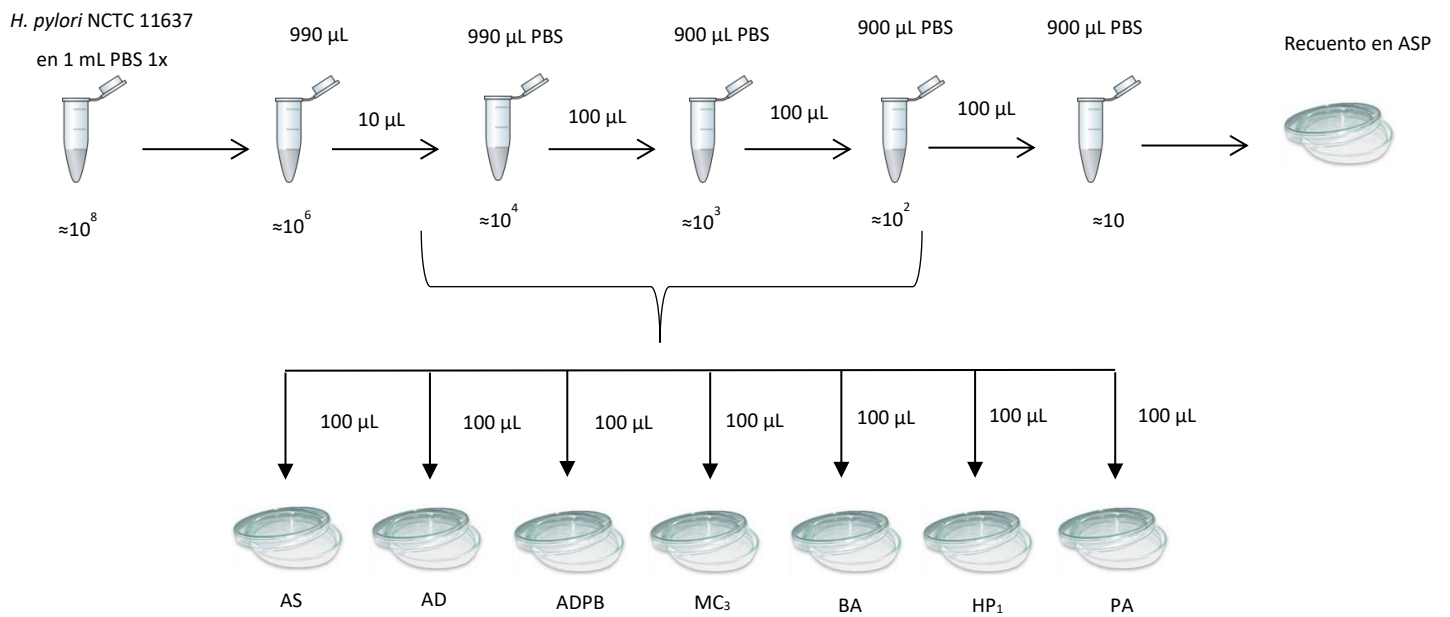


Figura 21: Tinción GRAM de *H. pylori* cultivado en el medio de cultivo HPA₁.

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

DILUCIONES SERIADAS Y CULTIVO DE *H. pylori*



INCUBAR en CONDICIONES DE MO_2 a 37 °C, durante siete días.

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

INOCULACIÓN Y DETECCIÓN DE *H. pylori* EN MUESTRAS AMBIENTALES Y CLÍNICAS

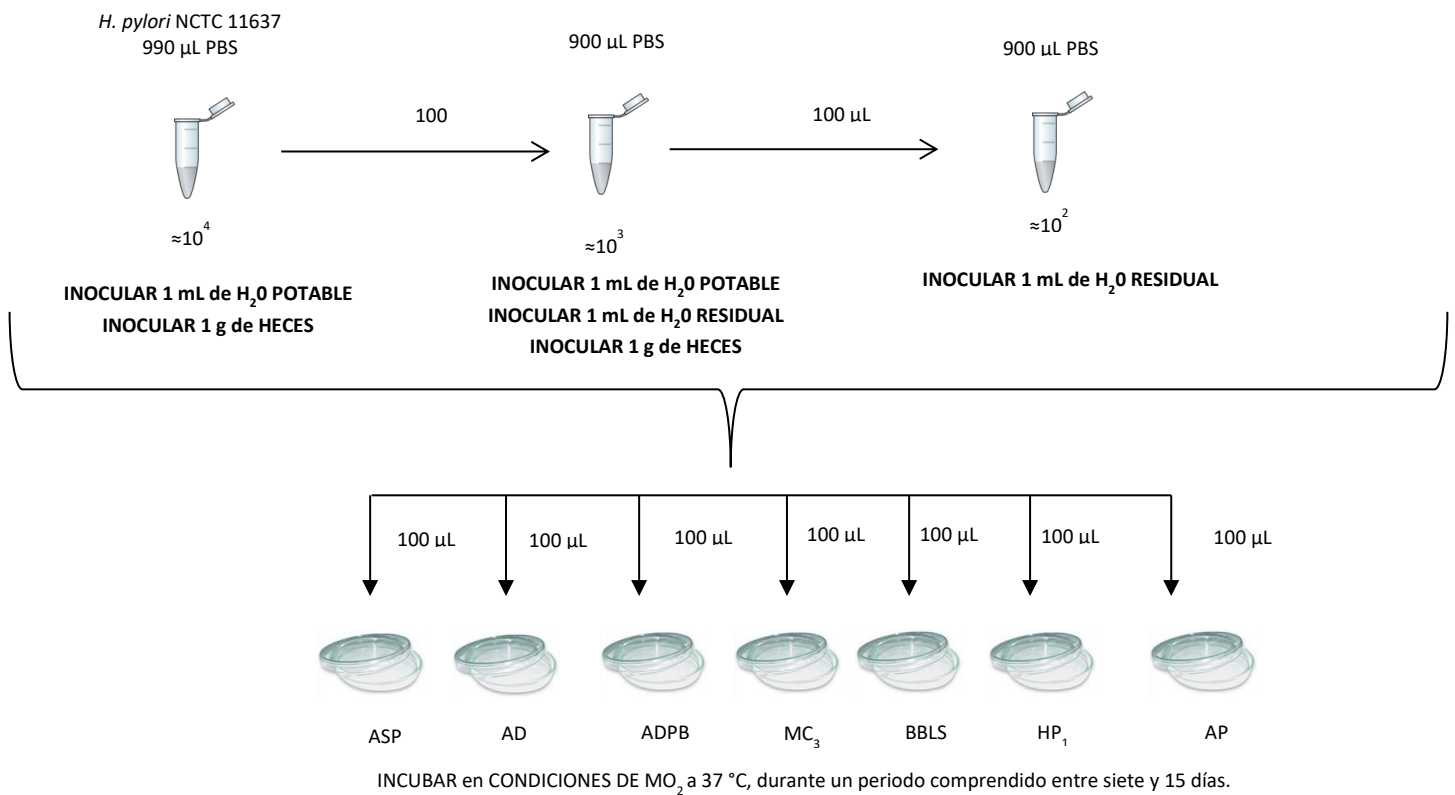


Figura 22: Protocolo de cultivo para la detección e identificación de *H. pylori* en diferentes matrices inoculadas.

1.3 RESULTADOS

Después del periodo de incubación se observó crecimiento bacteriano y se identificaron colonias visibles de *H. pylori* en siete de los diez medios estudiados. En los medios MC₁, MC₂ y HPA₂ no se observó crecimiento con ninguna de las concentraciones evaluadas. Por este motivo, dichos medios de cultivo se descartaron para el posterior ensayo con las muestras.

Las colonias de *H. pylori* procedentes de las diluciones con una concentración celular de 10⁵ UFC/mL y 10⁴ UFC/mL se recuperaron en todos los medios de cultivo con los mismos niveles de concentración inicial, a excepción del medio HPA₁, donde los recuentos obtenidos resultaron cien veces más bajos que el inóculo original.

En el medio de cultivo BBLS no se recuperaron colonias procedentes de la concentración de 10³ UFC/mL, mientras que en el medio HPA₁ no hubo crecimiento a partir de la dilución con 10² UFC/mL.

El inóculo de *H. pylori* con una concentración de 10³ UFC/mL resultó en un crecimiento diez veces menor en cinco de los diez medios de cultivo analizados (Tabla 3): En el medio AD se obtuvieron un total de 360 UFC/mL; en ADPB, 470 UFC/mL (Figura 23a); en el medio MC₃, 177 UFC/mL (Figura 23b); en BBLS, 2,74*10² UFC/mL y, finalmente, en el medio AP se recuperaron un total de 3080 UFC/mL.

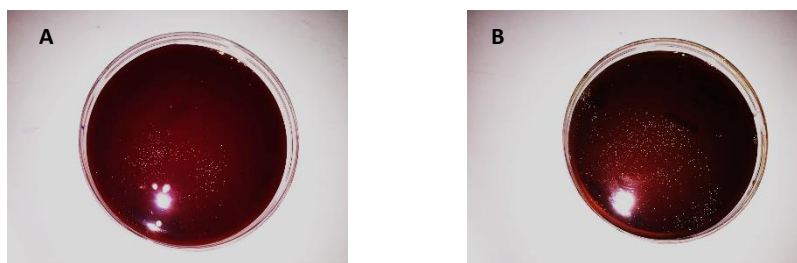


Figura 23: Recuperación de células de *Helicobacter pylori* en los medios de cultivo ADPB (A) y CM₃ (B) a partir del inóculo de 10³ UFC/mL.

Con respecto a la dilución de *H. pylori* de menor concentración (10² UFC/mL), se recuperaron un total de 180 UFC/mL en el medio AD (Figura 24); 107 UFC/mL en ADPB, 50 UFC/mL en MC₃; 590 UFC/mL en BBLS y un total de 510 UFC/mL en el medio de cultivo AP.

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.



Figura 24: Recuperación de células de *Helicobacter pylori* en medio de cultivo AD a partir del inóculo de 10^2 UFC/mL.

En las muestras de agua potable se observó el crecimiento de las primeras colonias características de *H. pylori* en la mayoría de los medios analizados a los 3 días de incubación. Únicamente en los medios de cultivo MC₃ y HPA₁ no se obtuvo crecimiento bacteriano a ninguna de las concentraciones estudiadas después de siete días de incubación.

El medio de cultivo AD resultó ser el más adecuado, permitiendo una recuperación de 10^4 y 10^3 UFC/mL respectivamente. Sobre el resto de los medios examinados, la recuperación de colonias fue mucho menor: Para la muestra inoculada con una concentración final de 10^4 UFC/mL, se obtuvieron los siguientes resultados en los medios de cultivo analizados: 10^3 UFC/mL en el medio AP; $1,77 \cdot 10^2$ UFC/mL en ADPB y $1,15 \cdot 10^2$ UFC/mL en el medio de cultivo BBLA.

Para la muestra inoculada con una concentración final de 10^3 UFC/mL se recuperaron una media de $1,49 \cdot 10^3$ UFC/mL en el medio de cultivo AD; $1,3 \cdot 10^3$ UFC/mL en ADPB; 90 UFC/mL en BBL y, finalmente, $2,42 \cdot 10^3$ UFC/mL en el medio AP.

Las muestras de aguas residuales fueron inoculadas con una concentración final de 10^3 y 10^2 UFC/mL de *H. pylori*. En este caso, en todos los medios examinados las células crecieron lentamente y fue necesario un periodo de incubación de 15 días para observar colonias en los medios de cultivo. Después de dicho periodo de incubación no se recuperaron colonias de *H. pylori* en los medios MC₃ y AD a partir de ninguna de las concentraciones evaluadas.

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

De la muestra inoculada con una concentración de 10^3 UFC/mL, se recuperaron una media de 570 UFC/mL en las placas de ADPB; $9,8 \cdot 10^2$ UFC/mL en BBLSS; $2,3 \cdot 10^2$ UFC/mL en HPA₁ y finalmente, $2,1 \cdot 10^3$ UFC/mL en AP.

Respecto a la muestra inoculada con 10^2 UFC/mL, se recuperaron colonias de *H. pylori* únicamente en el medio de cultivo BBL, con un recuento total de 40 UFC/mL.

En cuanto a las muestras de heces, en los medios de cultivo MC₃ y HPA₁ se observó un crecimiento bacteriano inespecífico, que no permitía identificar colonias presuntivas de *H. pylori*. Por otra parte, en el medio de cultivo comercial AP se observó ausencia total de crecimiento del patógeno para ambas concentraciones analizadas.

En el resto de los medios se observó crecimiento en las placas a partir del séptimo día de incubación. Para la muestra inoculada con 10^4 UFC/mL, se recuperó la misma concentración celular en los medios de cultivo AD y ADPB, mientras que a partir de la muestra inoculada con 10^3 UFC/mL, se obtuvo un recuento medio de $1,75 \cdot 10^3$ UFC/mL y $2,38 \cdot 10^3$ UFC/mL en AD y ADPB, respectivamente.

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

Tabla 3: Tasa de recuperación de *H. pylori* de todos los medios de cultivo para cada una de las matrices y diluciones ensayadas.

Medio de Cultivo	Cultivo puro				Agua potable		Agua residual		Heces	
	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁴ UFC/mL	10 ³ UFC/mL	10 ² UFC/mL	10 ⁴ UFC/mL	10 ³ UFC/mL	10 ³ UFC/mL	10 ² UFC/mL	10 ⁴ UFC/mL	10 ³ UFC/mL
AS	10 ⁵	10 ⁴	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AD	10 ⁵	10 ⁴	360	180	10 ⁴	1490	ND	ND	10 ⁴	1750
ADPB	10 ⁵	10 ⁴	470	107	1770	1300	570	ND	10 ⁴	2380
MC₃	10 ⁵	10 ⁴	177	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BBL_S	10 ⁵	10 ⁴	2750	590	1150	90	980	40	ND	ND
HPA₁	1180	160	ND	ND	ND	ND	230	ND	ND	ND
AP	10 ⁵	10 ⁴	3080	510	10 ³	2420	2100	ND	ND	ND

AS: Agar Sangre.

AD: Agar Dent

ADPB: Agar Dent con sulfato de polimixina B.

MC₃: Medio de cultivo 3, definido por Ranjbar *et al.* (2016).

BBL: Medio de Cultivo BBL: Brucella Agar (BBLTM, BD, Estados Unidos).

HPA₁: Medio de cultivo Agar HP, diseñado por Degnan *et al.* (2003).

AP: Medio de cultivo comercial Agar Pylori®, (BioMérieux, Francia).

*ND: No Desarrollado.

1.4 DISCUSIÓN

El aislamiento de *H. pylori* a partir de muestras ambientales es muy difícil, debido a sus exigentes requerimientos nutricionales y lento crecimiento (Azevedo *et al.*, 2004; Santiago *et al.*, 2015). Incluso en muestras clínicas de biopsia, donde su concentración es elevada y no hay microbiota competitiva, la tasa de éxito en su recuperación es muy variable (Al-Sulami *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Hasta la fecha, no existe un medio de cultivo óptimo y selectivo.

Helicobacter pylori se caracteriza por un crecimiento lento y generalmente requiere alrededor de cuatro días para desarrollar colonias distinguibles. En el presente estudio se observó que el periodo de incubación puede prolongarse dependiendo del origen de la matriz analizada y el medio de cultivo utilizado: En las muestras de aguas residuales y de heces inoculadas con una concentración de *H. pylori* conocida, el crecimiento bacteriano ocurrió después de un periodo de incubación de 15 y 7 días respectivamente.

En el presente capítulo se evaluaron 10 medios de cultivo con el fin de verificar su idoneidad para la identificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas. Cuatro de ellos habían sido descritos previamente y se modificaron para este estudio. El resto de los medios se diseñaron “*de novo*”. En todos los casos, se utilizaron diferentes suplementos nutricionales y antibióticos para abordar el problema microbiológico de encontrar un medio de cultivo nutricionalmente rico que permita la reanimación y el crecimiento de *H. pylori*, y al mismo tiempo inhiba el desarrollo de otros microorganismos competitivos. En el análisis también se incluyó un medio comercial (AP), cuya eficacia para el aislamiento primario de *H. pylori* a partir de muestras clínicas de biopsias gástricas, ha sido informado previamente (Miendje Deyia *et al.*, 2010). Sin embargo, la prolongación del periodo de incubación a más de 5 días resultó en todos los casos en el desarrollo de mohos, que enmascaraban cualquier crecimiento bacteriano.

Los medios de cultivo MC₁ y MC₂, modificados a partir del medio de cultivo líquido diseñado por Iwamoto *et al.* (2014) para la conservación de *H. pylori* aislado de biopsia gástrica, así como HPA₂ modificado del medio de cultivo diseñado por Degnan *et al.* (2003) para el aislamiento de *H. pylori* en muestras de agua, no resultaron adecuados para la identificación y el aislamiento de *H. pylori*, ya que no fue posible la recuperación de colonias cuando se cultivaron las diluciones

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

preparadas a concentraciones 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/mL. Un motivo para estos resultados negativos podría ser la cantidad de suero fetal bovino utilizado (SFB). Estudios previos realizados por Dent *et al.* (1988), Ansorg *et al.* (1991) y Testerman *et al.* (2006), sugirieron que el SFB puede aumentar la permeabilidad de la membrana externa celular, aumentando la sensibilidad a ciertos antibióticos como cefsulodina y polimixina B, e inhibiendo por tanto el crecimiento de *H. pylori*. Además, Shibayama *et al.* (2006) observaron un efecto inhibitorio significativo del SFB en medios de cultivo líquidos, que se relacionó con el efecto bactericida del sistema complemento del suero. Sin embargo, no hay evidencias concluyentes de que una concentración del 10% de SFB pueda inhibir el crecimiento bacteriano en medios sólidos. Igualmente, el suero es un componente nutricional habitual utilizado en medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos fastidiosos (Lagier *et al.*, 2015). Por lo tanto, no puede descartarse que otro aspecto de la composición de los medios pudiera ser el responsable de la ausencia de crecimiento bacteriano.

Respecto al medio HPA₂, probablemente sea demasiado nutritivo para un microorganismo que en condiciones naturales debe adaptarse fisiológicamente a condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. Como consecuencia, puede tener lugar un fenómeno conocido como “shock de nutrientes”, descrito previamente por Reasone *et al.* (1985). La simultaneidad de este “shock”, con la presencia de antibióticos como el ácido nalidíxico, el sulfato de estreptomina y la kanamicina probablemente resulta en un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori*.

Acerca del medio MC₃, los resultados negativos obtenidos en muestras ambientales podrían deberse a la presencia del antibiótico colistina. Un estudio realizado por McGee *et al.* (2011) mostró que altas concentración de este antibacteriano puede inhibir el crecimiento de *H. pylori*.

Cuando se estudió la composición de todos los medios de cultivos utilizados en este trabajo, no se encontró correlación entre un cultivo exitoso y las principales bases nutricionales, como la peptona o los extractos de proteínas que contenían los mismos. Por otro lado, no puede descartarse la influencia que pudiera haber tenido el uso, en este trabajo, del sistema de generación de atmósfera CampyGen™ 3-5 L, en lugar de un incubador de tres gases. Cuando se utiliza CampyGen, la generación de una atmósfera adecuada tarda aproximadamente media hora (Azevedo *et al.*, 2004), por lo que, durante este periodo de tiempo, las células de *H. pylori* pueden estar expuestas a estrés oxidativo por el remanente de oxígeno presente en el medio. Este fenómeno induce su

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

transformación al estado viable no cultivable (VBNC) (Nilsson *et al.*, 2002), dificultando el aislamiento del patógeno mediante técnicas de cultivo. Aunque el uso de sistemas para la generación de condiciones microaerofilicas es la única opción en muchos laboratorios, debería considerarse la posibilidad de usar otros métodos más estrictos para la generación de microaerofilia cuando el objetivo sea el aislamiento de este microorganismo a partir de muestras ambientales.

Los medios que habían dado resultados prometedores tras ser inoculados a partir de PBS fueron evaluados para la recuperación de *H. pylori* en muestras de agua potable, aguas residuales y heces, para los cuales actualmente no se dispone un medio específico.

Estudios previos han demostrado que el porcentaje de recuperación de *H. pylori* en agua potable es muy bajo (Gião *et al.*, 2008; Al-Sulami *et al.*, 2012; Bahrami *et al.*, 2013). En este trabajo, cuando se inocularon las muestras de agua potable con la suspensión bacteriana de *H. pylori*, los medios de cultivo que permitieron su recuperación fueron AD, ADPB, BBL5 y AP. Todos ellos tienen en común el Suplemento Selectivo Dent, compuesto por cuatro antibióticos recomendados para el análisis de muestras clínicas, vancomicina, trimetoprim, cefsulodín y anfotericina. El medio ADPB, además, contiene polimixina B, utilizada por su capacidad para suprimir gran cantidad de *Pseudomonas* spp (Jiang *et al.*, 2002), y piruvato de sodio, que mejora el crecimiento y la aerotolerancia de *H. pylori*, neutralizando el efecto tóxico del oxígeno y los efectos inhibitorios de los antibióticos (Jiang *et al.*, 2002). El medio de cultivo BBL5 contiene también el suplemento Isovitalax™, que proporciona vitaminas, aminoácidos, coenzimas, glucosa, iones férricos y otros factores que favorecen el desarrollo de *H. pylori* (Hultén *et al.*, 1998). También contiene Isovitalax el medio comercial PA, cuya eficacia para el aislamiento primario de *H. pylori* a partir de muestras clínicas de biopsias gástricas ha sido informado previamente (Miendje Deyia *et al.*, 2010).

Actualmente son muy pocos los estudios sobre el aislamiento e identificación de *H. pylori* a partir de muestras de aguas residuales. Un trabajo realizado por Lu *et al.* (2002) demostró la capacidad de *H. pylori* para crecer a partir de aguas residuales, después de utilizar la técnica de captura inmunomagnética. En otro estudio, Moreno y Ferrús (2012) demostraron la presencia de células cultivables de *H. pylori* en estaciones depuradoras de aguas residuales, aunque las colonias de *H. pylori* no pudieron ser aisladas, debido al crecimiento de microbiota competitiva acompañante en el medio de cultivo utilizado. Nuestros resultados mostraron que los medios de cultivo más

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

adecuados para el aislamiento e identificación de *H. pylori* a partir de aguas residuales fueron ADPB, BBL5, HPA₁ y AP. HPA₁ (Degnan *et al.*, 2003) contiene ácido clorhídrico y urea, lo que parece confirmar estudios previos que sugieren que la supervivencia de *H. pylori* mejora a valores de pH bajos. La presencia de urea en concentraciones menores a 10 mM parece facilitar el crecimiento y el aislamiento del patógeno (Stevenson *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2002; Boro *et al.*, 2016).

El aislamiento de *H. pylori* a partir de muestras de heces es muy complicado, debido a la naturaleza compleja de la muestra, rica en sales biliares y enzimas hidrolíticas (Van Tongeren *et al.*, 2005), la presencia de microbiota competitiva, y la probable transformación del microorganismo a su estado VBNC, debido al estrés ambiental que sufre a través del tracto gastrointestinal. Cuando se analizaron las muestras de heces inoculadas con una suspensión bacteriana de *H. pylori* de concentración conocida, los medios de cultivo idóneos para su aislamiento fueron AD y ADPB. Este resultado es relevante, ya que el diagnóstico de la infección por *H. pylori* a partir de muestras fecales consiste únicamente en la detección sus antígenos. Sin embargo, el cultivo del microorganismo proporciona más información, ya que permite la identificación de células viables y por lo tanto potencialmente infecciosas. Además, se puede realizar antibiogramas y detectar resistencia a los antibióticos, evitando así el uso de métodos de diagnóstico invasivos o fracasos en el tratamiento médico (Moreno *et al.*, 2015).

En este trabajo se ha podido determinar que los diferentes medios de cultivo resultaron óptimos en función de la naturaleza de la muestra analizada, siendo AP el medio óptimo para aguas residuales y ADPB para heces. Este resultado inesperado puede deberse a la diferente composición de las matrices evaluadas: Las aguas residuales contienen una gran variedad de productos químicos tóxicos, incluidos antibióticos, detergentes o compuestos orgánicos. De hecho, la muestra de agua residual analizada procedía de una estación depuradora de aguas residuales urbanas, donde generalmente existen contaminantes como fármacos, antibióticos, plaguicidas, drogas de abuso o compuestos perfluorados, (Álvarez-Ruiz *et al.*, 2018). No existen evidencias previas de que alguno de los componentes nutricionales y químicos utilizados en los medios de cultivo que permitieron el aislamiento de *H. pylori* y no se encontraba en los medios que resultaron negativos puedan ser mejor para absorber o inhibir el efecto de estos contaminantes. Por otro lado, la estación depuradora cuenta con un tratamiento de desinfección con cloro y/o radiación UV. Ambas técnicas

Capítulo 1: Optimización y evaluación de diferentes medios de cultivo para la detección y cuantificación de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas.

provocan una situación de estrés en las células de *H. pylori*. La presencia en la muestra de compuesto químicos tóxicos y los tratamientos de desinfección pueden explicar el periodo prolongado de incubación requerido para la recuperación de colonias de *H. pylori*.

Como resumen de este trabajo, podemos concluir que, debido a la naturaleza de *H. pylori*, encontrar una combinación de elementos selectivos que inhiban una gran cantidad de microbiota contaminante al mismo tiempo que permitan el crecimiento exitoso del patógeno es extremadamente difícil. Sin embargo, se han obtenido resultados muy positivos con el medio de cultivo ADPB, independientemente del origen de la muestra. La combinación del suplemento selectivo Dent, la polimixina B y el piruvato de sodio ha resultado ser muy selectiva para la detección y recuperación de *H. pylori*, sin inhibir el crecimiento del patógeno. El cultivo de muestras en este medio podría ser, por tanto, una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico, así como para estudios epidemiológicos.

CAPÍTULO 2

Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

2.1 OBJETIVO

Numerosos indicios sugieren la existencia de una vía indirecta de transmisión de *H. pylori* a través del agua o alimentos contaminados. Sin embargo, esta vía todavía no se ha podido demostrar, debido a las dificultades para detectar la presencia de células viables, y por tanto potencialmente infectivas, en este tipo de muestras. Por otra parte, la no disponibilidad de un medio de cultivo específico hace necesario el uso de técnicas moleculares, como la PCR, para su detección en muestras clínicas y ambientales. Disponer de una metodología de PCR que permitiera detectar exclusivamente células viables de *H. pylori* en muestras clínicas y ambientales sería, por tanto, de gran interés.

Para ello se ha propuesto el uso de colorantes intercalantes del DNA, como el “propidium monoazide iodide” (PMA) y el “ethidium monoazide bromide (EMA). Ambos son incapaces de penetrar la membrana de células vivas. Sólo cuando la membrana está dañada, penetran en las células, se unen a la molécula de DNA y forman enlaces covalentes estables, lo que evita su posterior amplificación por PCR. Recientemente, se ha propuesto una modificación de esta metodología, la técnica PEMAX™, para aumentar la eficiencia en la detección de DNA de células viables por PCR, mediante el uso de estos colorantes. Ninguna de estas técnicas ha sido evaluada hasta ahora para su aplicación a la detección de *Helicobacter pylori*.

Por tanto, el objetivo principal del presente capítulo es:

- OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PRE-TRATAMIENTO CON PMA O PEMAX™ QUE PERMITA LA DETECCIÓN EXCLUSIVA DE CÉLULAS VIABLES DE *H. pylori* EN DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS.

Para conseguirlo, se han estudiado los siguientes aspectos:

- La eficacia de los agentes intercalantes PMA y PEMAX™ para discriminar entre células viables y no viables, sin afectar a las células vivas, teniendo en cuenta su concentración y periodo de incubación.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

- La eficacia de PMA, PEMAX™, y un Tampón específico en combinación con PEMAX™, en células de *H. pylori* inactivadas con diferentes tratamientos desinfectantes comunes.
- La capacidad de PMA para atravesar las membranas celulares *H. pylori*, considerando sus diferentes estados de viabilidad (viable, viable pero no cultivable y no viable) y los cambios morfológicos asociados a los mismos.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para este estudio se utilizó la cepa de referencia *Helicobacter pylori* NCTC 11637. Se cultivó en placas de Agar Sangre Piruvato (ASP, Capítulo 1) que se incubaron en 90-95% de humedad, bajo condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂) a 37 °C durante 24-48 horas.

2.2.2 ESTUDIO DE VIABILIDAD, RECUENTO CELULAR Y ESTADO MORFOLÓGICO

En todos los ensayos se realizó el recuento de células viables y muertas, antes y después de cada tratamiento. Para ello se utilizó la técnica LIVE/DEAD™, descrita en el capítulo 1.

La pérdida de viabilidad celular también se confirmó mediante cultivo. Para ello, 100 µL de todas las suspensiones bacterianas utilizadas en los diferentes ensayos se inocularon en placas de ASP, que se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Transcurridos 3 días de incubación las placas se observaron diariamente durante los siguientes 11 días.

2.2.3 PRE-TRATAMIENTO CON PMA Y PEMAX™

El PMA (Propidio Monoazida; Biotium, Hayward, CA, USA) y PEMAX™ (GenÍUL, Barcelona, Spain), se disolvieron en agua Mili-Q en la cantidad adecuada para obtener una concentración de 2,5 mM y se almacenaron a -20 °C en condiciones de oscuridad, según las instrucciones del fabricante.

Para todos los ensayos, previamente a la extracción de DNA se agregó PMA y PEMAX™ a las muestras a dos concentraciones, 25 µM y 50 µM, y se incubaron en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente durante 5 y 10 minutos, manteniéndose en constante agitación, para promover la penetración de los intercalantes en las células (Agustí *et al.*, 2010). Después, las muestras se fotoactivaron durante 15 minutos utilizando el equipo PhAST Blue (GenIUL, España), se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µL de PBS. Finalmente, las muestras se conservaron a -20 °C hasta la extracción de su DNA y posterior análisis mediante qPCR.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

2.2.4 OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PRE-TRATAMIENTO CON PMA Y PEMAX™

Se ajustó una suspensión de un cultivo puro de *H. pylori* en fase exponencial de crecimiento (48 horas), mediante la técnica LIVE/DEAD, para obtener una concentración final de 10^6 células/mL de células viables. De esta solución inicial se utilizaron 3 mL como control de células viables del ensayo. Otra alícuota de 3 mL se incubó a 85 °C durante 30 minutos, para obtener una suspensión de células muertas. La viabilidad y morfología celular se comprobaron antes y después del tratamiento térmico, mediante el método LIVE/DEAD y la técnica de cultivo.

A continuación, diversas alícuota de 1,5 mL de la suspensión de células viables de *H. pylori* y de células muertas por calor, se trataron con PMA o PEMAX™ a concentraciones de 25 μ M y 50 μ M.

Del mismo modo, para comprobar si el tratamiento previo a la PCR con colorantes intercalantes de DNA afecta a la viabilidad de las células, dos suspensiones (A y B) del mismo inóculo con células viables de *H. pylori*, fueron analizadas independientemente por triplicado por qPCR, antes y después del tratamiento previo con PMA y PEMAX™, a tiempos de incubación de 5 y 10 minutos.

Además, se analizó una alícuota de 1,5 mL de cada muestra con PEMAX™ en combinación con un tampón específico, diseñado para mejorar la eficiencia de la técnica de viabilidad qPCR (Codony *et al.*, 2015). Para ello, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1,5 mL del tampón. A continuación, se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 5 y 10 minutos. Finalmente, se agregó PEMAX™ como se ha descrito anteriormente.

2.2.5 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE PMA, PEMAX™ Y UN TAMPÓN ESPECÍFICO COMBINADO CON PEMAX™ DESPUÉS DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

Para evaluar si la eficacia de los colorantes intercalantes de DNA varía en función de las condiciones que provocan la muerte celular, las células de *H. pylori* se expusieron a varios tratamientos desinfectantes: etanol al 70% durante 10 minutos; 100 ppm de hipoclorito de sodio durante 45 minutos y peróxido de hidrógeno al 5% durante 45 minutos.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

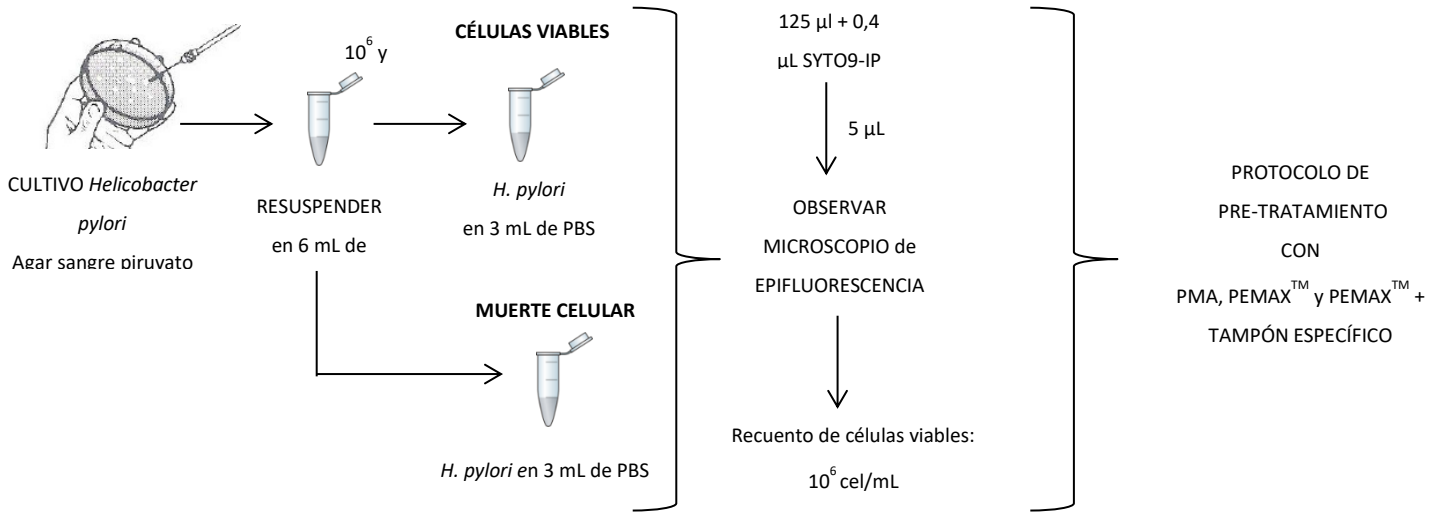
A partir de un cultivo puro de 48 horas de *H. pylori* NCTC 11637 se preparó un inóculo en 6 mL de PBS. Con la prueba LIVE/DEAD se ajustó a una concentración final a 10^6 células viables/mL. A continuación, se tomó una alícuota de 1,5 mL como control positivo de cada ensayo y otras con el mismo volumen fueron expuestas a los diferentes tratamientos desinfectantes para provocar la pérdida de viabilidad celular de *H. pylori*. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1,5 mL de PBS. La pérdida de viabilidad de *H. pylori* se determinó mediante cultivo y la prueba LIVE/DEAD antes y después de cada tratamiento de desinfección.

A continuación, las suspensiones bacterianas procesadas se trataron con PMA a $50 \mu\text{M}$ y PEMAX™ a $25 \mu\text{M}$ (con y sin tampón específico de PEMAX™), tal como se ha descrito con anterioridad, y se incubaron en oscuridad, durante 5 y 10 minutos, antes del análisis mediante qPCR (Figura 25).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se determinó el valor medio de los recuentos.

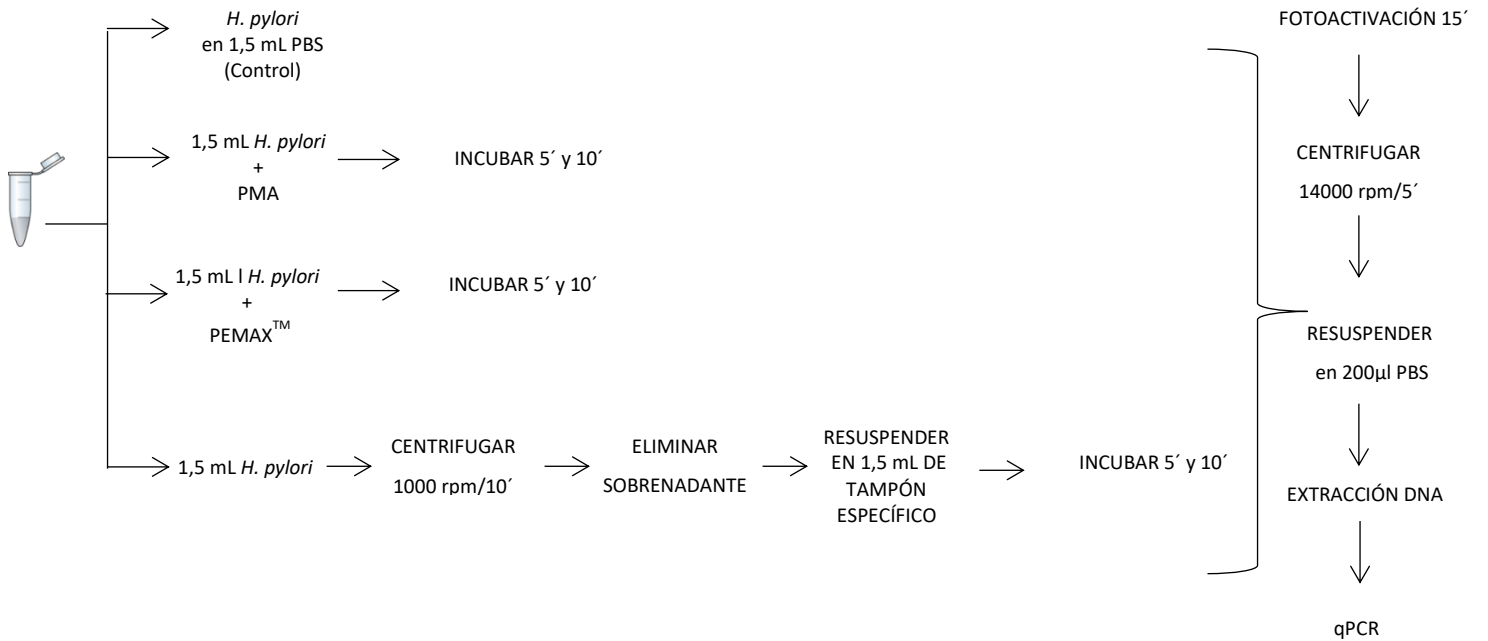
Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

CULTIVO CELULAR, ESTUDIO DE VIABILIDAD, RECuento CELULAR Y ESTADO MORFOLÓGICO



OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PRE-TRATAMIENTO CON PMA, PEMAX™ Y UN TAMPÓN ESPECÍFICO COMBINADO CON

PEMAX™



Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE PMA, PEMAX™ Y PEMAX™ COMBINADO CON UN TAMPÓN ESPECÍFICO DESPUÉS DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

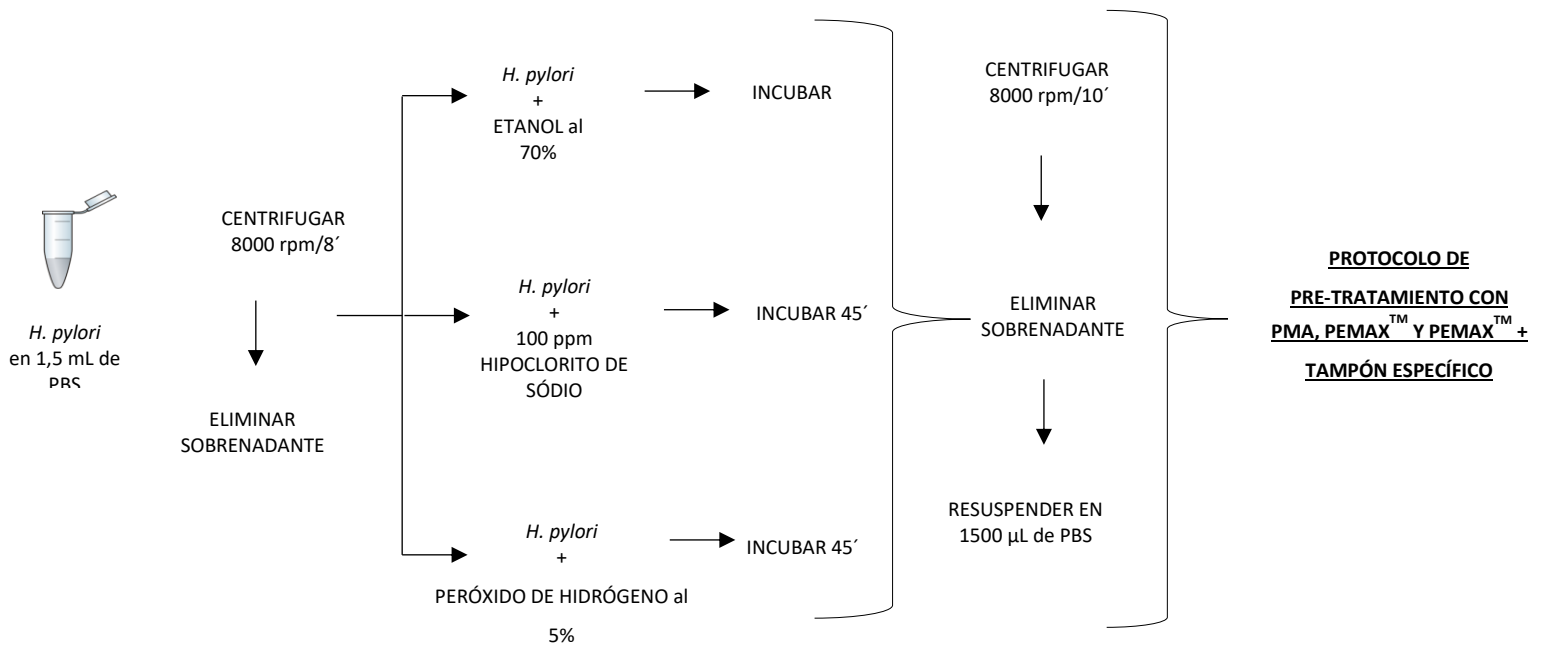


Figura 25: Protocolo de pre-tratamiento con PMA, PEMAX™ y un tampón específico combinado con PEMAX™ para la detección de células viables de *H. pylori*.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

2.2.6 ESTUDIO DE LA EFICACIA DE PMA PARA DETECTAR DIFERENTES ESTADOS MORFOLÓGICOS VIABLES DE *H. pylori*

Para obtener los diferentes estados morfológicos de *H. pylori* durante su transición a formas no-viables, la bacteria fue expuesta a diferentes condiciones de estrés:

Se preparó una suspensión bacteriana inicial en PBS a partir de un cultivo puro de *H. pylori* NCTC 11637 de 48 horas y se ajustó con el método LIVE/DEAD a una concentración final a 10^8 células viables/mL, como se ha descrito anteriormente. Se comprobó además mediante cultivo.

Se tomó una alícuota de 3 mL del inóculo inicial como control (forma espiral viable). Otras cuatro alícuotas de 1,5 mL fueron expuestas a diferentes condiciones ambientales, según estudios previos:

Para obtener las formas cocoide y bacilar no viables (NV) de *H. pylori*, las muestras se trataron con 100 ppm de hipoclorito de sodio y 5 % de peróxido de hidrógeno durante 45 minutos, respectivamente (Orta de Velásquez *et al.*, 2019). Las muestras se comprobaron cada 15 minutos con la técnica LIVE/DEAD, hasta que al menos el 95% de las células de la muestra presentaron la morfología deseada. Además, se confirmó la falta de viabilidad celular por la ausencia de colonias en el medio de cultivo.

Para inducir los cambios morfológicos a formas cocides y espirales viables, pero no cultivables (VBNC) se incubaron alícuotas con 1,5 mL de la suspensión de 10^8 células viables/mL de *H. pylori* en PBS a 25 °C y 4 °C (Zamani *et al.*, 2017), respectivamente. Las muestras se mantuvieron dentro de un tubo estéril de 10 mL en aerobiosis, en una cámara húmeda, durante dos meses y se examinaron todos los días con el método LIVE/DEAD hasta que al menos el 95% de las células de las muestras presentaron la morfología deseada. La pérdida de cultivabilidad se comprobó por la ausencia de colonias en los medios de cultivo.

Cuando se alcanzó la morfología deseada de las células de *H. pylori* las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1,5 mL de PBS. A continuación, se llevó a cabo el tratamiento con PMA a una

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

concentración final de 50 µM. Las muestras se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 5 minutos. Igualmente, se incubó el PMA en oscuridad a 37 °C durante 5 minutos, para comprobar si la temperatura favorece la penetración del colorante a través de la membrana celular comprometida. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

2.2.7 EXTRACCIÓN DE DNA

Se extrajo el DNA de todas las muestras utilizando el sistema GeneJET™ Genomic DNA Purification kit (ThermoScientific, Alemania), según las indicaciones del fabricante. Sin embargo, se modificó el tiempo de incubación a 30 minutos en lugar de los 10 minutos establecidos en el protocolo. El DNA aislado se conservó a -20 °C hasta realizar los ensayos de qPCR.

2.2.8 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR)

Para la identificación de *H. pylori* se utilizaron el par de iniciadores VacAR y VaAF, descritos por Nilsson *et al.* (2002), específicos para un fragmento de 394 pb del gen que codifica la proteína vacuolizante Vac de *H. pylori*, cuya su secuencia es:

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

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

Para todos los ensayos la reacción de amplificación se realizó 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 iniciador, a una concentración final de 20 Mm; 1,6 µL de MgCl₂ (50 mM) y 2 µL de DNA genómico. En el análisis se añadió un control negativo, en el que el DNA se reemplazó por agua ultrapura estéril y un control positivo, con DNA de la cepa de referencia *H. pylori* NCTC 11637, a una concentración de 10⁶ células/mL.

La reacción de amplificación se realizó en el termociclador LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, España), y se utilizó el software LightCycler® 4.1 (Roche Applied Science, Spain) para obtener automáticamente los valores C_q (Quantification Cycle), que marcan el ciclo en el que la fluorescencia de una muestra determinada supera significativamente la señal de referencia y la

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

cuantificación del DNA mediante el programa “Abs. Quant Analysis” y el método “Automated Second Derivate”. La cuantificación de las muestras se obtuvo según la curva estándar externa descrita previamente Santiago *et al.* (2015):

Tabla 4: Condiciones de qPCR para la detección de *H. pylori*.

Nombre Programa	Ciclos	Tipo análisis	Temperatura (°C)	Tiempo (h:mm:ss)	Rampa Tª (°C)	Modo Adquisición
Desnaturalización	1	Ninguno	95	0:10:00	20	Ninguno
			95	0:00:10	20	Ninguno
Amplificación	40	Cuantificación	62	0:00:05	20	Ninguno
			72	0:00:16	20	Sencilla
Fusión	1	Curva fusión	95	0:00:00	20	Ninguno
			71	0:00:15	20	Ninguno
Enfriamiento	1	Ninguno	95	0:00:15	0.1	Continuo
			40	0:00:30	20	Ninguno

Se incluyó un análisis de la temperatura de fusión (Tm) característica de los fragmentos amplificados, que debe ser de 85 °C (Santiago *et al.*, 2015). Brevemente, para elaborar la curva estándar ($Cq = -3,733 \text{ Log}_{10} (\text{GU}) + 38,98$; $R^2 = 1$), se utilizaron seis logaritmos de concentración de DNA de *H. pylori* NCTC 11637 en el rango de $2,16 \cdot 10^1$ a $1,79 \cdot 10^6$ unidades genómicas (GU), correspondientes a los valores medios del umbral de cuantificación (Cq), que oscilan entre 34 y 15,62. Las GU se calcularon teniendo en cuenta la existencia de una única copia del gen *VacA* en cada célula, según Linke *et al.* (2010). El peso del genoma de *H. pylori* (166,867 pb) se calculó de acuerdo con el peso medio de pares de bases (1,096 E21 g/pb) siguiendo la ecuación:

$$\text{*Unidades Genómicas (GU)} = \frac{\text{Concentración DNA (fg)}}{\text{Masa genómica}}$$

*En el caso de *H. pylori* para el gen *vacA*, este valor equivale a 1,76 fg.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

2.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos una vez en un experimento independiente. Los valores medios y la desviación estándar se calcularon utilizando Microsoft Excel.v.2010.

El efecto de los agentes intercalantes PMA y PEMAX™ con y sin su tampón específico, sobre células de *H. pylori* viables y muertas con los diferentes tratamientos de desinfección, se determinó calculando la reducción logarítmica (log 10) de las GU (Unidades Genómicas), utilizando los valores Cq obtenidos mediante qPCR. Para calcular el log10 de las copias del genoma detectables se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta GU = \text{Diferencia de valores GU} = \Delta GU_C - \Delta GU_{TS}$$

Donde:

ΔGU_C = Valor de GU de las muestras control, calculado con la ecuación de la curva estándar de *H. pylori*.

ΔGU_{TS} = Valor de GU de las muestras tratadas con PMA y PEMAX™ con y sin su tampón específico, calculado con la ecuación de la curva estándar de *H. pylori*. La eficiencia de amplificación (E) se estimó utilizando la pendiente de la curva estándar y la fórmula $E\% [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$

Las diferencias significativas entre los valores GU calculados a partir de los valores Cq y la ecuación de la curva estándar de *H. pylori* de los diferentes experimentos, se evaluó mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA), utilizando el programa Microsoft Excel.v.10 2010 (Microsoft Corporation, Redmon, WA, USA). En todos los casos las diferencia y correlaciones se consideraron estadísticamente significativas con valores $p < 0,05$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PRE-TRATAMIENTO CON PMA y PEMAX™

2.3.1.1 Determinación de la concentración óptima de ambos intercalantes.

Todas las células viables de *H. pylori* expuestas a tratamiento térmico se observaron de color rojo mediante la prueba LIVE/DEAD, indicando la pérdida de viabilidad celular (Figura 26). Además, se confirmó la ausencia de colonias en las placas de cultivo tras 14 días de incubación.



Figura 26: Células no viables de *H. pylori*, tratadas a 85 °C durante 30 minutos, observadas bajo el microscopio de epifluorescencia utilizando la prueba LIVE/DEAD. Observación 100X.

Se analizaron dos concentraciones diferentes de PMA y PEMAX™, 50 y 25 μ M. Como se observa en la Tabla 5, los resultados de qPCR de la muestra de células muertas sin pre-tratamiento, mostraron una reducción en el recuento de unidades genómicas (GU) de 0,95 log con respecto al control del ensayo (muestra de células vivas).

La concentración de 50 μ M, para ambos agentes intercalantes, PMA y PEMAX™ produjo reducciones visibles, pero no estadísticamente significativas ($P=0,06$) en la amplificación del DNA diana en la muestra de células muertas, en comparación con la muestra control de células viables, resultando en una disminución promedio de la señal de qPCR de 3,01 y 2,5 log GU, respectivamente.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

El pre-tratamiento con PMA y PEMAX™ a 25 µM mostró menos eficacia, obteniéndose una reducción media en los recuentos de 1,67 y 2,29 log GU, respectivamente.

Tabla 5: Efectos de las concentraciones de PMA y PEMAX™ en los resultados de qPCR en muestras de células de *H. pylori* muertas por calor.

Muestra	Concentration (µM)	Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	LogGU ^e
Inóculo control células viables ^a		15,64		6,3	
Inoculo control células muertas		19,01	3,37	5,35	-0,95
Pre-tratamiento con PMA	50 ^f	26,71 ± 0,353	11,07	3,29 ± 0,095	-3,01
Pre-tratamiento con PEMAX		24,78 ± 0,184	9,14	3,8 ± 0,049	-2,5
Pre-tratamiento PMA	25 ^g	21,72 ± 0,233	6,08	4,63 ± 0,062	-1,67
Pre-tratamiento con PEMAX		23,67 ± 0,113	8,03	4,09 ± 0,080	-2,29

^aInoculo control: sin tratamiento con PMA ni PEMAX.

^bCq: Ciclo de cuantificación. Los valores son la media de los valores Cq (n=3) ± SD.

^dGU: Unidades Genómicas. Los valores son la media de los valores GU(n=3) ± SD. Calculados con la curva estándar de *H. pylori* (coeficiente de correlación =1; $y = -3,7333x + 38,976$; eficiencia de la PCR = 99.8%).

^eΔCq: $\Delta Cq = \Delta Cq_c - \Delta Cq_{TS}$.

^eΔGU: $\Delta GU = \Delta GU_c - \Delta GU_{TS}$

ΔCq_c = Valor Cq del inóculo control de *H. pylori*.

ΔCq_{TS} = Valor Cq de muestra tratada con PMA, PEMAX™.

GU_c = Valor GU del inóculo control de *H. pylori* calculado con la curva estándar de *H. pylori*.

ΔGU_{TS} = Valor GU de la muestra tratada con PMA, PEMAX™, calculado con la curva estándar de *H. pylori*.

^fp-valor (50 µM): 0,06.

^gp-valor (25 µM): 0,01.

2.3.1.1 Evaluación del posible efecto tóxico de PMA y PEMAX™ (con y sin el tampón específico combinado con PEMAX™) en las células viables.

También se evaluó la posible acción tóxica de los colorantes intercalantes sobre las células viable. Para ello se trataron de forma independiente dos muestras diferentes, tomadas del mismo inóculo de células viable de *H. pylori* con PMA y PEMAX™ (con y sin su tampón específico) (Tabla 6). Para PMA, tanto con un tiempo de incubación de 5 como de 10 min, no se observó ningún efecto en los recuentos de qPCR, ya que el promedio de la reducción de la señal de qPCR (ΔCq) no fue significativamente diferente con respecto a los controles no tratados. No obstante, la muestra B, incubada durante 10 min con PMA, provocó una reducción media ligeramente superior de 0,30 log

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

GU en comparación con el control del ensayo. Esto sugiere un efecto más tóxico en las células viables.

Con respecto al pre-tratamiento con PEMAX™, los resultados fueron similares para ambos periodos de incubación. En la muestra A se observó una disminución de la señal qPCR de 4,000 y 3,97 log GU, respecto al control sin tratar, para 5 y 10 min de incubación respectivamente; y la muestra B, mostro una reducción de 0,75 y 1,12 log GU, tras su incubación durante 5 y 10 min respectivamente. Las diferencias observadas entre las muestras con y sin un tratamiento con PEMAX™ fueron estadísticamente significativa ($p=0,00001(A)$; $p=0,0065(B)$).

El uso de un tampón específico en combinación con PEMAX™ mostró un efecto más significativo en el promedio en unidades genómicas de los resultados de qPCR. La muestra A, dio lugar a una disminución de la señal de q PCR de 1,13 y 1,97 log GU, para 5 y 10 minutos de incubación, respectivamente. En cuando a la muestra B, dio lugar a una disminución de la señal qPCR de 1,97 y 2,82 log GU para 5 y 10 min de incubación respectivamente.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

Tabla 6: Efectos del PMA, PEMAX™ y el Tampón específico en combinación con el PEMAX™ en células viables de *H. pylori*.

Colorante intercalante	Tiempo de incubación (min)	SAMPLE A				SAMPLE B			
		Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e	Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e
Inóculo control ^a		16,1		6,12		13		6,96	
PMA ^h	5	16,48 ± 0,056	0,38	6,02 ± 0,015	-0,10	13,75 ± 0,035	0,75	6,77 ± 0,009	-0,19
	10	16,38 ± 0,052	0,28	6,03 ± 0,011	-0,09	14,12 ± 0,021	1,12	6,66 ± 0,005	-0,3
PEMAX ⁱ	5	20,1 ± 0,140	4,00	5,05 ± 0,038	-1,07	18,98 ± 0,055	5,98	5,41 ± 0,015	-1,55
	10	20,07 ± 0,120	3,97	5,06 ± 0,032	-1,06	20,04 ± 0,095	7,04	5,08 ± 0,025	-1,88
PEMAX+Tampon ^j	5	20,29 ± 0,026	4,19	4,99 ± 0,007	-1,13	20,34 ± 0,080	7,34	4,99 ± 0,021	-1,97
	10	23,47 ± 0,032	7,37	4,15 ± 0,008	-1,97	23,52 ± 0,076	10,52	4,14 ± 0,024	-2,82

^aInóculo control: sin pre-tratamiento con PMA y PEMAX.

^bCq: Ciclo de cuantificación. Los valores son la media de los valores Cq (n=3) ± SD.

^dGU: Unidades Genómicas. Los valores son la media de los valores GU(n=3) ± SD. Calculados con la curva estándar de *H. pylori* (coeficiente de correlación =1; $y = -3,7333x + 38,976$; eficiencia de la PCR = 99,8%).

^cΔCq: $\Delta Cq = \Delta Cq_c - \Delta Cq_{TS}$.

^eLogGU: $\Delta GU = \Delta GU_c - \Delta GU_{TS}$

ΔCq_c = Valor Cq del inóculo control de *H. pylori*.

ΔCp_{TS} = Valor Cq de muestra tratada con PMA, PEMAX™, con y sin tampón PEMAX™

GU_c = Valor GU del inóculo control de *H. pylori* calculado con la curva estándar de *H. pylori*.

ΔGU_{TS} = Valor GU de la muestra tratada con PMA, PEMAX™, con y sin tampón PEMAX™ calculado con la curva estándar de *H. pylori*.

^hp-valor (sample A): 0,85; p-valor (sample B): 0,81.

ⁱp-valor (sample A): 0,00001; p-valor (sample B): 0,006.

^jp-valor (sample A): 0,068; p-valor (sample B): 0,030.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

2.3.2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON PMA, PEMAX™ Y UN TAMPÓN ESPECÍFICO EN COMBINACIÓN CON PEMAX™ DESPUÉS DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

Para estudiar la influencia de las condiciones de estrés o el tratamiento físico-químico utilizado para causar la muerte celular en la efectividad del pre-tratamiento con PMA y PEMAX™, se realizaron ensayos mediante qPCR con diferentes tratamientos de desinfección.

Las muestras se trataron con 50 µM de PMA y 25 µM de PEMAX™, ya que en el ensayo inicial estas condiciones fueron las que causaron menor efecto sobre las células viables de *H. pylori*.

Además, se evaluó el tiempo de incubación de ambos colorantes, incubando las muestras durante 5 y 10 min. También se comprobó la eficacia del tampón específico en combinación con el PEMAX™ (Tabla 7).

2.3.2.1 Exposición de *H. pylori* a etanol al 70%.

La exposición de las células viables de *H. pylori* al tratamiento de desinfección con 70% de etanol, condujo a la pérdida completa de cultivabilidad, comprobada por la ausencia de colonias en los medios de cultivo. Además, la técnica LIVE/DEAD mostró células no viables de *H. pylori* con forma espiral. El pre-tratamiento con PMA indujo una reducción significativa de la señal de amplificación ($p=0,0057$) en las células de *H. pylori* muertas con etanol al 70% (Tabla 7). Se observó una reducción de 2,46 y 2,84 log GU, en comparación con los resultados obtenidos para las muestras inactivadas no tratadas con PMA, para los periodos de incubación de 5 y 10 minutos respectivamente. No se observaron diferencias significativas para ambos periodos analizados.

Se obtuvieron resultados similares con PEMAX™. El pre-tratamiento con el agente intercalante, provocó la reducción de la señal de qPCR en 2,83 y 2,87 log GU, después de un periodo de incubación de 5 y 10 minutos respectivamente. Además, el uso de un tampón específico en combinación con PEMAX™, resultó en una reducción de la señal de qPCR de 3,14 y 3,06 log GU (Tabla 7).

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

2.3.2.2 Inactivación de las células de *H. pylori* con 100 ppm de hipoclorito de sodio.

La eficiencia del tratamiento desinfectante se comprobó por la ausencia de colonias en los medios de cultivo y mediante la técnica LIVE/DEAD, que mostró células no viables de *H. pylori* con morfología cocoide. Los valores Cq observados después del pre-tratamiento con PMA presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), en comparación con las células de *H. pylori* inactivadas no tratadas (29,1 vs 17,15 y 17,78, después de 5 y 10 min respectivamente). Se obtuvieron resultados similares con PEMAX™ (29,1 vs 17,6 y 20,38, después de 5 y 10 min respectivamente). Con respecto a su utilización en combinación con un tampón específico, el análisis mediante qPCR mostró una reducción de la señal de amplificación de 0,31 y 1,04 log GU, en comparación con las células de *H. pylori* inactivadas no tratadas, resultados que no fueron significativamente diferentes de los obtenidos al usar PEMAX™ sin tampón (Tabla 7). Respecto a los periodos de incubación, no se observaron diferencias significativas, puesto que los valores ΔCq fueron similares en todos los casos analizados.

2.3.2.3 Tratamiento de *H. pylori* con peróxido de hidrógeno al 5%.

Se comprobó una vez más la eficacia del tratamiento desinfectante inoculando la muestra en placas de cultivo y mediante la prueba LIVE/DEAD. El pre-tratamiento con PMA redujo la señal de amplificación de la qPCR en las muestras con células de *H. pylori* inactivadas, en 2,82 y 2,52 log GU, en comparación con las células de *H. pylori* inactivadas no tratadas (Tabla 7), después de ser incubadas en condiciones de oscuridad durante 5 y 10 min respectivamente. El pre-tratamiento con PEMAX™ produjo resultados similares, ya que los recuentos de qPCR se redujeron en 1,93 y 2,67 log GU. Además, el uso del tampón específico redujo los recuentos de qPCR en 3,08 y 2,74 log GU, para ambos periodos de incubación, en comparación con las células de *H. pylori* inactivadas no tratadas.

En general todos los tratamientos realizados antes del análisis mediante qPCR produjeron reducciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$), en comparación con la muestra control inactivada no tratada, independientemente del tiempo de incubación utilizado. Cuando se compararon los resultados para ambos tiempos de incubación, no se observaron diferencias significativas para ninguno de ellos.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

Tabla 7: Reducción en los recuentos de qPCR de una suspensión de células no viables de *H. pylori*, considerando diferentes tratamientos desinfectantes utilizados para provocar la muerte celular.

Muestra	Tiempo de Incubación	Etanol 70%				Hipoclorito de sodio (100ppm)				Peróxido de Hidrógeno (5%)			
		Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e	Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e	Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e
Inoculo Viable	0	14,45		6,56		14,45		6,56		14,45		6,56	
Inoculo Tratado	0	19,16		5,31		17,1		5,86		16,3		6,79	
KPretratamiento con PMA	5	23,62 ± 0,031	9,17	4,1 ± 0,008	-2,46	17,15 ± 0,025	2,7	5,83 ± 0,007	-0,73	22,28 ± 0,181	7,83	3,74 ± 0,048	-2,82
	10	25,13 ± 0,015	10,68	3,72 ± 0,040	-2,84	17,78 ± 0,026	3,33	5,67 ± 0,007	-0,89	21,21 ± 0,061	6,76	4,02 ± 0,016	-2,54
LPretratamiento con PEMAX	5	24,99 ± 0,026	10,54	3,73 ± 0,007	-2,83	17,6 ± 0,055	3,15	5,71 ± 0,015	-0,84	21,64 ± 0,127	7,19	4,63 ± 0,034	-1,93
	10	25,17 ± 0,059	10,72	3,69 ± 0,016	-2,87	20,38 ± 0,025	5,93	4,98 ± 0,007	-1,58	24,4 ± 0,100	9,95	3,89 ± 0,027	-2,67
MPretratamiento con PEMAX + Tampom	5	26,15 ± 0,025	11,7	3,42 ± 0,007	-3,14	18,34 ± 0,030	3,89	6,25 ± 0,008	-0,31	25,95 ± 0,061	11,5	3,48 ± 0,016	-3,08
	10	25,87 ± 0,055	11,42	3,5 ± 0,015	-3,06	20,38 ± 0,097	5,93	5,52 ± 0,025	-1,04	25,67 ± 0,113	10,22	3,82 ± 0,03	-2,74

^bCq: Ciclo de cuantificación. Los valores son la media de los valores Cq (n=3) ± SD.

^dGU: Unidades Genómicas. Los valores son la media de los valores GU(n=3) ± SD. Calculados con la curva estándar de *H. pylori* (coeficiente de correlación =1; $y = -3,7333x + 38,976$; eficiencia de la PCR = 99,8%).

^cΔCq: $\Delta Cq = \Delta Cq_c - \Delta Cq_{TS}$.

^eLogGU: $\Delta GU = \Delta GU_c - \Delta GU_{TS}$.

ΔCq_c = Valor Cq del inóculo control de *H. pylori*.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

ΔC_{p75} = Valor Cq de muestra tratada con PMA, PEMAX™, con y sin tampón PEMAX™

GU_c = Valor GU del inóculo control de *H. pylori* calculado con la curva estándar de *H. pylori*.

ΔGU_{75} = Valor GU de la muestra tratada con PMA, PEMAX™, con y sin tampón PEMAX™ calculado con la curva estándar de *H. pylori*.

^kp-valor (Etanol 70%): 0,005; p-valor (Hipoclorito de Sodio 100ppm): 0,89; p-valor (Peróxido de Hidrógeno 5%): 0,053.

^lp-valor (Etanol 70%): 0,001; p-valor (Hipoclorito de Sodio 100ppm): 0,082; p-valor (Peróxido de Hidrógeno 5%): 0,025.

^Mp-valor (Etanol 70%): 0,0053; p-valor (Hipoclorito de Sodio 100ppm): 0,025; p-valor (Peróxido de Hidrógeno 5%): 0,00345.

2.1 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PMA EN LA AMPLIFICACIÓN DE DNA DE DIFERENTES ESTADOS MORFOLÓGICOS Y DE VIABILIDAD DE *Helicobacter pylori*

Se realizó un estudio con las condiciones óptimas de PMA previamente establecidas: una concentración final de 50 μ M y un periodo de incubación de 5 minutos. Asimismo, para analizar si la temperatura favorece en la penetración del agente intercalante a través de la membrana plasmática comprometida de *H. pylori*, las muestras se incubaron en oscuridad también a 37 °C durante 5 min. Las morfologías, la viabilidad y la cultivabilidad de las células se confirmaron mediante la técnica LIVE/DEAD (Figura 27) y la presencia/ausencia de colonias en las placas de cultivo.

No se observó ningún efecto del pre-tratamiento con PMA sobre los estados morfológicos viables de *H. pylori*, para ambas temperaturas de incubación analizadas (temperatura ambiente y 37 °C), ya que sus recuentos promedio (Δ GU) no resultaron significativamente diferentes de los obtenidos para la muestra sin tratar (Tabla 8).

Por el contrario, el pre-tratamiento con PMA indujo una reducción significativa de la señal de amplificación de la qPCR en las muestras con células no viables, tanto con morfología espiral (p=0,03) como cocoide (p=0,01), en comparación con el control de *H. pylori* sin pre-tratamiento con PMA. Además, los efectos del colorante en las células no viables aumentaron con el incremento de la temperatura de incubación a 37 °C. La señal de amplificación de las muestras no viables con morfología espiral y cocoide se redujo en 3,6 y 2,93 log GU respectivamente.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

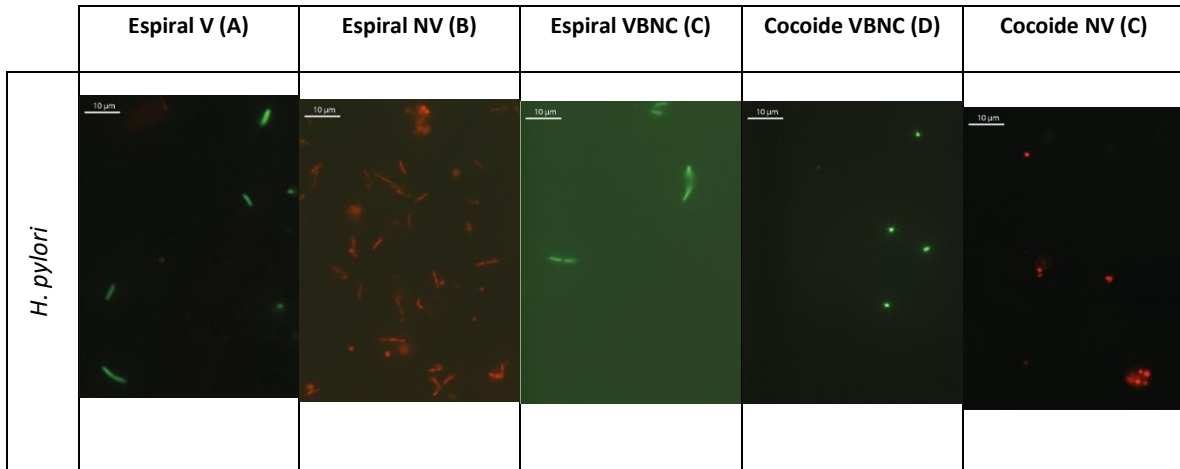
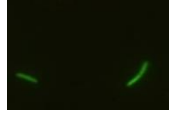
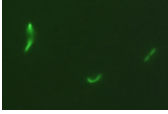
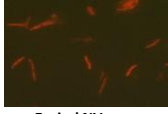




Figura 27: Prueba LIVE/DEAD utilizada para determinar los diferentes estados morfológicos de *H. pylori* tras su exposición a diferentes condiciones de estrés. (A) Espiral viable (inóculo control). (B) Espiral no viable (Tratada con peróxido de hidrógeno al 5%). (C) Forma espiral viable pero no cultivable (VBNC) (Incubada durante dos meses a 4°C). (D) Forma cocoide viable pero no cultivable (VBNC) (Incubada durante 2 meses a 25 °C). (E) Forma cocoide no viable (Tratada con 100 ppm de hipoclorito de sodio).

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

Tabla 8: Efectos del pre-tratamiento con PMA en los recuentos de qPCR de muestras de *H. pylori* considerando sus diferentes estados morfológicos y la temperatura de incubación del colorante.

Morfología																				
	Espiral V Spiral				Espiral VBNC				Espiral NV				Coccoide VBNC				Coccoide NV			
	Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e	Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e	Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e	Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e	Cq ^b	ΔCq ^c	GU ^d	ΔGU ^e
Inóculo Control	12,69		7,04		12,69		7,04		14,30		6,61		14,75		6,49		13,40		6,85	
Muestra sin pre-tratamiento con PMA	12,69 ± 0,305		7,04 ± 0,082		13,48 ± 0,27		6,83 ± 0,088		16,31 ± 0,21		6,07 ± 0,086		16,87 ± 0,086		5,92 ± 0,077		21,20 ± 0,07		4,76 ± 0,055	
^N Muestra con pre-tratamiento con PMAMA	12,21 ± 0,300	0,48	7,17 ± 0,101	0,13	14,11 ± 0,42	0,63	6,6 ± 0,38	-0,17	22,36 ± 0,12	6,05	4,45 ± 0,29	-1,34	18,29 ± 0,11	3,64	5,54 ± 0,83	-0,38	26,17 ± 0,66	12,77	3,43 ± 0,44	-1,08
Muestra con pre-tratamiento con PMA 37 °C	12,10 ± 0,359	0,59	7,20 ± 0,203	0,16	15,27 ± 0,26	1,79	6,350 ± 0,103	-0,51	25,50 ± 0,06	9,19	3,61 ± 0,05	-3,6	19,34 ± 0,85	2,47	5,26 ± 0,06	-0,66	28,41 ± 0,06	7,21	3,3 ± 0,59	-2,93

^a Inóculo control: sin pre-tratamiento con PMA y PEMAX.

^bCq: Ciclo de cuantificación. Los valores son la media de los valores Cq (n=3) ± SD.

^dGU: Unidades Genómicas. Los valores son la media de los valores GU(n=3) ± SD. Calculados con la curva estándar de *H. pylori* (coeficiente de correlación =1; $y = -3,7333x + 38,976$; eficiencia de la PCR = 99,8%).

^cΔCq: $\Delta Cq = \Delta Cq_c - \Delta Cq_{T5}$.

^eLogGU: $\Delta GU = \Delta GU_c - \Delta GU_{T5}$

ΔCq_c = Valor Cq del inóculo control de *H. pylori*.

ΔCp_{T5} = Valor Cq de muestra tratada con PMA, PEMAX™

GU_c = Valor GU del inóculo control de *H. pylori* calculado con la curva estándar de *H. pylori*.

ΔGU_{T5} = Valor GU de la muestra tratada con PMA, PEMAX™, calculado con la curva estándar de *H. pylori*.

VC: Viable y cultivable.

VBNC: Viable pero no cultivable.

^Np-valor (Espira VC): 0,423; p-valor (Espiral VBNC): 0,072; p-valor (Espiral NV): 0,003; p-valor (Coccoide VBNC): 0,24; p-valor (Coccoide NV): 0,01.

2.4 DISCUSIÓN

Helicobacter pylori se encuentra presente en muestras ambientales en concentraciones extremadamente bajas y principalmente en su forma VBNC. Estudios previos han detectado la presencia de células de *H. pylori* en ambientes acuáticos, demostrando que los tratamientos de desinfección pueden no ser totalmente eficaces para inactivar este patógeno (Castillo *et al.*, 2019; Sakudo *et al.*, 2018; Orta de Velásquez *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se basan en técnicas moleculares como la PCR, que no es capaz de discriminar entre células viables y no viables, siendo ésta una importante desventaja desde el punto de vista de la Salud Pública. Por esta razón, el pre-tratamiento de las muestras con PMA o con PEMAX™ previamente a la extracción del DNA, es utilizado en combinación con la qPCR para evitar la detección de células muertas, que de otro modo resultaría en falsos positivos. Sin embargo, todavía no existe un protocolo universal para su aplicación. Los resultados pueden verse afectados por factores que dependen de la metodología empleada, la concentración de los agentes intercalantes o su periodo de incubación, el tiempo de fotoactivación, el tipo de microorganismo estudiado (Gram positivo o negativo) o la matriz de la muestra (Nocker *et al.*, 2006; Fitipaldi *et al.*, 2012; Vondrakova *et al.*, 2018). Además, hasta ahora, el método PEMAX™ nunca se ha aplicado para la detección de *Helicobacter* spp.

En este trabajo se evaluó la efectividad del pre-tratamiento con PMA y PEMAX™ en combinación con la qPCR para su aplicación en la detección de células viables de *H. pylori* en muestras ambientales. Se consideraron y evaluaron diferentes parámetros, como la concentración de ambos colorantes intercalantes de DNA, el uso de un tampón específico en combinación con PEMAX™, así como el tiempo y la temperatura de incubación en condiciones de oscuridad. Además, por primera vez, se evaluó el rendimiento de esta metodología cuando se aplica a muestras previamente sometidas a diferentes procedimientos letales que se aplican habitualmente durante los procesos de desinfección en estaciones depuradoras de aguas residuales, instalaciones de procesamiento y almacenamiento de alimentos y esterilización de laboratorios.

Para analizar si la concentración de PMA y PEMAX™ influye en la detección de células viables de *H. pylori*, se compararon las concentraciones de 25 µM y 50 µM, teniendo en cuenta los trabajos realizados por Santiago *et al.* (2015) y Scaturro *et al.* (2016). Durante la optimización del

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

protocolo, de acuerdo con Nam *et al.* (2011), la concentración de PMA no tuvo efectos significativos en la reducción de la señal de qPCR de las células viables de *H. pylori*, lo que indica una baja citotoxicidad del PMA y una alta capacidad para penetrar solo en células con membrana dañadas (Nocker y Camper, 2006). La pequeña reducción logarítmica en unidades genómica de las células viables después del tratamiento con PMA puede deberse a la presencia de células muertas, debido al estrés osmótico ocurrido durante el traspaso del cultivo puro a PBS (Delgado-Visogliosi *et al.*, 2009). Se ha informado acerca de la subestimación de células viables para otras especies bacterianas (Yañez *et al.*, 2011; Liu y Mustapha, 2014; Barbau-Piednoir *et al.*, 2014) cuando se utilizan altas concentraciones de colorante o hay menor número de células diana en la muestra (Yasunaga *et al.*, 2013). Respecto al uso de PEMAX™, encontramos una reducción significativa en la señal de amplificación de las células viables para ambas concentraciones analizadas, lo que sugiere un efecto tóxico inespecífico en células viables tratadas con PEMAX™ o la neutralización de DNA de células con daños subletales. Se observó un efecto aún mayor cuando se utilizó un tampón específico en combinación con PEMAX™. Estudios previos han propuesto que el tratamiento con PEMAX™ es más preciso que el PMA para la detección de células con estructura de membrana intacta y metabolismo activo (Agustí *et al.*, 2017), lo que puede explicar que no se detecten algunas células dañadas, pero aún viables. Hasta donde sabemos, no hay ninguna referencia en la literatura que mencione resultados similares para *H. pylori*.

En cuanto al ensayo con células no viables, las muestras fueron expuestas a un tratamiento térmico a 85 °C durante 30 min. El calor induce la pérdida de polisacáridos de la membrana y la salida al medio de las sustancias intracelulares (Tsuchido *et al.*, 1985). Los resultados confirmaron que el calor altera la permeabilidad de la membrana, permitiendo la entrada de PMA/PEMAX™ en las células no viables. Sin embargo, no resultó en la extinción completa de la señal de qPCR en ningún caso. Estos datos están de acuerdo con varios estudios que describen la incompleta reducción de la señal PMA-qPCR, resultando en una sobreestimación de las células viables (Løvdal *et al.*, 2011). Estudios previos han propuesto que la presencia de un gran número de células muertas que exceden la capacidad del colorante intercalante de DNA, puede resultar en una insuficiente unión con el DNA de las células dañadas y por tanto la amplificación de estas mediante qPCR (Yañez *et al.*, 2009). Otros sugieren que el pequeño tamaño del amplicon en la qPCR puede influir en que su amplificación no sea anulada por completo mediante el pre-tratamiento con PMA (Luo *et al.*, 2010).

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

Para caracterizar mejor la utilidad de las metodologías analizadas en este trabajo, comparamos su eficiencia para discriminar entre células de *H. pylori* viables y no viables inactivadas con diferentes tratamientos comunes de desinfección. Los diferentes procesos se realizaron teniendo en cuenta tratamientos físicos y químicos que causan diferentes tipos de estrés en las células de *H. pylori* y, por tanto, su respuesta adaptativa (Dinh *et al.*, 2017). Además, el hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno suelen aplicarse a la desinfección medioambiental, principalmente de aguas residuales y potables. Confirmando lo expuesto por otros autores para diferentes microorganismos (Cho *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015), la efectividad de la detección mediante la técnica PMA-qPCR resultó diferente según el tratamiento desinfectante utilizado. Por lo tanto, los ensayos de viabilidad con colorantes deben optimizarse teniendo en cuenta el estrés celular ocasionado. Todos los tratamientos disminuyeron la señal de amplificación de qPCR, aunque ninguno permitió su completa extinción, lo que confirma que el uso de colorantes intercalantes de DNA, aunque sean útiles para el cribado entre células viables y no viables, no proporciona información del todo consistente para la cuantificación de células viables.

La reducción de la señal de qPCR más significativa se produjo después del tratamiento de las muestras viables de *H. pylori* con hipoclorito de sodio (100 ppm) durante 45 minutos. Los efectos del hipoclorito de sodio incluyen la destrucción de enzimas metabólicas (Wyss *et al.*, 1961) y la interrupción de síntesis de proteínas (Agranoff *et al.*, 1967). Este tratamiento desinfectante redujo la señal de qPCR en 3,47 log GU, en comparación con la muestra control de *H. pylori* sin tratamiento. No hubo diferencias significativas entre los colorantes intercalantes y el tampón específico utilizados. Esto puede explicarse porque el hipoclorito de sodio a altas concentraciones afecta tanto a la membrana celular como a los ácidos nucleicos, dificultando la unión covalente entre el DNA y cualquier colorante intercalante (Delgado-Viscogliosi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2015, Lin *et al.*, 2016).

El tratamiento con etanol al 70% provoca la deshidratación de las bacterias, daña la pared celular y provoca la coagulación de las proteínas (Huffer *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos mostraron una reducción de la señal de qPCR de 2,46 unidades logarítmicas en comparación con el control de *H. pylori* viable no tratado con PMA. No hubo diferencias significativas entre ambos colorantes. Sin embargo, los resultados indicaron una reducción significativa más alta cuando se utilizó el tampón específico en combinación con PEMAX™.

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

Acerca del peróxido de hidrógeno, éste genera estrés oxidativo y provoca peroxidación de lípidos, lo que resulta en una disminución en la fluidez de la membrana y su consiguiente inactivación (Nebe-von-Caron *et al.*, 2000). Los datos no mostraron diferencias significativas entre la muestra control viva y la muerta, lo que puede deberse a que el peróxido de hidrógeno conduce a la pérdida de la integridad/permeabilidad de la membrana, pero no daña el DNA (Krüger *et al.*, 2014).

Después de todos los ensayos analizados, se confirmó que el PMA, a una concentración de 50 µM y un periodo de incubación de 5 min, sería la metodología óptima de tratamiento antes del análisis mediante qPCR, ya que los resultados indicaron una reducción significativa de la señal de qPCR de las células muertas y menos reducción de la señal de qPCR (menos efectos citotóxicos) sobre las células viables.

También se estudió si los resultados PMA-qPCR podrían verse alterados por el estado morfológico de *H. pylori*, ya que este patógeno puede estar presente frecuentemente en el medio ambiente en su forma cocoide, que presenta algunas propiedades estructurales y funcionales diferentes (Krüger *et al.*, 2014). Como se esperaba, no se observó ningún efecto del pre-tratamiento con PMA sobre los estados morfológicos viables de *H. pylori*, ya que el promedio de sus recuentos no fue significativamente diferente, lo que confirma que este colorante se excluye de las células viables y, por tanto, no reduce la señal de qPCR de las morfologías viables y viables, pero no cultivables de *H. pylori*, independientemente de que sea espiral o cocoide.

Nuestro trabajo también mostró que el uso de PMA redujo la señal de las muestras que contenían células con morfologías cocoide y espiral no viables. Sin embargo, nuevamente este estudio no resultó en una pérdida completa de la señal de amplificación del DNA de estas células no viables (LØvdal *et al.*, 2011).

Además, los datos mostraron que el incremento de la temperatura de incubación a 37 °C favorece la entrada del PMA a través de la membrana comprometida de las células no viables de *H. pylori*. Hasta donde conocemos, esta es la primera vez que se realiza el pre-tratamiento con PMA con las condiciones establecidas para la detección y cuantificación de células viables de *H. pylori*. Sin

Capítulo 2: Desarrollo de un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación de células viables de *Helicobacter pylori*

embargo, nuestros resultados son consistentes con estudios previos donde células no viables de *Listeria* (Nkuipou-Kenfack *et al* 2013) y *Campylobacter* (Krüger *et al.*, 2014) fueron tratadas con PMA e incubadas en condiciones de oscuridad a 40 °C y 37 °C respectivamente.

En conclusión, las técnicas de PMA y PEMAX™, en combinación con la q-PCR pueden reducir significativamente la señal de amplificación de las células no viables, pero no son capaces de discriminar totalmente entre células viables y no viables presentes en una muestra. Aunque la metodología PMA-qPCR es el método más directo para minimizar los resultados falsos positivos en la detección de células muertas, y proporciona resultados rápidos en comparación con los métodos de cultivo (Goh y Gin, 2015), este enfoque no puede considerarse como un marcador de viabilidad universal y para su uso deben considerarse otros factores como la especie bacteriana, el origen de la muestra y el tratamiento de desinfección.

CAPÍTULO 3

Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

3.1 OBJETIVO

Ante la situación de escasez de agua en el planeta, la recuperación y la reutilización de las aguas residuales para el riego se han convertido en una alternativa insoslayable para garantizar la sostenibilidad de las prácticas agrícolas. Sin embargo, a pesar de los importantes progresos en las tecnologías de tratamiento de aguas residuales, se ha demostrado que diversos agentes patógenos humanos transmitidos por el agua (virus, bacterias y protozoos) pueden encontrarse en el efluente final.

En este sentido, *H. pylori* ha sido detectado reiteradamente en aguas que presentaban contaminación fecal. Sin embargo, y hasta la fecha, no existen estudios sobre la detección de especies patógenas del género *Helicobacter* distintas de *H. pylori* en aguas residuales.

El cultivo y aislamiento de *Helicobacter* spp. a partir de muestras ambientales es extremadamente complicado por lo que, para su detección en aguas, se utilizan técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación *in situ* (FISH). Ambas técnicas son sensibles y específicas, pero presentan el inconveniente de que no pueden diferenciar entre células viables y no-viables. La combinación del método de Recuento Directo de Viables y a la Hibridación *in situ* (DVC-FISH) sí que permite esta diferenciación y se ha usado previamente para detectar células viables de *H. pylori* con éxito en muestras ambientales. Por otra parte, la metagenómica de secuenciación dirigida con iniciadores específicos del gen 16S rRNA puede usarse para detectar posibles patógenos, permitiendo el estudio simultáneo de los microorganismos presentes en muestras ambientales complejas, así como su abundancia relativa y su diversidad.

Por tanto, el objetivo general del presente capítulo es:

- DETERMINAR, MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES, LA PRESENCIA DE ESPECIES DEL GÉNERO *Helicobacter* POTENCIALMENTE PATÓGENAS EN AGUAS RESIDUALES TRATADAS DESTINADAS AL RIEGO.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Para ello, se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar y evaluar iniciadores para la detección de bacterias del género *Helicobacter* mediante PCR.
- Detectar e identificar, mediante la técnica de Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), células de *Helicobacter* spp. y *H. pylori*.
- Detectar e identificar, mediante la técnica DVC-FISH, células viables de *Helicobacter* spp. y *H. pylori*.
- Detectar y cuantificar, mediante la técnica qPCR, células de *H. pylori*.
- Determinar, mediante secuenciación masiva dirigida (DAS), la presencia de las especies patógenas de *Helicobacter* spp. en aguas residuales.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 CEPAS DE REFERENCIA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para la optimización de los métodos moleculares se utilizaron diferentes cepas de referencia pertenecientes al género *Helicobacter* y otras especies filogenéticas afines pertenecientes a los géneros *Arcobacter* y *Campylobacter* (Tabla 9). Las cepas procedían de Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM), de la National Collection of Type Cultures (NCTC, Reino Unido) y de nuestra colección.

Tabla 9: Bacterias utilizadas para determinar la especificidad de los iniciadores *in vitro*.

MICROORGANISMO	ORIGEN	CEPA
<i>Helicobacter pylori</i>	DSM	10242
<i>Helicobacter hepaticus</i>	DSM	22909
<i>Helicobacter fennelliae</i>	DSM	7491
<i>Helicobacter cinaedi</i>	DSM	5359
<i>Helicobacter suis</i>	DSM	19735
<i>Arcobacter butzleri</i>	NCTC	12481
<i>Arcobacter skirrowii</i>	NCTC	12713
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	NCTC	11885
<i>Arcobacter cibarius</i>	UPV	Aislamiento ambiental
<i>Campylobacter jejuni</i>	NCTC	11168

Todas las cepas de referencia, excepto *H. suis*, fueron sembradas en placas de ASP (Capítulo 1) e incubadas a 37 °C en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂) durante 48-72 horas. *Helicobacter suis*, debido a su dificultad en crecer en medios de cultivo sólidos se inoculó en el medio de cultivo líquido Caldo Brucella (Anexo A.1) con 7% de suero fetal bovino y se incubó bajo las mismas condiciones descritas para las otras especies. Las cepas de *Arcobacter* y *Campylobacter* fueron sembradas en placas agar sangre e incubadas durante 48 horas a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Finalmente, se tomó una muestra del crecimiento bacteriano de cada una de las cepas utilizadas, que se conservó a -80 °C.

3.2.2 ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Para el presente trabajo se analizaron un total de 20 muestras, recogidas asépticamente después del tratamiento biológico (M1S-M10S) y del tratamiento de desinfección (M1T-M10T). Las muestras procedían de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR), localizada en la Comunidad Valenciana y se muestrearon durante el periodo comprendido entre febrero de 2016 hasta mayo de 2017.

La EDAR estudiada depura las aguas procedentes de una población de 155.674 habitantes, equivalente a un caudal de 36.625 m³/día. El pre-tratamiento consta de una reja para sólidos gruesos, una reja para sólidos finos, desarenador y desengrasador. El tratamiento primario se lleva a cabo por decantación. A continuación, se desarrolla un tratamiento secundario en reactores biológicos, con fangos activos. Finalmente, el tratamiento terciario se realiza mediante coagulación, floculación y desinfección con cloro y radiación ultravioleta.

3.2.3 PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras se recogieron en condiciones de esterilidad y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento, en un plazo máximo de 24 horas (Figura 28). Se centrifugó 1 litro de cada muestra a 3220 g durante 20 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 8000 g durante 8 minutos a 4 °C. El sedimento resultante se resuspendió en 10 mL de PBS 1X (Anexo B.2). A partir de este punto, se tomaron 200 µL para la identificación de *Helicobacter* spp. mediante cultivo, 1 mL para su análisis mediante qPCR y 1 mL para su estudio mediante DVC-FISH. Estas muestras se denominaron “D” (Directas).

Asimismo, se transfirió una alícuota de 5 mL de cada muestra a 10 mL de caldo de enriquecimiento (Anexo A.1), que se incubó en condiciones de microaerofilia a 37 °C durante 24 horas. Después del periodo de incubación, se realizó el análisis de detección de *Helicobacter* spp. mediante cultivo, qPCR y FISH. Las muestras se denominaron “E” (Enriquecimiento previo).

Para el análisis por secuenciación masiva dirigida de nueva generación (DAS), se tomó 1 mL de cada una de las 10 muestras recogidas tras el tratamiento de desinfección. Las muestras fueron analizadas directamente y después del paso de enriquecimiento.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

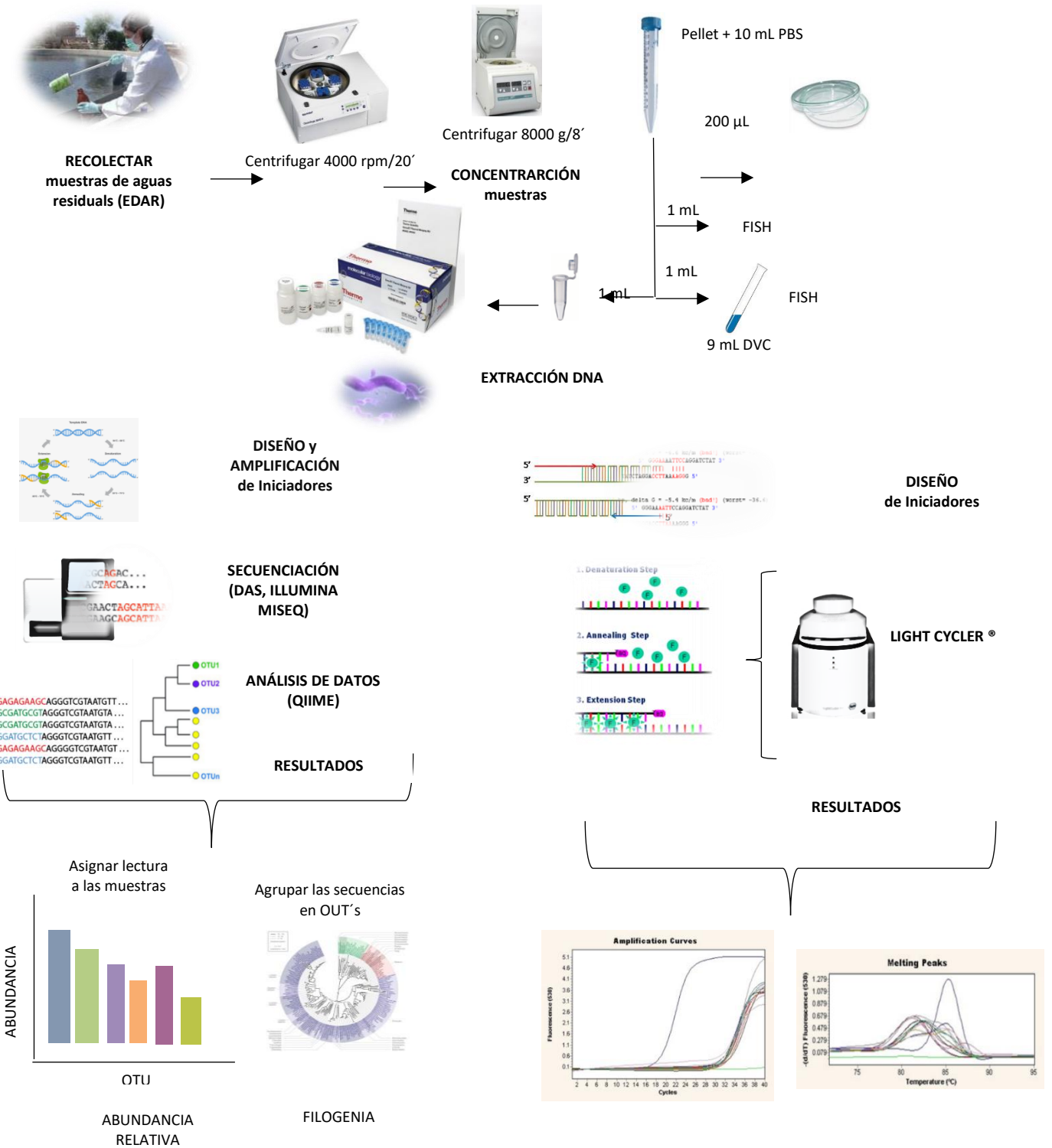


Figura 28: Protocolo para la detección e identificación de *H. pylori* y *Helicobacter* spp., en aguas residuales.

3.2.4 CULTIVO DE *Helicobacter* spp.

Para el cultivo de *Helicobacter* spp. se empleó el medio Agar Dent (AD; Capítulo 1). Se utilizaron dos procedimientos: El primer método consistió en la siembra en masa de 200 µL sobre los medios selectivos seleccionados e incubación en las condiciones óptimas, microaerofilia a 37 °C durante 48-96 horas. Para el segundo método se utilizó una técnica de filtrado, previamente descrita por Steele y Macdermot (1984) y posteriormente modificada por Moreno y Ferrús (2012): En condiciones asépticas se colocaron membranas estériles de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0,65 µm (Whatman, Maidstone, Inglaterra) sobre los medios selectivos. A continuación, sobre las membranas se añadieron 200 µL de muestra y se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente en condiciones de aerobiosis para asegurar su absorción. Finalmente, las placas fueron incubadas a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Después de 24 horas de incubación las membranas se retiraron asépticamente de las placas, y se incubaron de nuevo durante 14 días.

Después del periodo de incubación, las placas fueron examinadas para detectar la presencia de *Helicobacter* spp. Las colonias sospechosas se sembraron en Agar Sangre Piruvato (ASP, Capítulo 1) y se identificaron mediante tinción Gram y PCR específica para *Helicobacter* spp. y qPCR para *H. pylori*, como se describe más adelante.

3.2.5 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter* spp. y *H. pylori* MEDIANTE FISH y DVC-FISH

La detección e identificación de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* mediante la técnica de Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) y DVC-FISH, se realizó de acuerdo con los protocolos descritos por Moreno *et al.* (2003a) y Piqueres *et al.* (2006).

3.2.5.1 Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)

Fijación de las muestras: Para la fijación de las células, se centrifugo una alícuota de 1 mL de cada muestra (apartado 3.2.2). A continuación, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 1 mL de PBS y se realizó un lavado mediante centrifugación a 8000 rpm durante 8 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en PBS y paraformaldehído (PFA) (Anexo B.3) en proporción 1:3 durante 1,5 horas a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS, centrifugando entre cada uno a 8000 rpm durante 8 minutos para eliminar el PFA. Finalmente, el

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

sedimento se resuspendió en etanol absoluto a -20 °C y PBS en proporción 1:1. Las muestras fijadas se almacenaron a -20°C hasta su hibridación.

Condiciones de hibridación: Se depositaron alícuotas de 5 µL de cada muestra fijada sobre los pocillos de los portaobjetos de hibridación, tratados previamente con gelatina al 0,1% (Anexo B.3). Los portaobjetos se secaron en estufa a 46 °C o a temperatura ambiente y posteriormente se deshidrataron por inmersión sucesiva en volúmenes de 50, 80 y 100% de etanol, durante 3 minutos en cada uno. Para eliminar el etanol, los portaobjetos se secaron completamente a temperatura ambiente.

A continuación, 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, marcadas con sus correspondientes fluorocromos. Las hibridaciones para la identificación de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* se realizaron añadiendo 40% y 30% de formamida, respectivamente, en el tampón de hibridación.

El portaobjetos se introdujo en un tubo de plástico de 50 mL en posición horizontal, en el que se había colocado previamente una base de papel de celulosa humedecido con el mismo tampón de hibridación, con el fin de crear una atmósfera húmeda. La reacción se completó a 46 °C y en condiciones de oscuridad siguiendo las indicaciones de Moreno *et al.* (2001). El tiempo de hibridación establecido fue de 1,5 horas.

Posteriormente, se realizó el lavado del portaobjeto con 50 mL de solución de lavado (Anexo B.3). Para ello, inicialmente se vertió una pequeña cantidad de la solución de lavado para eliminar los restos de sonda que no se hubieran unido al rRNA. A continuación, se introdujo el portaobjetos en el tubo con la solución de lavado y se mantuvo en condiciones de oscuridad a 48 °C durante 15 minutos.

Después del proceso de lavado, los portaobjetos se limpiaron con agua ultrapura estéril y se secaron a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Finalmente, para su visualización se usó un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 50 con los filtros U-MWIB, U-MWIB y U-MIWG. El portaobjetos se montó con FluoroGuard Antifade Reagent (Bio-Rad, CA, EE. UU) (Anexo B.3) entre pocillos y cubre objetos. Las imágenes fueron fotografiadas con la cámara DP-10 Olympus.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Sondas de hibridación: En todas las hibridaciones realizadas en el presente estudio se utilizó como control positivo una combinación de tres sondas EUB338 complementarias a una región del rRNA 16S del dominio *Eubacteria* (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 6-Carboxyfluorescein (6-FAM), que emite en el espectro del verde (517 nm).

Para la identificación de *H. pylori* mediante hibridación *in situ* se utilizó la sonda HPY, diseñada previamente por Moreno *et al.* (2001), complementaria a la región específica del rRNA 16S, marcada con el fluorocromo CY3, que emite fluorescencia en el espectro del rojo (580 nm):

HPY: 5'-CCTG GAG AGA CTA AGC CCT CC-3'

La determinación específica de *Helicobacter* spp. se realizó con la sonda HEL717 diseñada por Chan *et al.* (2005), complementaria a una región específica del rRNA 16S (posición 717-737) de *Helicobacter* spp. La sonda fue marcada con el fluorocromo FAM (emisión de fluorescencia en el espectro del rojo, 580 nm).

HEL717-FAM: 5'-AGG TCG CCT TCG CAA TGA GTA-3'

La especificidad de la sonda HEL717-FAM se evaluó *in silico* mediante la herramienta on-line "Probe match", enfrentándola con la colección RDP'S de secuenciadas de rRNA 16S (<https://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>). Se determinó la especificidad *in vitro* mediante la hibridación de células de las diferentes cepas de referencia descritas en el apartado 3.2.1.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

3.2.5.2 Detección de Células Viables mediante DVC-FISH

Para el análisis de las muestras mediante la técnica DVC-FISH, se incorporó 1 mL de cada una de las muestras procesadas a 9 mL de caldo DVC (Anexo A.1), y se incubaron durante 24 horas en condiciones de microerofilia a 37 °C.

Después del periodo de incubación, las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 8 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS. A continuación, las muestras se volvieron a centrifugar y se fijaron con paraformaldehído e hibridaron según las condiciones descritas en el apartado 3.2.3.1.

3.2.6 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qPCR)

3.2.6.1 Extracción de DNA

Se tomó 1 mL de cada muestra directa y después del enriquecimiento. Para la extracción de DNA se utilizó el sistema comercial "GeneJET™ Genomic DNA Purification kit (ThermoScientific, Alemania), según el protocolo para células Gram negativas recomendado por el fabricante, modificando el tiempo de incubación a 56 °C durante 30 minutos en lugar de los 10 minutos especificados en el protocolo.

3.2.6.2 Condiciones de amplificación

Las condiciones de amplificación para la detección específica de *H. pylori* mediante qPCR con los iniciadores vacAR/vacAF fueron las descritas en el capítulo 2. En cada reacción se incluyó un control positivo con DNA procedente de la cepa de referencia *H. pylori* NCTC 11637 y un control negativo, en el que se sustituyó el DNA por agua estéril ultrapura. Todas las amplificaciones se realizaron por duplicado.

Todos los productos de qPCR positivos fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (Anexo B.4), en tampón Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) al que se le añadió un 0,01% de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, CA, EE.UU), a 90 V durante 90 minutos. Los geles se observaron en un transiluminador de luz UV para detectar la presencia de la banda correspondiente al fragmento de 394 pb del gen *vacA* de *H. pylori*.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Además, los productos de la amplificación fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV): En primer lugar, los productos se purificaron mediante el sistema comercial “GenElute PCR Clean-up” (Sigma-Aldrich, Francia) y se llevaron a secuenciar de forma inmediata. Las secuencias resultantes se visualizaron con el software Chromas versión 2.1.1 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) y se examinaron mediante la herramienta de análisis online BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.2.7 ANÁLISIS POR METAGENÓMICA PARA LA DETECCIÓN DE *Helicobacter* spp.

3.2.7.1 Evaluación de iniciadores

Para la selección de un par de iniciadores específicos para *Helicobacter* spp., inicialmente se realizó un estudio exhaustivo de la bibliografía disponible. Se seleccionó el iniciador HS2R, descrito por Huang *et al.*, (2002), y se diseñó uno “*de novo*”, HSF (Tabla 10). Ambos amplifican una zona de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA de bacterias de la familia Helicobacteraceae.

Tabla 10: Secuencias de los iniciadores HSF y HS2R.

INICIADOR	SECUENCIA (5´-3´)
HSF	CTAATACATGCAAGTCGAACGA
HS2R	GTGCTTATTCGTTAGATACCGTCAT

Para determinar las propiedades de los oligonucleótidos HSF y HS2R se usó la herramienta on-line Oligo Analyzer 3.1 ([OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT \(idtdna.com\)](http://www.idtdna.com/oligoanalyzer)). Se comprobó la especificidad y cobertura taxonómica de los iniciadores *in situ* mediante la herramienta TestPrime tool (<https://arb-silva.de/search/testprime>), utilizando la base de datos Silva SSUr132 y la colección de secuencias RefNR, permitiendo 0, 1 y 2 bases no complementarias en la unión de los iniciadores (Klindworth *et al.*, 2013).

A continuación, se evaluó *in vitro* la especificidad de los iniciadores mediante PCR convencional. Para ello se utilizaron las especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Helicobacter* spp., *Arcobacter* spp. y *Campylobacter* spp. que se recogen en la tabla 10: Se recogió una muestra de un cultivo en fase de crecimiento exponencial de cada una de las cepas de referencia

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

mediante un asa de siembra estéril, que se resuspendió en 1 mL de PBS. A continuación, se extrajo el DNA de acuerdo con el protocolo para bacterias Gram negativas del kit de extracción GeneJET™ Genomic DNA Purification kit (ThermoScientific, Alemania) y se eluyó el DNA en un volumen final de 50 µL. Una vez extraído, se midió su concentración con 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. El DNA se conservó a -20°C hasta su utilización.

Para la puesta a punto de la reacción de PCR se evaluaron diversas temperaturas de unión de los iniciadores, comprendidas en un rango de 55 °C a 65 °C (Tabla 11). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL, compuesta por 2,5 µL de Tampón 10X, 1,30 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada iniciador (10 mM), 5 U de Taq polimerasa (Ibiam Technologies SL, Zaragoza, España) y 4 µL del DNA extraído de cada una de las cepas de referencias utilizadas en este estudio.

Tabla 11: Condiciones de la PCR para la detección de *Helicobacter* spp.

Fase	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:m:s)
Desnaturalización inicial	1	95	0:05:00
Desnaturalización		95	0:00:45
Unión de iniciadores	28	55-65	0:00:45
Extensión del producto		72	0:00:45
Extensión final	1	72	0:05:00
Enfriamiento	1	4	Continuo

En cada ensayo se incluyó un control positivo, con DNA procedente de la cepa de referencia *H. pylori* NCTC 11637 y un control negativo, en el que el DNA se sustituyó por agua ultrapura.

Finalmente, un volumen de 10 µL del producto resultante de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Anexo B.4) y posterior observación en un transiluminador de luz UV.

3.2.7.2 Secuenciación de una comunidad artificial

Después de comprobar la especificidad de los iniciadores, se construyó una comunidad artificial (“mock”), para lo cual se mezclaron diferentes volúmenes de DNA de cada una de las cepas recogidas en la tabla 10, con el fin de tener una concentración de 2 ng del DNA de cada cepa bacteriana.

Por otra parte, se inocularon 3 µl de una muestra de agua residual directa procedente del tratamiento terciario (M1TD), en una alícuota de la comunidad artificial o “mock” creada. Esta muestra control tenía la finalidad de comprobar la idoneidad de las condiciones de secuenciación establecidas, así como la presencia de posibles inhibidores de la PCR en la muestra.

En total, para evaluar la eficacia de los iniciadores utilizados en el presente estudio se amplificaron y secuenciaron tres muestras: la comunidad artificial de bacterias o “mock”, la muestra de agua residual (M1TD) y la mezcla de la comunidad artificial de bacterias con la muestra (M1TD+mock).

3.2.7.3 Identificación de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* en muestras ambientales

Se analizaron un total de 20 muestras de aguas residuales: 10 muestras recogidas después del tratamiento secundario en el reactor biológico y 10 muestras tras el tratamiento de desinfección. Las muestras fueron analizadas directamente e integrando un paso previo de enriquecimiento. Todas las muestras fueron procesadas previamente mediante qPCR, FISH y DVC-FISH para la identificación de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. y fueron también analizadas por secuenciación dirigida, DAS.

La secuenciación dirigida de las muestras directas y enriquecidas procedentes del tratamiento de desinfección se realizó en la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq. Las librerías de amplicones de DNA se generaron empleando los iniciadores HSF y HS2R, de acuerdo con las instrucciones especificadas en la guía de preparación de las librerías de DNA para secuenciar mediante metagenómica en el secuenciador Illumina MiSeq (Amplicon P.C.R., 2013), utilizando la enzima KAPA HiFi HotStart (Kapabiosystems, USA). La secuenciación se realizó siguiendo el protocolo *paired-end* (2X300 pb). Las condiciones de PCR utilizadas fueron:

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Tabla 12: Condiciones de la PCR establecidas para el secuenciador Illumina MiSeq.

Fase	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:m:s)
Desnaturalización inicial	1	95	0:03:00
Desnaturalización		95	0:00:30
Unión de iniciadores	28	55	0:00:30
Extensión del producto		72	0:00:30
Extensión final	1	72	0:05:00

3.2.7.4 Análisis bioinformático

Una vez obtenidas las secuencias brutas de la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq, se hizo el análisis bioinformático de las mismas, a través de la plataforma de acceso libre QIIME 1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010). Para su análisis, se aplicaron los comandos adicionales disponibles en la máquina virtual Microbiome Helper (Comeau *et al.*, 2017). Primero se unieron las secuencias *forward* y *reverse* con el comando PEAR v0.9.19 (Zhang *et al.*, 2014). A continuación, para confirmar que las secuencias se habían unido correctamente, se empleó la herramienta FastQC (Andrews, 2010). Posteriormente, se aplicaron los comandos FASTX-Toolkit v0.014 (Gordon, 2009) para filtrar las secuencias por longitud y calidad. Se eliminaron las secuencias con menos de 200 pb y con cualquier base ambigua denominada “N” y con valor mínimo de calidad Q30 en al menos el 90% de las misma. Seguidamente, se usó nuevamente FastQC para eliminar las secuencias fusionadas con colas de baja calidad de secuenciación. Después del filtrado, se eliminaron las posibles lecturas potencialmente quiméricas, usando la herramienta VSEARCHv1.11.1 (Rognes *et al.*, 2016). Se utilizaron los denominados “wrapper scripts” de QIIME para clasificar las secuencias en diferentes unidades taxonómicas (OTU), definidas con un límite de similitud genética del 97%, empleando la base de datos Silva de ARN ribosómico de alta calidad Silva_132_release.tgz (Quast *et al.*, 2013). En concreto, la selección de OTUs se realizó con la opción “open reference”, lo que significa que las secuencias se agruparon primero comparándolas con las de referencia y después las restantes se agruparon comparándolas con las secuenciadas *de novo*. Para ello se utilizaron los métodos de código abierto SortMeRNA v2.0 (Kopylova *et al.*, 2012) y SUMACLUST v1.0.00 (Mercier *et al.*, 2013).

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Por último, las secuencias de OTUs que no se identificaron a nivel de especie mediante la base de datos Silva132 se alinearon con la base de datos NCBI, mediante la herramienta on-line BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter* spp. Y *H. pylori* POR CULTIVO

Prácticamente todas las muestras procedentes del tratamiento biológico y de desinfección, tanto directas como con un paso previo de enriquecimiento durante 24 horas, fueron negativas para la detección de *Helicobacter* spp. No obstante, en tres placas de Agar Dent procedentes de muestras directas, se observaron colonias sospechosas. Estas presentaron características fenotípicas específicas de *H. pylori*: colonias translúcidas con un diámetro entre 1-2 mm. Se realizó tinción Gram (Figura 29) y en todas ellas se observaron bacilos Gram negativos, cortos, con forma helicoidal o recta, correspondiente a la morfología característica del género *Helicobacter*.

Sin embargo, no fue posible su purificación, debido a la presencia de una masa de microbiota acompañante no específica (Figura 30).

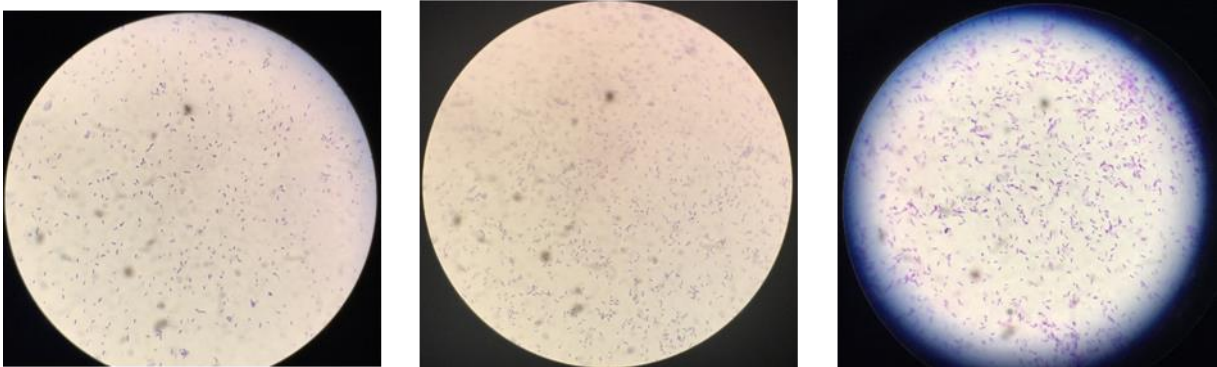


Figura 29: Tinción Gram de las colonias sospechosas de *Helicobacter* spp.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

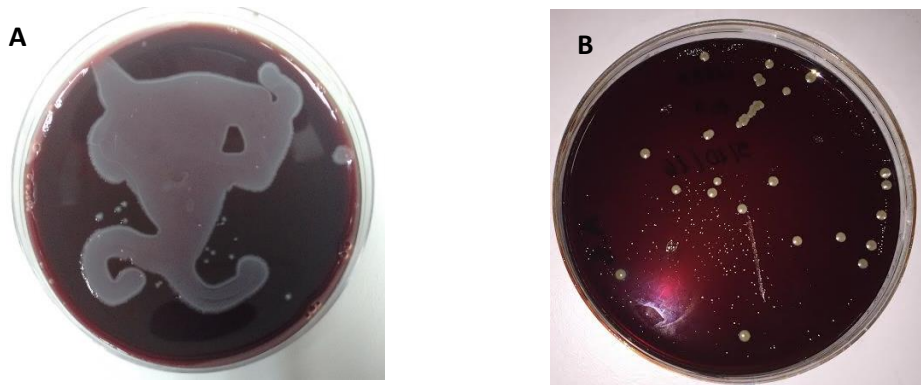


Figura 30: Colonias sospechosas de *Helicobacter* spp. (A) en Agar selectivo Dent. Purificación de las posibles colonias en Agar Sangre Piruvato(B).

Por lo tanto, para demostrar la presencia de células cultivables de *Helicobacter* spp. se recuperó todo el crecimiento bacteriano presente en las placas y, tras la extracción del DNA del cultivo mixto presente en las placas, se intentó detectar la presencia de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* mediante PCR y qPCR respectivamente. Se observó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%, que en una de las muestras se amplificaba el fragmento de 394 pb del gen *vacA* específico de *H. pylori* (Figura 31). Las colonias identificadas procedían de una muestra directa procedente del tratamiento terciario (M6TD).

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

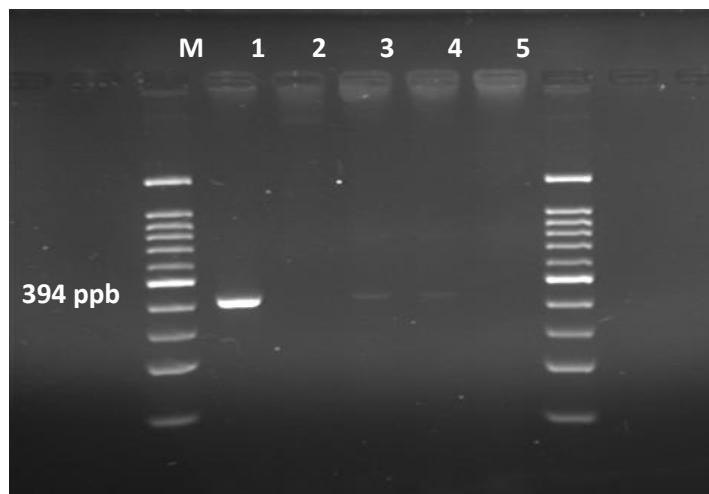


Figura 31: Identificación de colonias sospechosas de *Helicobacter* spp. por PCR. 1: Control positivo *H. pylori* NCTC 11637; 2, 3 y 4: colonia sospechosa. 5: Control negativo; M: marcador.

Para comprobar los resultados obtenidos mediante PCR, se secuenciaron los productos de amplificación, comprobándose que el fragmento amplificado presentaba una similitud del 100% con el gen *vacA* de *H. pylori*.

3.3.2 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter* spp. Y *H. pylori* MEDIANTE FISH y DVC-FISH

La especificidad de la sonda HEL717-FAM para la detección de *Helicobacter* spp. se comprobó *in silico* mediante la herramienta on-line “Probe match”, que comparó la secuencia en estudio con la colección de secuencias rRNA 16S de la base de datos RDP. Los ensayos *in vitro*, realizados con todas las cepas de referencia de *Helicobacter* spp., confirmaron su especificidad, ya que todas las especies de los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter* analizadas bajo las mismas condiciones de ensayo fueron negativas para la hibridación con la sonda HEL717-FAM.

El análisis mediante DVC-FISH reveló la presencia de células de *Helicobacter* spp. elongadas, es decir viables, en 15 (75%) de las 20 muestras directas (Tabla 13), 7 de ellas después del tratamiento secundario y 8 tras el tratamiento terciario de desinfección.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

El análisis por FISH de las muestras sometidas a enriquecimiento mostró la presencia de *Helicobacter* spp. en 14 (70%) de las 20 muestras de agua, 6 procedentes de la salida del reactor biológico y 8 procedentes del tratamiento de desinfección (Tabla 13).

Respecto a la detección de *H. pylori*, con la sonda específica HPY, se observaron células viables de *H. pylori* mediante DVC-FISH en un total de 10 (50%) de las 20 muestras directas analizadas, 4 de ellas recolectadas a la salida del reactor biológico y 6 a la salida del tratamiento de desinfección. Por FISH de las muestras enriquecidas, se identificó el patógeno en 11 (55%) de las 20 muestras analizadas, 5 procedentes del efluente secundario y 6 tras el proceso de desinfección.

En dos muestras procedentes del tratamiento secundario, M6S y M9S, se identificaron células de *Helicobacter* spp. pero no de *H. pylori*. Este resultado también se observó en las muestras procedentes del tratamiento terciario M3T y M9T.

En total, el porcentaje de detección mediante FISH de *Helicobacter* spp. fue del 80% (8 de las 10 muestras de aguas residuales analizadas tras enriquecimiento), mientras que el de *H. pylori* fue del 70% (7 de muestras).

Por DVC-FISH, se detectaron células viables de *Helicobacter* spp. y de *H. pylori* en el 80% (8 de 10 muestreos) y el 60% (6 muestras), respectivamente.

3.3.3 DETECCIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE qPCR

Con los iniciadores vacAR/vacAF se detectó la presencia de *H. pylori* en 11 (55%) de las 20 muestras de aguas residuales analizadas (Tabla 13), 4 muestras (M2, M3, M5 y M7) procedentes del reactor biológico y otras 4 muestras (M1, M4, M5 y M7) después del tratamiento terciario. Dos muestras (M2SE y M3SE) fueron positivas tras el tratamiento secundario pero negativas después del proceso de desinfección; las muestras M1TD y M4TD resultaron positivas únicamente después del tratamiento terciario. Los muestreos M5 y M7 resultaron positivos tras el tratamiento biológico (M5SE y M7SE) y de desinfección (M5TD, M5TE, M7TD y M7TE). Todas las muestras presentaron la temperatura de hibridación (“melting temperature”, T_m) específica de *H. pylori*. La presencia y peso molecular del producto de amplificación de la qPCR se comprobó posteriormente por electroforesis en gel de agarosa (Figura 32).

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

En total, el porcentaje de detección mediante qPCR de *H. pylori* fue del 60% (6 de los 10 muestreos de aguas residuales realizados).

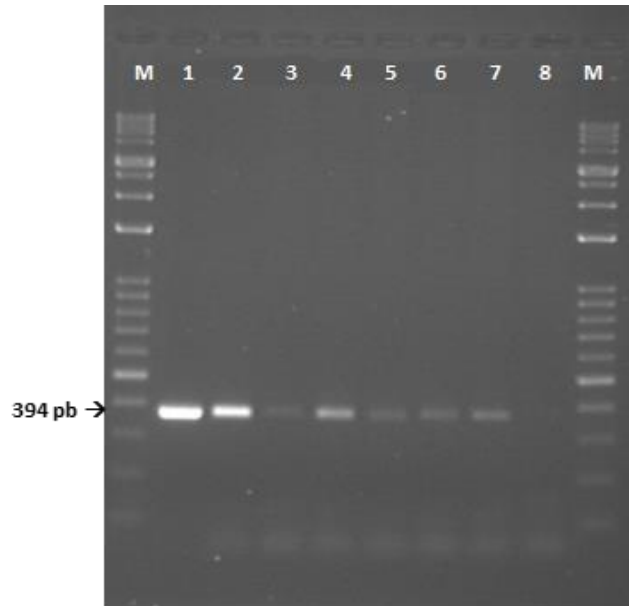


Figura 32: Detección de *H. pylori* en muestras tras el tratamiento secundario, por electroforesis en gel de agarosa. 1 y 2: control positivo. 3: MS2E; 4: M3SD; 5: M3SE; 6: M5SE; 7: M7SE; 8: control negativo. M: marcador de pesos moleculares 100pb.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Tabla 13: Detección de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* en muestras de aguas residuales destinadas para riego, mediante técnicas moleculares y DAS.

Muestreo	Punto de Muestreo	Tratamiento de la Muestra	qPCR	<i>H. pyl</i> DVC- FISH	<i>H. pyl</i> FISH	<i>Helicobacter</i> spp DVC- FISH	<i>Helicobacter</i> spp FISH	DAS	Especie (DAS)
M1	Secundario	Directo (M1SD)	-	-	-	-	-		
		Enriquecimiento (M1SE)	-		-		-		
M2	Secundario	Directo (M2SD)	+	+		+			
		Enriquecimiento (M2SE)	+		+		+		
M3	Secundario	Directo (M3SD)	+	+		+			
		Enriquecimiento (M3SE)	+		+		+		
M4	Secundario	Directo (M4SD)	-	-		+			
		Enriquecimiento (M4SE)	-		-		-		
M5	Terciario	Directo (M5TD)	+	+		+		+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i> , <i>Helicobacter</i> spp.
		Enriquecimiento (M5TE)	-		+		+	+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i> , <i>H. pullorum</i>
M6	Terciario	Directo (M6TD)	-	+		+		+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i> , <i>Helicobacter</i> spp.
		Enriquecimiento (M6TE)	-		+		+		
M7	Terciario	Directo (M7TD)	+	+		+		+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i> , <i>H. suis</i> , <i>Helicobacter</i> spp.
		Enriquecimiento (M7TE)	+		+		+	+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i> , <i>Helicobacter</i> spp.
M8	Terciario	Directo (M8TD)	-	-		+			
		Enriquecimiento (M8TE)	-		+		+		
M9	Terciario	Directo (M9TD)	-	+		+		+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i> , <i>Helicobacter</i> spp.
		Enriquecimiento (M9TE)	-		+		+		

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

		Enriquecimiento (M6TE)	-		-		+	+	<i>H. hepaticus</i>
M7	Secundario	Directo (M7SD)	-	+		+			
		Enriquecimiento (M7SE)	+			+		+	
	Terciario	Directo (M7TD)	+	+		+			<i>H. pylori</i>
		Enriquecimiento (M7TE)	+			+		+	<i>H. hepaticus,</i> <i>H. pullorum</i>
M8	Secundario	Directo (M8SD)	-	-		-			
		Enriquecimiento (M8SE)	-			-		-	
	Terciario	Directo (M8TD)	-	-		-			-
		Enriquecimiento (M8TE)	-			-		-	-
M9	Secundario	Directo (M9SD)	-	-		+			
		Enriquecimiento (M9SE)	-			-		+	
	Terciario	Directo (M9TD)	-	-		+			-
		Enriquecimiento (M9TE)	-			-		+	<i>H. hepaticus,</i> <i>H. pullorum,</i> <i>H. pylori</i>
M10	Secundario	Directo (M10SD)	-	-		-			
		Enriquecimiento (M10TE)	-			-		-	
	Terciario	Directo (M10TD)	-	-		-			-
		Enriquecimiento (M10TE)	-			-		-	-

3.3.4 DETECCIÓN DE *Helicobacter* spp. MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRIGIDA DAS

3.3.4.1 Evaluación de iniciadores para la amplificación de *Helicobacter* spp.

En el presente trabajo se seleccionó un segmento de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S rRNA de *Helicobacter* spp. para la amplificación y secuenciación de las muestras mediante la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq.

En primer lugar, se analizó *in silico* la cobertura de los iniciadores HSF/HS2R mediante el programa TestPrime, utilizando la base de datos Silva SSUr132. Se demostró que los iniciadores amplificaban mayoritariamente secuencias pertenecientes a *Helicobacter* spp. Cuando no se permitió ningún desapareamiento (mismatch) entre los iniciadores y las secuencias diana de la base de datos, la cobertura del género *Helicobacter* fue del 64,6%. Sin embargo, cuando se permitió 1 mismatch en el análisis, la cobertura del género *Helicobacter* aumento a 90,1% pero la cobertura del género *Campylobacter* fue de 22,7%, y en general la clase *Epsilonproteobacteria* mostro una cobertura del 14,1%. Cuando se permitieron 2 mismatches, la cobertura para el género *Helicobacter* aumento a 96,2% y la de las familias *Campylobacteraceae* y *Arcobacteraceae* se vio aumentada a 31,3% y 2,6% respectivamente. Para la clase *Epsilonproteobacteria* la cobertura aumento al 19,1%. De acuerdo con los resultados obtenidos con el análisis *in silico*, se observó que no era posible establecer unas condiciones óptimas de PCR con estos iniciadores, para que la detección resultara específica y además incluyera el mayor número de secuencias distintas de *Helicobacter* spp. contenidas en la base de datos.

Igualmente, se realizó el análisis *in vitro* para establecer las condiciones óptimas de amplificación. Se evaluó un gradiente de temperatura entre 55 °C a 65 °C (Figura 33 y Figura 34). Tras varios ensayos con diferentes especies de género *Helicobacter* spp., *Arcobacter* spp. y *Campylobacter* spp. se observó que, para una temperatura de amplificación de 59 °C, los iniciadores permitían la amplificación específica de DNA de todas las cepas de referencia de *Helicobacter* spp. incluidas en este trabajo y ninguna de los otros géneros.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

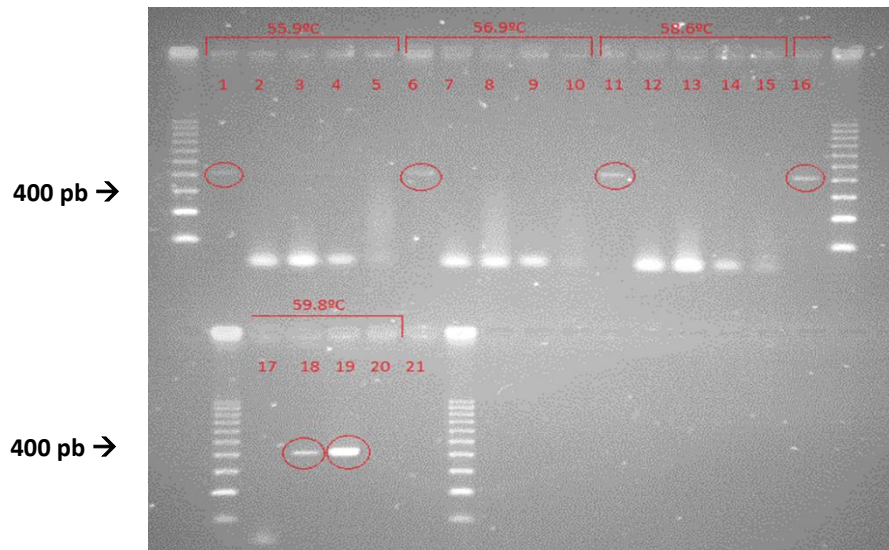


Figura 33: Gradiente de temperatura para la optimización de PCR para la detección de *Helicobacter* spp. por electroforesis en gel de agarosa. 1, 6, 11 y 16: *H. pylori* 10242; 2, 7, 12 y 17: *H. cinaedi* 5359; 3, 8, 13 y 18: *H. suis* 19735; 4, 9, 14 y 19: *A. cibarius*; 5, 10, 15 y 20: *A. cryarophilus*. 21: control negativo. M: marcador de pesos moleculares 100pb.

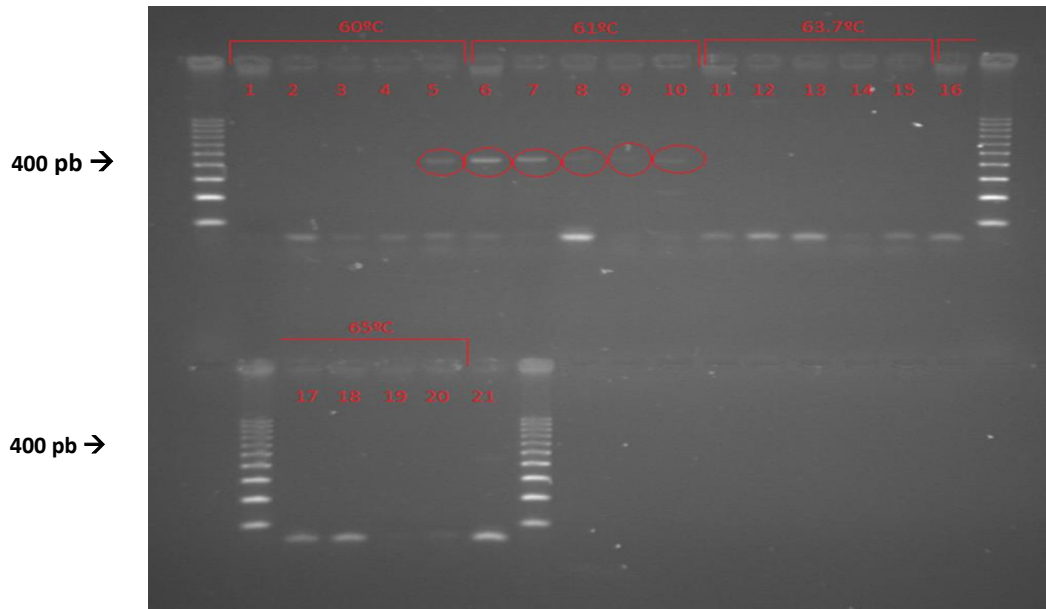


Figura 34: Gradiente de temperatura para la optimización de PCR para la detección de *Helicobacter* spp. por electroforesis en gel de agarosa. 1, 6, 11 y 16: *H. pylori* 10242; 2, 7, 12 y 17: *H. cinaedi* 5359; 3, 8, 13 u 18: *H. suis* 19735; 4, 9, 14 y 19: *A. cibarius*; 5, 10, 15 y 20: *A. cryarophilus*. 21: control negativo. M: marcador de pesos moleculares 100pb.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Sin embargo, en muestras ambientales se utilizó la temperatura de amplificación estándar de 55 °C recomendada por el protocolo Illumina para “Deep Amplicon Sequencing, DAS”, ya que se pretendía identificar en las muestras la presencia de todas las posibles secuencias del género y como se vio en el análisis *in silico*, las condiciones tenían que ser más laxas para permitir detectar secuencias con 2 o más mismatches y obtener así la máxima cobertura posible

Para comprobar la eficacia de los iniciadores para detectar *Helicobacter* en muestras ambientales complejas, como son las aguas residuales, se construyó una comunidad artificial (“mock”) de bacterias con DNA de especies de los géneros *Helicobacter*, *Arcobacter* y *Campylobacter*, que son los más próximos filogenéticamente. Además, esta comunidad artificial de bacterias se inóculo en el DNA de una muestra de agua residual (M1TE). Las muestras (M1TE, Mock y M1TE+Mock) fueron secuenciadas y posteriormente se llevó a cabo el análisis bioinformático. Tras filtrar las secuencias por calidad y eliminar las quimeras quedaron un total de 19614 secuencias, las cuales se agruparon en 233 OTUs o unidades taxonómicas asignadas al dominio Procariota con un 97% de similitud con la base de datos Silva v132.

Todas las especies incluidas en la comunidad artificial se recuperaron después del análisis de secuenciación. Como se esperaba, se obtuvo una desviación de la PCR que favorecía la amplificación de *Helicobacter*, ya que el resto de las especies estaban poco representadas en el mock e incluso no se detectaron en la muestra inoculada (Tabla14).

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Tabla 14: Secuencias recuperadas mediante el análisis informático de una muestra de agua residual, de la comunidad artificial de bacterias y la muestra inoculada con la comunidad artificial, después de la secuenciación con la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq.

Género	*M1TE	Mock	Mock+M1TE
<i>Helicobacter</i>	7	18511	19580
<i>Lactobacillus</i>	15365	0	0
<i>Limnohabitans</i>	431	0	0
<i>Comamonas</i>	198	0	0
<i>Arcobacter</i>	135	1038	0
<i>Morganella</i>	46	0	0
<i>Haliscomenobacter</i>	36	0	0
<i>Megamonas</i>	32	0	0
<i>Enterococcus</i>	32	0	0
<i>Oxalobacter</i>	15	13	0
<i>Fusibacter</i>	10	0	0
<i>Polynuclobacter</i>	8	0	0
<i>Trichococcus</i>	8	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	7	0	0
<i>Hydrogenophaga</i>	7	0	0
<i>Acinetobacter</i>	7	0	0
<i>Nannocystis</i>	6	0	0
<i>Hylemonella</i>	3	0	0
<i>Campylobacter</i>	0	8	0
Otros	3245	0	0

*M1TE: Muestra 1 Tratamiento Terciario Enriquecimiento

Como se esperaba, el filo bacteriano más abundante de la comunidad artificial bacteriana generada fue Proteobacteria. Dentro de la clase *Epsilonproteobacteria* los géneros *Helicobacter*, *Arcobacter* y *Campylobacter* comprendían el 99,71% del mock. Asimismo, en la muestra de agua residual abundaban *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Dentro del filo *Firmicutes*, los géneros más abundantes fueron *Lactobacillus*, *Megamonas*, *Enterococcus*, *Fusibacter* y *Trichococcus* y dentro de *Bacteroidetes*, el género *Haliscomenobacter*. En la muestra inoculada no se detectó ninguno de estos géneros.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

3.3.4.2 Identificación de *Helicobacter* spp. en muestras de aguas residuales tratadas

Se analizó el microbioma de las 16 muestras de aguas residuales que habían resultado positivas para la detección de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* mediante técnicas moleculares: 8 muestras de aguas residuales recolectadas tras el tratamiento secundario y 8 muestras tras el tratamiento de desinfección.

Una vez secuenciadas las muestras, se obtuvieron un total de 746.198 secuencias. Después de filtrarlas por calidad, unir las lecturas finales emparejadas y eliminar las quimeras, quedaron un total de 673.902 secuencias de alta calidad, las cuales se agruparon en 3.078 OTUs.

El filo bacteriano dominante en el promedio de todas las muestras analizadas fue *Proteobacteria*, que representaba el 59,53% de las secuencias identificadas, seguido de *Bacteroidetes* (23,7%) y *Firmicutes* (15,01%) (Figura 35).

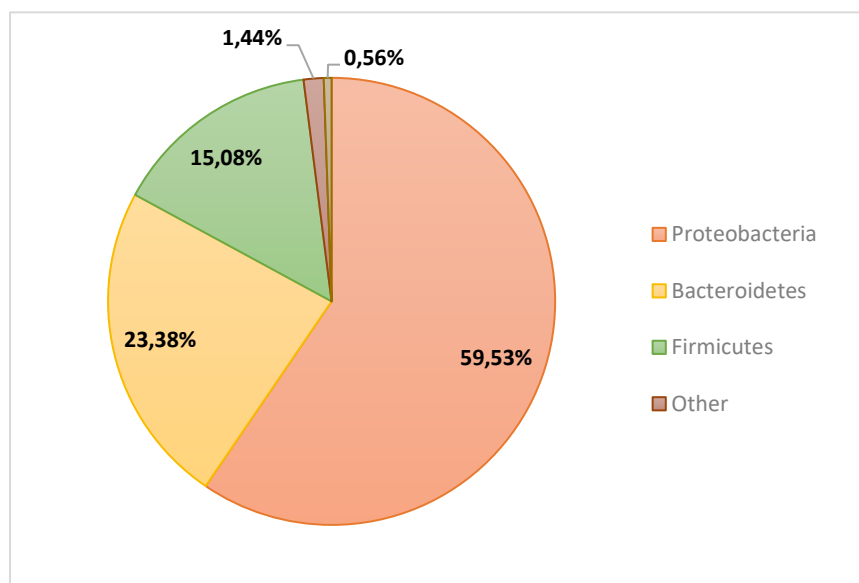


Figura 35: Distribución de los filis más abundantes del promedio de las muestras de aguas residuales (%).

La abundancia relativa de los filis taxonómicos en cada una de las muestras analizadas se representa en la figura 36. El filo *Proteobacteria* fue el más abundante en las muestras directas

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

M1TD, M3TD, M4TD, M5TD, M6TD, M7TD, M8TD y las muestras enriquecidas M7TE y M8TE. El filo *Bacteroidetes* (23,27%) fue el más abundante en las muestras M1TE, M2TD, M2TE, M3TE. El filo *Firmicutes* (15,01%) únicamente obtuvo la mayor abundancia en muestras enriquecidas M4TE, M5TE y M6TE.

El filo *Proteobacteria* (28,04%) fue el más abundante en las muestras directas M1TD, M4TD, M7TD, M8TD y en las muestras enriquecidas M7TE y M8TE.

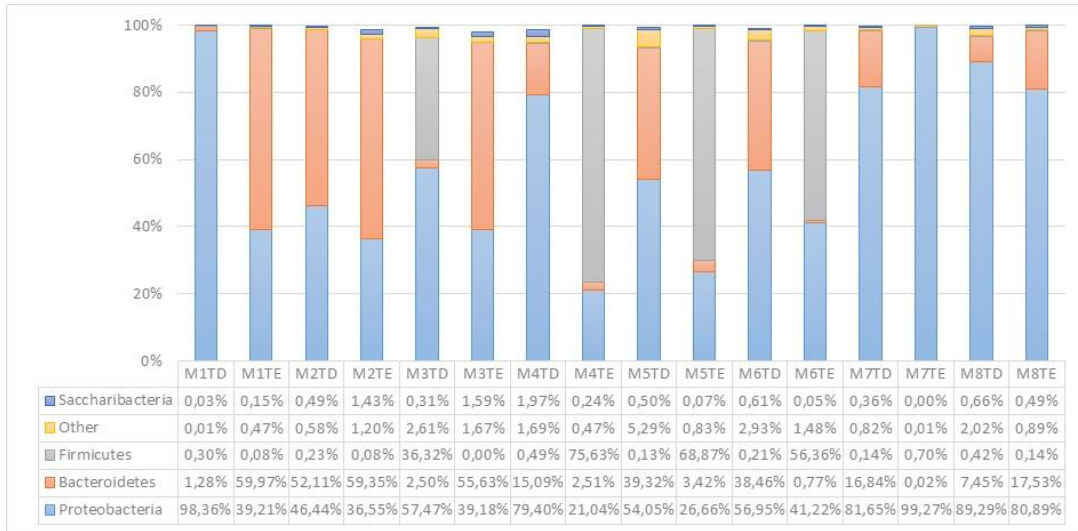


Figura 36: Distribución de filos presentes en las muestras de aguas residuales analizadas (%).

Las clases bacterianas más abundantes en el promedio de las muestras de aguas residuales fueron *Epsilonproteobacteria*, *Sphingobacterria*, *Betaproteobacteria*, *Bacilli*, *Grammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Clostridia*, las cuales representaron el 97,18% de la abundancia relativa en el promedio de las muestras (Figura 37).

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

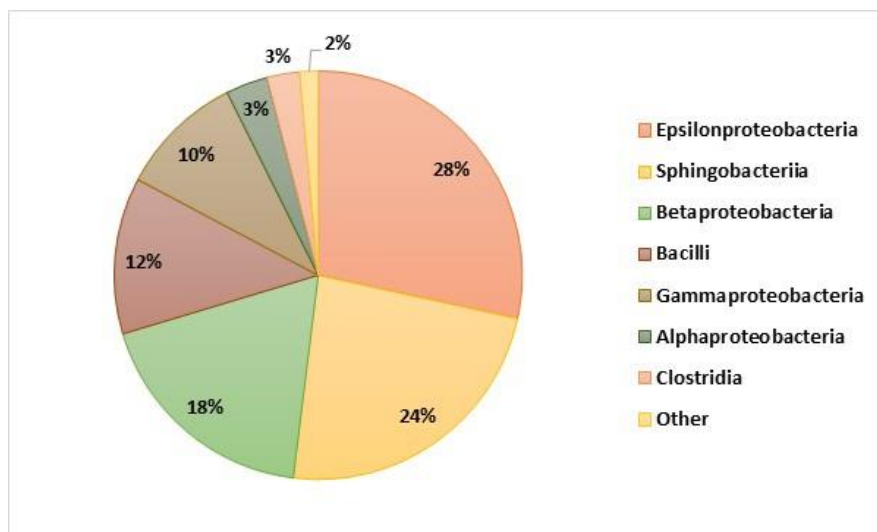


Figura 37: Distribución de las clases bacterianas más abundante del promedio de las muestras de aguas residuales.

La abundancia relativa de las clases bacterianas en cada una de las muestras analizadas se representa en la figura 38. La clase *Epsilonproteobacteria* fue la más abundante en 6 de las 16 muestras de aguas residuales analizadas (37,02%-97,09%). La segunda clase bacteriana más abundante fue *Sphingobacteria* (38,42%-59,99%), seguida de *Betaproteobacteria*, con un promedio de 18,2% y presente en todas las muestras analizadas. Bacilli fue la cuarta clase bacteriana más abundante en las muestras M4TE, M5TE y M6TE (50,31%-67,9%).

Todas las bacterias pertenecientes a Epsilonbacteraeota presentes en las muestras de aguas residuales analizadas se asignaron al orden *Campylobacterales*.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

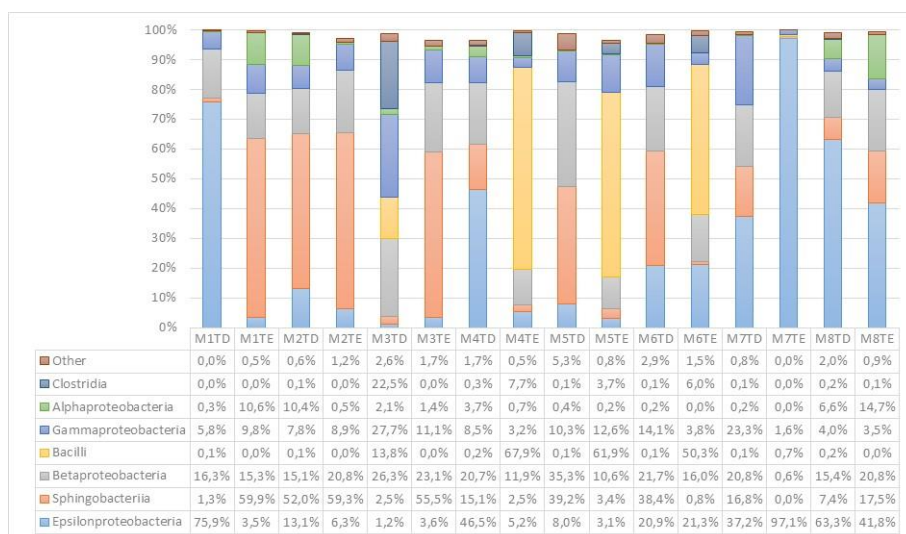


Figura 38: Distribución de las clases bacterianas más abundantes en las aguas residuales (%).

El análisis bioinformático permitió la asignación taxonómica hasta el nivel de género. Como era de esperar, los géneros bacterianos más abundante en el promedio de las muestras de aguas residuales fueron *Arcobacter*, *Helicobacter* y, además, *Enterococcus*, los cuales representaron el 58% de la abundancia relativa del promedio de las muestras estudiadas (Figura 39).

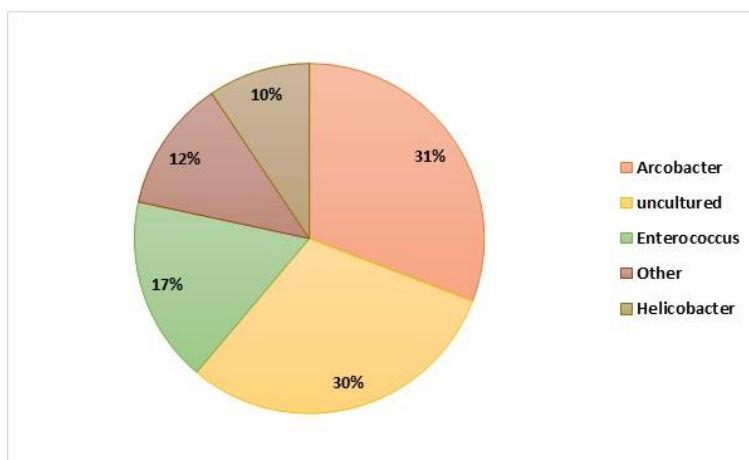


Figura 39: Distribución de los géneros bacterianos más abundantes del promedio de las muestras de aguas residuales (%).

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

El análisis taxonómico identificó como pertenecientes a *Helicobacter* las secuencias de 20 OTUs con más de un 97% de similitud. Sin embargo, para la identificación a nivel de especie, las secuencias de cada OTU se analizaron individualmente, alineándolas con las contenidas en la base de datos NCBI, mediante la herramienta on-line Blast (Tabla 15). Ocho OTUs se identificaron con la especie *H. hepaticus* con un 97% de similitud. Estas se reconocieron en todas las muestras de aguas residuales analizadas excepto en el muestreo M1. Las secuencias de 5 OTUs presentes en los muestreos M1, M2, M4, M5, M6 y M7, fueron identificadas como *H. pylori*.

Además, en las muestras M4TDE y M7TDE se detectaron dos OTUs identificadas como *H. pullorum*, con un porcentaje de similitud de secuencias del 98% y 99%, respectivamente. Un solo OTU se identificó como *H. suis*, en la muestra M5TD. El resto de OTUs recuperadas de los muestreos M1, M4, M5 y M6, solo pudieron identificarse a nivel de género, con un porcentaje de similitud del 98%.

Hay que destacar que los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que un paso previo de enriquecimiento favorecía la identificación de *H. hepaticus*, ya que 3 muestras directas negativas (M2TD, M3TD y M7TD), resultaron positivas después el enriquecimiento. Sin embargo, para la identificación de *H. pylori* con la técnica DAS, el paso previo de enriquecimiento resulto perjudicial, como se pudo observar en las muestras M6TE y M7TE.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Tabla 15: Número de secuencias del género *Helicobacter* identificadas en las aguas residuales. Especie asignada según la base de datos NCIB mediante la herramienta BLAST.

M1TD	M1TE	M2TD	M2TE	M3TD	M3TE	M4TD	M4TE	M5TD	M5TE	M6TD	M6TE	M7TD	M7TE	M8TD	M8TE	Cobertura*	Especie
0	0	0	893	0	145	103	414	129	95	73	36	0	11618	0	0	100%-99%	<i>H. hepaticus</i>
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94%-96%	<i>H. hepaticus</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	100%-99%	<i>H. hepaticus</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	100%-98%	<i>H. hepaticus</i>
0	0	0	2	0	0	1	1	7	5	0	0	0	29	0	0	100%-99%	<i>H. hepaticus</i>
0	0	0	24	0	0	4	0	0	4	0	0	0	293	0	0	94%-99%	<i>H. hepaticus</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	100%-97%	<i>H. hepaticus</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	100%-97%	<i>H. hepaticus</i>
0	0	0	14	0	0	0	27	0	0	0	0	0	98	0	0	100%-99%	<i>H. pullorum</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	51	3	0	100%-98%	<i>H. pullorum</i>
0	0	0	0	0	0	3	0	9	0	0	0	0	0	0	0	94%-99%	<i>H. pylori</i>
0	0	1	666	0	0	3	16	15	11	2	0	1	0	1	0	100%-99%	<i>H. pylori</i>
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100%-98%	<i>H. pylori</i>
0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%-99%	<i>H. pylori</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	100%-99%	<i>H. pylori</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	94%-99%	<i>H. suis</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	100%-98%	<i>Helicobacter</i> spp
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	100%-97%	<i>Helicobacter</i> spp
0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	100%-98%	<i>Helicobacter</i> spp
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	100%-96%	<i>Helicobacter</i> spp

3.4 DISCUSIÓN

La utilización de aguas regeneradas en ambientes urbanos, agrícolas, industriales, recreativos y ambientales es cada vez más frecuente, sobre todo en zonas donde la escasez de agua es evidente. En España, el régimen jurídico que regula la reutilización de aguas residuales es el Real Decreto 1620/2007, cuyo objetivo es garantizar una protección de la salud y del medioambiente, a la vez que se fomenta su desarrollo. En esta ley se contempla el uso de aguas residuales regeneradas para el riego de cultivos. Pero para ello es necesario que las depuradoras tengan un tratamiento de desinfección adecuado y eficaz, ya que, en caso contrario, esta puede convertirse en un potencial vehículo de transmisión de los patógenos presentes en la misma a través del riego.

La detección de patógenos en aguas se realiza mediante métodos convencionales, que tienen limitaciones significativas (Rousselon *et al.*, 2004). El control se basa en la identificación de microorganismos indicadores como *E. coli* y *Clostridium perfringens*, para evaluar de manera indirecta el número de patógenos en muestras de agua potable y aguas residuales (Ulrich *et al.*, 2005). Por lo tanto, dicho valor no refleja el número real de patógenos en el medio ambiente, y tampoco tiene en cuenta la variación en dosis infectante entre diferentes microorganismos. Por otra parte, no hay evidencias de que exista una correlación directa entre los indicadores bacterianos utilizados para determinar la calidad de las aguas con la presencia de otros patógenos humanos. Así, se ha demostrado la existencia de patógenos emergentes, más resistentes a los tratamientos de desinfección que los indicadores habituales (Besser *et al.*, 2018).

Este es el caso de *H. pylori*, más resistente al cloro que *E. coli* (Johnson *et al.*, 1997). Se ha demostrado la capacidad de supervivencia de *H. pylori* en hortalizas que han sido irrigadas durante largos periodos de tiempo con aguas contaminadas (Piqueres *et al.*, 2006) así como la presencia de especies del género *Helicobacter* como *H. pylori*, *H. nemestrinae*, *H. heilmanni*, *H. mustelae* y *H. canis*, en aguas subterráneas y municipales (Richards *et al.*, 2018). Para muchas de estas especies, aún se desconoce con exactitud el modo de transmisión.

En este estudio se ha confirmado la presencia de diferentes especies de *Helicobacter* en muestras de aguas residuales recolectadas tras el tratamiento biológico y de desinfección, mediante técnicas moleculares, incluyendo DAS, y cultivo.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

Respecto a su aislamiento por cultivo, a pesar de los intentos de mejora, no existe un medio de cultivo óptimo que permita el aislamiento exclusivo de *Helicobacter* de muestras clínicas y ambientales complejas como heces, alimentos y agua (Moreno *et al.*, 2017), ya que su cultivo se encuentra limitado por el rápido y excesivo crecimiento de microbiota acompañante. A pesar de ello, en el presente trabajo fue posible la detección de 4 colonias sospechosas de *Helicobacter* spp. y *H. pylori*, cuya identificación fue confirmada mediante amplificación y posterior secuenciación del amplicón obtenido. Se ha demostrado por tanto la presencia de *H. pylori* cultivable en aguas residuales tras el tratamiento de desinfección. Esto plantea algunas cuestiones acerca del riesgo real que supone el consumo de verduras regadas con este tipo de agua, ya que la cultivabilidad está intrínsecamente relacionada con la infectividad.

Los resultados de nuestro estudio muestran una vez más que la técnica de cultivo no es la idónea para la detección de *Helicobacter* spp. en muestras de aguas residuales. Como consecuencia de todo ello, y debido a la demanda de una detección precisa y rápida, resulta de gran utilidad el uso de técnicas moleculares para su detección.

Entre las técnicas moleculares, la hibridación *in situ* (FISH), permitió la visualización e identificación de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* en un alto porcentaje de las muestras. Su combinación con un paso previo de incubación en medio DVC permitió la diferenciación entre células viables y no viables. En el presente estudio se obtuvieron resultados negativos en 5 muestras procedentes del reactor biológico, es decir tras el tratamiento secundario. Dos muestras (M1 y M4), fueron positivas tras el tratamiento terciario. Este hecho podría deberse a la presencia masiva de microbiota acompañante en las muestras del tratamiento secundario, así como de un alto porcentaje de materia orgánica, que podrían enmascarar u ocultar la presencia de células fluorescentes de *Helicobacter* en el microscopio de epifluorescencia, o a que las muestras se contaminaron en el transcurso de su salida del reactor biológico y entrada al tratamiento de desinfección, debido al mal mantenimiento de las lámparas de UV (Nocker *et al.*, 2018). Lo cierto es que *H. pylori* puede persistir en los sistemas de distribución de aguas tratadas formando o adherida a biopelículas, que actúan como reservorio y fuente de contaminación para este microorganismo (García *et al.*, 2014).

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

En este estudio, la técnica FISH permitió la detección de *Helicobacter* spp. en 8 de las 10 muestras de aguas residuales de los efluentes del tratamiento de desinfección, identificando *H. pylori* en 7 de ellas. Indicando la presencia de otras especies viables, y por tanto potencialmente activas del género *Helicobacter*. Los resultados obtenidos apoyan que la técnica FISH es una herramienta útil y rápida para investigar la presencia y la epidemiología de *Helicobacter* spp. en muestras ambientales, facilitando el control de la seguridad y calidad de la reutilización de agua residuales para fines agrícolas.

Por otro lado, la técnica molecular qPCR permitió la detección de *H. pylori* en el 55% de las aguas residuales analizadas. Sin embargo, 4 muestras en las que la técnica FISH y NGS dieron resultados positivos para la presencia de *H. pylori* (M2TD, M2TE, M4TE, M6TD), fueron negativos mediante qPCR. Este hecho puede deberse a la presencia de compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales que actúan como inhibidores de la PCR, o bien a que las condiciones de la qPCR son más restrictivas (Li *et al.*, 2014). Además, en dos de las muestras analizadas (M1T y M4T), se obtuvieron resultados positivos mediante qPCR antes del paso previo de enriquecimiento, resultando negativo después del mismo como consecuencia, probablemente, del aumento de la microbiota competitiva (Schrader *et al.*, 2012). Por consiguiente, aunque la técnica qPCR se caracteriza por su especificidad y sensibilidad en muestras clínicas (Botes *et al.*, 2013; Clavel *et al.*, 2016), puede dar falsos negativos en matrices más complejas, como son las aguas residuales. No obstante, nuestros resultados confirman que el tratamiento de desinfección de las aguas residuales no elimina completamente a *H. pylori*.

Con respecto al estudio e identificación de *Helicobacter* spp. y *H. pylori*, su presencia se analizó también mediante secuenciación masiva dirigida. Se trata de un método independiente del cultivo que permite la identificación hasta el nivel de género, además de ser una técnica precisa que puede detectar bacterias poco representativas en entornos complejos (Cao *et al.*, 2017) y sugiere nuevas perspectivas para el diagnóstico cuantitativo, específico y sensible de bacterias patógenas (Pereira *et al.*, 2017).

En este trabajo, la técnica puesta a punto no pareció verse afectada por posibles sustancias inhibitorias presentes en la muestra ambiental, ya que los resultados mostraron la recuperación de

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

la misma cantidad de secuencias de *Helicobacter* en la muestra de agua residual inoculada como en la comunidad artificial de bacterias. Determinados autores sugieren la utilización de comunidades bacterianas simuladas cuando se utilizan técnicas DAS para el análisis de muestras ambientales, puesto que su incorporación puede ayudar directamente a los análisis posteriores a la secuenciación (Bokulich *et al.*, 2013; Brooks *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017). Además, puede usarse para comprobar la formación de quimeras, la tasa de error de secuenciación y la desviación en la representación de una comunidad de microorganismos (Schloss *et al.*, 2011).

En este trabajo, a pesar de que el “mock” se inoculó con la misma cantidad de DNA de cada cepa de referencia, la abundancia relativa de secuencias de *Helicobacter* detectadas fue mucho mayor que la de otras especies, lo que confirma la afinidad de los iniciadores por este género, ya que como mostro el análisis *in silico*, el apareamiento es del 100% con su región diana del 16SrRNA. Este hecho es aún más evidente en los resultados obtenidos de la muestra inoculada con el “mock”, en el que solo se recuperaron las secuencias de *Helicobacter*, lo que muestra de nuevo el sesgo importante del procedimiento de secuenciación con los iniciadores HS/HS2R usados, diseñados para favorecer la detección de *Helicobacter*. Pese a ello, estos iniciadores permitieron la recuperación de secuencias pertenecientes a otros géneros filogenéticamente cercanos pertenecientes al orden *Campylobacterales*, como *Arcobacter* y *Campylobacter*. Este suceso era de suponer, de acuerdo con los resultados obtenidos tras la evaluación *in silico* e *in vitro*, y teniendo en cuenta las condiciones de baja especificidad de la reacción de amplificación de la plataforma de secuenciación de Illumina. Debe considerarse también que cada célula del género *Helicobacter* tiene entre 1 y 2 copias del gen 16S rRNA, mientras que *Campylobacter* posee entre 1 y 3 copias de este mismo gen (Gantuya *et al.*, 2021), lo que también influye en la detección.

Asimismo, después del análisis de las muestras recolectadas tras el tratamiento de desinfección, tanto directas como tras enriquecimiento mediante la plataforma Illumina MiSeq, se observó que los iniciadores HSF/HS2R permitían la identificación de secuencias genómicas pertenecientes a otros filos diferentes a *Proteobacteria*. El filo más abundante en el promedio de las muestras de aguas residuales, como cabía esperar, fue *Proteobacteria*. Este hecho concuerda con investigaciones previas que han demostrado que este filo es el más abundante en las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (Wagner y Loy, 2002; Wang *et al.*, 2012; Qiao *et al.*,

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

2015). También concuerda con otros estudios en los que se analizaron muestras de aguas residuales mediante la técnica de pirosecuenciación y la plataforma de secuenciación Illumina (Ye y Zhang 2013; Kumaraswamy *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2018).

Todas las bacterias pertenecientes a la clase Epsilonproteobacteria se asignaron al orden *Campylobacterales*. La mayoría de las secuencias analizadas se clasificaron a nivel de género como *Arcobacter*, *Enterococcus* y *Helicobacter*, siendo este último el quinto género más abundante identificado en las muestras analizadas, lo que confirma una vez más la eficacia de los iniciadores seleccionados para detectar estos microorganismos.

H. pylori es el patógeno más conocido del género *Helicobacter*, existiendo numerosos estudios sobre su presencia y transmisión en aguas residuales (Bai *et al.*, 2016; Vesga *et al.*, 2018; Farhadkhani *et al.*, 2019). Sin embargo, en este análisis, la especie que más se identificó, fue *H. hepaticus* (6,16%), seguida de *H. pylori* (0,19%). Con este resultado se demuestra por primera vez la presencia de *H. hepaticus* en muestras ambientales. Actualmente no existe ninguna publicación sobre la coexistencia de ambos patógenos en ambientes acuáticos. Algunos trabajos sobre la patogenicidad de *H. hepaticus* han apoyado la hipótesis de que se trata de un patógeno humano asociado con enfermedades de hígado y del tracto biliar (Nilson *et al.*, 2000; Hamada *et al.*, 2009) y se ha propuesto que puede ser un factor de riesgo en la progresión de la enfermedad hepática a cirrosis y carcinoma hepatocelular (Pellicano *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2010). Falsafi *et al.* (2013), sugirieron como posible potencial vía de transmisión del patógeno los alimentos y aguas contaminadas.

Con respecto a *H. pullorum* y *H. suis*, estas especies se encontraron en una abundancia relativa más baja. *H. pullorum* se ha asociado con la enfermedad de Crohn y la colelitiasis (Fukuda *et al.*, 2002; Bohr *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Karagin *et al.*, 2010). *H. suis* es el responsable del 13,9%-78,5% de las infecciones humanas por *Helicobacter* no *H. pylori* (Groote *et al.*, 2005; Haesebrouck *et al.*, 2009). Los principales reservorios de ambas especies son los cerdos y las aves, respectivamente. Ménard y Smet (2019) sugirieron como principal vía de transmisión de ambos patógenos el contacto directo con animales rurales (Trebesius *et al.*, 2001; Groote *et al.*, 2005; Joosten *et al.*, 2013), planteando la posibilidad de su transmisión fecal-oral por agua contaminada.

Capítulo 3: Optimización de métodos moleculares para la cuantificación y detección de células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp. patógenos en aguas residuales.

No obstante, nuestros resultados son demasiado preliminares como para obtener conclusiones definitivas. Además, solo existe un estudio previo realizado por Fernández-Delgado *et al.* (2016), en el que detectaron la presencia de ambas especies de *Helicobacter* en agua dulce.

Un resultado destacable es que los muestreos M1 y M8, resultaron negativos para *H. pylori* mediante la técnica DAS (Tabla 14), pero resultaron positivos con otras técnicas moleculares como DVC-FISH.

Dado que uno de los principales objetivos de este capítulo era la optimización de técnicas moleculares para la detección de *Helicobacter* spp., se incorporó un proceso previo de enriquecimiento, ya que varios autores han propuesto el uso de este paso para aumentar la sensibilidad de detección mediante técnicas moleculares basadas en PCR (Ahmed *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos solo mostraron la efectividad de este procedimiento para la detección de *H. hepaticus* mediante la técnica DAS, mientras que para el resto de las técnicas moleculares utilizadas no hubo diferencias entre la muestra directa y enriquecida. Para establecer una conclusión contundente sobre la efectividad de un paso de enriquecimiento para la detección de un patógeno tan débil y poco abundante en muestras muy contaminadas con microbiota competitiva sería necesario un estudio mucho más amplio, puesto que el presente trabajo se ha realizado con un número limitado de muestras.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que informa sobre la presencia de *Helicobacter* spp. en muestras de aguas residuales, detectado por diferentes técnicas moleculares, incluida la metagenómica dirigida mediante amplificación específica del 16S rRNA. Los resultados demuestran la presencia de especies pertenecientes al género *Helicobacter*, como *H. pylori*, *H. hepaticus*, *H. pullorum* y *H. suis*, en muestras de aguas residuales, incluso después del tratamiento de desinfección. Se han detectado la presencia de células de *H. pylori* y, por primera vez, de *Helicobacter* spp. viables y por lo tanto potencialmente infectivas, mediante la técnica DVC-FISH, lo que sugiere el posible papel de las aguas residuales como vehículo de transmisión de especies de *Helicobacter* patógenas a los humanos a través del riego. La técnica de secuenciación de amplicones optimizada para el presente estudio demostró ser un método específico y sensible para la detección simultánea de especies de *Helicobacter* patógenas en muestras ambientales.

CAPÍTULO 4

Optimización de métodos moleculares para la detección y genotipificación de *H. pylori*.

4.1 OBJETIVO

El estudio de los marcadores de virulencia y de resistencia de *H. pylori* constituye una herramienta esencial para la identificación y caracterización epidemiológica de *H. pylori* en diferentes muestras, así como para predecir el pronóstico de la infección en los pacientes.

Entre los principales factores de virulencia de *H. pylori* se encuentran aquellos que intervienen en la capacidad del microorganismo para colonizar la mucosa gástrica y adaptarse al medio ácido, como su motilidad, las actividades ureasa y catalasa y su habilidad de adhesión a las células epiteliales gástricas. También se han identificado marcadores de patogenicidad de *H. pylori* que se encuentran relacionados de manera directa con la enfermedad que produce en el hospedador, siendo las más estudiadas la citotoxina vacuolizante *VacA* y la citotoxina *cagA*.

Por último, es muy importante conocer la posible resistencia de las cepas de *H. pylori* a los antibióticos de uso común. En este sentido, la resistencia a la amoxicilina y el metronidazol, son de especial interés, ya que ambos son fármacos de primera línea para el tratamiento de la infección por este microorganismo.

De este modo y considerando que los aspectos epidemiológicos del microorganismo son poco claros en muestras de aguas, los objetivos de este trabajo fueron:

- OPTIMIZAR UN PROTOCOLO DE PCR PARA DETECTAR MARCADORES DE VIRULENCIA DE *H. pylori*
- OPTIMIZAR UN PROTOCOLO DE PCR PARA DETECTAR MARCADORES DE RESISTENCIA FRENTE AL METRONIDAZOL Y AMOXICILINA EN MUESTRAS AMBIENTALES.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para este estudio se utilizaron un total de 17 cepas de referencia (Tabla 16). Se incluyeron cepas pertenecientes al género *Helicobacter* que se encuentran presentes de forma habitual en muestras clínicas y ambientales, procedentes de Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM). También se utilizaron cepas aisladas de biopsia de la mucosa gástrica de pacientes infectados, pertenecientes a nuestra colección (UPV). Por último, se incorporaron especies afines pertenecientes al género *Arcobacter* procedentes de la National Collection of Type Cultures, Reino Unido (NCTC) como controles negativos.

Tabla 16: Cepas utilizadas en el estudio.

MICROORGANISMO	ORIGEN	CEPA
<i>Helicobacter pylori</i>	DSM	10242
<i>Helicobacter hepaticus</i>	DSM	22909
<i>Helicobacter fennelliae</i>	DSM	7491
<i>Helicobacter cinaedi</i>	DSM	5359
<i>Helicobacter suis</i>	DSM	19735
<i>Helicobacter pylori</i>	UPV	B6
<i>Helicobacter pylori</i>	UPV	B11
<i>Helicobacter pylori</i>	UPV	B662a
<i>Helicobacter pylori</i>	UPV	B665a
<i>Helicobacter pylori</i>	UPV	B5132
<i>Helicobacter pylori</i>	UPV	B6690
<i>Helicobacter pylori</i>	UPV	B61120
<i>Helicobacter pylori</i>	UPV	B61190
<i>Arcobacter butzleri</i>	NCTC	12481
<i>Arcobacter skirrowii</i>	NCTC	12713
<i>Arcobacter cryarophilus</i>	NCTC	11885
<i>Arcobacter cibarius</i>		Aislamiento ambiental

Todas las cepas pertenecientes al género *Helicobacter* fueron sembradas en Agar Sangre Piruvato (ASP, Capítulo 1), excepto *H. suis*, que se cultivó en caldo Brucella con 7% de suero fetal bovino. Todas ellas se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂). Las cepas de *Arcobacter* fueron sembradas en medio de agar sangre e incubadas durante 48 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis.

4.2.2 EXTRACCIÓN DEL DNA

Después de 48 horas de incubación, se recogió el contenido de las placas o tubos y se resuspendió en 1 mL de PBS 1X. Se extrajo el DNA de cada cepa de referencia con el kit de extracción GeneJET™ Genomic DNA Purification kit (ThermoScientific, Alemania) siguiendo el protocolo para bacterias Gram negativas. De acuerdo con las indicaciones del fabricante, se eluyó el DNA en un volumen de 50 µL y se conservó a -20 °C hasta su análisis mediante PCR.

4.2.3 OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *H. pylori*

Para la genotipificación de *H. pylori* se usaron los iniciadores descritos por Zhang *et al.* (2016), que detectan un conjunto de genes facultativos, de virulencia y resistencia a antibióticos de *H. pylori*.

Los iniciadores utilizados en este trabajo incluyeron 3 pares que detectaban genotipos asociados a la virulencia (*vacA s1*, *vacA m1*, *cagA*) y dos para la detección de genes de resistencia, *rdxA* y *pbp1A* (Tabla 17).

Tabla 17: Secuencias de los iniciadores para la amplificación de los genes de virulencia y resistencia de *H. pylori*.

Iniciador	SNP	Secuencia de los iniciados	Tamaño del producto de amplificación
Genes de virulencia	<i>cagA</i>	F: 5'-GATCGTTTTGATGGGACACC-3' R: 5'-CAAAAATCCTACCAAAAAGAATCAGT-3'	600 pb
	<i>vacA (s1)</i>	F: 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3' R: 5'-ATGGAAATACAACAAACACACC-3'	s1: 259 pb
	<i>vacA (m1)</i>	F: 5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3' R: 5'-GCGTCTAATAATTCCAAGG-3'	m1: 570 pb
Genes de resistencia	<i>pbp1A</i>	F: 5'-TTTGGGACATCAAACCTTCCTT-3' R (1): 5'-CGACYATTRGCAAAGGAGCAA-3' R (2): 5'-TAACACGACYATTRGCAAAGGAGCTC-3'	R (1): 154 pb R (2): 159 pb
		F: 5'-CACTCTAACYTATAAGACTCYGGRTA-3' R (1): 5'-CGCCAAGCTCTTACAACACCC-3' R (2): 5'-ACTATCGCCAAGCTCTTACAACACTT-3'	R (1): 253 pb R (2): 2598 pb

La especificidad de los iniciadores se comprobó *in silico*, usando la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y mediante la amplificación de las cepas de referencia detalladas en la tabla 16.

4.2.3.1 Condiciones de amplificación

Para la optimización de la reacción de PCR con los iniciadores *cagAR/cagAF*, se evaluó un rango de temperatura entre 60 °C y 62 °C (Tabla 18).

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL, conteniendo: 2,5 µL de Tampón 10X; 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,5 µL de DNTPs (10 mM); 5U de Taq DNA polimerasa; 0,5 µL de cada iniciador a 25mM y 1 µL de DNA de las cepas.

Tabla 18: Condiciones de la PCR para la amplificación del gen *cagA* de *H. pylori*.

Fase	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:m:s)
Desnaturalización inicial	1	95	0:05:00
Desnaturalización		94	0:01:00
Unión de iniciadores	40	60-62	0:01:00
Extensión del producto		72	0:01:00
Extensión final	1	72	0:05:00
Enfriamiento	1	4	Continuo

Para la optimización de la reacción de PCR con los iniciadores vacAmR/vacAmF y vacAsR/vacAsF se evaluó un rango de temperatura entre 59 °C y 62 °C (Tabla 19).

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL, con 2,5 µL de Tampón 10X; 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 5U de Taq DNA polimerasa; 1,25 µL de cada iniciador a 25mM y 1 µL de DNA de las cepas de referencia.

Tabla 19: Condiciones de amplificación de PCR para el gen *vacA* de *H. pylori*.

Fase	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:m:s)
Desnaturalización inicial	1	95	0:05:00
Desnaturalización		94	0:01:00
Unión de iniciadores	35	59-62	0:01:00
Extensión del producto		72	0:01:00
Extensión final	1	72	0:05:00
Enfriamiento	1	4	Continuo

Para la optimización de la reacción de PCR con los iniciadores para la amplificación del gen de resistencia *pbp1A* se analizó un rango de temperatura entre 57 °C y 62 °C.

Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final 25 µL, que contenía 5 µL de tampón 10X; 0,4 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 1 µL de cada iniciador a 10 mM; 5 U de Taq polimerasa y 1 µL de DNA (Tabla 20).

Tabla 20: Condiciones de la PCR para la amplificación del gen de resistencia *pbp1A* de *H. pylori*.

Fase	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:m:s)
Desnaturalización inicial	1	95	0:05:00
Desnaturalización		94	0:01:00
Unión de iniciadores	35	57-62	0:01:00
Extensión del producto		72	0:01:00
Extensión final	1	72	0:05:00
Enfriamiento	1	4	Continuo

Para establecer las condiciones específicas de PCR para la detección del gen de resistencia *rdxA* de *H. pylori* se ensayó un rango de temperatura comprendido entre 56 °C -62 °C.

Los ensayos de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ L, compuesto por 5 μ L de Tampón 10X; 0,4 μ L de $MgCl_2$ (50 mM); 0,5 μ L de dNTPs (10 mM); 1 μ L de cada uno de los iniciadores a 10 mM; 5 U del enzima Taq polimerasa y 1 μ L de DNA (Tabla 21).

Tabla 21: Condiciones de amplificación para el gen de resistencia *rdxA* de *H. pylori*.

Fase	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:m:s)
Desnaturalización inicial	1	95	0:05:00
Desnaturalización		94	0:01:00
Unión de iniciadores	40	56-62	0:01:00
Extensión del producto		72	0:01:00
Extensión final	1	72	0:05:00
Enfriamiento	1	4	Continuo

En cada uno de los ensayos se incluyó un control negativo, donde el DNA se sustituyó por agua ultrapura.

Tras todas las reacciones, se recogió un volumen de 10 μ L del producto, que se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X a 90 V durante 90 minutos. El gel fue teñido con 0,01% GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EE. UU). Se incluyó un marcador de pesos moleculares (M100-1000, Blirt, Polonia), para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA amplificado. Finalmente, los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

4.2.4 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE *H. pylori* EN MUESTRAS AMBIENTALES

Una vez determinadas las condiciones óptimas de la reacción de PCR para la detección de los distintos marcadores de virulencia y resistencia (Apartado 4.2.3) se procedió a su detección en muestras ambientales.

Se analizaron un total de 37 muestras ambientales: 11 aguas residuales, 2 aguas potables, 2 aguas de riego y 23 de biopelículas. Todas las muestras habían sido previamente procesadas y analizadas, resultando positivas para la detección de *H. pylori* mediante cultivo o técnicas moleculares (Capítulos 3 y 6).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE *H. pylori*

Tras varios análisis, las condiciones óptimas de la reacción de amplificación para cada uno de los iniciadores utilizados fueron las que se recogen en la tabla 22:

Tabla 22: Condiciones óptimas de la reacción de PCR para amplificación de los genes *cagA*, *vacA* (formas alélicas *s1* y *m1*), *pbp1A* y *rdxA* de *H. pylori*.

Gen	Fase	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:m:s)
<i>cagA</i>	Desnaturalización inicial	1	95	0:05:00
	Desnaturalización		94	0:01:00
	Unión de iniciadores	40	62	0:01:00
	Extensión del producto		72	0:01:00
	Extensión final	1	72	0:05:00
	Enfriamiento	1	4	Continuo
<i>vacA (s1)</i> <i>vacA (m1)</i>	Desnaturalización inicial	1	95	0:05:00
	Desnaturalización		94	0:01:00
	Unión de iniciadores	35	59	0:01:00
	Extensión del producto		72	0:01:00
	Extensión final	1	72	0:05:00
<i>pbp1A</i>	Desnaturalización inicial	1	95	0:05:00
	Desnaturalización		94	0:01:00
	Unión de iniciadores	35	57	0:01:00
	Extensión del producto		72	0:01:00
	Extensión final	1	72	0:05:00
	Enfriamiento	1	4	Continuo
<i>rdxA</i>	Desnaturalización inicial	1	95	0:05:00
	Desnaturalización		94	0:01:00
	Unión de iniciadores	35	57	0:01:00
	Extensión del producto		72	0:01:00
	Extensión final	1	72	0:05:00
	Enfriamiento	1	4	Continuo

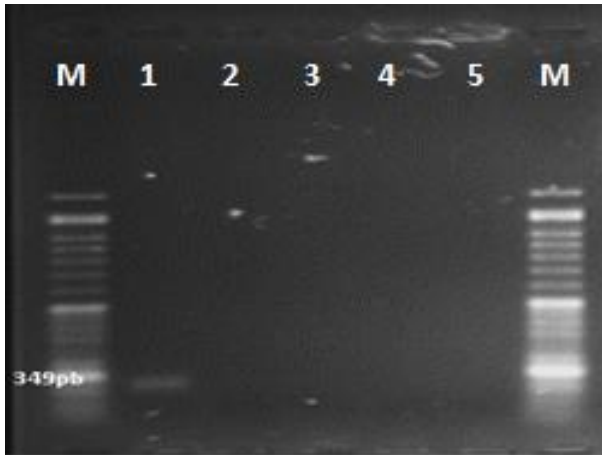


Figura 41: Temperatura de 57 °C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen *vacA* (forma alélica s1/s2) de *H. pylori*. M: marcador 100 pb; 1: *H. pylori* 10242; 2: *A. cryaerophilus* 11885; 3: *A. skirrowii* 12713; 4: *A. butzleri* 12481; 5: Control -.

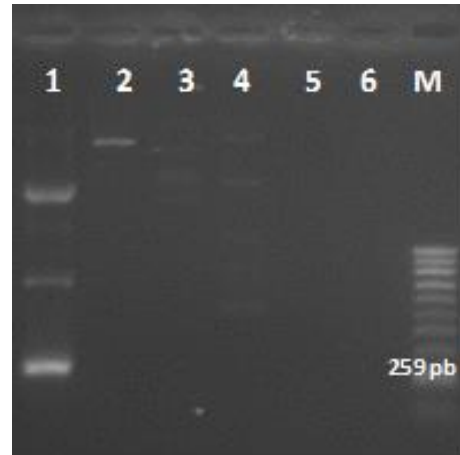


Figura 40: Temperatura de 62°C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen *cagA* de *H. pylori*. M: marcador 100 pb; 1: *H. pylori* 10242; 2: *A. cryaerophilus* 11885; 3: *A. skirrowii* 12713; 4: *A. butzleri* 12481; 5: Control -.

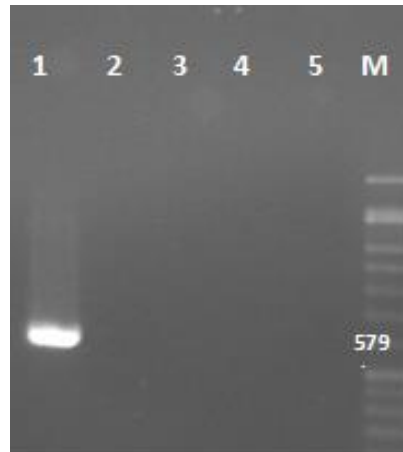


Figura 42: Temperatura de 57°C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen *vacA* (forma alélica m1/m2) de *H. pylori*. 1: *H. pylori* 10242; 2: *A. cryaerophilus* 11885; 3: *A. skirrowii* 12713; 4: *A. butzleri* 12481; 5: Control -; M: marcador 100 pb.

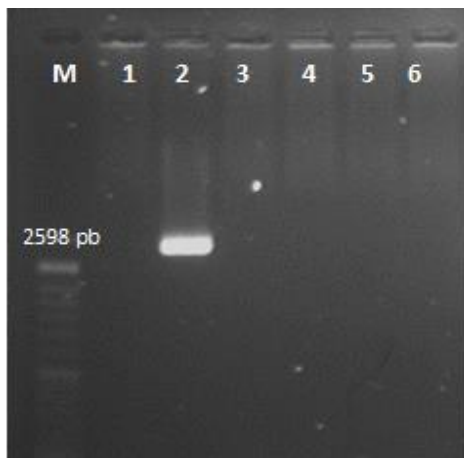


Figura 44: Temperatura de 57 °C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen *rdxA* de *H. pylori*. M: marcador 100 pb. 1: *H. hepaticus* 22904; 2: *H. pylori* 10242; 3: *H. fennelliae* 749; 4: *A. butzleri* 12481; 5: *A. skirrowii* 12713; 6: Control -.

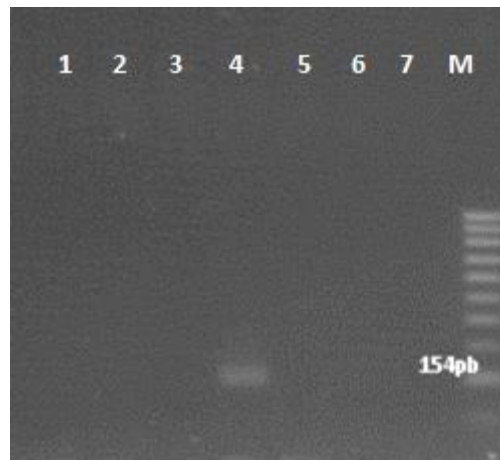


Figura 43: Temperatura de 57 °C de unión de los iniciadores para la amplificación por PCR del gen *pbp1A* de *H. pylori*. 1: *H. hepaticus* 22904; 2: *H. fennelliae* 749; 3: *H. suis* 19735; 4: *H. pylori* 10242 5: *A. butzleri* 12481; 6: *A. skirrowii* 12713; 7: Control -. M: marcador 100 pb

4.3.2 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE *H. pylori* EN MUESTRAS AMBIENTALES

Para las 11 muestras de aguas residuales, 2 de agua potable y 2 de agua de riego los resultados mostraron 5 muestras de aguas residuales y una de agua potable positivas para el gen *cagA*; 4 muestras de aguas residuales fueron positivas para *vacAs1*; con respecto a la forma alélica *vacAm1*, resultaron positivas una muestra de agua potable y 2 de agua de riego.

Todas las muestras de aguas analizadas resultaron negativas para la detección e identificación de los genes de resistencia *pbp1A* y *rdxA*.

Tabla 23: Resultados de los análisis para la detección de *H. pylori* en agua residual, potable y de riego.

Muestra	qPCR	FISH	DVC-FIHS	DAS	Genotipo
M1TD	+		+	-	<i>vacAs1</i>
M2SE	+	+			<i>cagA</i>
M3SD	+	+			
M3SE	+		+		<i>vacAs1</i>
M4TD	+		+	+	<i>vacAs1</i>
M5SE	+	+			<i>cagA</i>
M5TD	+	+		+	<i>cagA</i>
M5TE	+		+	+	<i>cagA</i>
M7SE	+	+			
M7TD	+		+	+	
M7TE	+	+			<i>cagA/vacAs1</i>
1APE	+				<i>cagA</i>
1ACD	+				<i>vacAm1</i>
4ACD	+				<i>vacAm1</i>
4ACE	+				<i>vacAm1</i>

Respecto a las muestras de biopelículas, se analizaron las que previamente habían resultado positivas para la detección de *H. pylori* mediante qPCR. Los genes de virulencia *cagA* y *vacA* (en su forma alélica *s1* y *m1*) se analizaron en las muestras B5, B13, B17, B24, B25, B31, B32, B33, de las cuales únicamente resultaron positivas las muestras B17 y B24 para la detección del gen *vacAm1*.

La presencia de los genes de resistencia *pbp1A* y *rdxA* de *H. pylori* se analizó en las muestras B31, B32, B33, B34, B36, B37, B38, B39, B40, B41, B42, B43, B44, B47 y B50. Solo dos muestras, B39 y B43, resultaron positivas para el gen de resistencia *pbp1A*.

4.4 DISCUSIÓN

Helicobacter pylori es un patógeno de gran variabilidad genética. Esta característica dota al patógeno de capacidad para colonizar, evadir y modular la respuesta inmune del hospedador, alterar la expresión de ciertos genes en las células del epitelio, sobrevivir y adaptarse al medio gástrico (Isaeva y Valieva, 2018; Whitmire y Merrell, 2019). Además, existen factores de virulencia que favorecen el desarrollo de complicaciones graves en infecciones por *H. pylori* (Duquesne *et al.*, 2018). Asimismo, la creciente resistencia frente a los fármacos influye en la eficiencia del tratamiento de erradicación, y hace cada vez más necesario un análisis de resistencia a los antibióticos antes de establecer un tratamiento adecuado (Savoldi *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019).

Convencionalmente, los estudios de determinación e identificación de factores de virulencia y resistencia de *H. pylori* se realizan en muestras clínicas como biopsia gástrica, heces y saliva (Wongphutorn *et al.*, 2018). Sin embargo, el agua puede ser un vehículo para la transmisión de *H. pylori*. Por este motivo, es de gran interés epidemiológico analizar la virulencia, y la resistencia de las cepas de *H. pylori* presentes en muestras ambientales.

En este trabajo se ha analizado la presencia de genes específicos de virulencia y resistencia a antibióticos de *H. pylori* en muestras de agua residual destinada a riego, agua potable y biopelículas que habían resultado previamente positivas para la presencia de este microorganismo.

Aunque todas las células de *H. pylori* contienen el gen *vacA*, su mayor o menor virulencia depende de la combinación de regiones variables de este gen (Yamaoka y Graham, 2014; Sgoyras *et al.*, 2015), especialmente de las variaciones en la región señal (*s1* y *s2*) y la región media (*m1* y *m2*). La infección con cepas de *H. pylori* *s1* o *m1* causa mayor daño celular en comparación con las personas infectadas con *s2* o *m2* (Hemmatinezhad *et al.*, 2016). En este estudio, el genotipado de *H. pylori* en las muestras de agua mostró la presencia de los perfiles *vacAs1* (26,7%) y *vacAm1* (20%), asociados con un riesgo 3,5 veces mayor de desarrollar cáncer. Asimismo, se detectó el gen *cagA* en el 40% de las muestras de agua analizadas. Este gen codifica la proteína CagA y se encuentra asociada con un mayor riesgo de producir úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer (Keilberg y Otterman, 2016). Los resultados concuerdan con el estudio realizado por Yingzhi *et al.* (2002), quienes demostraron la alta prevalencia *vacAs1/m1* en muestras de aguas residuales. Y más

recientemente, con el trabajo desarrollado por Ranjbar *et al.* (2016) en muestras de agua embotellada procedente de Irán.

Actualmente, la eficacia de la triple terapia convencional para el tratamiento de la infección por *H. pylori* ha disminuido debido al aumento de la resistencia a los antibióticos. El desarrollo de la resistencia a la claritromicina o al metronidazol ha reducido significativamente la tasa de éxito de la terapia, que oscila entre 77,0%-81,1% (Yeo *et al.*, 2018; Hashemi *et al.*, 2019). Respecto a la amoxicilina, se ha demostrado que la prevalencia de la resistencia a la amoxicilina es baja (1,0%-4,8%) en comparación con la claritromicina (15,2%-35,6%), metronidazol (20,0%-69,5%) u otros antibióticos de la clase fluoroquinolonas (11,6%-24,1%) (Choi *et al.*, 2019; Bang *et al.*, 2020; Kim y Chung, 2020). La resistencia al metronidazol y amoxicilina desencadenan el fracaso del tratamiento de las principales terapias de primera línea, ya que todas incluyen al menos uno de estos fármacos (Kwon *et al.*, 2017; Pih *et al.*, 2021).

Para establecer la prevalencia de estas resistencias en un área geográfica determinada, así como para determinar el perfil de resistencias de una cepa concreta, es necesario el aislamiento por cultivo del microorganismo, para realizar un antibiograma. Sin embargo, el cultivo tiene bajas tasas de éxito, como ya se ha comentado, por lo que los estudios se realizan únicamente sobre aquellas cepas que han podido cultivarse, sesgando los resultados. En el caso de las muestras ambientales, el cultivo es aún más ineficaz, disminuyendo enormemente la posibilidad de disponer de resultados fiables sobre la frecuencia de cepas especialmente virulentas o resistentes a los antibióticos, y, por tanto, las conclusiones epidemiológicas. Esto confiere gran interés a la optimización de técnicas moleculares para la detección de factores de virulencia o resistencias a los antibióticos de cepas en muestras ambientales (Tongtawee *et al.*, 2016; Rizvanoz *et al.*, 2019).

Por todo lo expuesto, en este trabajo se planteó como objetivo la optimización de una reacción de PCR para la detección de los genes de resistencia a antibióticos más comunes, amoxicilina (*pbp1A*) y metronidazol (*rdxA*). Los resultados mostraron la presencia del gen *pbp1A* en el 13,34% de las muestras de biopelículas. Sin embargo, las muestras resultaron negativas para el gen *rdxA*. Hasta el momento, son pocos los estudios realizados *in vitro* sobre la detección de la sensibilidad a los antibióticos en biopelículas de *H. pylori* (Yonezawa *et al.*, 2015) y sin embargo su evaluación podría desempeñar un papel muy importante en la prevención y el control de la infección

por *H. pylori*. Se ha demostrado que las bacterias formadoras de biopelículas tienen una tasa de mutación 100 veces mayor que las células planctónicas, resultando en un rápido desarrollo de mutaciones resistentes a los antibióticos. Además, la proximidad entre los microorganismos dentro de las biopelículas y la abundancia de DNA exógeno facilitan la transferencia horizontal, la adquisición y propagación de genes de resistencia, lo que le confiere al patógeno la capacidad de formar subpoblaciones con una mayor resistencia a los antibióticos y de eDNA (Loera, 2012; Penesyan *et al.*, 2015).

El número de estudios realizados hasta el momento sobre el genotipado de *H. pylori* aislado de muestras de agua y biopelículas es significativamente bajo. Cabe destacar el trabajo realizado por Ranjbar *et al.* (2016), quienes estudiaron los genotipos *vacA*, *cagA*, *cagE*, *oipA*, *iceA* y *babA2* y la resistencia frente a antibióticos de cepas de *H. pylori* aislados de muestras de agua. Linke *et al.* (2010) desarrollaron una metodología de qPCR utilizando como gen diana la subunidad *ureA* para la detección de *H. pylori* en biopelículas de agua potable. Yingzhi *et al.* (2002) demostraron en muestras de aguas residuales la presencia de los genotipos *vacAs1a*, *vacAm1a* y *vacAm1a* en 11 de 23 aislados de *H. pylori* identificados mediante PCR específica del 16S rRNA.

En este estudio, el bajo porcentaje de detección podría deberse a la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras de aguas ambientales (Abdolkazem *et al.*, 2015), a la sensibilidad del método o la baja concentración del patógeno. Además, el número de muestras analizadas en este trabajo fue limitado, ya que se trataba de un estudio preliminar, por lo que para establecer conclusiones fundamentadas sería necesario confirmarlo con estudios más amplios.

Los resultados obtenidos demuestran la presencia, y por tanto potencial riesgo de transmisión al ser humano a través del agua, de cepas de *H. pylori* resistentes al tratamiento antibiótico habitual y/o de especial virulencia.

CAPÍTULO 5

Detección de *Helicobacter pylori* en muestras clínicas mediante técnicas de cultivo y moleculares.

5.1 OBJETIVO

Helicobacter pylori puede detectarse en muestras clínicas mediante métodos invasivos y no invasivos. No obstante, muchas de estas técnicas no permiten evaluar la existencia de una infección activa, y en prácticamente ninguna de ellas se consigue aislar la bacteria, impidiendo la realización de pruebas de resistencia frente antibióticos o ensayos de caracterización genética.

La detección de *H. pylori* en heces mediante cultivo podría ser una técnica idónea para su diagnóstico, ya que no es un método invasivo y permite recuperar la bacteria, demostrando sin lugar a duda la existencia de una infección activa potencialmente transmisible y posibilitando la caracterización del microorganismo. Sin embargo, las heces son muestras complejas, ricas en microbiota interferente, sales biliares y enzimas degradativas, lo que puede obstaculizar el crecimiento de microorganismos fastidiosos como *H. pylori*. También puede ser que la bacteria se encuentre en estado viable pero no cultivable (VBNC), por las condiciones ambientales estresantes durante su recorrido por el tracto gastrointestinal.

Debido a las desventajas que ofrece el cultivo, los métodos moleculares, como la PCR o la hibridación *in situ* (FISH), se consideran una alternativa para la detección de *H. pylori*, especialmente si se combinan con técnicas que determinen su viabilidad.

Por tanto, el objetivo general del presente capítulo es:

- DETERMINAR LA PRESENCIA DE *H. pylori* EN MUESTRAS DE HECES A PARTIR DE TÉCNICAS MOLECULARES COMBINADAS CON LA DETECCIÓN CLÁSICA POR CULTIVO.

Para ello, se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

- Detectar, mediante la técnica qPCR, *H. pylori* en heces de posibles pacientes infectados.
- Detectar, mediante la técnica molecular DVC-FISH, células viables de *H. pylori* en heces procedentes de posibles pacientes infectados.
- Detectar, mediante la técnica de cultivo, células cultivables de *H. pylori* en heces procedentes de posibles pacientes infectados.

- Identificar mediante secuenciación masiva dirigida (DAS) la presencia de *Helicobacter* spp. en muestras de heces de posibles pacientes infectados.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Se analizaron un total de 45 muestras de heces, recogidas durante el periodo 2016-2018 por el servicio de gastroenterología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, procedentes de pacientes menores de edad con sintomatología compatible con infección por *H. pylori* y sin tratamiento antibiótico previo que pudiera impedir el crecimiento de la bacteria.

En el hospital se recogieron los consentimientos informados y se realizaron los análisis de las heces mediante la prueba HpSA a los pacientes.

5.2.2 PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de heces fueron recolectadas en botes estériles y se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta su análisis. El intervalo de tiempo transcurrido desde la recogida hasta su estudio no fue superior a 24 horas.

Para determinar la presencia de *H. pylori*, las muestras de heces fueron analizadas directamente e introduciendo un paso previo de enriquecimiento. Se analizaron un total de 90 muestras de heces: 45 directas y 45 enriquecidas.

En todos los casos, se atemperaron y homogeneizaron 2 gramos de muestras fecales en 20 mL de PBS 1X estéril (Anexo B.2). Se tomaron 100 µL para la identificación de *H. pylori* mediante técnicas de cultivo, 400 µL se depositaron en una membrana estéril sobre las placas de cultivo (Apartado 3.2.3) y 1 mL se procesó para su análisis mediante las técnicas moleculares qPCR, DVC-FISH y DAS. Estas muestras se denominaron “D”, refiriéndose al tratamiento directo de las mismas.

Al mismo tiempo se transfirieron 10 mL de muestra a 20 mL de caldo Dent (Anexo A.1) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones de microaerofilia. Tras el periodo de incubación, se realizó el análisis por qPCR y FISH. Para cultivo, se tomaron 100 µL de caldo de enriquecimiento y se procesaron por siembra con membrana en placas de Agar Dent (AD, Capítulo 1). Las muestras se nombraron “E”, por su enriquecimiento.

El esquema del proceso para la detección de *H. pylori* en heces se encuentra detallado en la figura 45:

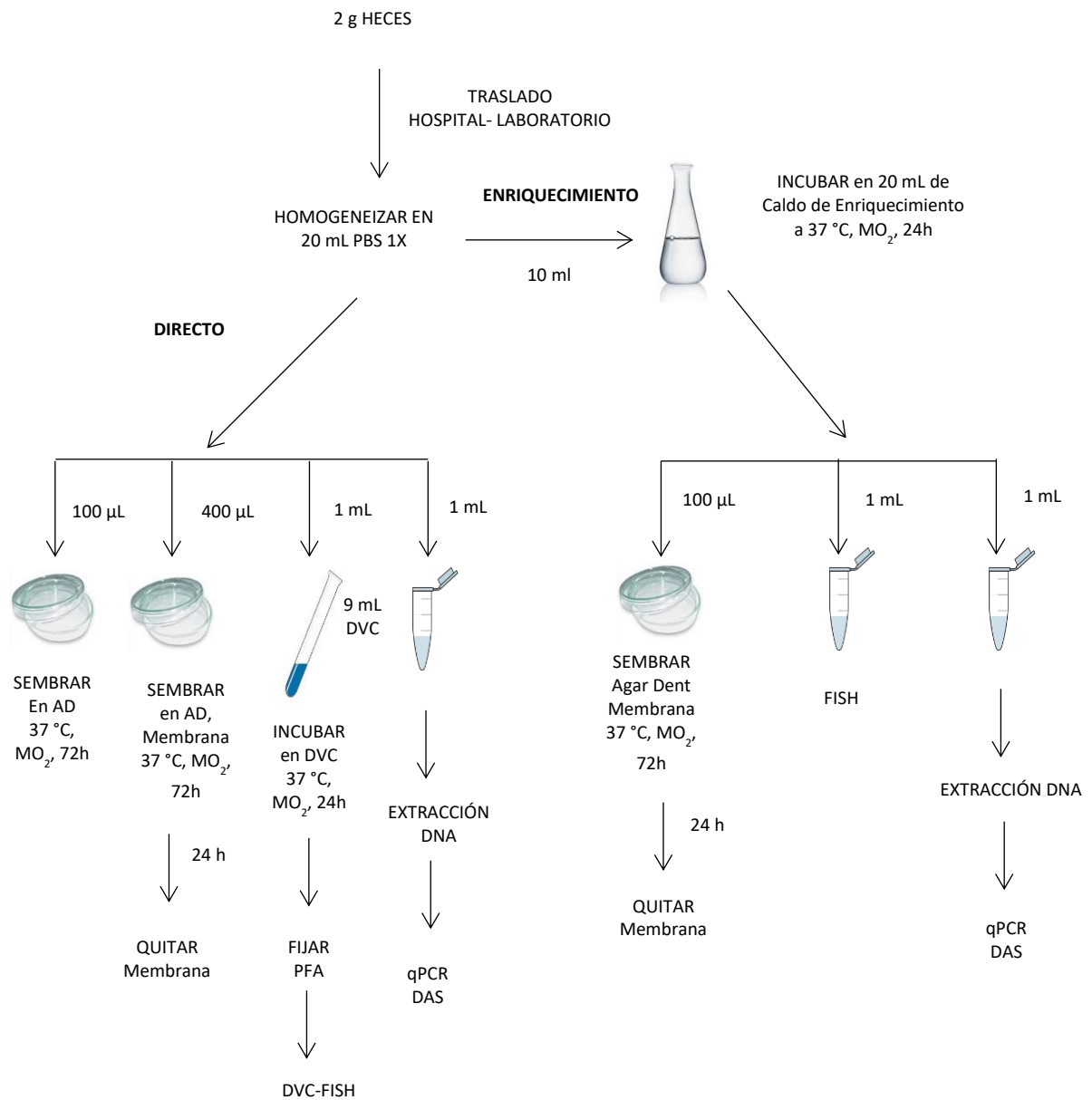


Figura 46: Protocolo de detección de *H. pylori* en heces mediante técnicas moleculares y cultivo.

5.2.3 CULTIVO DE *H. pylori*

Para el aislamiento de *H. pylori* a partir de muestras de heces directas y enriquecidas se utilizó el medio de cultivo Agar Dent (AD, Capítulo 1), sembrando 100 µL sobre las placas, e incubando a 37 °C durante 24 horas en condiciones de microaerofilia. Paralelamente, se depositaron 400 µL de muestra sobre una membrana de 0,65 µm (Whatman, Maidstone, Inglaterra) sobre el medio de cultivo y se dejaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en condiciones de aerobiosis para garantizar su absorción. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Después de 24 horas de incubación, las membranas se retiraron y las placas se incubaron de nuevo bajo las mismas condiciones durante 48-72 horas.

5.2.4 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE qPCR

5.2.4.1 Extracción de DNA

Se recogió una alícuota de 1 mL de cada muestra, tanto directa como enriquecida. Para extraer el DNA se utilizó el sistema comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific, Alemania), siguiendo el protocolo de purificación de DNA genómico de bacterias Gram negativas, con una incubación inicial de 30 minutos a 56 °C.

5.2.4.2 qPCR específica de *H. pylori*

Las condiciones de amplificación mediante qPCR para la detección y cuantificación de *H. pylori* fueron las descritas en el Capítulo 2. En cada reacción se incluyó un control negativo, en el que el DNA se sustituyó agua ultrapura estéril y un control positivo, en el que el DNA procedía de la cepa de referencia *H. pylori* NCTC 11637.

Todos los productos de amplificación procedentes de la qPCR fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa (Apartado 3.2.5.2) y posterior secuenciación (Capítulo 3).

5.2.5 IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter* spp. EN HECES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA (DAS)

Se emplearon los iniciadores HSF/HS2R (Capítulo 3) para la identificación de especies patógenas pertenecientes al género *Helicobacter* en todas las muestras, directas y enriquecidas.

Mediante el análisis de secuenciación dirigida, realizado en la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq, se generaron librerías de amplicones a partir del DNA extraído de las muestras positivas para *H. pylori*. A continuación, las secuencias brutas se analizaron bioinformáticamente mediante la plataforma de acceso libre QIIME 1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010), tal como se describe en el Capítulo 3.

Finalmente, las secuencias que no fueron identificadas a nivel de especie mediante la base de datos Silva de RNA ribosómico de alta calidad Silva_132_release.tgz, se alinearon con la base de datos NCBI mediante la herramienta en línea BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.2.6 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH)

Las muestras se fijaron para el análisis mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes según el protocolo de fijación para bacterias Gram negativas descrito por Moreno *et al.* (2007). Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada muestra enriquecida en Caldo Dent durante 24 horas a 37 °C en condiciones de microaerofilia y de la muestra procedente de la incubación DVC.

En todas las hibridaciones se utilizó como control la mezcla de tres sondas EUB 338, complementarias a una región del 16S del rRNA del dominio *Eubacteria*.

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

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

La sonda HPY-LNA fue sintetizada por EXIQON (Woburn, USA) y marcada con CY3, que emite en el espectro del rojo (552-565 nm). La concentración de formamida añadida a la solución del tampón de hibridación para la sonda HPYL-LNA fue del 40%. La reacción de hibridación se completó a 46 °C y en oscuridad durante 2 horas.

Igualmente, se realizó la detección de las mutaciones del 23S rRNA que confieren resistencia a la claritromicina. La combinación de sondas utilizadas en este caso fueron las específicas HPYL-LNA para determinar la presencia de *H. pylori* y la mezcla CLAR, compuesta por las sondas CLAR-I, CLAR-II y CLAR-III (Trebesius *et al.*, 2000). La secuencia de cada una de las sondas CLAR es:

CLAR-I: 5'-CGG GGT CTT CCC GTC TT-3'

CLAR-II: 5'-CGG GGT CTC TCC GTC TT-3'

CLAR-III: 5'-CGG GGT CTT GCC GTC TT-3'

La concentración de formamida utilizada fue 30%.

5.2.7 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* VIABLE MEDIANTE DVC-FISH

Para la detección e identificación de células viables de *H. pylori* en muestras de heces, se tomó 1 mL de muestra directa y se incubó en 9 mL de caldo DVC. Después de 24 horas de incubación a 37 °C en condiciones de microaerofilia, la muestra se centrifugó a 8500 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS 1X estéril. Inmediatamente, se fijaron las células para su análisis mediante FISH (Capítulo 3).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 DETECCIÓN MEDIANTE CULTIVO

Tras varios días de incubación, no se observaron colonias sospechosas en Agar Dent selectivo a partir de la siembra directa de las muestras, con o sin membrana. En las muestras enriquecidas las colonias características se encontraban cubiertas con una masa bacteriana inespecífica, que impidió el aislamiento de las colonias. Se recogieron las colonias aisladas y los cultivos mixtos sospechosos para su identificación mediante PCR, resultando negativas en todos los casos.

5.3.2 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE qPCR

Se consideraron positivas las muestras cuyos valores de Tm estaban comprendidos entre 84,8 y 86,5 (Figura 46 y 47). La detección se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de amplificación obtenidos, visualizándose la banda correspondiente al fragmento específico de 394 pb del gen *vacA* de *H. pylori*. Asimismo, todas las muestras que resultaron positivas al menos a uno de los dos tiempos de procesamiento (directa o tras enriquecimiento) se secuenciaron, para confirmar los resultados obtenidos.

De 90 muestras analizadas mediante qPCR, se detectó la presencia de DNA de *H. pylori* en 41 muestras (45,56%) (Tabla 24), de las cuales 18 resultaron positivas tanto directamente como después de su enriquecimiento. Con respecto a las 5 muestras restantes, fueron positivas únicamente tras su enriquecimiento en caldo de cultivo Dent. Solo en 10 muestras directas y 18 enriquecidas fue posible la cuantificación de *H. pylori*, con concentraciones entre $3,39 \cdot 10^3$ y $2,61 \cdot 10^3$ unidades genómicas/mL. En las 13 muestras positivas restantes (8 directas y 5 enriquecidas), no se pudo cuantificar la presencia de *H. pylori* ya que su correspondiente valor Cq superaba el umbral de fiabilidad (>35 ciclos).

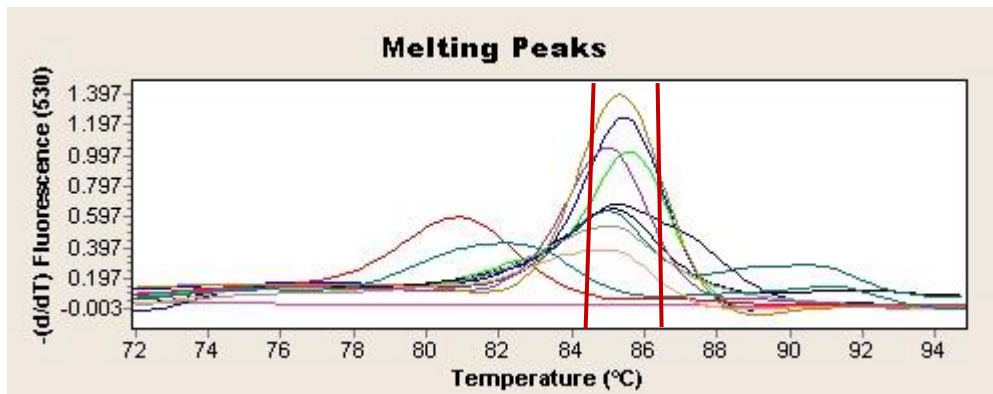


Figura 47: Tm: 84,5-86,5 $^{\circ}\text{C}$ de muestras de heces positivas para el gen *vacA* de *H. pylori*.

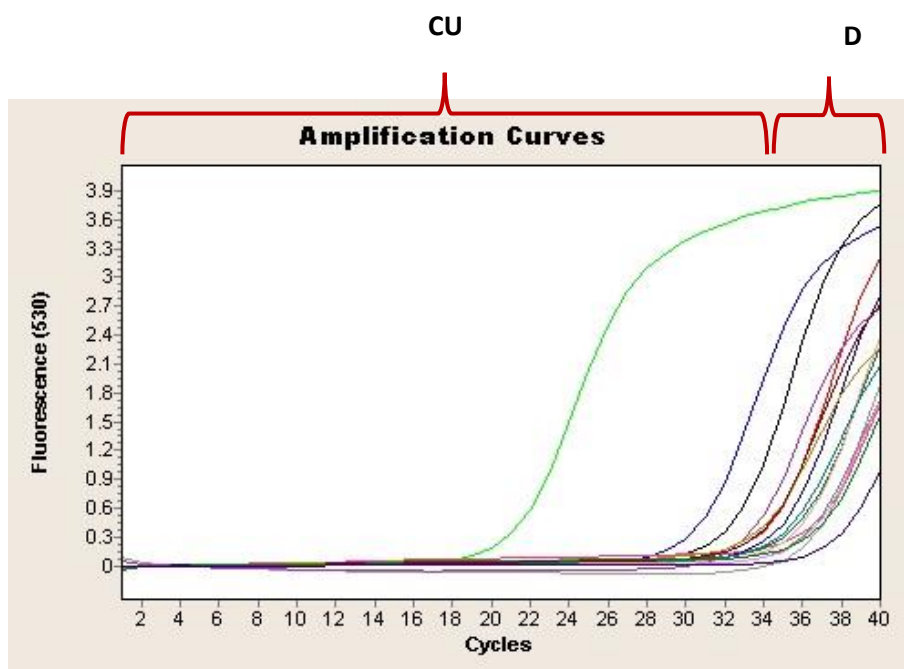


Figura 48: Curva de amplificación del gen *vacA* de *H. pylori*, en muestras de heces.

5.3.3 IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter* spp. EN HECES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA (DAS)

El análisis bioinformático permitió la asignación taxonómica hasta nivel de género. Para la identificación a nivel de especie, las secuencias obtenidas se enfrentaron a la base de datos NCBI mediante la herramienta en línea Blast. Este análisis permitió la identificación de secuencias con un porcentaje de similitud del 99% y 100% con el 16S rRNA de *H. pylori*, en 13 muestras directas y 13 muestras enriquecidas. Además, se identificó DNA de la especie *H. hepaticus* con un 99%-100% de similitud con las secuencias de la base de datos, en 8 muestras directas y 3 muestras tras enriquecimiento (H3E, H4E y H32E). También se identificó *H. pullorum*, detectando secuencias que presentaban una similitud del 100% con las bases de datos en una muestra (H10E) tras su enriquecimiento (Tabla 25).

5.3.4 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE FISH Y DVC-FISH

El análisis mediante FISH permitió detectar la presencia de *H. pylori* en 21 (40%) de las 45 muestras tras enriquecimiento. El enriquecimiento de las muestras y posterior hibridación *in situ* mostraron gran cantidad de microbiota acompañante, lo que dificultó la detección e identificación de *H. pylori* en el microscopio de epifluorescencia.

Por otro lado, el análisis mediante FISH tras el tratamiento DVC mostró células elongadas, es decir células viables de *H. pylori*, en 26 (57,78%) de las 45 muestras directas analizadas.

5.3.5 DETECCIÓN DE *H. pylori* RESISTENTE A LA CLARITROMICINA MEDIANTE FISH Y DVC-FISH

Todas las muestras en las que se había observado previamente la presencia de *H. pylori* mediante FISH con la sonda específica HPYL-LNA, fueron analizadas con las sondas CLAR I-II-III (clar mix) para comprobar si las células detectadas presentaban resistencia a la claritromicina. La hibridación resultó positiva mediante FISH y DVC-FISH en 17 muestras de heces. El porcentaje de muestras con células de *H. pylori* resistentes a la claritromicina fue del 37,78% para ambas técnicas.

Tabla 24: Resultados de la detección directa y tras enriquecimiento de *H. pylori* en muestras de heces según las técnicas empleadas en el presente capítulo.

Muestra	Método	qPCR (VacAR- VacAF)	<i>H. pylori</i> FISH	<i>H. pylori</i> DVC-FISH	<i>H. pylori</i> FISH (CLAR)	<i>H. pylori</i> DVC-FISH (CLAR)
Heces	Directo	18/45 (40%)		26/45 (57,78%)		17/45 (37,78%)
	Enrique	23/45 (51,11%)	21/45 (46,67%)		17/45 (37,78%)	

Tabla 25: Detección de *H. pylori* mediante qPCR, FISH, DVC-FISH, Secuenciación, y DAS en muestras clínicas.

Muestra	Tratamiento de la Muestra	qPCR (VacAR- VacAF)	<i>H. pylori</i> FISH	<i>H. pylori</i> DVC-FISH	<i>H. pylori</i> FISH (CLAR)	<i>H. pylori</i> DVC-FISH (CLAR)	DAS
H1	Directo (H1D)	+		+		+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
	Enriquecimiento (H1E)	+	+		+		
H2	Directo (H2D)	+		+		+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
	Enriquecimiento (H2E)	+	+		+		
H3	Directo (H3D)	-		+		+	
	Enriquecimiento (H3E)	+	+		+		<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
H4	Directo (H4D)	+		+		+	
	Enriquecimiento (H4E)	+	+		+		<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
H5	Directo (H5D)	+		+		+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
	Enriquecimiento (H5E)	+	+		+		
H6	Directo (H6D)	+		+		+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
	Enriquecimiento (H6E)	+	+		+		
H7	Directo (H7D)	+		+		+	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H7E)	+	+		+		<i>H. pylori</i>
H8	Directo (H8D)	-		+		-	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H8E)	+	-		-		<i>H. pylori</i>
H9	Directo (H9D)	+		+		+	<i>H. hepaticus</i>
	Enriquecimiento (H9E)	+	-		+		

H10	Directo (H10D)	+		+		+	
	Enriquecimiento (H10E)	+	-			+	<i>H. pullorum</i>
H11	Directo (H11D)	+		+		+	
	Enriquecimiento (H11E)	+	-			+	
H12	Directo (H12D)	-		-		-	
	Enriquecimiento (H12E)	-	-			-	<i>H. pylori</i>
H13	Directo (H13D)	-		+		+	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H13E)	-	+			+	
H14	Directo (H14D)	-		+		-	
	Enriquecimiento (H14E)	-	+			-	
H15	Directo (H15D)	-		-		+	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H15E)	+	-			+	<i>H. pylori</i>
H16	Directo (H16D)	-		-		-	
	Enriquecimiento (H16E)	-	-			-	
H17	Directo (H17D)	-		+		+	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H17E)	-	+			+	
H18	Directo (H18D)	-		-		-	
	Enriquecimiento (H18E)	-	-			-	
H19	Directo (H19D)	-		-		-	
	Enriquecimiento (H19E)	-	-			-	
H20	Directo (H20D)	-		-		-	
	Enriquecimiento (H20E)	-	-			-	
H21	Directo (H21D)	-		+		-	
	Enriquecimiento (H21E)	-	-			-	<i>H. pylori</i>
H22	Directo (H22D)	+		-		-	
	Enriquecimiento (H22E)	+	-			-	<i>H. pylori</i>
H23	Directo (H23D)	-		-		-	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
	Enriquecimiento (H23E)	-	-			-	
H24	Directo (H24D)	-		-		-	
	Enriquecimiento (H24E)	-	-			-	<i>H. pylori</i>
H25	Directo (H25D)	-		-		-	
	Enriquecimiento (H25E)	-	-			-	
H26	Directo (H26D)	-		-		-	

	Enriquecimiento (H26E)	+	-	-	-	<i>H. pylori</i>
H27	Directo (H27D)	-		-	-	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
	Enriquecimiento (H27E)	-	-		-	
H28	Directo (H28D)	-		-	-	
	Enriquecimiento (H28E)	-	-		-	
H29	Directo (H29D)	-		-	-	
	Enriquecimiento (H29E)	-	-		-	
H30	Directo (H30D)	-		+	-	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H30E)	+	+		-	<i>H. pylori</i>
H31	Directo (H31D)	-		-	-	
	Enriquecimiento (H31E)	-	-		-	
H32	Directo (H32D)	+		+	+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
	Enriquecimiento (H32E)	+	+		+	<i>H. pylori</i> , <i>H. hepaticus</i>
H33	Directo (H33D)	+		+	-	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H33E)	+	+		-	
H34	Directo (H34D)	+		+	+	
	Enriquecimiento (H34E)	+	+		+	<i>H. pylori</i>
H35	Directo (H35D)	-		-	-	
	Enriquecimiento (H35E)	-	-		-	
H36	Directo (H36D)	+		+	+	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H36E)	+	+		+	
H37	Directo (H37D)	-		-	-	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H37E)	-	-		-	
H38	Directo (H38D)	+		+	+	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H38E)	+	+		+	<i>H. pylori</i>
H39	Directo (H39D)	-		-	-	
	Enriquecimiento (H39E)	-	-		-	<i>H. pylori</i>
H40	Directo (H40D)	-		-	-	<i>H. pylori</i>
	Enriquecimiento (H40E)	-	-		-	<i>H. pylori</i>
H41	Directo (H41D)	+		+	-	
	Enriquecimiento (H41E)	+	+		-	<i>H. pylori</i>

H42	Directo (H42D)	+		+		-	
	Enriquecimiento (H42E)	+	+			-	<i>H. pylori</i>
H43	Directo (H43D)	-		-		-	
	Enriquecimiento (H43E)	-	-			-	
H44	Directo (H44D)	+		+		-	
	Enriquecimiento (H44E)	+	+			-	
H45	Directo (H45D)	-		+		-	
	Enriquecimiento (H45E)	-	-			-	<i>H. pylori</i>

5.4 DISCUSIÓN

Helicobacter pylori, puede ser detectado en muestras clínicas mediante métodos no invasivos e invasivos, requiriendo éstos últimos la realización de una endoscopia. Las pruebas no invasivas para la detección del patógeno consisten en la medida del CO₂ exhalado mediante el marcaje del ¹³C (conocido como la prueba del aliento, Urea Breth Test, UBT), la serología y el análisis con PCR de materiales como heces, saliva y orina (Beer-Davidson *et al.*, 2018; Kakiuchi *et al.*, 2019; Guaman *et al.*, 2020).

Determinadas técnicas como el cultivo, la PCR o el inmunoensayo enzimático, han sido utilizadas para la detección del patógeno en heces, al tratarse de muestras de fácil disponibilidad. En este estudio se realizó la detección e identificación de *H. pylori* en heces de pacientes pediátricos con síntomas dispépticos, mediante métodos moleculares y de cultivo, además de los rutinarios que se habían realizado previamente en el hospital. Estas pruebas con métodos no invasivos en muestras de heces están adquiriendo gran importancia en la práctica clínica para el diagnóstico adecuado de la infección de *H. pylori*, especialmente en niños (Sabbagh *et al.*, 2019).

El método de cultivo es la prueba más específica para la detección de células viables de *H. pylori* en muestras clínicas. Su principal ventaja es que permite el aislamiento del patógeno para un mejor estudio, favoreciendo la elección del tratamiento adecuado con antibióticos. Sin embargo, la tasa de éxito en el aislamiento de *H. pylori* en heces mediante cultivo es baja (Abadi, 2018). En este trabajo, no fue posible la detección del microorganismo por cultivo debido al sobrecrecimiento de microbiota acompañante, a pesar de que se utilizó el medio de cultivo Agar Dent con polimixina B (ADPB), que previamente había demostrado ser selectivo para la detección de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas (Capítulo 1). Este resultado también podría deberse a la conversión de *H. pylori* a su forma VBNC durante su recorrido a través del entorno anaeróbico del duodeno y el colon, donde entra en contacto con enzimas degradativas, polisacáridos, microorganismos competentes y especialmente, con los ácidos biliares que resultan tóxicos para *H. pylori* (van Tongeren *et al.*, 2005).

Parsonnet *et al.* (1999) cultivaron *H. pylori* a partir del 22% de muestras fecales obtenidas artificialmente mediante el uso de un agente catártico, el fosfato de sodio, para inducir diarrea en el paciente. Sin embargo, este método no representa las condiciones naturales del tránsito

intestinal, además de resultar molesto para el paciente. Dore *et al.* (2000) demostraron que un pretratamiento de las muestras de heces con colestiramina, resina básica de intercambio aniónico que se une a los ácidos biliares, podría favorecer la recuperación de *H. pylori*. Falsafi *et al.* (2006) utilizaron este pre-tratamiento para neutralizar las sales biliares y consiguieron aislar *H. pylori* en heces de niños, donde el tiempo de exposición a las sales biliares en el tránsito intestinal es más corto en comparación con los adultos. Sin embargo, ninguno de los métodos descritos para el cultivo se podría considerar un método sencillo para el diagnóstico rutinario, a lo que debemos añadir el tiempo de cultivo y la identificación posterior.

Las técnicas moleculares basadas en la PCR permiten la detección específica de ácidos nucleicos y han sido utilizadas para el diagnóstico de *H. pylori* en muestras clínicas. Su baja sensibilidad, normalmente se debe a que las heces contienen de forma natural materiales que pueden inhibir la PCR, dando lugar a falsos negativos (Kabir *et al.*, 2004; Shulman *et al.*, 2012). Schabereuter-Gurtner *et al.* (2004) detectaron *H. pylori* resistentes a la claritromicina en heces, mediante qPCR y propusieron la técnica qPCR en heces como un método rápido no invasivo con alta especificidad y bajo riesgo de contaminación en comparación con la PCR convencional. Posteriormente los estudios realizados por Lottspeich *et al.* (2007), Vécsei *et al.* (2010) y Scaltsky *et al.* (2011) y recientemente Clines y Beckman, 2019, demostraron la especificidad (100%) de la técnica qPCR en la detección de cepas de *H. pylori* resistentes a la claritromicina en heces de niños mediante un conjunto de iniciadores de la casa comercial Meridian Bioscience.

En este trabajo se obtuvieron 18 muestras directas positivas por qPCR. Tras el método de enriquecimiento se detectó la presencia de *H. pylori* en 23 muestras. Los resultados muestran, de acuerdo con otros trabajos publicados (Ahmed *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2015), que la incorporación de un paso previo de enriquecimiento mejora la detección de patógenos de crecimiento lento o fastidioso como es el caso de *H. pylori* (Weissensteiner *et al.*, 2003). Además, dicho paso diluye los posibles inhibidores de la PCR, al igual que diluyen el DNA de bacterias muertas de *H. pylori*, que pueden ocasionar falsos positivos (Kabir *et al.*, 2004). En nuestro caso, el enriquecimiento de las muestras favoreció la detección de *H. pylori* en seis muestras que habían sido negativas previamente. El único inconveniente es que la cuantificación solo es posible en muestras directas, por lo que la qPCR tras enriquecimiento solo permite la detección.

La técnica de secuenciación dirigida con Illumina MiSeq permitió identificar simultáneamente todas las secuencias del género presentes en las muestras. De este modo, se detectó *H. pylori* en 17 muestras directas y 19 enriquecidas, incluso en 15 que previamente habían resultado negativas para la qPCR del gen *VacA*. En 11 de ellas se detectó también *H. hepaticus*, demostrando por primera vez la coexistencia entre ambos patógenos en muestras clínicas. También se detectó *H. pullorum* en una de las muestras analizadas. Estos resultados están en la línea de otros estudios recientes sobre la detección de especies patógenas de *Helicobacter* no *H. pylori* (NHPH), como el de Nakamura *et al.* (2019), quienes demostraron la prevalencia de NHPH en muestras de biopsia de pacientes con enfermedad gástrica que habían sido negativos para *H. pylori* por inmunohistoquímica y PCR.

El presente estudio demuestra el valor de la técnica DAS, ya que ha revelado la presencia de otros NHPH de importancia en muestras de heces de pacientes con sintomatología gástrica. Según nuestro conocimiento, solo en un estudio realizado por Tsuchiya *et al.* (2018), se utilizó la metodología de secuenciación del 16S rRNA basada en DAS para la detección de NHPH en muestras de bilis de pacientes con cáncer de vesícula biliar, aunque todos los resultados fueron negativos.

No obstante, las técnicas moleculares como la PCR en tiempo real o incluso el DAS, podrían verse afectadas por sustancias inhibitoras presentes en las muestras, como ya se ha comentado, lo que llevarían a la obtención de falsos resultados negativos. Por lo tanto, el uso combinado con otras técnicas específicas como FISH y DVC-FISH podría mejorar la precisión de los resultados.

Las técnicas FISH y DVC-FISH no son utilizadas habitualmente para la detección de *H. pylori* en muestras clínicas. Una de las principales limitaciones de la técnica FISH es la baja intensidad de la señal de fluorescencia, como consecuencia de la hibridación inespecífica y el ruido de fondo. Por ello se utilizó la sonda HPY-LNA (Moreno *et al.*, 2001), cuya estructura mejora la afinidad por el rRNA, aumentando significativamente su sensibilidad. Mediante FISH se identificaron, tras su enriquecimiento, 21 muestras positivas de las 45 analizadas. Fue complicado su visualización debido al ruido de fondo y a la microbiota acompañante inespecífica presente en la muestra, lo que dificultó la identificación de *H. pylori*, confirmando que el caldo utilizado para el enriquecimiento no es totalmente específico para la detección *H. pylori*. Al igual que la PCR, el análisis mediante FISH no

permite la detección selectiva de células viables de *H. pylori*. Por ello, con el objetivo de detectar únicamente células viables, las muestras fueron sometidas a análisis por DVC-FISH (Piqueres *et al*, 2006).

Moreno *et al.* (2015) realizaron un estudio para identificar células viables de *H. pylori* mediante DVC-FISH en heces, comparándola con las técnicas qPCR y cultivo. Los resultados mostraron una mayor eficiencia que la qPCR. Nuestros resultados revelaron la presencia de células de *H. pylori* elongadas en 26 muestras de heces de las 45 analizadas, lo que parece demostrar que los factores que afectan al cultivo de *H. pylori* en las heces no afecta su actividad metabólica, identificándose formas activas y por lo tanto potencialmente infecciosas. Al igual que en el estudio de Moreno *et al.* (2015), la eficiencia de la técnica DVC-FISH resultó mayor que la qPCR, debido probablemente al tipo de matriz analizada, rica en inhibidores de la Taq polimerasa. La técnica DVC-FISH es, por tanto, un método sensible y específico para detectar células viables de *H. pylori* en heces. Se trata de un método no invasivo y económico que permite tener una visión general del hábitat y de la microbiota acompañante de las especies estudiadas, pudiendo ser una alternativa a las técnicas de cultivo.

Esta técnica también permitió la identificación de células de *H. pylori* que presentaban las mutaciones en el gen 23s rRNA que confieren resistencia a la claritromicina. La detección de células resistentes puede facilitar una terapia de erradicación adecuada, evitando el daño que provoca el abuso de antibióticos en los niños y el aumento de resistencias secundarias o múltiples.

En este trabajo, mediante las técnicas FISH y DVC-FISH, se detectó la presencia de cepas de *H. pylori* resistentes a la claritromicina en 17 muestras de las 45 muestras analizadas. Hasta donde conocemos, es la primera vez que se identifican células viables de *H. pylori* resistentes a la claritromicina en muestras fecales de pacientes con sintomatología de infección. Este análisis proporcionaría información complementaria antes de establecer una terapia de erradicación, además de ser un ensayo no invasivo y económico, que solamente requeriría de cierta inversión inicial y de personal cualificado. Además, los resultados se obtienen en un periodo de tiempo relativamente corto, 48 h, en comparación con las técnicas tradicionales de cultivo a partir de muestras de biopsia.

En conclusión, en este estudio se evidencia, por primera vez, la presencia de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp. en muestras de heces, mediante técnicas moleculares, incluida la secuenciación dirigida, DAS. El método DVC-FISH demuestra la presencia de células viables y por lo tanto potencialmente infectivas de *H. pylori*. Por último, los resultados obtenidos mediante DAS demuestran la presencia de otras especies NHPH, como *H. hepaticus* y *H. pullorum* que coexisten con *H. pylori* en muestras de heces, proporcionando un punto de partida para el estudio de la posible transmisión fecal-oral de estas especies.

CAPÍTULO 6

Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

6.1 OBJETIVOS

Se sospecha que *Helicobacter* sobrevive en los sistemas de distribución de agua potables adhiriéndose a biopelículas ya formadas por otros géneros. En este sentido, sería de gran interés conocer si *H. pylori* tiene la capacidad de formar biopelículas por sí mismo o únicamente se integra en ellas participando de forma no activa.

Por otra parte, la desinfección de las biopelículas implica normalmente el uso de biocidas, siendo el cloro el más común en el tratamiento de las aguas potables y residuales. Sin embargo, los valores de cloro en los sistemas de distribución de agua potable deben estar entre 0,1 y 0,3 mg/L. Se ha demostrado que un tratamiento inadecuado con concentraciones bajas de cloro puede no provocar la inactivación de *H. pylori*, suponiendo un riesgo de infección para los consumidores. Por ello, evaluar la eficacia de distintas estrategias de erradicación del patógeno de las biopelículas sería de gran utilidad para la prevención y el control de *H. pylori* en los sistemas de distribución de agua.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, los principales objetivos que se plantean en el presente capítulo son:

- ESTUDIAR EXPERIMENTALMENTE LA CAPACIDAD DE *H. pylori* PARA FORMAR BIOPELÍCULAS.
- COMPARAR Y EVALUAR MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO Y TÉCNICAS MOLECULARES DE VIABILIDAD, LA EFECTIVIDAD DE LOS TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN CON CLORO Y UV EN BIOPELÍCULAS FORMADAS POR *H. pylori*.
- DETECTAR *H. pylori* EN BIOPELÍCULAS DE SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE AGUA POTABLE MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES (qPCR).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 FORMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS

6.2.1.1 Cepa de referencia y Condiciones de Cultivo

En este trabajo se utilizó la cepa de referencia *H. pylori* NCTC 11637, proporcionada por el Departamento de Microbiología Clínica, Hospital Universitario de Copenhagen, Denmark. Se sembró en placas de agar sangre piruvato (ASP, Capítulo 1) y se incubó en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂) y 90-95% de humedad. Se utilizó un sistema de generación de atmósfera CampyGen™ 3-5 L (Oxoid, Reino Unido) en jarras anaeróbicas (Oxoid, Reino Unido) a 37 °C durante 48 a 72 horas. Tras el periodo de incubación, el cultivo bacteriano se recogió y se inoculó en 10 mL de caldo Brucella (BB) suplementado con suero fetal bovino al 7% (SFB) (Yonezawa *et al.*, 2010). Inmediatamente, se incubó bajo las mismas condiciones durante 12 horas.

A continuación, el caldo de cultivo se ajustó a una densidad óptica (OD₆₀₀) de aproximadamente 0,1, equivalente a una concentración de 5*10⁹ a 8*10⁹ UFC/mL. Para ello se preparó una dilución 1:10, (100 µL del cultivo incubado durante 12 horas en 900 µL de caldo de enriquecimiento) y se midió la absorbancia A_{600nm}. Se calculó y se preparó la suspensión celular para los diferentes ensayos, utilizando la siguiente formula (Kragh y Truelstrup, 2020):

$$X_{mL} = \frac{A_{600nm} \times 10mL}{1}$$

La suspensión bacteriana se centrifugo a 8000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en PBS 1X (Anexo B.2). La suspensión se mantuvo a una temperatura de 20 °C hasta su utilización, en un periodo inferior a 24 horas (Figura 48).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES ESTANDARIZADAS

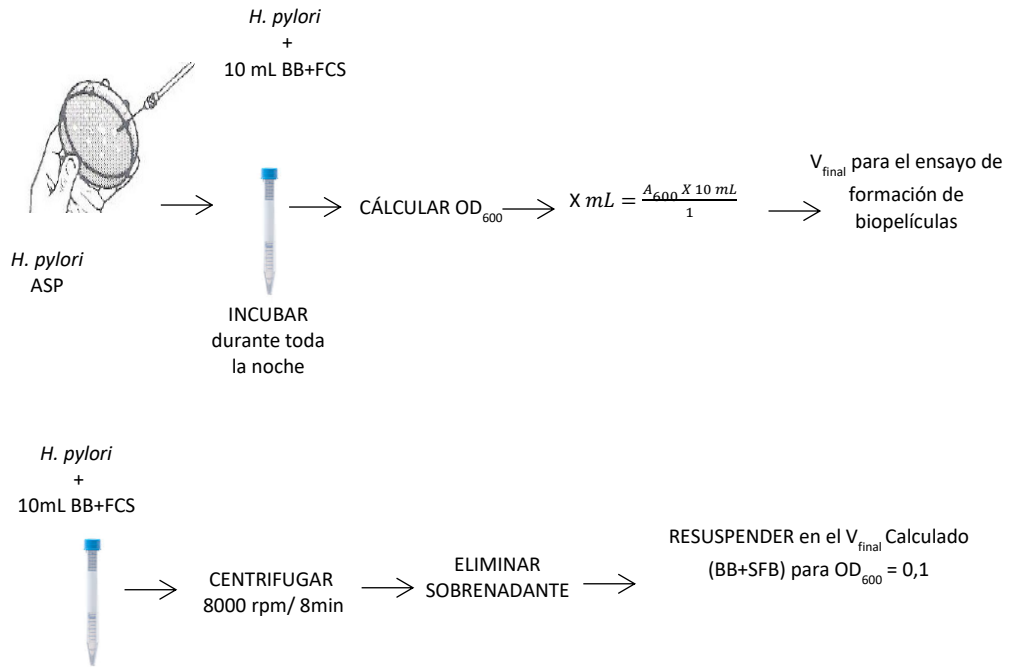


Figura 49: Protocolo de preparación de suspensiones celulares estandarizadas.

6.2.1.2 Formación de Biopelículas en microplacas

Los diferentes ensayos se realizaron de acuerdo con métodos descritos previamente (Cole *et al.*, 2004; Cellini *et al.*, 2005; Yonezawa *et al.*, 2009), modificados para este estudio (Figura 49): Se utilizaron placas comerciales de poliestireno de fondo redondo de 96 pocillos (Thermo Fisher, Roskilde Site, Denmark) en los que se inocularon 200 μ L de la suspensión celular estandarizada, descrita en el apartado 6.2.1.1, en cada uno de los pocillos. A continuación, las placas fueron incubadas a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante 48-72 horas, hasta observar las formaciones de biopelículas.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Se estudió si la disponibilidad de nutrientes afectaba a la formación de biopelículas de *H. pylori*. Para ello, se prepararon tres inóculos distintos a partir de una nueva suspensión celular estandarizada preparada: uno solo con BB y SFB; otro con un 10% de BB+SFB y el resto NaCl (solución de cloruro de sodio al 0,9%); y otro con 1% de BB+SFB y el resto de NaCl. Todas ellas se inocularon en placas de poliestireno y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en microaerofilia.

Siguiendo con el estudio de la influencia de la disponibilidad o restricción de nutrientes en la formación de biopelículas, se analizó cómo afectaba la disponibilidad de oxígeno. Para ello, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones tanto de anaerobiosis como de aerobiosis.

También se evaluó el efecto de la temperatura incubando las placas de 96 pocillos a 15 °C y 5 °C durante 24 horas en microaerofilia.

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

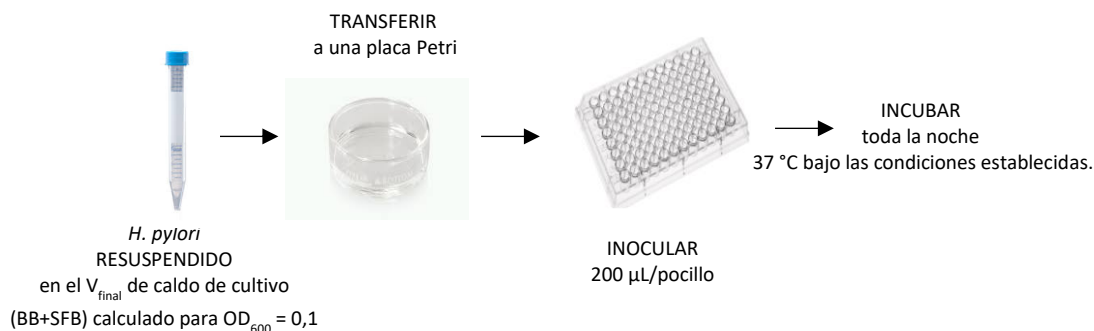


Figura 50: Protocolo experimental para estudiar la formación de biopelículas de *H. pylori*.

6.2.1.3 Cuantificación de biopelículas con Cristal Violeta (CV)

La capacidad de *H. pylori* para formar biopelículas se puede determinar utilizando el método de tinción cristal violeta, la técnica más comúnmente utilizada para bacterias Gram negativas (Misba *et al.*, 2017).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

En cada uno de los ensayos realizados, después del tiempo de incubación de las microplacas, se tomó una medición inicial de la absorbancia (OD) del cultivo a 450 nm (OD_{450} “basic”) y 570 (OD_{570} “basic”), con el equipo Multiskan® GO Microplate Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Los valores de absorbancia fueron analizados utilizando el programa Thermo Scientific SkanIt software para lectores de microplacas. Este valor inicial fue tomado antes de la tinción para comparar los resultados antes y después de la formación de las biopelículas.

A continuación, las células planctónicas de *H. pylori* suspendidas en el medio de cultivo líquido fueron eliminadas invirtiendo la placa con cuidado, para mantener las formaciones sésiles en el fondo de los pocillos.

Posteriormente, se lavó cada uno de los pocillos por triplicado con 300 μ L de PBS estéril, para retirar el resto de las células planctónicas. Las placas fueron incubadas a 60 °C durante 40 minutos, para su fijación. Tras este periodo se agregaron 100 μ L por pocillo de cristal violeta (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) al 0,1% (w/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El cristal violeta fue descartado por inversión y se incubó de nuevo a 60 °C durante 15 minutos. A continuación, se lavaron cada uno de los pocillos por triplicado, con 300 μ L de PBS estéril, para eliminar el exceso de colorante, y el cristal violeta retenido en las biopelículas formadas se solubilizó añadiendo 150 μ L de etanol al 95% por pocillo e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El nivel de formación de las biopelículas se cuantificó mediante la medición de la absorbancia de cristal violeta eliminado a 570nm (OD_{570} “Biofilm”), con un paso previo de agitación de 10 segundos (Figura 50). El cristal violeta es un tinte básico, que se une a las moléculas con carga negativa en su superficie y a los polisacáridos en la matriz extracelular, por lo tanto, la absorbancia obtenida se estima proporcional a la biomasa de la biopelícula formada.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

MEDICIÓN DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS CON CRISTAL VIOLETA

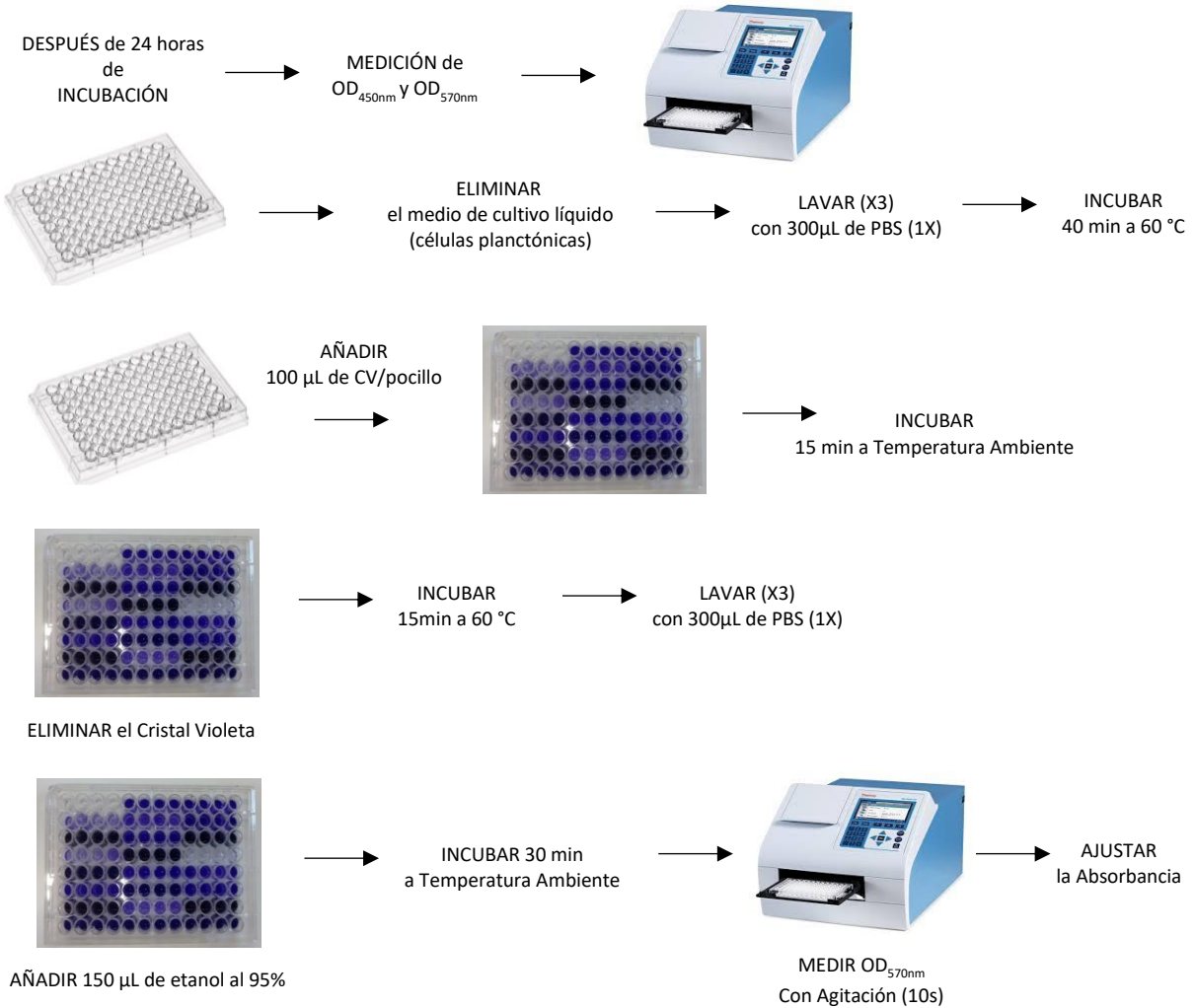


Figura 51: Protocolo de medición de formación de biopelículas de *H. pylori*.

La cantidad de biopelícula formada (BF) por *H. pylori*, se calculó utilizando la fórmula de Soto *et al.* (2006):

$$BF = CW/AB$$

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Donde BF, es el índice de formación de biopelículas, CW es la cantidad de cristal violeta (CV) adherido a cada uno de los pozos debido a los factores abióticos (para eliminar valores OD inespecíficos o abióticos) y AB es la cantidad de biopelícula formada.

Se calculó la media y desviación estándar del índice BF, para cada uno de los ensayos (Tabla 26), realizados por duplicado. Para interpretar los resultados, se utilizó la clasificación semicuantitativa descrita previamente por Martínez-Medina *et al.* (2009): No formadora ($BF \leq 0,5$), moderadamente formadora ($0,5 > BF \leq 1$) y fuertemente formadora ($BF > 1$).

6.2.2 TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

Se estudió la resistencia de *H. pylori* a los tratamientos de desinfección con radiación UV y con cloro. Para ello, se evaluó el efecto a distintos tiempos de exposición para ambos desinfectantes. Además, se consideraron el efecto del cloro a diferentes concentraciones. En los ensayos se tuvieron en cuenta tanto las formas celulares planctónicas (libres) como sésiles (embebidas en biopelículas).

6.2.2.1 Crecimiento bacteriano y formación de biopelículas

Se preparó un inóculo de trabajo, tal como se describe en apartado 6.2.1.1. La formación de biopelículas se realizó sobre filtros estériles de celulosa de $0,45 \mu\text{m}$ (GN-6 Metricel® MCE Membrane Disc Filters, PALL, Life science, Port Washington, NY), siguiendo las indicaciones descritas por Bjarsholt *et al.* (2015), con algunas modificaciones teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento de *H. pylori*. El ensayo (Figura 51), consistió en sembrar $20 \mu\text{L}$ del inóculo de trabajo en filtros de celulosa, colocados sobre placas de agar sangre piruvato (ASP, Capítulo 1), incubadas a 37°C durante 24 horas, bajo condiciones de microaerofilia.

Las biopelículas de *H. pylori* desarrolladas en filtros de celulosa se colocaron en una placa Petri vacía.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

FORMACIÓN DE BIOPELICULAS EN FILTROS DE CELULOSA DE 0,45 μ M

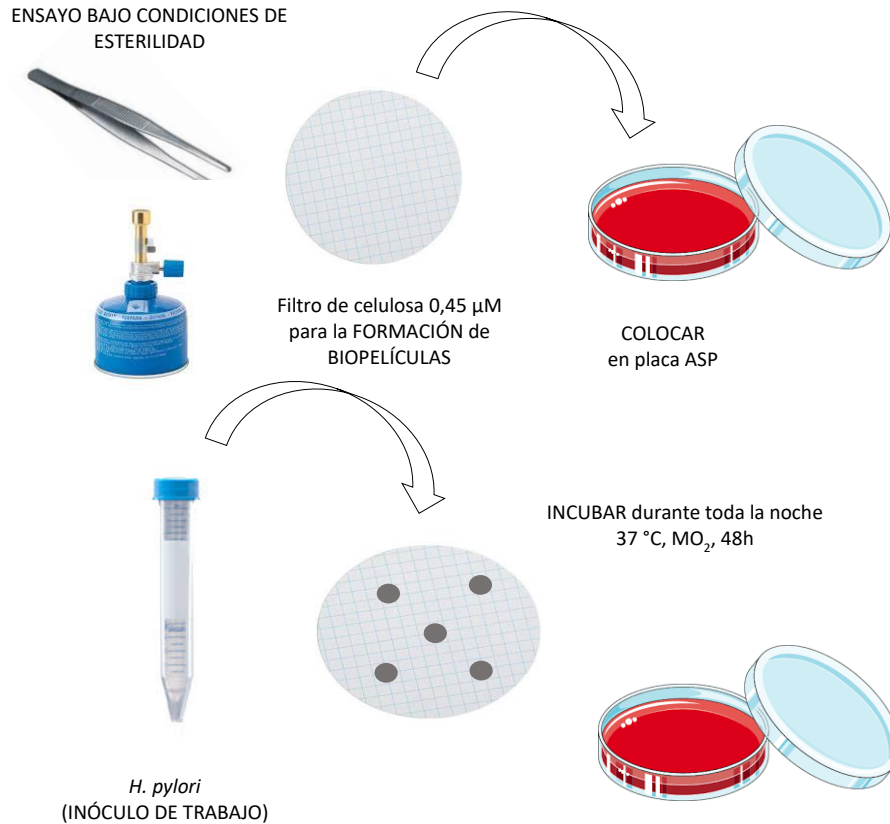


Figura 52: Protocolo de formación de biopelículas de *H. pylori* sobre filtro de celulosa de 0,45 μ m.

6.2.2.2 Tratamiento con radiación UV

Para el estudio de la resistencia de *H. pylori* a la radiación UV (Figura 53) se preparó el inóculo de trabajo a una concentración de $1,10 \cdot 10^8$ UFC/mL y se diluyó en un volumen final de 200 mL de PBS estéril. A continuación, se colocaron 20 mL en una placa Petri (de 5 cm de diámetro).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Las placas Petri con ambas formas celulares se colocaron bajo un dispositivo (Figura 52) compuesto por tres lámparas OSRAM Hg “Germicidal” que emitían un haz de luz UV con una longitud de onda de 254 nm (Puritec HNS 8W, G5, G8T5/OF, RG3, Italia) (DTU departamento de Medio Ambiente, Lyngby, Denmark).

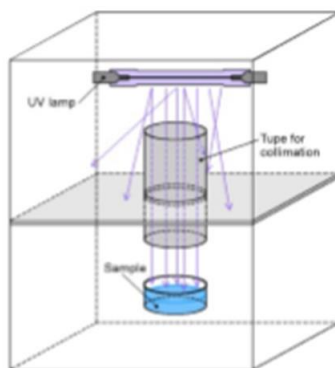


Figura 53: Descripción esquemática del dispositivo utilizado para llevar a cabo la exposición a radiación UV de *H. pylori*.

Para garantizar una luz UV constante, las lámparas se activaron durante 30 minutos antes del ensayo. A continuación, se midió la intensidad de la luz UV (mW/m^2) con un radiómetro UVX (UVP, California, EE. UU). Para ello, se colocó el radiómetro en el centro del campo de exposición a una distancia de 34 cm. Las tres lámparas y la placa Petri de trabajo están separadas por una placa compuesta por un tubo de 280 mm con un diámetro interno de 76 mm para concentrar el haz de luz UV de forma paralela, a partir de un único foco luminoso.

Durante las pruebas de irradiación las muestras se mantuvieron en agitación constante (agitador magnético) y a una temperatura ambiente de 20 °C.

Las suspensiones de células planctónicas fueron expuestas a siete dosis entre 0 y 493 mJ/cm^2 . Transcurrido el periodo de exposición calculado para cada dosis (Tabla 26), se tomó 1 mL de la muestra irradiada y se transfirió inmediatamente a un tubo eppendorf de 1,5 mL vacío, que se mantuvo a 4 °C en condiciones de oscuridad hasta su análisis mediante técnicas de cultivo y extracción de DNA.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Tabla 26: Tiempo de exposición de las células planctónicas, calculado a partir de la dosis de radiación UV.

Dosis (mJ/cm ²)	Tiempo (hh:mm:ss)
D20	00:02:43
D40	00:05:27
D60	00:07:56
D80	00:10:35
D100	00:13:13
D493	01:05:11

Para determinar y cuantificar el número de células viables de *H. pylori*, las muestras se inocularon en placas de ASP, siguiendo la técnica de siembra de punción (3 Å~ 20 µL) y siembra en superficie (100 µL) (Han *et al.*, 2019). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas, en condiciones de microaerofilia. Tras su incubación se llevó a cabo el recuento celular. Se calculó el promedio y reducción logarítmica respecto a la suspensión inicial. Igualmente, las muestras fueron analizadas mediante la técnica molecular PMA-qPCR, como se describe en el apartado 6.2.3. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

TRATAMIENTO DE CÉLULAS PLANCTÓNICAS DE *H. PYLORI* CON UV-C

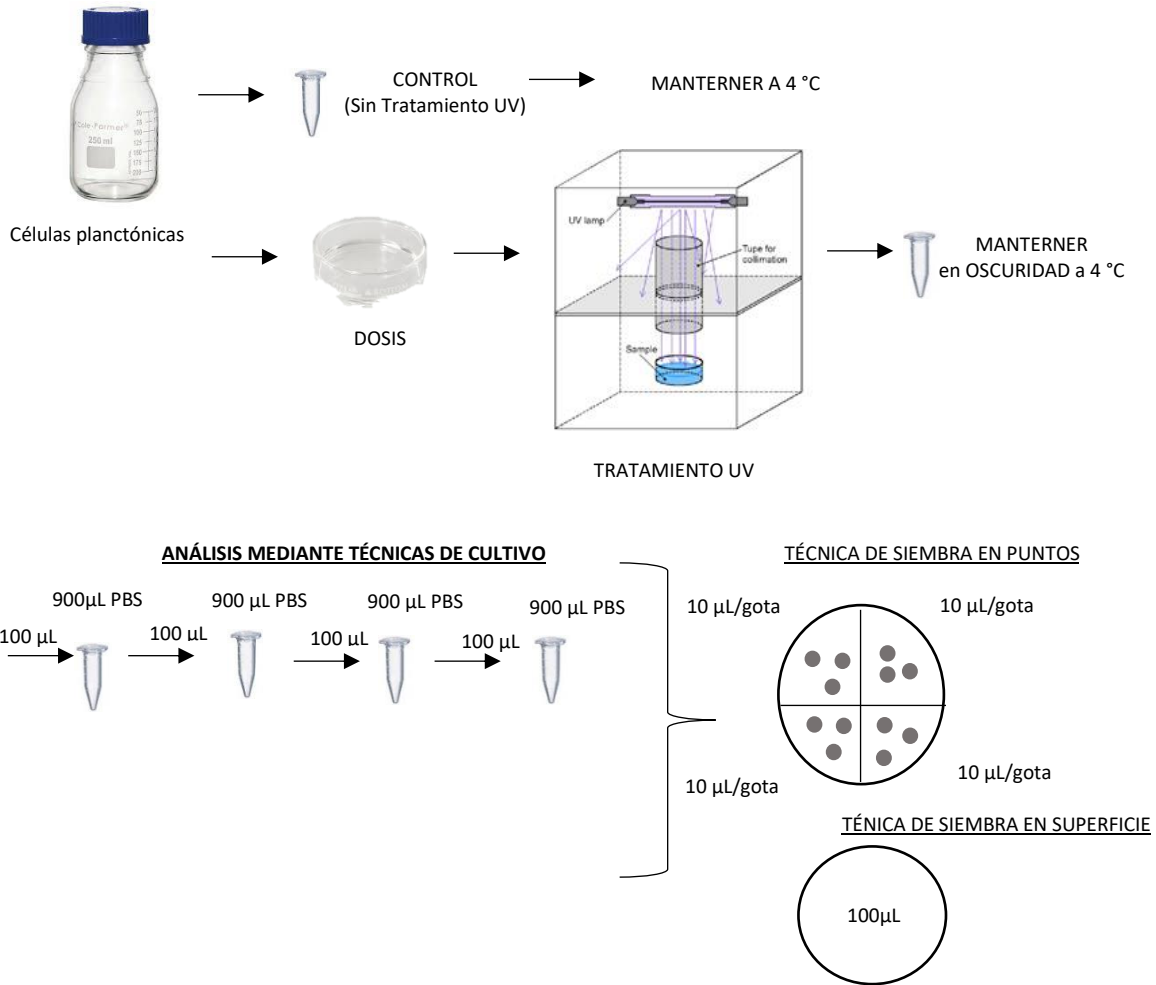


Figura 54: Protocolo de tratamiento de células planctónicas de *H. pylori* con UV-C.

Las biopelículas de *H. pylori* fueron expuestas a dosis comprendidas entre 493 y 13.680 mJ/cm^2 (Tabla 27). Tras su exposición, las biopelículas se recogieron bajo condiciones asépticas y se introdujeron en un tubo con 10 mL de PBS estéril. Se agitó en un vortex durante 15 segundos y se sometió a su disgregación por sonicación durante 5 min en un baño de ultrasonidos. Posteriormente, se analizaron mediante técnicas de cultivo y técnicas moleculares (Figura 54).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Tabla 27: Tiempo de exposición de células sésiles, calculado a partir de la dosis de radiación UV.

Dosis (mJ/cm²)	Tiempo (hh:mm:ss)
D493	01:05:11
D986	02:01:34
D1.479	03:02:21
D2.019	04:08:55
D2.465	05:03:55
D3.420	06:35:31
D6.840	08:11:01
D1.0260	10:46:32
D13680	12:22:02

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULAS DE *H. pylori* CON UV-C

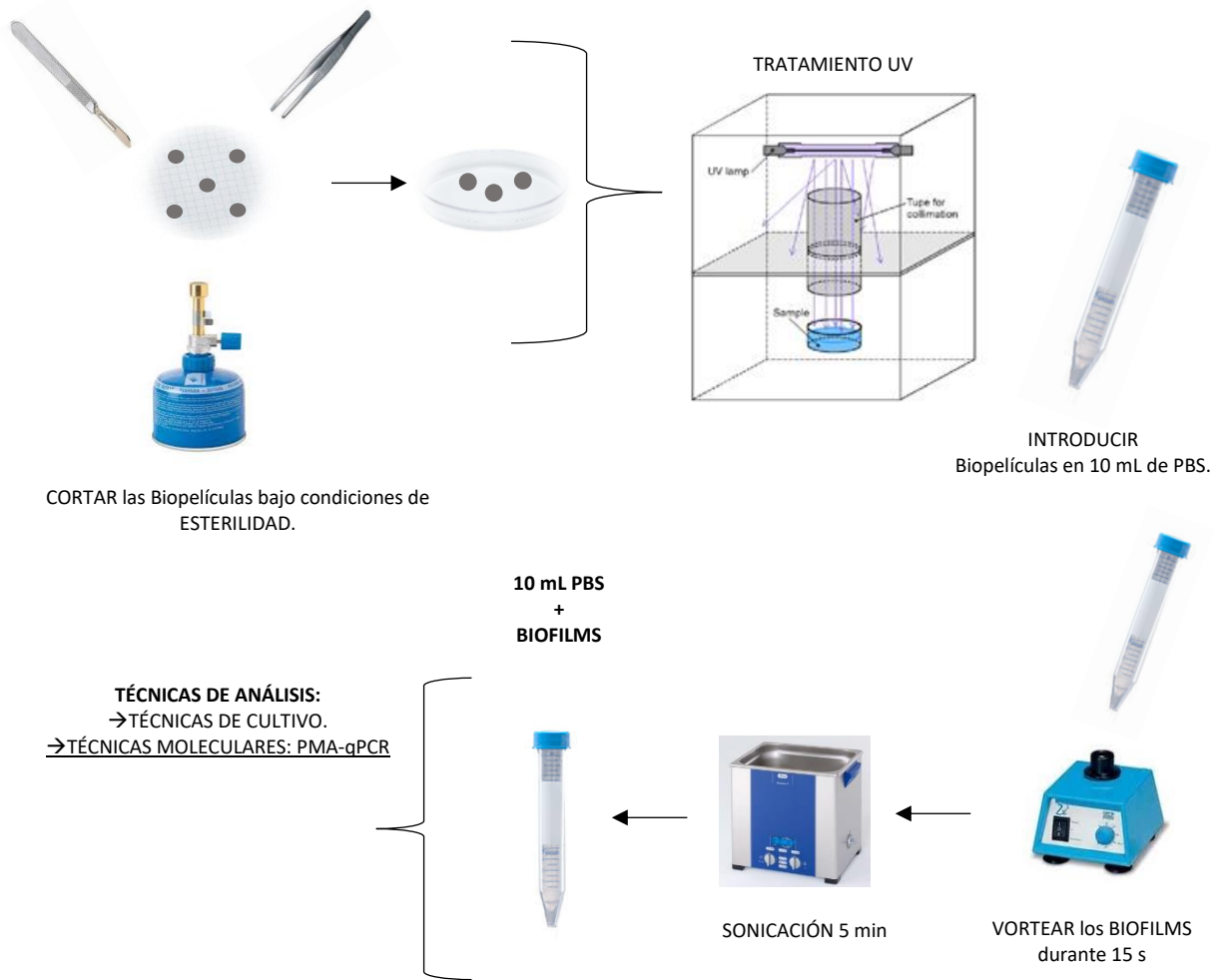


Figura 55: Protocolo de tratamiento de biopelículas de *H. pylori* con UV-C.

6.2.2.3 Tratamiento con hipoclorito de sodio

Para el ensayo con células planctónicas (Figura 55), el inóculo de trabajo se diluyó en un volumen final de 50 mL de agua desionizada estéril (Tabla 28).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Tabla 28: Características del agua desionizada autoclavada, utilizada para los experimentos con Cloro. *DQO: demanda química de oxígeno.

Parámetro	Valor
pH	6,89
*DQO	>5
Alcalinidad (CaCO ₃ /L)	5

Las suspensiones bacterianas se prepararon en vasos de precipitado de vidrio, para evitar cualquier alteración de la concentración final de cloro. Se mantuvieron en agitación constante (Unimax 2010, Heidoph) a una velocidad de 115 rpm y se añadió cloro (Klorin Original, Colgate DK, Denmark) a una concentración final de 1,2 mg/L. Los valores se midieron mediante Spectroquant test Kit nº 100598 (Merck, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se recogieron alícuotas tras su inoculación (T_0) y después de 20 y 30 minutos de exposición al cloro (Baker *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2007; Gião *et al.*, 2010). Para evaluar los efectos de la temperatura, los ensayos se realizaron a 15 °C y 25 °C.

Tras los 20 y 30 minutos de incubación, el cloro se neutralizó. Para ello se transfirieron 900 µL de las muestras tratadas a un microtubo con 100 µL de tampón de Neutralización (NB). El tampón se preparó a una concentración de 0,52% (w/v) (NB, Difco™, R, Francia) en agua desionizada, se autoclavó (15 min a 121 °C) y se mantuvo en refrigeración (4 °C) hasta su utilización. A continuación, los microtubos se mantuvieron en agitación constante durante 45 minutos para garantizar la neutralización total del cloro.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para determinar los efectos de dicho desinfectante, se realizó un ensayo control en el que las células de *H. pylori* se suspendieron en agua no clorada y se retiraron las muestras a T_0 y después de 20 y 30 minutos de incubación.

El análisis de viabilidad se realizó mediante cultivo. Para ello, se prepararon diluciones decimales seriadas a partir de la, concentración inicial de $10 \cdot 10^9$ UFC/mL del inóculo de trabajo. Las muestras se inocularon en placas de ASP siguiendo la técnica de siembra de punción (3 Å~ 20 µL) y siembra en superficie (100 µL), para determinar el número de células viables de *H. pylori*. Las placas

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

se incubaron a 37° C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. Después de su incubación se hizo el recuento celular y se calculó el promedio y la reducción logarítmica. Igualmente, las muestras fueron analizadas mediante la técnica molecular PMA-qPCR.

TRATAMIENTO DE CÉLULAS PLANCTÓNICAS DE *H. pylori* CON HIPOCLORITO DE SODIO



ANÁLISIS MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO

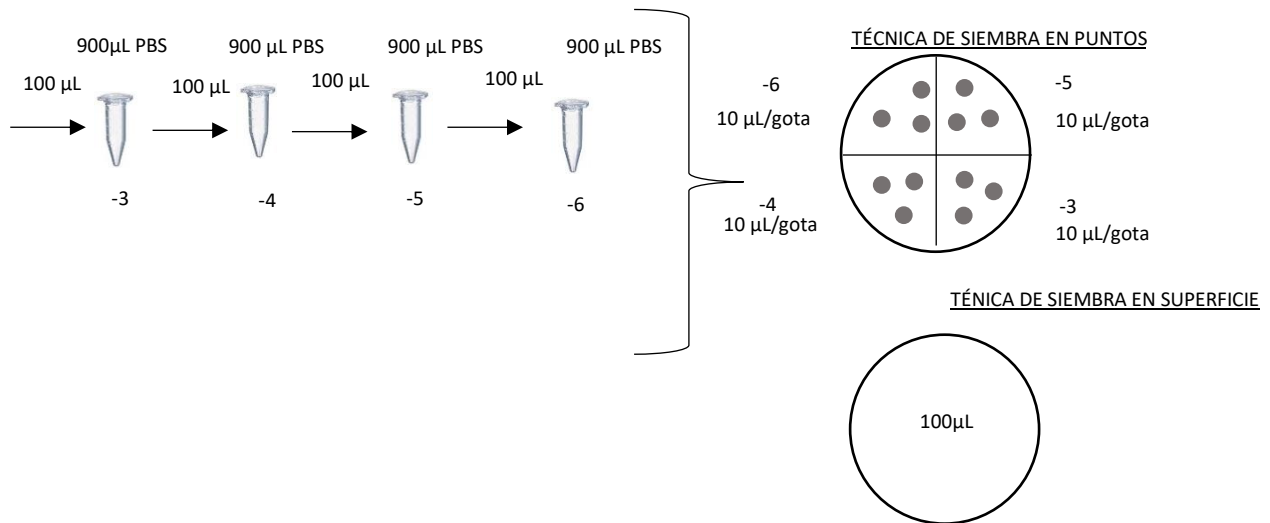


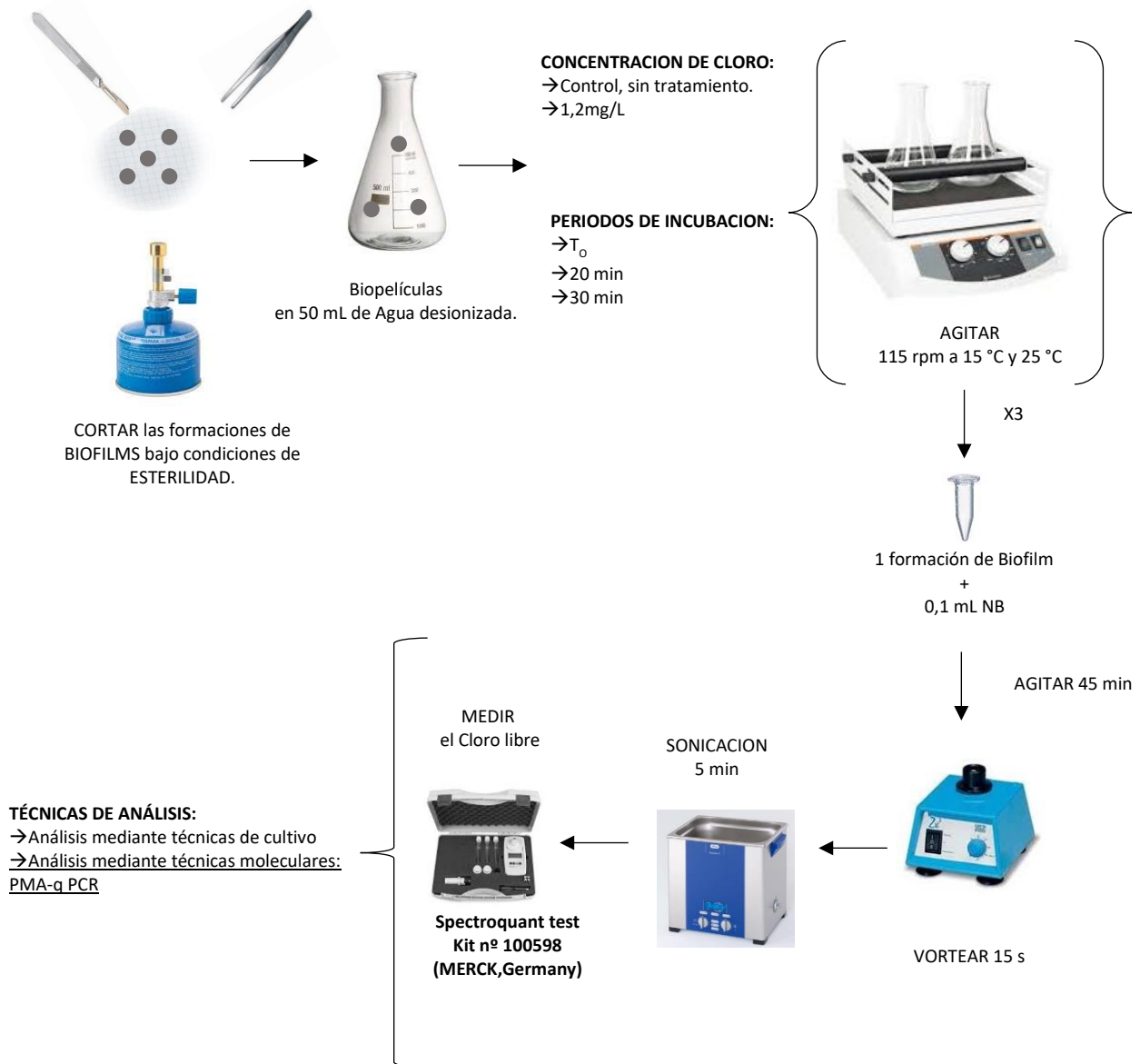
Figura 56: Protocolo de tratamiento de células planctónicas de *H. pylori* con hipoclorito de sodio.

Con respecto al tratamiento de las biopelículas con cloro (Figura 56), éstas se introdujeron en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de agua desionizada y se aplicaron las mismas condiciones descritas para las células planctónicas de *H. pylori*. Sin embargo, en este caso, después del periodo

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

de neutralización, las biopelículas se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 5 min para su disgregación. Posteriormente se prepararon diluciones decimales seriadas en PBS estéril para llevar a cabo el análisis de viabilidad por cultivo. Igualmente se analizó mediante la técnica molecular PMA-qPCR.

TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULAS DE *H. pylori* CON HIPOCLORITO DE SODIO.



Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

6.2.2.4 Análisis y modelización de los resultados

Para describir las curvas de supervivencia de las muestras analizadas mediante cultivo y PMA-qPCR, se empleó el modelo de distribución de Weibull (Mafart *et al.*, 2002).

Para ello, con los resultados de UFC/mL obtenidos durante el desarrollo experimental se calculó el promedio de las células viables para cada tratamiento de desinfección. Posteriormente, se calcularon los valores Log10, para homogeneizar los datos. A continuación, los datos se ajustaron a la distribución de Weibull (Mafart *et al.*, 2002) utilizando el Software Excel (Ec1):

$$\text{LOG}_{10}(N)=\text{LOG}_{10}(N_0) - ((t/\delta) **p) \text{ (Eq 1)}$$

De donde se obtuvieron dos parámetros: δ , que indica la velocidad de inactivación bacteriana y p , parámetro estadístico que indica la forma en que el microorganismo en estudio sobrevive a los tratamientos de desinfección, por tanto, la forma de distribución. Ambos parámetros se utilizan para calcular la distribución de frecuencias de resistencia, es decir el tiempo en el que la mayoría de la población muere o se inactiva.

6.2.3 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE qPCR

6.2.1 Extracción de DNA genómico

En todos los ensayos, el DNA de las biopelículas de *H. pylori*, se extrajo con el sistema de extracción de Dneasy® PowerSoil® Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las indicaciones del protocolo proporcionado por la casa comercial.

6.2.2 qPCR Específica de *H. pylori*

Se seleccionó un fragmento de 394 pb del gen *vacA*, que codifica para la toxina vacuolizante Vac de *H. pylori* (Capítulo 2). La reacción de qPCR se realizó en el termociclador MX300P (Stratagene, United State), utilizando el sistema comercial TYPE_IT HRN PCR KIT (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Se realizó la puesta a punto de la qPCR teniendo en cuenta diferentes temperaturas de unión de los iniciadores (60 °C- 62 °C) y tiempo de extensión (de 10 seg hasta 30 seg). Los análisis se llevaron a cabo con la cepa *H. pylori* KAK58, proporcionada por el Departamento de Microbiología Clínica, Hospital Universitario de Copenhagen, Denmark.

Tras varios ensayos con diferentes condiciones de amplificación, se establecieron como condiciones óptimas para la detección de *H. pylori*: 12,5 µL de Master Mix (Eva Green), 1,75 µL de cada uno de los iniciadores a 10 mM y 2 µL de DNA molde de cada muestra, en un volumen final de 25 µL. Estas condiciones fueron las que se aplicaron en todos los ensayos realizados en el presente estudio.

Tabla 29: Condiciones de qPCR para la detección de formación de biopelículas de *H. pylori*.

N° CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (hh:mm:ss)	FASES
1	95	00:10:00	Desnaturalización
55	95	00:00:30	Amplificación
	62	00:00:30	
	72	00:01:00	
1	95	00:01:00	Fusión
	72	00:00:15	
	95	00:00:30	
1	4	Continuo	Enfriamiento

Para el análisis cuantitativo se fijó una curva patrón (Figura 57), a partir de los datos proporcionados por el software MxPro QPCR para el sistema Mx300 mediante la herramienta Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmon, WA, USA). Para ello se utilizó, un cultivo puro en fase exponencial de *H. pylori* KAK58 y se realizó el recuento en placa de agar sangre piruvato de diluciones seriadas, para conocer su concentración inicial. A partir de 1 mL del inóculo inicial se realizó la extracción de DNA (apartado 6.2.3.1) y se cuantifico mediante el sistema Qubit™ 3.0 Fluorometer® (ThermoFisher Scientific).

Se generaron diluciones seriadas y de cada una de ellas se realizó la qPCR. A continuación, se compararon valores de fluorescencia y se determinaron los puntos de corte (Ct, cycle thershold).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

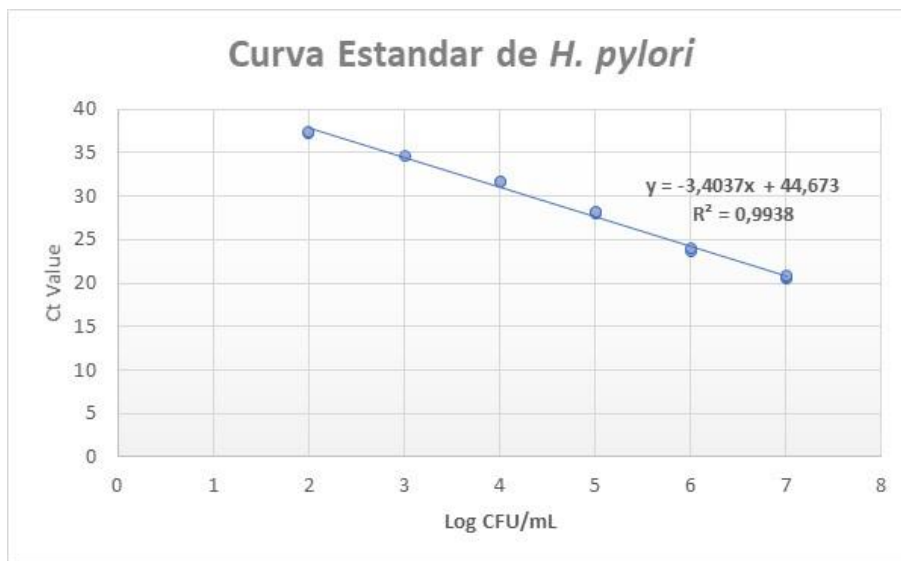


Figura 58: Curva patrón de *H. pylori*.

6.2.3 Detección e identificación de células viables de *H. pylori* mediante PMA-qPCR

Para la detección y diferenciación de células viables de *H. pylori* mediante PMA-qPCR, las muestras expuestas a los tratamientos desinfectantes y los controles del ensayo se trataron con PMA (Figura 58).

El PMA (Biotium, Hayward, CA) se disolvió en agua destilada estéril para obtener una concentración inicial de 2,5 mM, siguiendo las instrucciones del fabricante y se repartió en alícuotas que se almacenaron a -20 °C, en oscuridad. Previamente a realizar la PCR, se añadieron 25 µL de la solución de PMA a las alícuotas de 900 µL expuestas a los tratamientos de desinfección (UV e hipoclorito de sodio), para conseguir una concentración final de PMA de 25 µM. Las muestras se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad y agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo, se fotoactivaron durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 1300 rpm durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µL de PBS estéril. Las muestras se congelaron a -20 °C hasta la extracción de DNA y posterior análisis por qPCR (apartado 6.2.3.2).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULAS CON PMA

BIOPELÍCULAS. después del tratamiento con DESINFECTANTES (UV-C e hipoclorito de sodio).

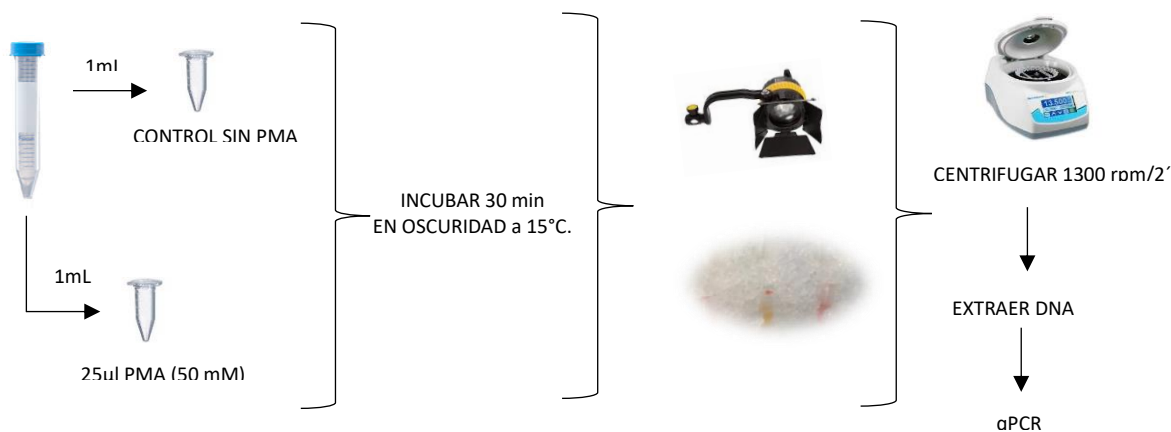


Figura 59: Tratamiento con PMA de biopelículas de *H. pylori* expuestas a tratamientos de desinfección.

6.2.4 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* EN BIOPELÍCULAS MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR)

6.2.4.1 Toma de muestras

Durante los años 2017 y 2018 se recogieron un total de 27 muestras de biopelículas procedentes del sistema de distribución de agua potable de la ciudad de Valencia.

La toma de muestras se realizó *in situ* y en todo momento bajo condiciones de esterilidad para evitar cualquier contaminación cruzada. Las muestras se recogieron utilizando un martillo de punta estéril para arrastrar las incrustaciones duras, fueron depositadas en un tubo estéril de 50 mL y se enviaron al laboratorio en condiciones de refrigeración para su posterior análisis.

6.2.4.2 Tratamiento de las muestras

Cuando las muestras se recibieron en el laboratorio, fueron analizadas inmediatamente. Inicialmente las muestras de biopelículas sólidas fueron homogeneizadas en tampón PBS, mediante agitación en vortex durante 10 minutos. A continuación, se llevó a cabo la extracción de DNA empleando el sistema comercial FastDNA Spin kit for soil (MP Biomedicals, Estados Unidos),

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

utilizando la Lysing Matrix E para la ruptura física de las células. Se siguieron las especificaciones del fabricante, eluyendo el DNA en un volumen final de 50 µL del tampón de elución. Posteriormente, se determinó la pureza del DNA, mediante el espectofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos) y su concentración se cuantificó usando el Qubit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, CA, Estados Unidos) y el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

6.2.4.3 qPCR

Para la detección e identificación de *H. pylori* con los iniciadores vacAR/vacAF en muestras ambientales de biopelículas se utilizaron las condiciones de amplificación descritas en el Capítulo 2.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 FORMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS

Se realizó un ensayo preliminar para comprobar si la cepa de referencia *H. pylori* CCUG 17874, incubada en condiciones idóneas de cultivo, oxígeno y temperatura tenía la capacidad de formar biopelículas. En la tabla 30 se observan los valores OD_{450nm} (media ± SD) obtenidos, que reflejaban el crecimiento bacteriano alcanzado.

Tabla 30: Densidad óptima alcanzada por las células de *H. pylori*, suspendidas en el medio de cultivo en las microplacas.

	Cont	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H19	H11	Cont
	0,049	1,074	1,019	1,006	0,995	0,871	0,969	0,989	0,815	0,919	1,015	0,049
	0,050	0,960	1,017	0,989	0,896	0,966	0,956	0,934	0,951	0,927	0,895	0,049
	0,049	1,235	1,000	1,018	0,916	0,961	1,033	1,033	0,987	0,896	0,897	0,049
	0,049	0,919	1,011	0,935	1,751	0,937	0,944	0,909	1,289	0,789	0,942	0,050
	0,050	1,034	1,094	1,062	1,184	0,848	0,781	0,948	1,004	0,958	0,973	0,052
	0,050	1,085	1,140	1,051	1,019	0,927	1,007	0,989	1,009	0,967	1,176	0,052
	0,049	1,066	1,134	1,115	1,074	0,999	1,084	1,049	1,034	0,987	1,113	0,052
	0,052	1,199	1,195	1,176	1,119	1,150	1,165	1,092	1,096	1,070	1,131	0,055
Media Control	0,050											
Media <i>H. pylori</i>	1,013											
SD	0,136											

Los valores de OD₅₇₀ “basic” y OD₅₇₀ “biofilm” se utilizaron para determinar el índice de formación de biopelículas por medio de la fórmula establecida BF=CW/AB. Se obtuvieron los valores OD₅₇₀ “basic” de 0,666 ± 0,127 y OD₅₇₀ “biofilm” de 3,134 ± 0,743.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Como resultado se obtuvo un índice de formación de biopelículas (FB) de *H. pylori* de $4,777 \pm 1,14$ (Tabla 31), valores que indican que *H. pylori* tiene una capacidad de formación de biopelículas “fuerte” en condiciones óptimas de cultivo, oxígeno y temperatura.

Tabla 31: Análisis cuantitativo de las células plantónicas OD450nm), células sésiles (OD570nm “biofilm”), cantidad de CV (OD570nm “basic”) e índice de formación de biopelículas de *H. pylori*.

Condiciones	OD _{450nm}	OD _{570nm} “basic”	OD _{570 nm} “biofilm”	FB
Medio de cultivo: 100%BB+SFB. Temperatura de incubación: 37°C. Condiciones anaeróbicas	$0,963 \pm 0,136$	$3,134 \pm 0,743$	$0,666 \pm 0,127$	$4,777 \pm 1,14$

* Los resultados corresponden a la media \pm SD, calculados a partir de los valores obtenidos mediante el software Thermo Scientific Skanlt. Ensayo en condiciones idóneas de cultivo.

Para analizar el efecto de las condiciones ambientales en la formación de las biopelículas, se utilizaron tres medios nutricionales diferentes durante 24 horas. Al comparar los valores de FB obtenidos por *H. pylori* NCTC 11637 en cada medio de cultivo (Figura 60), se observó que *H. pylori* tiene una capacidad formadora “fuerte” ($3,500 \pm 0,844$) (Tabla 32) cuando el cultivo es óptimo, dato que corrobora los resultados obtenidos en el ensayo preliminar. Sin embargo, cuando se modificó la composición del medio de cultivo su capacidad de formar biopelículas disminuyó. La Tabla 32 muestra que *H. pylori* desarrolló una capacidad moderadamente formadora ($-0,032 \pm 12,191$) y ($0,359 \pm 0,889$). Los resultados negativos obtenidos indican ausencia de crecimiento celular.

Además, la OD_{450nm} ($1,253 \pm 0,034$) muestra el crecimiento óptimo de células planctónicas cuando *H. pylori* se cultivó en un medio de cultivo enriquecido únicamente por caldo Brucella y suero fetal bovino.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Tabla 32: Análisis cuantitativo de las células planctónicas (OD_{450nm}), células sésiles (OD_{570nm} “biofilm”), cantidad de CV (OD_{570nm} “basic”) e índice de formación de biopelículas de *H. pylori*. Los resultados corresponden a la media ± SD, calculados a partir de los valores obtenidos mediante el software Thermo Scientific Skanlt. I. Incubación bajo condiciones anaeróbicas y limitación nutricional.

Condiciones nutricionales	OD _{450nm}	OD _{570nm} “basic”	OD _{570 nm} “biofilm”	FB
100%BB_FBS	1,253 ± 0,034	0,870 ± 0,030	0,260 ± 0,054	3,500 ± 0,844
10%BB_FBS + NaCl ₂	0,146 ± 0,018	0,107 ± 0,014	0,058 ± 0,044	-0,032 ± 12,191
1%BB_FBS + NaCl ₂	-0,009 ± 0,001	-0,08 ± 0,001	-0,055 ± 0,018	0,359 ± 0,889

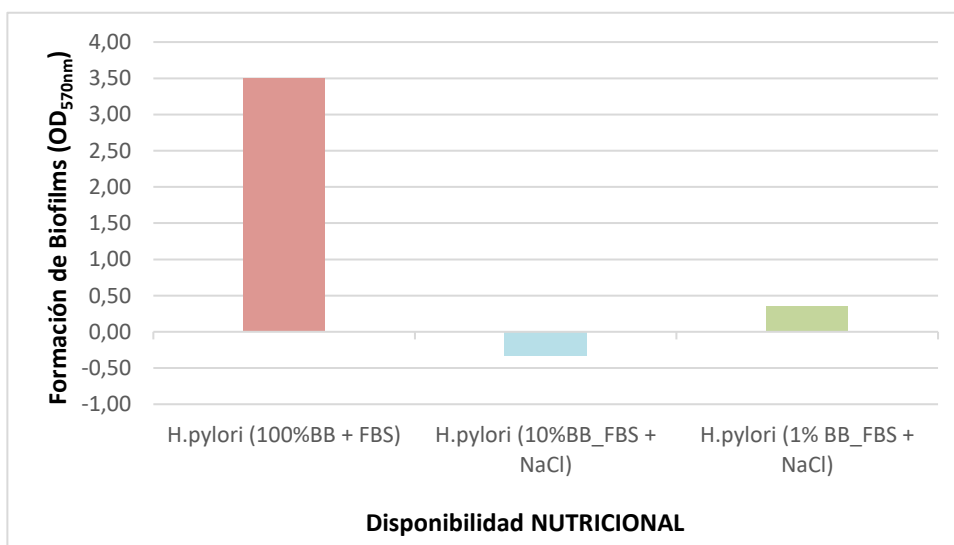


Figura 60: Formación de Biopelículas (FB) de *H. pylori*. Placas incubadas con limitación nutricional a 37 °C, en condiciones anaeróbicas.

Con respecto a las células planctónicas de *H. pylori*, los valores OD_{450nm} (1,033 ± 0,049) solo muestran crecimiento celular cuando las placas se incubaron en un cultivo óptimo.

Para evaluar si *H. pylori* requiere oxígeno para formar biopelículas, las placas de microtitulación se incubaron a 37 °C durante 24 horas, bajo condiciones aeróbicas, considerando, además, distintas composiciones nutricionales del cultivo. La Tabla 33 muestra que *H. pylori* presenta un índice FB fuertemente formador en los tres ensayos realizados, siendo mayor cuando

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

se incubó en un medio de cultivo compuesto por 10% de Caldo Brucella con suero fetal bovino y NaCl al 0,9% (Figura 61).

Tabla 33: Análisis cuantitativo de las células planctónicas (OD_{450nm}), células sésiles (OD_{570nm} “biofilm”), cantidad de CV (OD_{570nm} “basic”) e índice de formación de biopelículas de *H. pylori*. Los resultados corresponden a la media ± SD, calculados a partir de los valores obtenidos mediante el software Thermo Scientific Skanlt. Incubación bajo condiciones aeróbicas y limitación nutricional.

Condiciones nutricionales	OD _{450nm}	OD _{570nm} “basic”	OD _{570 nm} “biofilm”	FB
100%BB_FBS	1,033 ± 0,049	0,870 ± 0,048	0,691 ± 0,179	1,328 ± 0,296
10%BB_FBS+90%NaCl ₂	0,274 ± 0,039	0,238 ± 0,034	0,124 ± 0,038	2,744 ± 3,706
1%BB_FBS+99%NaCl ₂	0,050 ± 0,018	0,042 ± 0,016	0,025 ± 0,013	1,065 ± 4,732

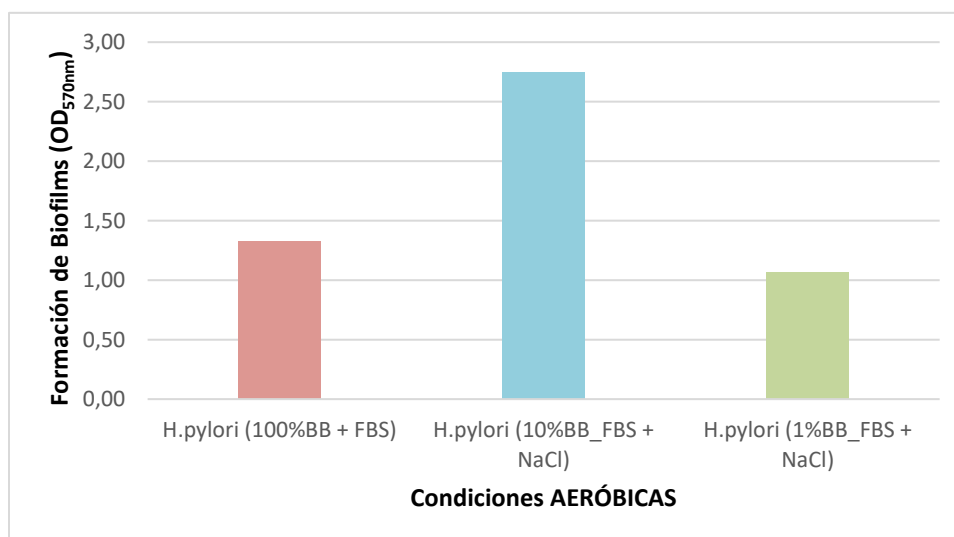


Figura 61: Formación de Biopelículas (FB) de *H. pylori*. Placas incubadas con limitación nutricional 37°C, en condiciones aeróbicas.

Del mismo modo, para evaluar si la temperatura afecta a la formación de biopelículas de *H. pylori*, se preparó una suspensión celular estandarizada de *H. pylori* y las placas se incubaron bajo condiciones de aerobiosis a 15 °C y 5 °C, bajo distintas condiciones de composición de los cultivos y disponibilidad de oxígeno, como en los ensayos anteriores. Los valores negativos de las Tablas 34 y 35, muestras que *H. pylori* no tiene capacidad formadora de biopelículas bajo las condiciones descritas (Figura 62 y 63).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

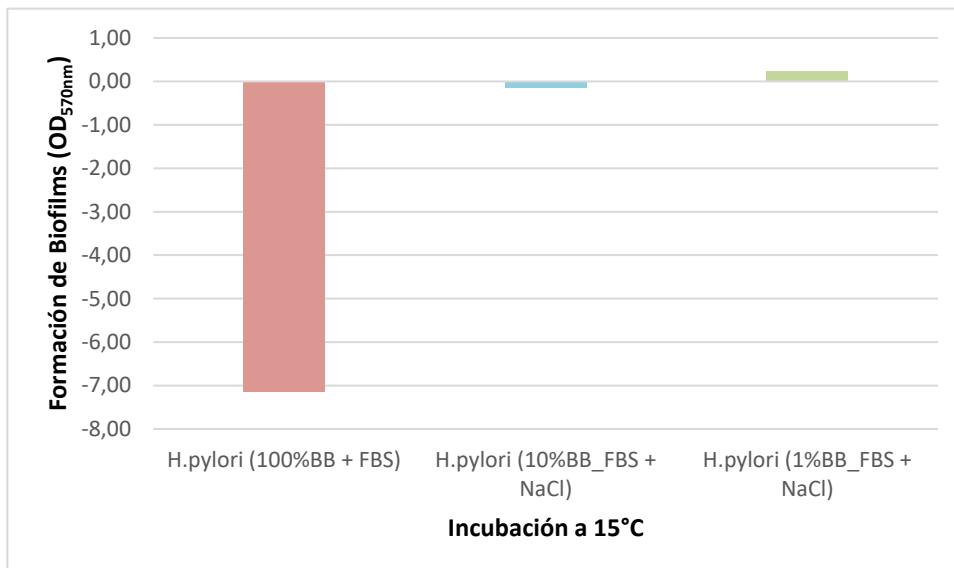


Figura 62: Formación de Biopelículas (FB) de *H. pylori*. Placas incubadas a 15 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.

Tabla 34: Análisis cuantitativo de las células planctónicas (OD_{450nm}), células sésiles (OD_{570nm} “biofilm”), cantidad de CV (OD_{570nm} “basic”) e índice de formación de biopelículas de *H. pylori*. Los resultados corresponden a la media ± SD, calculados a partir de los valores obtenidos mediante el software Thermo Scientific Skanlt. Placas incubadas a 15 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.

Condiciones nutricionales	OD _{450nm}	OD _{570nm} “basic”	OD _{570 nm} “biofilm”	FB
100%BB_FBS	0,505±0,037	0,320±0,024	-0,060±0,022	-7,138±6,177
10%BB_FBS+90%NaCl ₂	0,017±0,004	0,090±0,003	-0,062±0,017	-0,159±0,095
1%BB_FBS+99%NaCl ₂	-0,01±0,001	-0,008±0,001	-0,053±0,023	0,236±0,347

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Tabla 35: Análisis cuantitativo de las células planctónicas (OD450nm), células sésiles (OD570nm “biofilm”), cantidad de CV (OD570nm “basic”) e índice de formación de biopelículas de *H. pylori*. Los resultados corresponden a la media \pm SD, calculados a partir de los valores obtenidos mediante el software Thermo Scientific SkanIt. Placas incubadas a 5 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.

Condiciones nutricionales	OD _{450nm}	OD _{570nm} “basic”	OD _{570 nm} “biofilm”	FB
100%BB_FBS	0,451 \pm 0,085	0,282 \pm 0,051	-0,111 \pm 0,042	-2,942 \pm 1,342
10%BB_FBS+90%NaCl ₂	0,124 \pm 0,266	0,097 \pm 0,226	-0,112 \pm 0,042	-0,961 \pm 2,160
1%BB_FBS+99%NaCl ₂	-0,016 \pm 0,001	-0,013 \pm 0,001	-0,117 \pm 0,033	0,127 \pm 0,063

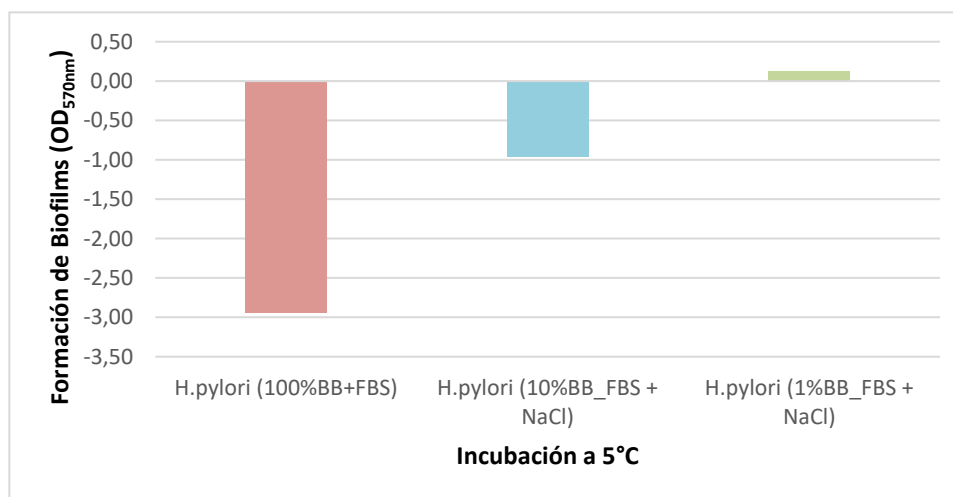


Figura 63: Formación de Biopelículas (FB) de *H. pylori*. Placas incubadas a 5 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.

6.3.2 TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

6.1 Tratamiento con UV

Para evaluar la resistencia de *H. pylori* frente a tratamientos de desinfección basados en el uso de radiación UV, las formas celulares planctónicas y sésiles fueron expuestas durante un periodo de tiempo calculado a diferentes dosis de radiación. El análisis de la viabilidad se realizó mediante técnicas de cultivo y moleculares. Las células planctónicas de *H. pylori*, fueron expuestas a diferentes dosis: 20, 40, 60, 80, 100, 250 y 493. El crecimiento de células de *H. pylori* fue visible a partir del segundo día de incubación, cuando el inóculo inicial sin tratamiento (control) contenía aproximadamente $10 \cdot 10^8$ UFC/mL. Se observó crecimiento bacteriano en las placas hasta la dosis 100. Con el recuento celular, se realizó una modelación Tipo Weibull. Se estimó un solo *p*-valor de

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

acuerdo con una regresión no lineal utilizando el programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmon, WA, USA).

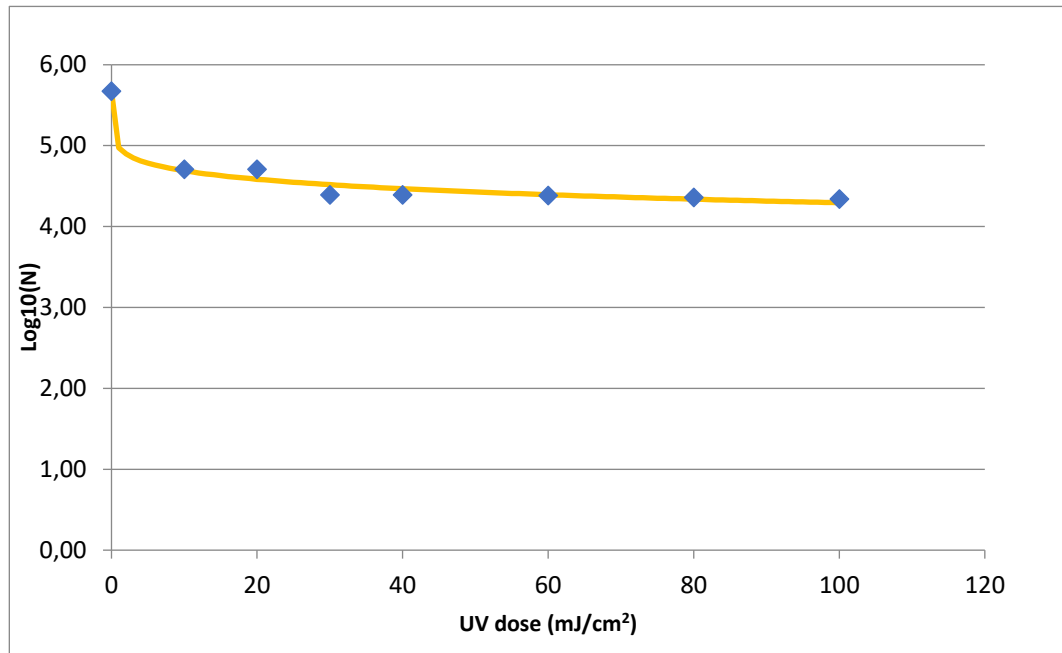


Figura 64: Curva de inactivación de células planctónicas de *H. pylori* a diferentes influencias de dosis de radiación UV.

La Figura 64 muestra la curva de inhibición de *H. pylori* a diferentes dosis de UV. Para el caso de los controles, el inóculo sin ser expuesto a radiación UV presentó valores inferiores a 10×10^6 UFC/mL. La curva muestra convexidad, caracterizada por una pequeña disminución de carga bacteriana cercana a 2 órdenes logarítmicas, que posteriormente se hace menos pronunciada, provocada por una disminución de la velocidad de inactivación directamente proporcional al incremento del tiempo de exposición a radiación UV.

La tabla muestra los valores de los parámetros de la distribución de Weibull: el valor del coeficiente de regresión $r^2=0,969$ y una raíz del cuadrado medio del error $RMSE=0,048$. El alto valor de r^2 y el bajo de $RMSE$ nos indican un buen ajuste del modelo utilizado.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Se calcularon los parámetros $\log N_0$, δ y p-valor. El valor $\delta = 1,15$ indica el primer tiempo de reducción que conlleva a la reducción de la décima parte de la población viable, que tuvo lugar durante el tiempo de exposición a una dosis de 20 mJ/cm^2 . El p-valor=0,06 indica una tasa de inactivación decreciente, mostrando una regresión no lineal lo que concuerda con los resultados de la Figura 63.

Tabla 36: Parámetros de la distribución de Weibull para células planctónicas de *H. pylori* expuestas a diferentes influencias de radiación UV.

Cepa	Δ	p	$\log N_0$	r^2	RMSE
<i>H. pylori</i>	$1,15 \pm 1,22$	$0,06 \pm 0,01$	$5,67 \pm 0,05$	0,97	0,97

El experimento realizado mediante cultivo indica una reducción del recuento de colonias hasta una dosis de 100 mJ/cm^2 . Con respecto las dosis 250 mJ/cm^2 y 493 mJ/cm^2 , su aplicación produjo ausencia total de crecimiento (formación de colonias) de *H. pylori* transcurrido el periodo de incubación.

Al mismo tiempo, se realizó el análisis de viabilidad mediante la técnica molecular PMA-qPCR, utilizando los iniciadores descritos por Santiago *et al.* (2015). La curva estándar lineal se construyó trazando el logaritmo de la cantidad de DNA conocida frente al valor de C_q de qPCR y la regresión lineal se calculó como $y = -3,4683x + 45,053$ con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,99$. Esta curva estándar se usó para cuantificar las células viables y valores de reducción de células \log_{10} entre células no tratadas y tratadas con el agente intercalante de DNA.

Todas las muestras analizadas presentaron amplificación de los fragmentos específicos del gen *vacA* de *H. pylori* tras el análisis de qPCR (Tabla 37). Como se observa en la Figura 64, no hubo diferencias en el número de copias de DNA de células planctónicas de *H. pylori* tratadas y sin tratar con PMA, expuestas a diferentes dosis de radiación UV. Los resultados indican, como se confirma en el Capítulo 2, que el PMA no es capaz de discriminar totalmente entre células viables y no viables.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Tabla 37: Parámetros estadísticos de la inactivación de células planctónicas de *H. pylori* con radiación UV.

Dosis	qPCR	PMA-qPCR	ST	STD_PMA
	Log UFC	LogUFC_PMA		
DO	6,01	5,78	0,06	0,40
D40	5,89	5,55	0,17	0,17
D60	5,89	5,52	0,41	0,41
D80	5,71	5,66	0,24	0,24
D100	5,71	5,49	0,01	0,01
D250	5,66	5,51	0,41	0,41
D493	5,65	5,46	0,06	0,06

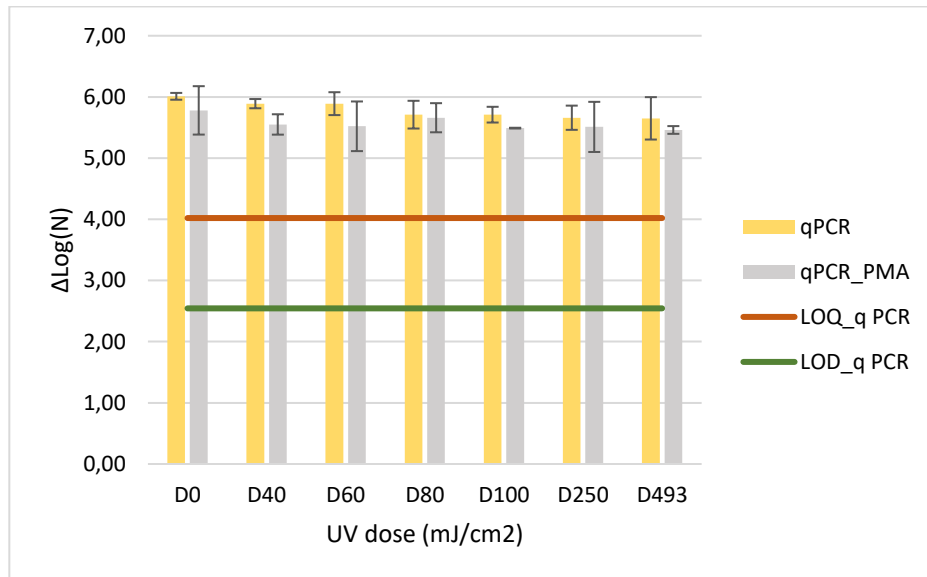


Figura 65: Efecto de la radiación UV en la supervivencia de células planctónicas de *H. pylori*. LOD: 2,54 y LOQ: 4,02.

Respecto a las biopelículas, el inóculo de trabajo fue ajustado a una concentración aproximadamente de $10 \cdot 10^8$ UFC/mL. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las células planctónicas de *H. pylori*, se incrementaron las dosis de radiación UV: 500, 1.000, 1.500, 2.000,

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

2.500, 3.420, 6.840, 10.260, 13.680 (mJ/cm²). La resistencia de biopelículas de *H. pylori* frente al tratamiento de desinfección fue evaluado de nuevo mediante técnicas de cultivo y técnicas moleculares. Con los valores obtenidos mediante técnicas de cultivo se realizó una modelación de Tipo Weibull como en el ensayo anterior.

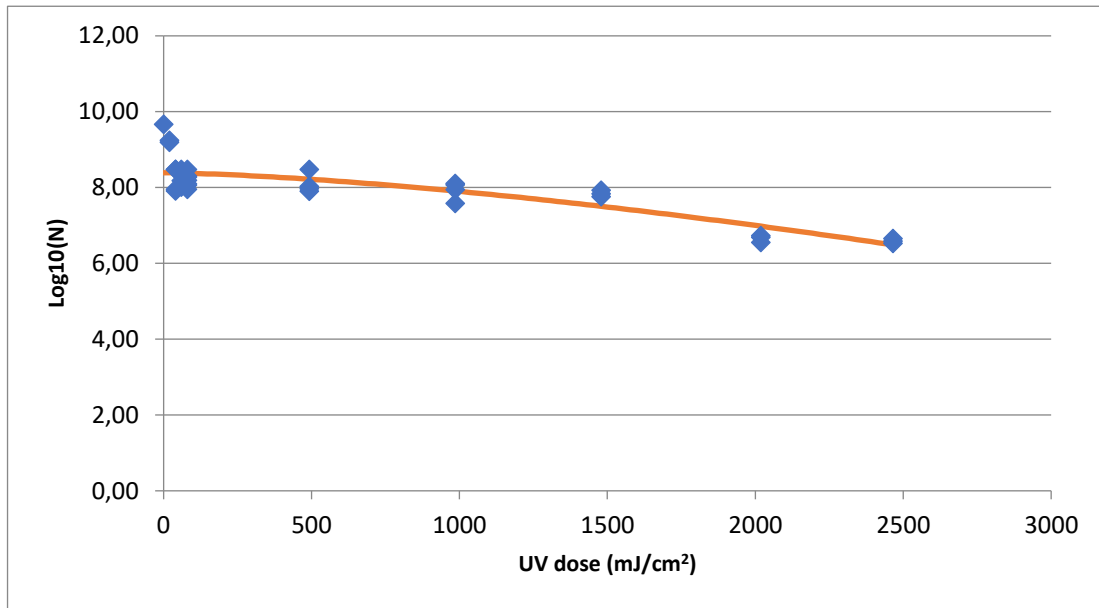


Figura 66: Curva de inactivación de Biopelículas de *H. pylori* a diferentes dosis de radiación UV.

La Figura 66 muestra la curva de inhibición de biopelículas de *H. pylori* de las muestras que presentaron crecimiento en medio de cultivo tras ser expuestas a radiación UV. Se caracteriza por una pequeña disminución de la carga bacteriana cercana a los 2 órdenes logarítmicos, con una dosis de 500 mJ/cm². Se produce una inactivación de biopelículas de *H. pylori* directamente proporcional al incremento de tiempo de exposición a radiación UV y la disminución alcanza hasta 3 órdenes logarítmicas con una dosis de 2.500 mJ/cm².

La Tabla 38 muestra los valores de los parámetros de la distribución de Weibull: el valor del coeficiente de regresión $r^2=0,91$ y una raíz del cuadrado medio del error RMSE=0,041. El alto valor de r^2 y el bajo de RMSE nos indican un buen ajuste del modelo utilizado.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Se calcularon los parámetros $\log N_0$, δ and p-valor. El valor $\delta = 1606,68$ indica tiempo de reducción que conlleva a la reducción de la décima parte de la población sobreviviente, que tuvo lugar de manera progresiva hasta una influencia de 15.00 mJ/cm^2 . Respecto al p-valor > 1 indica una curva de supervivencia descendente cóncava.

Tabla 38: Parámetros de la distribución de Weibull para Biopelículas de *H. pylori* expuestas a diferentes dosis de radiación UV.

Cepa	Δ	p	$\log N_0$	r^2	RMSE
<i>H. pylori</i>	$1606,68 \pm 195,51$	$1,50 \pm 0,41$	$8,39 \pm 0,10$	0,91	0,041

El análisis de viabilidad mediante PMA-qPCR permitió la detección de células viables de *H. pylori* en las biopelículas que no pudieron ser detectadas mediante técnicas de cultivo, indicando la presencia de células viable no cultivable (VBNC), correspondiente a las dosis de radiación UV más elevadas analizadas en el presente estudio (3.420 mJ/cm^2 , 6.840 mJ/cm^2 , 10.260 mJ/cm^2 y 13.680 mJ/cm^2) (Tabla 39).

En la Figura 67 se observa que los valores resultados obtenidos utilizando PMA previamente a la qPCR descienden a partir de una D6840 respecto a los utilizados sin PMA.

Tabla 39: Parámetros estadísticos de la inactivación de formación biopelículas de *H. pylori* con radiación UV.

Dosis	qPCR	PMA-qPCR	ST	STD_PMA
	Log UFC	LogUFC_PMA		
DO	5,81	5,48	0,15	0,14
D3.420	5,69	5,43	0,12	0,01
D6.840	5,58	3,31	0,04	0,20
D10.260	5,54	3,32	0,12	0,06
D13.680	5,53	3,34	0,30	

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

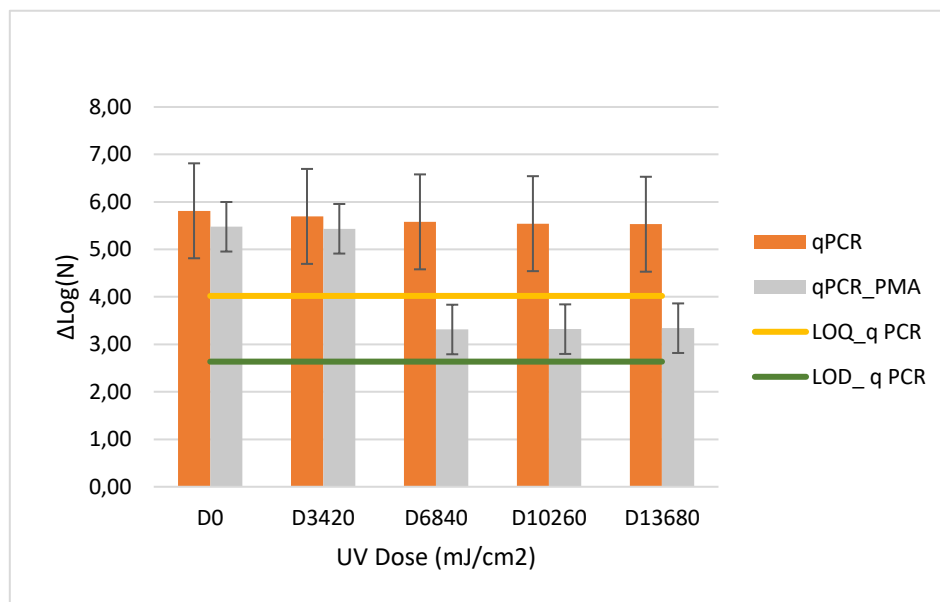


Figura 67: Efecto de la radiación UV en la supervivencia de biopelículas de *H. pylori*. LOD: 2,64 y LOQ:4,02.

6.2 Tratamiento con hipoclorito de sodio

Para determinar la viabilidad de *H. pylori* frente al hipoclorito de sodio, las células planctónicas y sésiles de un cultivo puro de una concentración aproximada de $10 \cdot 10^8$ UFC/mL se expusieron a una concentración final de 1,2 mg/L. Se tuvo en cuenta el tiempo de incubación (20 y 30 minutos) y la temperatura (15 °C y 25 °C). El estudio de viabilidad se realizó mediante técnicas de cultivo y moleculares (PMA-qPCR).

El ensayo mostró que *H. pylori* sobrevivía a una temperatura de incubación de 15 °C, ya que se observó crecimiento tanto de células planctónicas como sésiles (Tabla 39), incluso tras un periodo de incubación de 2 y 3 días. Los valores obtenidos permitieron realizar un modelo de regresión (Figura 67). En la muestra control con hipoclorito de sodio tomada en t_0 , se observó mediante técnicas de cultivo una reducción de aproximadamente 1 log (Tabla 39) para células planctónicas con respecto al inóculo inicial (sin tratamiento de desinfección). Teniendo en cuenta los tiempos de incubación de 20 y 30 minutos, no hubo disminución en el número de células viables planctónicas.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Sin embargo, sí que se experimentó un descenso brusco inicial, ya que los valores promedio ($\Delta\log$) en la reducción logarítmica entre el T_0 y 20 min, con respecto al inóculo control fueron diferentes.

Sin embargo, con respecto a las biopelículas los resultados obtenidos (Tabla 40) mediante cultivo no mostraron diferencias entre los parámetros evaluados, sugiriendo resistencia de las biopelículas frente a las condiciones de hipoclorito de sodio evaluadas.

Tabla 40: Inactivación de *H. pylori* con hipoclorito de sodio a 1,2 mg/mL y temperatura de incubación de 15 °C.

	Tiempo (min)	LogUFC/mL	STD	$\Delta\log(N)$
Inóculo Control		7,78	0,65	
Células Planctónicas	0	6,41	0,14	-1,37
	20	6,36	0,25	-1,42
	30	6,16	0,10	-1,62
Inóculo Control		7,87	0,62	
Biopelículas	0	7,63	0,18	-0,24
	20	7,13	0,51	-0,74
	30	7,10	0,57	-0,77

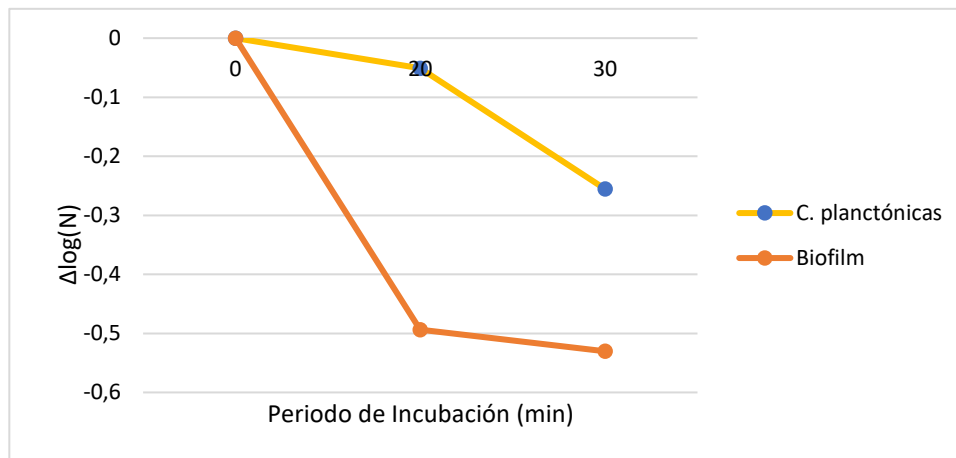


Figura 68: Inactivación de *H. pylori* con hipoclorito de sodio a 1,2 mg/mL y temperatura de incubación de 15 °C.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Respecto al análisis mediante PMA-qPCR (Tabla 41), no se observó diferencia relevante entre las células con y sin tratamiento con PMA, independientemente de su forma celular (plantónica o biopelícula) (Figura 69 y 70): Los valores muestran una reducción poco notable de aproximadamente 1 log de células planctónicas y sésiles expuestas, con respecto al inóculo control,

una concentración de hipoclorito de sodio de 1,2 mg/mL e incubadas a 15 °C durante 30 min (Figura 69).

Tabla 41: Parámetros estadísticos de la inactivación de células planctónicas de *H. pylori* con radiación hipoclorito de sodio 1,2 mg/mL y una temperatura de incubación de 15 °C.

Muestra	Periodo de incubación (min)	qPCR	PMA-qPCR	ST	STD_PMA
		Log UFC	LogUFC_PMA		
Inóculo Control		6,65	6.46	0.10	0.04
Células planctónicas	0	6,24	6,18	0,11	0,40
	20	5,93	5,92	0,76	0,17
	30	5,81	5,69	0,38	0,41
Inóculo control		7.16	6.80	0.21	0.10
Biopelículas	0	6,11	6,09	0,09	0,27
	20	6,25	6,02	0,02	0,01
	30	5,67	5,49	0,01	0,41

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

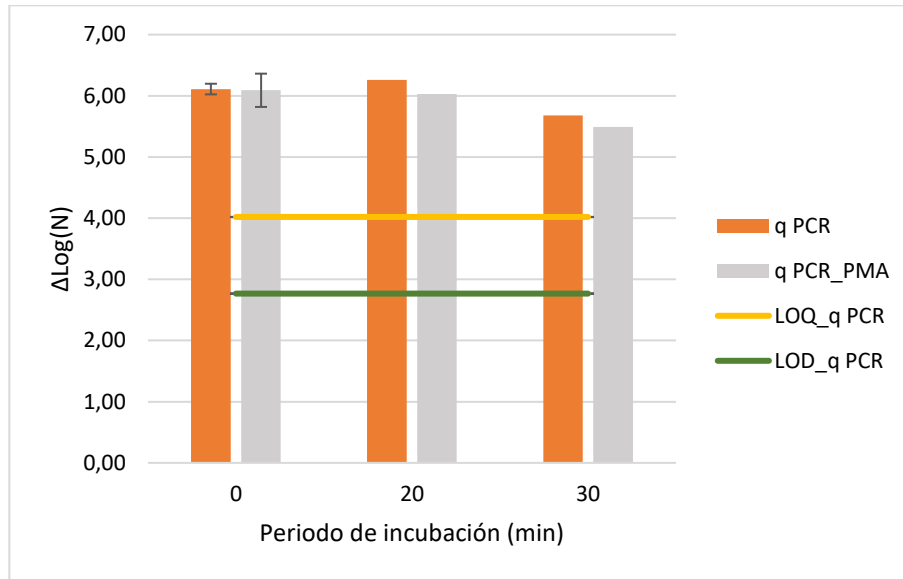


Figura 69: Inactivación de células plánticas de *H. pylori* con hipoclorito de sodio (1,2 mg/mL) y una temperatura de incubación de 15 °C. LOQ: 4,02 y LOD: 2,77.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

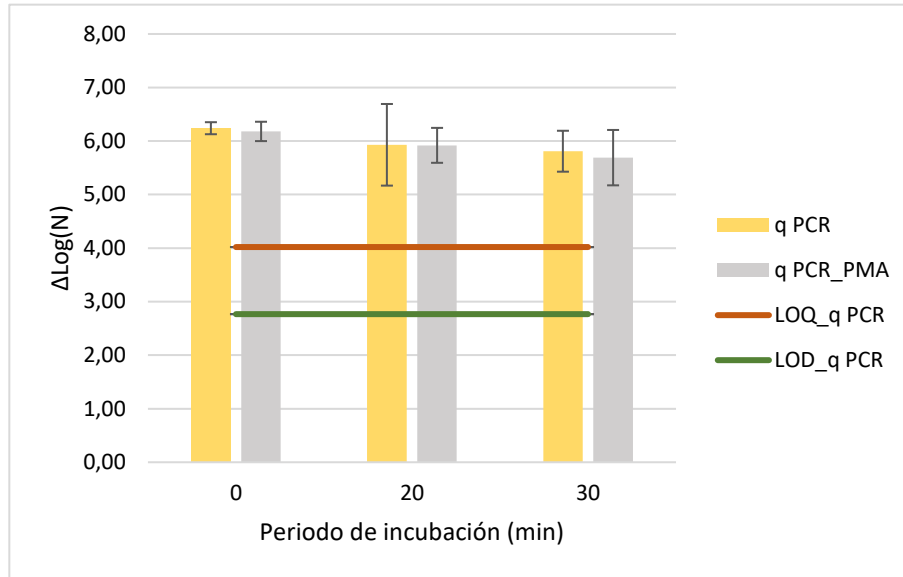


Figura 70: Inactivación de Biopelículas de *H. pylori* con hipoclorito de sodio (1,2 mg/mL) y una temperatura de incubación de 15 °C. LOQ: 4,02 y LOD: 2,77.

Tras el ensayo de desinfección realizado a una temperatura de incubación de 25 °C bajo las condiciones descritas con anterioridad, se observó crecimiento de células planctónicas y sésiles después de 2 a 3 días de incubación. Los valores obtenidos permitieron realizar un modelo de regresión lineal mediante el programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmon, WA, USA). En la muestra tomada en t_0 , en la que se agregó hipoclorito de sodio se obtuvo mediante técnicas de cultivo una reducción de aproximadamente 1 Log (Tabla 42) para células planctónicas y sésiles, con respecto al inóculo inicial, indicando un ligero descenso de células viables al primer contacto con el desinfectante. Teniendo en cuenta los tiempos de incubación de 20 y 30 minutos, tuvo lugar una disminución 1,31 y 1,4 log con respecto al inóculo control sin tratamiento para células planctónicas. Valores similares se obtuvieron en el caso de las biopelículas. Para ambas formas estudiadas se observó una disminución de células viables proporcional al periodo de incubación del tratamiento de desinfección (Figura 71).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Tabla 42: Inactivación de *H. pylori* con una concentración de hipoclorito de sodio de 1,2 mg/mL a 25 °C.

	Tiempo (min)	LogUFC/mL	STD	$\Delta\log(N)$
Inóculo Control		7,15	0,59	
Células Planctónicas	0	6,28	0,19	-0.87
	20	5,84	0,31	-1.31
	30	5,75	0,35	-1.4
Inóculo Control		7,81	0,80	
Biopelículas	0	7,15	0,36	-0,66
	20	6,72	1,19	-1,09
	30	6,70	1,19	-1,11

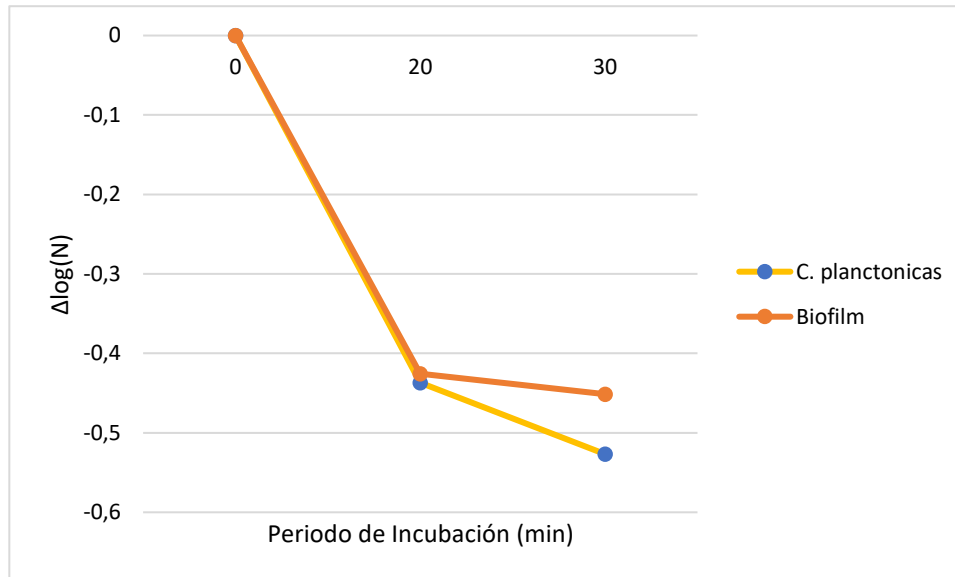


Figura 71: Inactivación de *H. pylori* con hipoclorito de sodio a 1,2 mg/mL y temperatura de incubación de 25 °C.

En el análisis con PMA-qPCR no se observaron diferencias relevantes entre células planctónicas y biopelículas viables tratadas con hipoclorito de sodio, aunque las concentraciones de DNA obtenidas mediante PMA-qPCR fueron ligeramente menores en comparación con las muestras sin ser tratadas con PMA. En todos los ensayos, el promedio $\Delta\log$ de las muestras tratada con hipoclorito de sodio con respecto al inóculo control fue similar: aproximadamente se redujo 1Log, mostrando células no viables tras su exposición al desinfectante (Tabla 43).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Tabla 43: Parámetros estadísticos de la inactivación de células planctónicas de *H. pylori* con radiación hipoclorito de sodio 1,2 mg/mL y una temperatura de incubación de 25 °C.

Muestra	Periodo de incubación (min)	qPCR	PMA-qPCR	ST	STD_PMA
		Log UFC	LogUFC_PMA		
Inóculo Control		7,09	6,67	0,23	0,22
Células planctónicas	0	6,34	6,35	0,36	0,52
	20	6,54	6,23	0,44	0,39
	30	6,58	6,03	0,61	0,49
Inóculo Control		7,02	6,79	0,37	0,09
Biopelículas	0	7,27	6,61	0,86	0,60
	20	6,97	6,80	1,14	1,16
	30	6,79	6,10	1,24	0,98

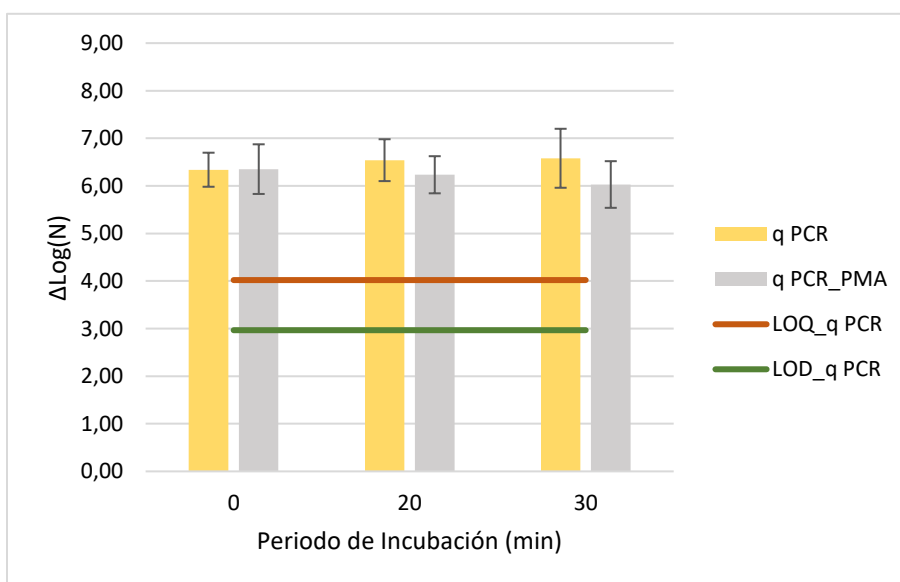


Figura 72: Inactivación de células planctónicas de *H. pylori* con hipoclorito de sodio (1,2mg/mL) y una temperatura de incubación de 25 °C. LOQ: 4,02 y LOD: 2,97.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

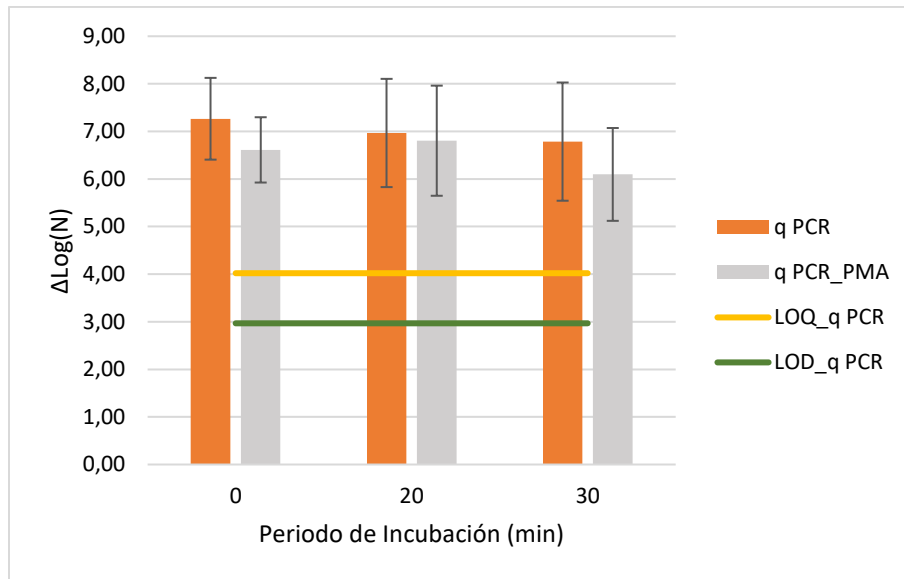


Figura 73: Inactivación de Biopelículas de *H. pylori* con hipoclorito de sodio (1,2 mg/mL) y una temperatura de incubación de 25 °C. LOQ: 4,02 y LOD: 2,97.

6.3 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori* MEDIANTE qPCR EN MUESTRAS DE BIOPELÍCULAS

El análisis de las muestras de biopelículas procedentes del sistema de distribución de agua potable mediante qPCR se llevó a cabo sin un tratamiento previo con PMA, debido a que en los ensayos anteriores con biopelículas experimentales los resultados obtenidos no mostraron diferencias entre las muestras con y sin PMA.

Se consideraron potencialmente positivas todas las muestras cuyos valores T_m estaban comprendidos entre 84,5 y 86,6 (Figura 75). El porcentaje de detección de *H. pylori* mediante qPCR fue del 23% (7/27) (Tabla 44). En 5 de las muestras positivas fue posible cuantificar la presencia de *H. pylori* con valores de C_t dentro del rango entre 29 y 34 ciclos (Figura 74), correspondientes a concentraciones entre $7,32 \cdot 10^1$ y $1,16 \cdot 10^1$ unidades genómicas/mL (Tabla 44). En el resto de las muestras no se cuantificó la presencia de *H. pylori* porque presentaron un valor de C_t por encima del umbral de fiabilidad (>35).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Los productos resultantes de la qPCR fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. En todos ellos se observó la banda correspondiente al fragmento específico de 395 pb de *H. pylori* (Figura 75).

Tabla 44: Detección de *H. pylori* en Biopelículas mediante qPCR.

Nº DE MUESTRA	ID DE MUESTRA	H. pylori qPCR	H. pylori qPCR (GU/mL)
1	B4	+	2,97*10 ¹
2	B5	+	7,32*10 ¹
3	B6	-	-
4	B7	-	-
5	B8	+	5,44*10 ¹
6	B10	-	-
7	B11	-	-
8	B12	-	-
9	B13	-	-
10	B14	-	-
11	B15	-	-
12	B16	-	-
13	B17	-	-
14	B19	-	-
15	B20	+	-
16	B21	+	1,16*10 ¹
17	B22	-	-
18	B23	-	-
19	B24	-	-
20	B25	-	-
21	B26	-	-
22	B27	-	-
23	B28	-	-
24	B30	-	-
25	B31	+	2,74*10 ¹
26	B32	-	-
27	B33	+	-

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

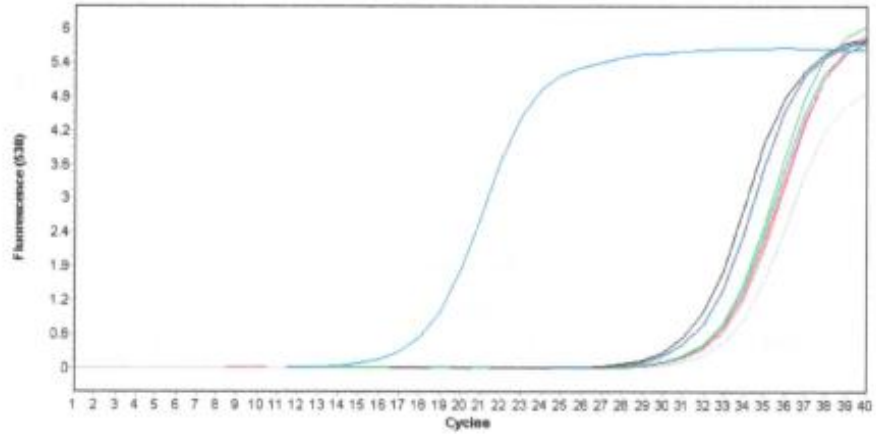


Figura 74: Curvas de amplificación del gen *vacA* de *H. pylori* en muestras de Biopelículas.

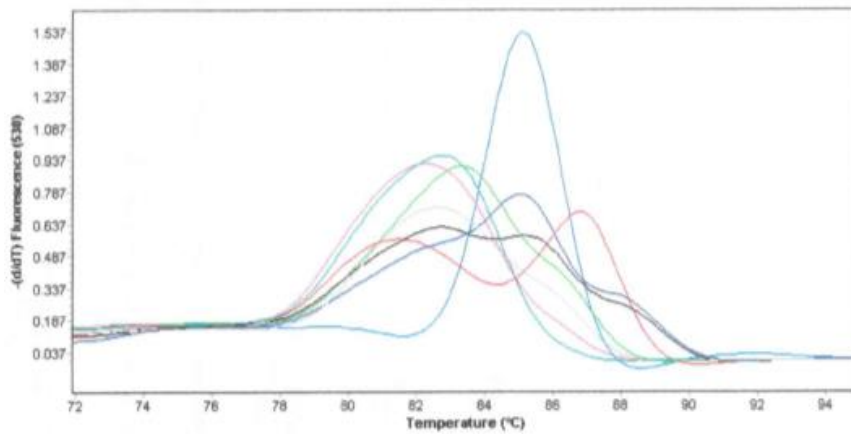


Figura 75: T_m de los iniciadores *vacA* en muestras de Biopelículas.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

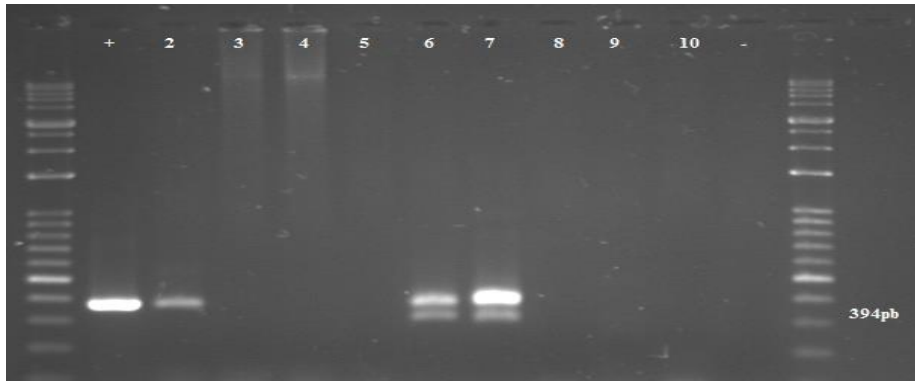


Figura 76: Detección de *H. pylori* en Biopelículas por electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Control positivo (+): *H. pylori* NCTC 11637; Control negativo (-); Marcador de 100pb.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

6.4 DISCUSIÓN

Actualmente el modo de transmisión de *H. pylori* sigue sin ser evidente, aunque todas las investigaciones apoyan tanto la ruta fecal-oral como la oral-oral (Leja *et al.*, 2016). Sin embargo, existe el convencimiento de que el agua contaminada desempeña un papel clave en la transmisión de *H. pylori* (Farhadkani *et al.*, 2019). *H. pylori* puede sobrevivir en diferentes tipos de agua durante días e incluso semanas a temperaturas comprendidas entre 4 °C y 15 °C, en un amplio rango de pH (Waskito *et al.*, 2018). Aunque la mayoría de estas observaciones se centran en la detección de células planctónicas de *H. pylori* presentes en el agua, en los sistemas de distribución de agua las bacterias pueden adherirse a diferentes materiales, agregarse con otras bacterias y formar estructuras complejas en tuberías u otras superficies en contacto con el agua (Azevedo *et al.*, 2008). Asimismo, las biopelículas ofrecen a las bacterias mecanismos de protección, como la capacidad de sobrevivir a procesos de desinfección (Skowron *et al.*, 2018).

Estudios preliminares indican que *H. pylori* tiene la habilidad de formar biopelículas en superficies abióticas, así como en la mucosa gástrica humana (Challa *et al.*, 2018). Además, se ha sugerido la supervivencia de *H. pylori* asociada a biopelículas dentro de sistemas de distribución de agua (Linke *et al.*, 2010; Richards *et al.*, 2018; Reuben *et al.*, 2019) y se ha sugerido que estas podrían actuar como reservorio del patógeno. Esto explicaría muchas de las conclusiones sobre la epidemiología y transmisión del patógeno que la asocian a un suministro deficiente de agua.

Las biopelículas se definen como poblaciones bacterianas que crecen en una matriz orgánica autoproducida y adheridas a una superficie viva o inerte. Pueden estar formadas por una única especie microbiana o por un conjunto de diferentes especies que interactúan entre sí (Tasneem *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Gebreselema *et al.*, 2019). La presencia de biopelículas en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y estaciones de tratamientos de agua potable (ETAP) puede suponer un importante problema tecnológico y de Salud Pública. Las características de esta forma de crecimiento bacteriano muestran propiedades distintas que las células planctónicas, como una mayor resistencia a biocidas y agentes antimicrobianos, lo que implica un comportamiento diferente ante los procesos de limpieza y desinfección.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

La capacidad de formar biopelículas no parece estar limitado a un grupo específico de microorganismos (*P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Klebsiella* y *S. aureus*), sino que, en condiciones ambientales adecuadas, la mayoría de las bacterias independientemente de la especie tiene la capacidad de adherirse entre sí y/o a superficies (Reisner *et al.*, 2006; Nazar, 2014). Por lo tanto, para establecer estrategias efectivas de control en los sistemas de distribución de agua, es necesario el estudio de la capacidad de formación de las biopelículas de cada uno de los microorganismos de interés. Esta capacidad depende de la bacteria implicada, los factores ambientales asociados a dicha formación, así como su resistencia ante los tratamientos desinfectantes comunes.

En este trabajo se estudió la capacidad de *H. pylori* de formar biopelículas usando la técnica de tinción con cristal violeta (CV), un método ampliamente utilizado por diferentes investigadores para el estudio de adhesión y formación de biopelículas (Corte *et al* 2019; Behzadi *et al.*, 2020) en diversas superficies (Paluch *et al.*, 2020), y la comparación del desarrollo de biopelículas por distintos patógenos (Jin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003). Dicho colorante se caracteriza principalmente por su bajo coste y es una técnica relativamente rápida y adaptable para su uso en placas de microtitulación (Aiyer *et al.*, 2019).

Para nuestro estudio consideramos distintos factores que podrían influir sobre el crecimiento de *H. pylori*, tanto en su modo de vida libre como sésil formando parte de biopelícula, tales como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y el oxígeno, con la finalidad de mejorar la comprensión de su comportamiento en dichas asociaciones bacterianas.

Uno de los factores más influyentes, independientemente de la especie con capacidad de formación de biopelículas, es la composición del medio de cultivo (Zhang *et al.*, 2018), factor que es también responsable del cambio morfológico de *H. pylori* (Salama, 2020). Por ello se utilizó y evaluó un medio de cultivo óptimo para *H. pylori* a diferentes concentraciones. El medio de cultivo compuesto por caldo brucella suplementado con suero fetal bovino al 7%, fue seleccionado como medio óptimo para este estudio, de acuerdo con estudios previos realizados por Yonezawa *et al.* (2010) y Bessa *et al.*, (2012). Nuestros resultados confirman que la cepa *H. pylori* NCTC 11637 tiene una fuerte capacidad de formar biopelículas *in vitro* en superficies de plástico cuando la

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

disponibilidad de nutrientes es óptima, bajo condiciones microaerofilicas y una temperatura de 37 °C.

Cuando se modificó el medio nutricional, los resultados indicaron una débil formación de biopelículas de *H. pylori*. Una disminución en la concentración de suero fetal bovino, suplemento que favorece al desarrollo de células viables de *H. pylori* (Testerman *et al.*, 2006), sugiere la limitación en el crecimiento del patógeno y por consiguiente su capacidad para formar biopelículas, corroborando estudios preliminares en los que se demuestra que la manipulación de la composición de los medios de cultivo puede afectar a la formación de biopelículas de *H. pylori* (Servetas *et al.*, 2016; Windham *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2018).

H. pylori se considera una bacteria microaerofila y por ello se cultiva en atmosfera controlada, con niveles de oxígeno entre 5% y 19%. Para determinar si el oxígeno es un factor limitante en la formación de biopelículas de *H. pylori*, las placas de microtitulación se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones aeróbicas, manteniendo la limitación de nutrientes. Los resultados mostraron un índice FB de *H. pylori* alto en los tres ensayos realizados, siendo ligeramente menor cuando es incubado en un medio de cultivo con limitación nutricional. El estudio realizado en anaerobiosis también demostró que las células planctónicas de *H. pylori* tienen la capacidad de desarrollarse en ausencia de O₂ cuando son incubadas en condiciones nutricionales óptimas.

Otro de los parámetros físicos que afectan al crecimiento de *H. pylori* es la temperatura. *H. pylori* puede crecer a una temperatura de 30 °C, pero no entre 40 °C o 42 °C y presenta un rápido crecimiento a 37 °C durante las 2 primeras horas de cultivo Jiang *et al* (1998). Por otra parte, se ha demostrado que *H. pylori* permanece en estado cultivable durante 22 días a bajas temperaturas (4 °C), sin embargo, a temperaturas más elevadas de 23 °C tiene una capacidad de supervivencia de 6 a 10 días (Adams *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta los trabajos anteriores y que la temperatura de las aguas residuales oscila entre 10 °C y 20 °C (15°C en función de la zona geográfica), en este estudio se analizó la capacidad de *H. pylori* de formar biopelículas a 5 °C y 15 °C, siguiendo las indicaciones de la Directiva 91/271/CEE. Los resultados indicaron una capacidad débil para el desarrollo de células de *H. pylori* y por tanto para formar biopelículas, a ambas

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

temperaturas analizadas, bajo condiciones aeróbicas y limitación nutricional, indicando que la temperatura y el aporte nutricional son dos factores limitantes en el desarrollo de biopelículas por *H. pylori*.

Nuestros resultados parecen indicar que *H. pylori* no tendría la capacidad de formar biopelículas en lugares con condiciones estresantes, como pueden ser los sistemas de distribución de aguas potables o residuales. Su persistencia en aguas oligotróficas puede deberse a que *H. pylori* puede incorporarse a biopelículas formadas por determinadas especies bacterianas como *V. paradoxus*, *M. chelonae*, *Acidovorax* spp, *Sphingomonas* spp. y *Brevundimonas* spp. (Gião *et al.*, 2011), como estrategia para sobrevivir en entornos hostiles y coexistiendo en dichas estructuras tridimensionales junto con otras especies bacterianas dentro de comunidades microbianas complejas.

Determinados estudios epidemiológicos se han centrado en estudiar el agua como vía de transmisión de *H. pylori*, suponiendo un factor de riesgo de infección para el ser humano. Para prevenir la transmisión de dicho patógeno y preservar la calidad microbiológica de los sistemas de agua, se vuelve necesario un adecuado proceso de desinfección en las estaciones depuradoras de aguas residuales y plantas potabilizadoras, con el fin de garantizar el cumplimiento de los límites microbianos reglamentarios. La desinfección se puede lograr por medio de agentes químicos, siendo el más utilizado el hipoclorito de sodio, o por agentes físicos, como la radiación ultravioleta. La desinfección mediante UV-C, está siendo la más utilizada en todo el mundo para el tratamiento de las aguas potables (Hijnen *et al.*, 2006), aguas residuales (Mounaouer y Abdennaceur, 2012) o aguas reutilizadas (De Lima Issac *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que las bacterias adheridas son mucho más resistentes a los métodos de desinfección que las que se hayan en suspensión (Marwa *et al.*, 2018).

Actualmente los productos más utilizados para reducir el riesgo de contaminación de patógenos transmitidos por el agua, a través de las biopelículas, son el cloro y sus derivados, el ozono y la luz ultravioleta (UV), por lo que, en el presente capítulo se planteó el estudio del comportamiento de las biopelículas formadas por *H. pylori* frente a la radiación UV e hipoclorito de sodio.

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

Actualmente, son pocos los ensayos realizados sobre la inactivación de *H. pylori* mediante radiación UV. Solo un estudio realizado por Hayes *et al.* (2006) demostró mediante técnicas de cultivo la inactivación de células planctónicas de *H. pylori* con una radiación UV inferior a 8 mJ/cm², lo que sugiere la necesidad de realizar estudios sobre la penetración de la luz ultravioleta en biopelículas. Este capítulo proporciona, por primera vez, información acerca del comportamiento de *H. pylori* tras exponerse a UV-C en ambas formas celulares (planctónicas y sésiles). Se utilizó la longitud de onda empleada para la desinfección de las aguas residuales (253,7 nm) (Mounaouer *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos mediante técnicas de cultivo muestran una inactivación progresiva de células planctónicas de *H. pylori* hasta una radiación de 100 mJ/cm², demostrando por primera vez que *H. pylori* en estado planctónico pierde la capacidad de formación de colonias después de su exposición a dicha intensidad de UV. Igualmente, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las biopelículas son mucho más resistentes a UV, ya que se requiere una influencia de 2.500 mJ/cm² para provocar la pérdida de su cultivabilidad. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados con otros microorganismos, en los que se ha requerido mayor influencia UV para lograr niveles de inactivación similares entre los microorganismos formando biopelículas y en estado planctónico (Stevens *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2019).

En este estudio las muestras planctónicas y sésiles fueron tratadas con PMA después de su exposición a diferentes dosis de UV e hipoclorito de sodio. El PMA en combinación con la PCR se utiliza para determinar la integridad celular (Gao *et al.*, 2021), ya que tiene la capacidad de penetrar en células con las membranas dañadas, unirse al DNA e impedir su posterior amplificación en la PCR. Los resultados obtenidos para células planctónicas de *H. pylori* muestran que no hubo una disminución considerable de células de *H. pylori*, incluso con una dosis elevada de 493 mJ/cm². Esto puede deberse a que la cantidad de yodo o radical hidróxilo generados por UV-C (Bale *et al.*, 2008) son insuficientes para degradar compuestos orgánicos como las paredes celulares bacterianas, la membrana celular y las proteínas (Lunov *et al.*, 2014). La radiación UV-C, emite fotones que son absorbidos por la estructura de DNA de los microorganismos causando importantes daños genéticos que reduce la reproducción bacteriana (Marugán *et al.*, 2010). Sin embargo, dicho deterioro depende de tres factores principalmente: el tipo de pared celular, su espesor y su composición. Para las biopelículas de *H. pylori*, se utilizaron dosis mucho más elevadas, teniendo en cuenta que dichas estructuras tridimensionales son mucho más resistentes a los tratamientos de desinfección. Los

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

resultados revelaron que la irradiación UV-C indujo una inactivación insignificante en biopelículas maduras de *H. pylori*, de acuerdo con estudios realizados con otros patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* (Argyaki, *et al.*, 2017) y *Escherichia coli* (Nocker *et al.*, 2018), y confirmando que la efectividad del tratamiento UV depende del grosor y la opacidad, factores que pueden variar en función de la biopelícula, por lo que la dosis administrada en las capas más profundas se reduce, y en consecuencia el crecimiento bacteriano puede aumentar o mantenerse constante.

Para las formas celulares analizadas, los valores experimentales no se ajustaron inicialmente a un modelo logaritmo lineal. Sin embargo, el modelo “Weibull”, un modelo más complejo en el que se tiene en cuenta un cambio de comportamiento bacteriano, se ajustó adecuadamente a los datos experimentales de células planctónicas ($R^2= 0,97$) y biopelículas ($R^2=0,91$). Se utilizó el coeficiente de determinación (r^2), para describir las relaciones entre las variables crecimiento bacteriano y dosis de radiación UV. Bialka *et al.* (2008) predijeron con éxito la inactivación de *Escherichia coli* y *Salmonella entérica* después de su exposición a tratamientos de desinfección con ozono mediante el modelo de “Weibull”.

En el presente estudio se obtuvo un valor $p < 1$ para las células planctónicas de *H. pylori*, lo que significa una inhibición de las células viables de *H. pylori* detectadas mediante técnicas de cultivo. No obstante, para las formaciones de biopelículas, los valores $p > 1$ indican la persistencia de las bacterias con menos probabilidad de muerte celular, lo que sugiere una adaptación a la radiación o que no se vieron afectadas al encontrarse en las capas más profundas de la biopelícula, quedando protegidas por las sustancias poliméricas extracelulares.

Por otra parte, el mecanismo de desinfección más aplicado en los sistemas de tratamientos de aguas residuales es el cloro y sus derivados (Mendoza y Vera, 2010). El hipoclorito de sodio es el derivado del cloro más utilizado, debido a su eficacia, su fácil aplicación y manipulación y su coste. Su efectividad depende del pH, concentración, tiempo de contacto e impureza del agua (Castro y Neves, 2003).

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

El uso extendido e inapropiado del cloro como desinfectante, ha dado lugar a la aparición de bacterias resistentes al cloro (Ding *et al.*, 2019), convirtiéndose en una amenaza grave para la salud pública. Determinados estudios han demostrado la resistencia al cloro de determinados

microorganismos patógenos como *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium avium* y *Legionella pneumophila* (Bohrerova *et al.*, 2006, Álvarez *et al.*, 2012). Todavía existe un gran debate con respecto a la resistencia que presenta *H. pylori* frente a las prácticas de desinfección con cloro (Percival *et al.*, 2014). Baker *et al.* (2002) demostraron que *H. pylori* puede transmitirse a través del suministro de agua debido a su tolerancia y resistencia al cloro y al ozono. Santiago *et al.* (2015) señalaron la capacidad de supervivencia de *H. pylori* a concentraciones de cloro de 0,05-6 mg/L. Por otra parte, bajas concentraciones de cloro residual, de 0,05-0,2 mg/L, pueden disminuir la expresión de ciertos genes e inducir el estado VBNC (Lin *et al.*, 2016). Moreno *et al.* (2007) concluyeron que *H. pylori* en estado VBNC puede sobrevivir a niveles de cloro utilizados en los sistemas de distribución de aguas. Además, la resistencia de *H. pylori* al cloro aumenta notablemente en las biopelículas (Watson *et al.*, 2004). Solo un estudio realizado por Gião *et al.* (2010) demostró que bajas concentraciones de cloro en el agua pueden inhibir la actividad de *H. pylori*, pero no su eliminación en biopelículas, donde puede sobrevivir en un estado VBNC.

En este capítulo, se analizaron mediante técnicas de cultivo y moleculares la supervivencia de células planctónicas y biopelículas de *H. pylori* sometidas a concentraciones de hipoclorito de sodio de 1,2 mg/L. En el análisis se tuvo en cuenta por primera vez la temperatura y tiempo de exposición al desinfectante, dos factores que afectan a la eficacia de este compuesto químico. Los resultados de los ensayos realizados a 15 °C y 25 °C obtenidos mediante técnicas de cultivo mostraron crecimiento bacteriano de *H. pylori* tanto en células planctónicas como en biopelículas. La disminución puede deberse a la transformación de *H. pylori* a un estado VBNC inmediatamente al añadir el desinfectante, como ocurre con otros microorganismos como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurim* (Oliver *et al.*, 2005). Mejores resultados se obtuvieron para un periodo de exposición de hipoclorito de sodio de 30 minutos, de acuerdo con Gião *et al.* (2010), que demostraron que *H. pylori* no pierde completamente su capacidad de cultivo tras su exposición a concentraciones de cloro de 0,2 mg/mL, 0,7 mg/mL y 1,2 mg/mL, y que las biopelículas proporcionan una protección adicional frente a este compuesto químico. Además, nuestros resultados concuerdan con los

Capítulo 6: Formación de biopelículas por *H. pylori*: resistencia a la desinfección y detección en muestras de un sistema de distribución de agua potable mediante técnicas moleculares.

obtenidos mediante la técnica moleculares de viabilidad donde se observó una reducción insignificante en la cantidad de copias de DNA de las células planctónicas de *H. pylori* después de ser tratadas con hipoclorito de sodio, independientemente de la temperatura y tiempo de exposición. Los resultados obtenidos muestran la resistencia de las células planctónicas y biopelículas de *H. pylori* frente a tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio, independientemente de la temperatura. La mayor inactivación tiene lugar en t_0 , al entrar en contacto con el cloro. A continuación, se produce una ligera inactivación de *H. pylori* con un tiempo de exposición de 30 minutos, lo que sugiere que *H. pylori* sufre cambios que permiten a las células evadir el tratamiento con cloro (Cuellar, 2016), y apoya la opinión de otros autores de que el cloro en el agua podría inhibir la actividad de *H. pylori*, pero no elimina al patógeno, que sobreviviría en un estado VBNC, metabólicamente activo y potencialmente infeccioso.

Uno de los objetivos del presente estudio fue determinar la presencia de *H. pylori* en muestras de biopelículas procedentes del sistema de distribución de agua potable de Valencia, mediante técnicas moleculares (qPCR). Las biopelículas analizadas en este trabajo proceden de tuberías que presentaban corrosión y deterioro, ya que eran en su mayoría de hierro. Wang *et al.* (2014) establecieron una relación directa entre la formación de biopelículas y el estado de las tuberías, ya que las sustancias corroídas facilitan la adherencia de bacterias favoreciendo la proliferación de las biopelículas.

El análisis por qPCR permitió la detección de *H. pylori* en 23% de las muestras de biopelículas analizadas. La detección del patógeno confirma el agua como posible vía de transmisión de *H. pylori*. Igualmente se demuestra que las biopelículas en el sistema de distribución de agua potable actúan como lugar para una acumulación pasiva de *H. pylori* o como posible reservorio del patógeno, protegiéndolo de las condiciones adversas.

Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo tienen implicaciones importantes para comprender mejor la capacidad de formación de biopelículas de *H. pylori*, su supervivencia y resistencia frente a tratamientos de desinfección, así como su propagación a través de los sistemas de distribución de aguas.

CONCLUSIONES

Entre los objetivos planteados en esta tesis doctoral. La optimización y aplicación de métodos de cultivo y moleculares que detecten y cuantifiquen células viables de *H. pylori* y *Helicobacter* spp, a fin de establecer la existencia o no de un riesgo real para la Salud Pública, engloba la puesta a punto de numerosas técnicas para su consecución.

Todos los protocolos puestos a punto *in vitro*, se han aplicado en el análisis de muestras reales para comprobar su utilidad. Estos resultados han determinado mediante métodos moleculares la presencia de *H. pylori* en aguas de riego, así como de otras especies patógenas como *H. hepaticus*, nunca aislada de aguas.

Asimismo, ha sido de gran interés el estudio realizado con el Hospital Doctor Peset de Valencia, en el que se aplicaron las técnicas puestas a punto previamente en esta tesis, para la detección de *Helicobacter* en heces procedentes de niños con sintomatología gástrica. La transferencia de técnicas ha resultado muy fructífera, demostrando ser más eficaces que las utilizadas en clínica, pudiendo incluso determinar la viabilidad del patógenos en heces, de forma no invasiva para el paciente.

En este sentido, los resultados obtenidos durante el periodo de investigación han permitido desarrollar y establecer protocolos y métodos de ensayo prometedores.

Cabe destacar, que todos los resultados obtenidos durante la Tesis son de gran relevancia tanto por su aportación al conocimiento, del potencial riesgo de las aguas como via de transmisión de *Helicobacter*, como por su novedad, ya que muy pocos grupos a nivel mundial están trabajando en este tema.

Todos los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. El medio de cultivo Agar Dent con sulfato de polimixina B (ADPB) es una buena combinación selectiva para la detección y recuperación de *H. pylori*, puesto que no inhibe el crecimiento del patógeno. El cultivo de muestras ambientales y clínicas en este medio puede ser de gran utilidad para el diagnóstico, así como para estudios epidemiológicos.
2. El método de cultivo no es adecuado para el aislamiento e identificación de *Helicobacter* spp. en muestras muy contaminadas, como las aguas residuales o las heces.
3. El pretratamiento con Propidium Monoazide, PMA, o con la mezcla PEMAX™ previo a la detección por qPCR, reduce significativamente la señal de amplificación de las células no viables,

y proporciona resultados rápidos en comparación con los métodos de cultivo. Sin embargo, no puede considerarse como un marcador de viabilidad universal.

4. Antes de utilizar un pre-tratamiento con marcadores de viabilidad PMA y/o PEMAX para la detección de células viables de *H. pylori* se han de considerar factores como el origen de la muestra y el tratamiento de desinfección.
5. En este estudio se ha conseguido detectar, por primera vez, la presencia de especies de *Helicobacter* spp. patógenas diferentes a *H. pylori* en muestras de aguas residuales recolectadas tras el tratamiento biológico y de desinfección y destinadas al riego de productos alimenticios vegetales.
6. Se han detectado células de *H. pylori* y, por primera vez, de otras especies de *Helicobacter* spp. viables, y por lo tanto potencialmente infectivas, en aguas residuales, lo que sugiere su posible papel como vehículo de transmisión a los humanos a través del riego.
7. La técnica qPCR ha demostrado ser un método rápido y específico para la detección directa e identificación de *H. pylori* en muestras ambientales. Sin embargo, puede dar falsos negativos en muestras complejas, como son las aguas residuales.
8. La técnica FISH ha resultado ser una herramienta útil y rápida para investigar la presencia de *Helicobacter* spp. en muestras ambientales, y se propone su uso para el control de la seguridad y calidad de la reutilización de agua residuales para fines agrícolas.
9. Los iniciadores HS2R y HSF, éste último diseñado en este trabajo, han sido evaluados en esta investigación y han mostrado ser adecuados para la amplificación de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp. patógenos mediante metagenómica de secuenciación dirigida.

Conclusiones

10. En este trabajo se demuestra el potencial de transmisión de cepas de *H. pylori* resistentes al tratamiento antibiótico habitual y/o portadoras de determinantes de especial virulencia a través del agua.
11. En esta investigación se evidencia, por primera vez la presencia de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp. en muestras de heces mediante técnicas de cultivo y moleculares, incluida la metagenómica dirigida.
12. Las técnicas moleculares utilizadas resultan efectivas para la detección e identificación de *H. pylori* en heces. El método DVC-FISH permite demostrar la presencia de células viables de *H. pylori*, además de identificar su resistencia a la claritromicina.
13. Los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva dirigida (DAS) demuestran la presencia de otras especies patógenas del género *Helicobacter*, como *H. hepaticus* y *H. pullorum*, que coexisten con *H. pylori* en muestras de heces, dando un punto de partida para el estudio de la epidemiología de estas especies y su posible transmisión fecal-oral.
14. Se ha demostrado que *H. pylori* es capaz de formar biopelículas y sobrevivir a los tratamientos comunes de desinfección del agua con radiación UV e hipoclorito de sodio, lo que debería considerarse al evaluar el riesgo real al que está expuesto el consumidor.
15. Mediante qPCR se ha detectado *H. pylori* en el 23% de muestras de biopelículas obtenidas de sistemas de distribución de agua potable, lo que sugiere que las biopelículas en el sistema de distribución de agua potable podrían actuar como lugar para una acumulación pasiva de *H. pylori* o como posible reservorio del patógeno, protegiéndolo de las condiciones adversas.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abadi, A.T.B. 2918. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using invasive and noninvasive approaches. *J Pathog* 9064952. doi: 10.1155/2018/9064952.

Abd El-Ghany, W. A. 2020. *Helicobacter pullorum*: A potential hurdle emerging pathogen for public health. *J Infect Dev Ctries*, 14(11): 1225-1230. doi: 10.3855/jidc.12843

Abdolkazem, N., Zeynab, B., Mojtaba, M., Soheila, K. 2015. Detection of *Helicobacter pylori* in raw and drinking water of Ahvaz City, Iran by PCR. *J Pure Appl Microbiol* 9(1): 483-490.

Acosta, C.P., Codony, F., Fitipaldi, M., Sierra-Torres, C.H., Morato, J. 2018. Monitoring levels of viable *Helicobacter pylori* in Surface water by qPCR in Notheast Spain. *Water Health* 16(5): 839-845. doi: 10.2166/wh.2018.195.

Adams, B.L., Bates, T.C., Oliver, J.D. 2003. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Appl Environ Microbiol* 69: 7461-7466. doi: 10.1128/AEM.69.12.7462-7466.2003.

Agranoff, B., 1967. Memory and Protein Synthesis. *Scientific American*. 216(6), 115-123.

Agustí, G., Codony, F., Fittipaldi, M., Adrados, B., Morató, J. 2010. Viability determination of *Helicobacter pylori* using Propidium Monoazide quantitative PCR. *Helicobacter* 15(5): 473-6. doi: 10.1111/j.15235378.2010.00794.x.

Agustí, G., Fittipaldi, M., Codony, F. 2017. False-positive viability PCR results, an association with microtubes. *Curr Microbiol* 74: 377-380. doi: 10.1007/s00284-016-1189-3.

Ahmed, A., Younis, E., Ishida, Y., Shimamoto, T. 2009. Genetic basis of multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovars *Enteritidis* and *Typhimurium* isolated from diarrheic calves in Egypt. *Acta Trop* 111: 144-149. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.04.004.

Aiyer, K.S., Vijayakumar, B.S. 2019. An improvised microtiter dish biofilm assay for non-invasive biofilm detection on microbial fuel cell anodes and studying biofilm growth conditions. *Braz J Microbiol* 50: 769-775 doi:10.1007/s42770-019-00091-5.

Alexandratos, N., Bruisma, J. 2012. World Agricultural Trends Towards 2030/2050, the 2012 Revision. Working Paper, 12-13, FAO.

Al-Sulami, A.A., Al-Edani, T.A., Al-Abdulaz, A.A. 2012. Culture method and PCR for the detection of *Helicobacter pylori* in drinking water in Basrah Governorate Iraq. *Gastroenterol Res Pract* 12: 5. doi:10.1155/2012/245167.

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(9): 920-925. doi: 10.26719/2010.16.9.920.

Bibliografía

- Álvarez-Ruiz, R., Cuñat, A., Picó, Y. 2018. Pollution fingerprinting of sewage sludge and their related risk in Albufera's wetland, Valencia. 16th IWA International Conference on Wetlands Systems for Water Pollution Control. <http://hdl.handle.net/10261/184328>.
- Allwood, J.S., Fierer, N., Dunn, R.R. 2020. The future of environmental DNA in forensic science. *Applied and Environmental Microbiol* 86(2) e01504-19- doi: 10.1128/AEM.01504-19
- 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(2): 762-770. doi: 10.1128/jb.172.2.762-770.1990.
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., Vakhlu, J. 2016. High throughput sequencing, an overview of sequencing chemistry. *Indian J Microbiol* 56(4): 394-404. doi: 10.1007/s12088-016-0606-4.
- 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(3): 504-512. doi: 10.2166/wh.2013.150.
- 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 13/02/2019).
- Andersen, A.P., Elliot, D.A., Lawson, M., Barland, P., Haatcher, 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*-cocoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 56: 112-115. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00556.x.
- 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/>
- Ansorg, R., Von Recklinghausen, G., Pomarius, R., Schmid, E.N. 1991. Evaluation of techniques for isolation, subcultivation and preservation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 29: 51-53.
- Aquarec Project 2006. Work Package 2: Guideline for Quality Standards for Water Reuse in Europe. EVK1-CT-2002-00130.
- Arévalo, A., Trespacios, A.A., Otero, W. 2009. Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol* 24: 4.
- Argyaki, A., Markvart, M., Bjorndal, L., Bjarnsholt, T., Michael P. 2017. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after ultraviolet light emitting diode treatment: a comparative study between ultraviolet C and ultraviolet B. *J Biomed Opt* 22(6): 65004. doi: 10.1117/1.JBO.22.6.065004.
- Atapoor, S., Dehkordi F.S., Rahimi, E. 2014. Detection of *Helicobacter pylori* in various types of vegetables and salads. *Jundishapur J Microbiol* 7(5): e10013. doi:10.5812/jjm.10013.

Avalos García, R., Vanterpool Héctor, M., Morales Diaz, M., Lamoth Wilson, I., Prendes Huerta, A. 2019. Nuevos retos en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Médica Electrónica*, 41(4). Recuperado de: <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/2983>

Azevedo, N.F., Almeida, C., Cerqueira, L., Días, S., Keevil, C.W., Vieira, M.J. 2007. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl Environ Microbiol* 73(10): 3423-3427. doi: 10.1128/AEM.00047-07.

Azevedo, N.F., Almeida, C., Fernandes, I., Cerqueria, L., días, S., Keevil, C.W. 2008. Survival of gastric and enterohepatic *Helicobacter spp* in water. Implications for transmission. *Appl Environ Microbiol* 74(6): 1805-1811. doi: 10.1128/AEM.02241-07.

Azevedo, N.F., Pachecom 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. doi: 10.1128/AEM.70.1.490-493.2004.

Azevedo, N.F., Pacheco, A.P., Keevil, C.W., Vieira, M.J. 2006. Adhesion of water stressed *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces. *J Appl Microbiol* 101: 718-724. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03029.x.

B

Bahrami, A.R., Rahimi, E., Safaei, H.G. 2013. Detection of *Helicobacter pylori* in city water, dental units' water and bottled mineral water in Isfahan, Iran. *Sci World J* 280510: 1-5. doi: 10.1155/2013/280510.

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(4): 692-698. doi: 10.2166/wh.2016.259.

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(2): 981-984. doi: 10.1128/AEM.68.2.981-984.2002.

Bale, C.S.E., Ingham, T., Commane, R., Heard, D.E., Bloss, W.J. 2008. Novel measurements of atmospheric iodine species by resonance fluorescence. *J Atmos Chem* 60: 51-70. doi: 10.1007/s10874-008-9108-z.

Bamford, K.B., Lutton, D.A., O' Loughlin, B., Coulter, W.A., Collins, J.S. 1998. Nested primers improve sensitivity in the detection of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *J Infect* 36: 105-110.

Bang, C.S., Lim, H., M., Jeong, H.M., Shin, W.G., Choi, J.H., Soh, J.S., Kang, H.S., Yang, Y.J., Hong, J.T., Shin, S.P., Suk, K.T., Lee, J.J., Baik, G.H., Kim, D.K. 2020. Amoxicillin or tetracycline in bismuth-containing quadruple therapy as first-line treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Gut Microbes* 11 (5): 1314-1323. doi: 10.1080/19490976.2020.1754118

Barbau-Piednoir, E., Mahillon, J., Pillyser, J., Coucke, W., Roosens, N.H., Botteldoorn, N. 2014. Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella serovar Enteritidis*. *J Microbiol Methods*. 103: 131-7. doi: 10.1016/j.mimet.2014.06.003.

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.

Bibliografía

Barragan, V.C., Gutiérrez, E.J., Casteblando, R.L. 2014. Membrana externa de *Helicobacter pylori* y su papel en la adhesión al epitelio gástrico. *UN Med* 56(1): 44-62.

Bazzoli, F., Cecchini, L., Corvaglio, L., Dall'Antonia, M., De Giacomo, C., Fossi, S., Casali, L.G., Gullinim S., Lazzari, R., Leggeri, G., Lerro, P., Valdambrini, V., Mandriolu, G., Marani, M., Martelli, P., Mianom A., Nicolini, G., Oderda, G., Pazzi, P., Pozzato, P., Ricciardiello, L., Roda, E., Simoni, P., Sottili, S., Zagari, R.M. 2000. Validation of the 13C urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: a multicenter study. *Am J Gastroenterol* 95: 645-650. doi: 10.1111/j.1572-1241.2000.01836.x.

Beer-Davidson, G., Hindiyeh, M., Muhsen, K. 2018. Detection of *Helicobacter pylori* in stool samples of young children using real-time polymerase chain reaction. *Helicobacter* 23: e12450. doi: 10.1111/hel.12450.

Behzadi, P., Urbán, E., Gajdács, M. 2020. Association between Biofilm-Production and Antibiotic Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): An In Vitro Study. *Diseases* 8(2):17. doi: 10.3390/diseases8020017.

Bellack, N.R., Koehoorn, M.W., Macnab, T.C., Morshed, M.G. 2006. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of evidence. *Epidemiol Infect* 134(3): 439-449. doi: 10.1017/S0950268806006005.

Benedict, K.M., Reses, H., Vigar, M., Roth, D., Roberts, V., Mattioli, M., Cooley, L., Hilborn, E., Wade, T., Fulleron, K., Yoder, J., Hill, V. 2017. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water United State, 2013-2014. *Centers for Disease Control and Prevention* 66(44): 1216-1221. doi: 10.15585/mmwr.mm6644a3.

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(3): 221-225. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01555.x.

Berry, V., Jennings, K., Woodnutt, G. 1995. Bactericidal and morphological effects of amoxicillin on *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 39(8): 1859-1861. doi: 10.1128/aac.39.8.1859.

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(4): 359-370. doi: 10.1051/vetres:2002022.

Bessa, L.J., Grande, R., Di Iorio, D., Di Giulio, M., Di Campli, E., Cellini, L. 2013. *Helicobacter pylori* free-living and biofilm modes of growth: behavior in response to different culture media. *APMIS* 121: 549-560. doi: 10.1111/apm.12020.

Besser, J., Carleton, H.A., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R.L., Trees, E. 2018. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infec* 24(4): 335-341. doi: 10.1016/j.cmi.2017.10.013.

Bialk, K.L., Demirci, A. 2008. Efficacy of pulsed UV-light for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on raspberries and strawberries. *J Food Science* 73(5). Doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00743.x.

Bizzozero, G. 1893. Ueber die schlauchförmigen drüsen des magendarmkanals und die beziehungen ihres epithels zu dem oberflächenepithel der schleimhaut. *Archiv für mikroskopische anatomie entwicklungsmechanik* 42: 82-152., Tafel VII.

Bjarnsholt, T., Alhede, M., Jensen, P.Ø., Nielsen, A.K., Johansen, H.K., Homøe, P., Høiby, N., Givskov, M., Kirketerp-Møller, K. 2015. Antibiofilm Properties of Acetic Acid. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 1, 4(7):363-372. doi: 10.1089/wound.2014.0554.

Bode, G., Mauch, F., Malfertheiner, P. 1993. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect* 111(3): 4083-490. doi: 10.1017/s0950268800057216.

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>

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>.

Boehnke, K., Brewster, R.K., Sánchez, B.N., Valdivieso, M., Bussalleu, A., Guevara, Gonzales Saenz, C., Osorio Alva, S., Gil, E., Xi, C. 2018. An assessment of drinking water contamination with *Helicobacter pylori* in Lima, Peru. *Helicobacter* 1-8. doi: 10.1111/hel.12462.

Bohr, U., Glasbrenner, B., Primus, A., Zagoura, A., Wex, T., Malfertheiner, P. 2004. Identification of enterohepatic *Helicobacter* species in patients suffering from inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 72: 2766-2768. doi: 10.1128/JCM.42.6.2766-2768.2004.

Bohrerova, Z., Linden, K.G. 2006. Ultraviolet and chlorine disinfection of mycobacteria in wastewater effect of aggregation. *Water Environ Res* 78(69): 565-571. doi: 10.2175/106143006X99795.

Bokulich, N., Subramanian, S., Faith, J., Gevers, D., Gordon, J., Knight, R., Mills, D., Caporaso, J. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods* 10(1): 57-59. doi: 10.1038/nmeth.2276.

Bonnet, M., Lagier, J.C., Raoult, D., Khelaifia, S. 2020. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections* 34, 100622. doi: 10.1016/j.nmni.2019.100622.

Boro, S., Sarma, M., Sarma, P. 2016. *Helicobacter pylori* and steps for its elimination: a review global *J Med Res* 16(4): 31-36.

Botes, M., Kwaadsteniet, M., Cloete, T.E. 2013. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal Bioanal Chem* 405: 91-108. doi: 10.1007/s00216-012-6399-3.

Boutin, S. R. 2005. Molecular pathogenesis of *Helicobacter hepaticus* induced liver disease, Massachusetts Institute of Technology. Disponible en: http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/34665877.html.

Bragança, S.M., Azevedo, N.F., Simoes, L.C., Keevil, C.W., Vieira, M.J. 2007. Use of fluorescent *in situ* hybridization for the visualization of *Helicobacter pylori* in real drinking water biofilms. *Water Sci Technol* 55(8-9): 387-393. doi: 10.2166/wst.2007.282.

Bibliografía

Brechtbuehl, K., Whalley, S.A., Dusheiko, G.M., Saunders, N.A. 2001. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *J Virol Methods* 93(1-2): 105-113. doi: 10.1016/S0166-0934(01)00260-9.

Brooks, J., Edwards, D., Harwich, M., Rivera, M., Fettweis, J., Serrano, M., Reris, R., Sheth, N., Huang, B., Girerd, P., Consortium, V., Strauss, J., Jefferson, K., Buck, G. 2015. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiology* 15: 66. doi: 10.1186/s12866-015-0351-6.

Buck, A., Oliver, J.D. 2010. Survival of spinach-associated *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state. *Food Control* 21: 1150-1154. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.01.010.

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(6): 450-454. doi: 10.1046/j.1472-765X.2002.01122.x.

Burke, M., Emerick, K. 2016. Adaption to climate change, evidence from US agriculture. *Am Econ J Econ Policy* 8(3): 106-140. doi: 10.1257/pol.20130025.

C

Cai, L., Zhang, T. 2013. Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a High-Throughput Shotgun Sequencing Technique. *Environ Sci Technol* 47(10): 5433-5441. doi: 10.1021/es400275r.

Campuzano, S., Jiménez, L., Hernández, D.M. 2018, La formación de biopelículas y la calidad del agua en la consulta odontológica. *Biofilm formation and water quality in the dental practice*. 16(29):39-49.

Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., Srikumar, S. 2017. A review on the applications of Next Generation Sequencing Technologies as applied to food-related microbiome studies. *J Front Microbiol* 21(8): 1829. doi: 10.3389/fmicb.2017.01829.

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. doi: 10.1038/nmeth.f.303.

Cappelier, J.M., Besnard, V., Roche, S.M., Velge, P., Federighi, M. 2007. Avirulent viable but non-culturable cells of *Listeria monocytogenes* needs the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Vet Res* 38(4): 573-583. doi: 10.1051/vetres:2007017.

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. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.242.

Carron, M.A., Tran, V.R., Sugawa, C., Coticchia, J.M. 2006. Identification of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa. *J Gastrointest Surg* 10(5): 712-12. doi: 10.1016/j.gassur.2005.10.019.

Bibliografía

- Casswall, T.H., Németh, A., Nilsson, I., Wadström, T., Nilsson, H.O. 2010: *Helicobacter* species DNA in liver and gastric tissues in children and adolescents with chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 45(2): 160-167. doi: 10.3109/00365520903426915.
- Castillo, M., Bernabe, L., Castaneda, C.A., Chavez, I., Ruiz, E., Barreda, F., Valdivia, D., Suarez, N., Nieves, J., Días-Neto, E., Boehnke, K., Landa-Baella, M.P., Montenegro, P. 2019. *Helicobacter pylori* detected in tap water of Peruvian patients with gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 20(11): 3193-3196. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.11.3193.
- Castro, P., Neves, M. 2003. Chlorine decay in water distribution systems case study lousada network. *Electron J Environ Agric Food Chem* 2: 261-266.
- Catrenich, C.E., Makin, K.M. 1991. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. *Scand J Gastroenterol Suppl* 181: 58-64.
- Cellini, L. 2014. *Helicobacter pylori*, a chameleon-like approach to life. *World J Gastroenterol* 20(19): 5575-5582. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5575.
- Cellini, L., Grande, R., Artese, L., Marzio, L. 2010. Detection of *Helicobacter pylori* in saliva and esophagus. *New Microbiol* 33(4): 351-357.
- Cellini, L., Grande, R., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Di Giulio, M., Traini, T., Trubiani, O. 2008. Characterization of a *Helicobacter pylori* environmental strain. *J Appl Microbiol* 105: 761-769. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03808.x.
- Cellini, L., Grande, R., Traini, T., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Di Iorio, D., Caputi, S. 2005. Biofilm formation and modulation of luxS and rpoD expression by *Helicobacter pylori*. *Biofilms* 2: 119-127. doi: 10.1017/S1479050505001845.
- Cequeira, L., Almeida, C., Jardim, T., Keevil, C., Vierira, M. 2008. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Int J Mol Sci* 9(10): 1944-60. doi: 10.3390/ijms9101944.
- Cervantes-García, R. 2016. *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Rev Latinoam Ptol Clin Med Lab* 63(2): 100-109.
- Challa, S., Neelapu, N.R.R. 2018. Quorum Sensing in *Helicobacter pylori*: Role of Biofilm and Its Implications for Antibiotic Resistance and Immune Evasion. In: Pallaval Veera Bramhachari (eds) Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence. Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-13-2429-1_18.
- Chan, V., Crocetti, G., Grehan, M., Zhang, L., Danon, S., Lee, A., Mitchell, H. 2005. Blackwell publishing, Ltd. visualization of *Helicobacter* species within the murine cecal mucosa using specific fluorescence *in situ* hybridization. *Helicobacter* 10: 114-124.
- Chen, D., Hu, L., Yi, P., Liu, W.W., Fang, D.C., Cao, H. 2007. *H. pylori* are associated with chronic cholecystitis. *World J Gastroenterol* 13: 119-1122. doi: 10.3748/wjg.v13.i7.1119.

Bibliografía

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: 212-238. doi: 10.1038/ajg.2016.563.

Choi, Y. I., Chung, J. W., Park, D. K., Kim, K. O., Kwon, K. A., Kim, Y. J., Seo, J. Y. 2019. Tailored eradication vs empirical bismuth-containing quadruple therapy for first-line *Helicobacter pylori* eradication: A comparative, open trial. *World J. Gastroenterol* 25 (46): 6743–6751. doi: 10.3748/wjg.v25.i46.6743

Chomvarin, C., Wongboot, W., Tirapattanun, A., Kanthawong, S., Wongwajana, S., Tongpim, S., Boonyanugomo, W. 2017. Detection of *Helicobacter pylori* in aquatic environments and drinking waters in Northeastern Thailand. *Chiang Mai J Sci* 44(3): 731-741.

Cho, M., Kim, J., Kim, J.Y., Yoon, J., Kim, J.H. 2010. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research* 44, 11. doi: [10.1016/j.watres.2010.03.017](https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017).

Cittelly, D.M., Huertas, M.G., Martínez, J.D., Oliveros, R., Posso, H., Bravo, M.M. 2002. *Helicobacter pylori* genotypes in non-atrophic gastritis are different of the found in peptic ulcer, premalignant lesions, and gastric cancer in Colombia. *Rev Med Chile* 130: 143-51. doi: 10.4067/S0034-98872002000200003.

Citterio, B., Casaroli, A., Pierfelici, L., Battistelli, M., Falcieri, E., Baffone, W. 2004. Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. *New Microbiol* 27(4): 353-360.

Clavel, M., Barraud, O., Moucadel, V., Meynier, F., Karam, E., Ploy, M., François, B., Pichon, N., Vignon, P., Droual, R., Duchiron, C., Vignaud, J., Chainier, D., Mattei, M., Sommare, A., Mercier, E., Le Brun, C., Desachy, A., Garandeau, C., Rodrigue, M., Lacroix, M., Prudent, S., Jestin, M.A., Yugueros-Marcos, J. 2013. Molecular quantification of bacteria from respiratory samples in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 22: 812.e1-812.e7. doi: 10.1016/j.cmi.2016.06.013.

Clines, N., Beckman, E., 2019. Development of a high throughput human stool specimen processing method for a molecular *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance assay. *PLoS ONE* 14(12): e0224356. Doi: 10.1371/journal.pone.0224356.

Codony, F., Agustí, G., Allué, G. 2015. Cell membrane integrity and distinguishing between metabolically active and inactive cells as a means of improving viability PCR. *Molecular and cellular probes* 29: 190-192. doi: 10.1016/j.mcp.2015.03.003.

Cole, S.P., Harwood, J., Lee, R., Guiney, D.G. 2004. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 186: 3124-3132. doi: 10.1128/JB.186.10.3124-3132.2004.

Comeau, A.M., Douglas, G.M., Langile, M.G. 2017. Microbiome Helper a custom and streamlined workflow for microbiome research. *Methods Por Novel Syst Biol Techniq mSystems* 2: e00127-16. doi: 10.1128/mSystems.00127-16.

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(3): 573–583. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03285.x.

Corcoran, E., Nellesmann, E., Baker, R., Bos, R., Osborn, D., Savelli H. 2010. Sick water? The central role of wastewater management in sustainable development. A rapid response assessment. UNEP (United Nations Environment Programme), UN-HABITAT, Nairobi, Kenia.

Corral Sánchez, G. M., Mendoza Hidalgo, K. L., Basurto Valencia, M. R., Rivas Loo, A. K. 2019. *Helicobacter pylori* diagnóstico tratamiento y consecuencia en la infancia. *RECIAMUC* 2(2), 484-505. Doi: 10.26820/reciamuc/2.2.2018.484-505

Correa, P., Piazuolo, M.B. 2008. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis* 40(7): 490-496. doi: 10.1016/j.dld.2008.02.035.

Corte, L., Casagrande Pierantoni, D., Tascini, C., Roscini, L., Cardinali, G. 2019. Biofilm Specific Activity: A Measure to Quantify Microbial Biofilm. *Microorganisms*. 7(3):73. doi: 10.3390/microorganisms7030073.

Coudron, P.E., Stratton, C.W. 1995. Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J Clin Microbiol* 33: 1028-1030.

Cover, T. 2006. Role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in gastroduodenal disease. *J Infect Dis* 194(10): 1343-1355. doi: 10.1086/508432.

Crowe, S.E. 2019. *Helicobacter pylori* Infection. *N Eng J Med* 380(12): 1158-1165. Doi: 10.1056/NEJMcp1710945. PMID: 30893536.

Cuellar, P. 2016. transmisión de *Helicobacter pylori* a través del agua: estudio de la presencia del patógeno e identificación de formas viables mediante técnicas moleculares. [Tesis doctoral]. Valencias: Universidad Politécnica de Valencia; 2016. Available from:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/75086/SANTIAGO%20-%20TRANSMISIÓN%20DE%20HELICOBACTER%20PYLORI%20A%20TRAVÉS%20DEL%20AGUA%3A%20ESTUDIO%20DE%20LA%20PRESENCIA%20DEL%20PATÓ....pdf?sequence=1>.

Cuervo, C.M., Gaviria, A.M. 2017. Detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua y biopelícula de los grifos de las instituciones educativas oficiales en la ciudad de Medellín. *Acta Med Colomb* 42(2): 121-128. doi: 10.36104/amc.2017.761.

Cunachi, A.M., Fernández-Delgado, M., Suárez, P., Contreras, M., Michelangeli, F., García-Amad, M.A. 2016. Detection of *Helicobacter* DNA in different water sources and penguin feces from Greenwich, Dee and Barrientos Islands, Antarctica. *Polar Biol* 39: 1539-1546. doi: 10.1007/s00300-015-1879-5.

D

Da Costa, D., Guidotti, F., Cabello, N., Trigo, F., Contreras, C., Vergara, F., Miranda, J.P., Montenegro, C., Muñoz, P., Berger, Z. 2018. Disminución en la frecuencia de infección por *Helicobacter pylori* en endoscopías digestivas altas. *Revista médica de Chile* 146(5), 555-561. Doi:10.4067/s0034-98872018000500555

De Lima Issac, R., Dos Santos, L.U., Tosetto, M.S., Franco, R.M., Guimaraes, J.R. 2014. Urban water reuse: microbial pathogens control by direct filtration and ultraviolet disinfection. *J Water Health* 12: 465-473. doi: 10.2166 / wh.2014.221.

- De Reuse, H., Labigne, A., Mengin-Lecreulx, D. 1997. The *Helicobacter pylori ureC* Gene Codes for a Phosphoglucosamine Mutase. *J Bacteriol* 179: 3488-3493. doi: 10.1128/jb.179.11.3488-3493.1997.
- Degnan, A. J., Sonzogni, W. C., Standrige, J. H. 2003. Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples. *Appl Environl Microbiol* 69(5): 2914-2918. doi: 10.1128/AEM.69.5.2914-2918.2003.
- Delahay, R., Ruge, M. 2012. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 17: 9-15. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00976.x.
- Delgado, S., Suarez, A., Otero, L., Mayo, B. 2004. Variation of microbiological and biochemical parameters in the feces of two healthy people over a 15-day period. *Eur J Nutr* 43(6): 375-80. doi: 10.1007/s00394-004-0485-z.
- Delgado-Viscogliosi, P., Solignac, L., Delattre, J.M. 2009. Viability PCR, a culture independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Appl Environ Microb* 75: 3502-3512. doi: 10.1128/AEM.02878-08.
- Dent, J.C., McNulty, C.A.M. 1988. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7: 555-558. doi: 10.1007/bf01962615.
- Desantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Broie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069-5072. doi:10.1128/AEM.03006-05.
- Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Grande, R., Di Giulio, M., Cellini, L. 2010. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on *Helicobacter pylori* biofilm. *Curr Microbiol* 60: 412-418. doi: 10.1007/s00284-009-9558-9.
- Ding, W., Jin, W., Cao, s., Zhou, X., Wang, C., Jiang, Q., Huang, H., Tu, R., Han, S.f., Wang, Q. 2019. Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water. *Water Research* 160:339-349. Doi: 10.1016/j.waters.2019.05.014.
- Dinh Thanh M, Agustí G, Mader A, Appel B, Codony F. 2017. Improved sample treatment protocol for accurate detection of live *Salmonella* spp. in food samples by viability PCR. *PLoS One* 12: e0189302. doi: 10.1371/journal.pone.0189302.
- Diomedi, A., Chancón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, I., Medel, M., Quintanilla, M., Riedel, G., Tinoco, J., Cifuentes, M. 2017. Antiseptics and disinfectants: aiming at rational use. Recommendations of the Advisory Committee on Healthcare Associated Infections. Sociedad Chilena de Infectología. *Rev chil infecto* 34(2).
- Directiva del consejo de 21 de mayo de 1991 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (91/271/CEE). DOUE-L-1991-80646.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L.A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 68: 2950-2958. doi: 10.1128/aem.68.6.2950-2958.2002.

Doenges, J.L. 1939. Spirochetes in the gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. *Proc SocExp Med Biol* 38: 536-538.

Dolan, B., Burkitt-Gray, L., Shovelin, S., Bourke, B., Bourkem 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. *Int J Med Microbiol* 308(2). doi: 10.1016/j.ijmm.2017.11.005.

Dore, M.P., Osato, M.S., Malaty, H.M., Graham, D.Y. 2000. Characterization of a culture method to recover *Helicobacter pylori* from the feces of infected patients. *Helicobacter* 5(3): 165-168. doi: 10.1046/j.1523-5378.2000.00026.x.

Dore, M.P., Sepúlveda, A.R., Osato, M.S., Realdi, G., Graham, D.Y. 1999. *Helicobacter pylori* in sheep milk. *Lancet* 354(9173): 132. doi: 10.1016/S0140-6736(99)01724-9.

Dorr, T., Vulic, M., Lewis, K. 2010. Ciprofloxacin causes persisted formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 8: e1000317. doi: 10.1371/journal.pbio.100031.

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 32-54. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1998-82174>.

Drechsel, L., Qadis, M., Wichelns, D. 2015. Wastewater: Economic in an urbanizing world. *Springer Netherlands, Dordrecht*. doi: 10.1007/978-94-017-9545-6.

Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10: 720-741.

Dunne, C., Dolan, B., Clyne, M. 2014. Factors that mediate colonization of human stomach by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 20(19): 5610-5624. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5610.

Duque-Jamaica, R., Arévalo-Galvis, A., Poutou-Piñales, R.A., Trespalacios, A.A. 2010. Sequential statistical improvement of the liquid cultivation of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 15(4): 303-312. doi: 10.1111/j.1523-5378.2010.00763.x.

Duquesne, A.A., Llanes, C.R., Feliciano, S.O., Falcón, M.R., Figueredo, B.M.E., Argudin, C.M. 2018. Correlación entre la presencia de factores de patogenicidad de *Helicobacter pylori* y enfermedades digestivas en pacientes con síntomas digestivos. 2012-2016. *Cuba y Salud* 13(2):40-47.

E

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(2): 203-210.

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.

Eslamian, S., Sayahi, M., Khosrav, B. 2016. Urban water reuse handbook. Chapter B2. Conjunctive use of water reuse and urban water.

Bibliografía

Espinosa, M.G., Vazque, R.G., Mendez, I.M., Vargas, C.R., Cerezo, S.G. 2011. Detection of the *glmM* gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. *J Clinical Microbiol* 49(4): 1650-1652. doi: 10.1128/JCM.00461-10.

E

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. 2006. Culture of *Helicobacter pylori* from stool samples in children. *Can J Microbiol* 53(3): 411-416. doi: 10.1139/W06-144.

Falsafi, T., Mahboubi, M. 2013. *Helicobacter hepaticus*, a new pathogenic species of the *Helicobacter* genus: similarities and differences with *H. pylori*. *Iran J Microbiol* 5(3): 185-194.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2015. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Cumplimiento de los objetivos internacionales para 2015 en relación con el hambre, balance de los desiguales progresos. Londres/Roma, Earthscan/FAO.

Farhadkhani, M., Nikaeen, M., Hassanzadeh, A., Nikmanesh, B. 2019. Potential transmission sources of *Helicobacter pylori* infection: detection of *H. pylori* in various environmental samples. *J Environ Health Sci Engineer* 17: 129-134. doi: 10.1007/s40201-018-00333-y.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., Bray, F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe, estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49(6): 1374-403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.

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(4): 529-542. doi: 10.1007/s10482-016-0658-9.

Fernández-Tilapa, G., Axinecuilteco-Hilera, J., Giono-Cerezo, S., Martínez-Carrillo D.N., Illades-Aguiar, 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(2): 175-180. doi: 10.4317/medoral.16.e175.

Figueiredo, C., Quint, W., Nouhanm N., van den Munckhof, H., Herbrink, P., Schepernisse, J., Boer, W., Scheneberger, P., Perez-Perez, G., Blaser, M.J., van Doorn, L.J. 2001. Assessment of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes and host serological response. *J Clin Microbiol* 39(4): 1339-1344. doi: 10.1128/JCM.39.4.1339-1344.2001.

Figuroa, G., Faúndez, G., Troncoso, M., Navarrete, P., Toledo, M.S. 2002. Immunoglobulin G antibody response to infection with coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(5): 1067-1071. doi: 10.1128/CDLI.9.5.1067-1071.2002.

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 Method* 91: 276-289 doi: 10.1016/j.mimet.2012.08.007.

Flemming, H.C. 2002. Biofouling in water systems-cases and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 629-640. doi: 10.1007/s00253-002-1066-9.

Ford, A.C., Axon, A.T. 2010. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter* 15: 1-6. doi:10.1111/j.1523-5378.2010.00779.x.

Frost, F., Kacprowski, T., Rühlemann, M., Bang, A.C., Franke, A., Zimmerman, K., Nauck, M., Völzke, H., Biffar, R., Schuelz, C., Mayerle, J., Weiss, F.U., Homuth, G., Lech, M. 2019. *Helicobacter pylori* infection associates with fecal microbiota composition and diversity. *Sci Rep* 9,20100. Doi: 10.1038/s41598-019-56631-4

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(2): 961-968. doi: 10.1128/AEM.67.2.961-968.2001.

Fukuda, K., Kuroki, T., Tajima, Y., Tsuneoka, N., Kitajima, T., Matsuzaki, S., Furui, J., Kanematsu, T., 2002. Comparative analysis of *Helicobacter* DNAs and biliary pathology in patients with and without hepatobiliary cancer. *Carcinog vol* 23: 1927-1931. doi: 10.1093/carcin/23.11.1927.

G

Gallego-Schmid, A., Zepon Tarpani, R.R.2019. Life cycle assessment of wastewater treatment in developing countries: A review, *Water Research* 153: 63-79. Doi: 10.1016/j.watres.2019.01.010.

Gao, S., Sun, C., Hong, H., Gooneratne, R., Mutukumira, A., Wu, X. 2021. Rapid detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula using improved propidium monoazide (PMAxx) and quantitative recombinase polymerase amplification (qRPA) assay. *Food Control* 107899. doi: 10.1016/j.foodcont.2021.107899.

Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., Magnani, M. 2018. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites Vectors* 11,273. Doi: 10.1186/s13071-018-2859-8

Gantuya, B., El Serag, H.B., Saruuljavkhlan, B., Azzaya, D., Matsumoto, T., Uchida, T., Oyuntstseg, K., Oyunbileg, N., Davaadorj, D., Ymaoka, Y. 2021. Advantage of 16S Rna amplicon sequencing in *Helicobacter pylori* diagnosis- *Helicobacter* e12790. Doi: 10.1111/hel.12790.

García, A., Salas-Jara, M.J., Herrera, C., González, C. 2014. Biofilm and *Helicobacter pylori*: from environment to human host. *World J Gastroenterol* 20: 5632-5638. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5632.

García, E. 2006. *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. *Revista Facultad de Medicina UNAM* 49.

Garlapati, D., Charankumar, B., Ramu, K., Madeswaran, P., Murthy, M.V.R. 2019. A review on the applications and recent advances in environmental DNA (eDNA) metagenomics. *Rev Environ Sci Biotechnol* 18: 389-411. Doi: 10.1007/s11157-019-09501-4

Bibliografía

- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hofmann, R., Hass, R. 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Sci* 301: 1099-1102. doi: 10.1126/science.1086871.
- Gebreselema, G., Andrew, N., Christine, B., Desta Berhe, S. 2019. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* 5: 8. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02192.
- Gerrits, M.M., Van Vilet, A.H., Kuipers, E.J., Kusters, J.G. 2006. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* 6: 699-709. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70627-2.
- Gharpure, R., Perez, A., Miller, A.D., Wikswo, M.E., Silver, R., Hlavsa, M.C. 2019. Cryptosporidiosis Outbreaks-United States, 2009-2017. *MMWR* 68: 568-572. Doi: 10.15585/mmwr.mm6825a3.
- Gião, M.S., Azevedo, N.F., Wilks, S.A., Vieira, M.J., Keevil, C.W. 2008. Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking water biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74: 5898-5904. doi: 10.1128/AEM.00827-08.
- Gião, M.S., Azevedo, N.F., Wilks, S.A., Vieira, M.J., Keevil, C.W. 2010. Effect of chlorine on incorporation of *Helicobacter pylori* into drinking water biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74: 5898-5904.
- Gisbert, J.P., Trapero, M., Calvet, X., Mendoza, J., Quesada, M., Guell, M., Pajares, J.M. 2004. Evaluation of three different test for the detection of stool antigens to diagnose *Helicobacter pylori* infection in patients with upper gastrointestinal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 923-929. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.01932.x. PMID: 15080854.
- Goh, S.G., Gin, K.Y., 2015. The effects of Pretreatment on qPCR Detection of Bacteria- Bacteria Indicator, *Enterococcus* as a Model. *J Microbiol Biochem Technol* 7(2), 124-132. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000193>
- Goldman, C.G., Loureiro, J.D., Matteo, M.J., Catalano, M., Gonzalez, A.B., Heredia, S.R., Zubillaga, M.B., Solnick, J.V., Cremaschi, G.A. 2009. *Helicobacter* spp. from gastric biopsies of stranded South American fur seals (*Arctocephalus australis*). *Res Vet Sci* 86: 18-21. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.04.001.
- Gong, R. J., Xu, C. X., Li, H., & Liu, X. M. 2021. Polymerase chain reaction-based tests for detecting *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance in stool samples: A meta-analysis. *World journal of clinical cases*, 9(1), 133–147. Doi: 10.12998/wjcc.v9.i1.133
- González, A., Piqueres, P., Moreno, Y., Cañigral, I., Owen, R.J., Hernández, J., Ferrús M.A., 2008. A novel real-time PCR assay for the detection of *Helicobacter pullorum*-like organisms in chicken products. *Int Microbiol* 11. doi: 10.2436/20.1501.01.xx
- González, F.R. 2005. Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación microbiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad de desinfectantes *in situ* de productos limpiadores comerciales. Disponible en: <https://www.tdx.cat/handle/10803/5664?show=full>.
- 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 as *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* 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/

Gourmelon, M., Cillard, J., Pommepuy, M. 1994. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater, oxidative stress hypothesis. *J Appl Bacteriol* 77(1): 105-112. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03051.x.

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(2): 77-84. doi: 10.1111/j.1751-2980.2009.00368.x

Groote, D., Doorn, L.J., Bulck, K., Vandamme, P., Vieth, M., Stolte, M., Debongnie, J.C., Burette, A., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. 2005. Detection of non-pylori *Helicobacter* species in “*Helicobacter heilmannii*”-infected humans. *Helicobacter* 10: 398-406. doi: 10.1111/j.1523-5378.2005.00347.x.

Guaman, J., Baya-Morejon, F., Brito, E., Paredes, N. 2020. Bacterial DNA extraction method for the detection of *Helicobacter pylori* from human fecal samples. *Asian J Pharm Clin Res.* 13(6): 38.40. doi: 10.22159/ajpcr2020.v13i6.37344.

Guarner, J., Kalach, N., Elitsur, Y., Koletzko, S. 2010. *Helicobacter pylori* diagnostic test in children: review of literature from 1999 to 2009. *Eur J Pediatr* 169(1): 15-25. doi: 10.1007/s00431-009-1033-x.

Gutierrez, O., Gomez, M., Castillo Moreno, B. 2001. La infección gástrica por *Helicobacter pylori* modifica la secreción de ácidos. *Rev Fac Med UN Col* 49: 76-80.

H

Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, B., Baele, M., Meyns, T., Decostere, A., Ducatelle, R. 2009. Gastric *Helicobacters* in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clin Microbiol* 22: 202-223. doi: 10.1128/CMR.00041-08.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms, from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108. doi: 10.1038/nrmicro821.

Hamada, T., Yokota, K., Ayada, K., Hirai, K., Kamada, T., Haruma, K., Chayama, K., Oguma, K. 2009. Detection of *Helicobacter hepaticus* in human bile samples of patients with biliary disease. *Helicobacter* 14(6): 545-551. doi: 10.1111/j.1523-5378.2009.00729.x.

Han, M.W., Koll, U., Schmidt, J. 2019. Isolation and cultivation of bacteria. In: Hurst C. (eds) The structure and function of aquatic microbial communities. *Advances in Environmental Microbiology*, vol 7. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-030-16775-210.

Hashemi, S.J., Sheikh, A.F., Goodarzi, H., Yadyad, M.J., Seyedian, S.S., Aslani, S., Assarzagdegan, M.A. 2019. Genetic basis for metronidazole and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastroduodenal disorders. *Infect Drug Resist* 12: 535-543. Doi: 10.2147/IDR.S192942.

Hathroubi, S., Beaudry, F., Provost, C., Martelet, L., Segura, M., Gagnon, CA, Jacques, M. 2016. Impact, of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm mode of growth on the lipid structures and stimulation of immune cells. *Innate Immun* 22: 353-362. doi: 10.1177/1753425916649676.

Bibliografía

- Hathroubi, S., Servetas, S.L., Windham, I., Merrell, D.S., Ottemann, K.M. 2018. *Helicobacter pylori* biofilm formation and its potential role in pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82(2): e00001-18. Doi: 10.1128/MMBR.00001-18.
- Hayes, S.L., White, K.M., Rodgers, M.R. 2006. Assessment of the effectiveness of low-pressure UV light for inactivation of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 72: 3763-3765. doi: 10.1128/AEM.72.5.3763-3765.2006.
- Heilmann, K.L., Borchard, F. 1991. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*, clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut* 32(2): 137-140. doi: 10.1136/gut.32.2.137.
- Hemmatinezhad, B., Momtaz, H., Rahimi, E. 2016. *VacA*, *cagA*, *iceA* and *oipA* genotypes status and antimicrobial resistance properties of *Helicobacter pylori* isolated from various types of ready to eat foods. *Ann Clin Microbiol Antimic* 15: 2. doi: 10.1186/s12941-015-0115-z.
- Hijnen, W., Beerendonk, E., Medema, G. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria, and protozoan (oo) cysts in water: a review. *Water Res* 40: 3-33. doi: 10.1016/j.watres.2005.10.030.
- Hirai, I., Sasaki, T., Fujimoto, S., Moriyama, T., Azuma, T., Yamamoto, Y. 2009. A method for assessment of *Helicobacter pylori* genotype using stool specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 56(1): 63-66. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00549.x.
- Höcker, M., Hohenberger, P. 2003. *Helicobacter pylori* virulence factors one part of a big picture. *Lancet* 362(9391): 1231-1233. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14547-3.
- 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(12): 1365-1373. doi: 10.1038/ismej.2009.89.
- 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. *Gastroenterol* 153: 420-429. doi: 10.1053/j.gastro.2017.04.
- Horiuchi, T., Ohkusa, T., Watanabe, M., Kobayashi, D., Miwa, H., Eishi, Y. 2001. *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiol Immunol* 45: 515-519. doi: 10.1111/j.1348-0421.2001.tb02652.x.
- Hua, J., Ho, B. 1996. Is the coccoid form of *Helicobacter pylori* viable? *Microbios* 87: 103-112.
- Huang, Y., Fan, X.G., Chen, Y.P., Li, N., Tang, L.J. 2002. Detection of *Helicobacter* species 16S rRNA gene in paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissues. *World Chinese J Digestol* 10(8).
- Huffer, S., Clark, M.E., Ning, J.C., Blanch, H.W., Clark, D. 2011. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. *Appl. Environ. Microbiol* 77(18): 6400-6408. doi: 10.1128/AEM.00694-11.
- Hugenholtz, P., Pace, N.R. 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment, a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol* 14: 190-197.

Hulten, K., Enroth, H., Nyström, T., Engstrand, L. 1998. Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water.

Hurst, A., Hughes, A., Collins-Thompson, D.L., Shah, B.G. 1974. Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating of *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol* 20: 1153-1158.

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).

Ibekwe, A.M., Jincai, M.A., Murinda, S.E. 2016. Bacterial community composition and structure in an urban river impacted by different pollutant sources. *Sci Total Environ* 566-567: 1176-1185. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.168.

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.

International Food Policy Research Institute (IFPRI); and VEOLIA. 2015. The murky future of global water quality, New global study projects rapid deterioration in water quality. Washington, D.C. and Chicago, IL, International Food Policy Research Institute (IFPRI) and Veolia Water North America. <http://ebrary.ifpri.org/cdm/ref/collection/p15738coll2/id/129349>.

Isaeva, G.Sh., Valieva, R.I. 2018. Biological characteristics and virulence of *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Antinicrobial Chemotherapy* 20 (1): 14-23. Doi: 10.36488/cmac.2018.1.14-23.

Ishijama, N., Suzuki, M., Ashida, H., Ichikawa, Y., Kanegae, Y., Saito, I., Borén, T., Haas, Rainer., Sasakawa, C., Mimumom, H. 2011. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem* 286(28): 25256-25264. doi: 10.1074/jbc.M111.233601.

Iwamoto, A., Tanahashi, T., Okada, R., Yoshida, Y., Kikuchi, K., Keida, Y., Yoshida, M. 2014. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. *Gut Pathog* 6: 27. doi: 10.1186/1757-47496-27.

Izquierdo, P. 2015. comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms. Trabajo final de grado. Fisabio, Valencia. <http://hdl.handle.net/10017/20350>.

J

Jaff, MS. 2011. Relation between ABO blood groups and *Helicobacter pylori* infection in symptomatic patients. *Clin Exp Gastroenterol* 4: 221-226. doi: 10.2147/CEG.S23019.

Jaka, H., Ah. Rhee, J., Östlunch, L., Smart, L., Peck, R., Mueller, A., Kasang, C., E. Mshana, S. 2018. The magnitude of antibiotic resistance to *Helicobacter pylori* in Africa and identified mutations which confer resistance to antibiotics: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 18: 193. doi: 10.1186/s12879-018-3099-4.

Bibliografía

Janzon, A., Sjöling, A., Lothigius, A., Ahmed, D., Qadri, F., Svennerholm, A.M. 2009. Failure to detect *Helicobacter pylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using extremely sensitive real-time PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 75(10): 3039-3044. doi: 10.1128/AEM.02779-08.

Javed S., Skoog E.C., Solnick J.V. 2019. Impact of *Helicobacter pylori* Virulence Factors on the Host Immune Response and Gastric Pathology. In: Backert S. (eds) Molecular Mechanisms of Inflammation: Induction, Resolution and Escape by *Helicobacter pylori*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 421. Springer, Cham. Doi:10.1007/978-3-030-15138-6_2

Jeong, J.Y., Mukhopadhyay, A.K., Dailidienė, D., Wang, Y., Velapatiño, B., Gilman, R.H., Parkinson, A.J., Nair, G.B., Wongm B.C.Y., Lam, A.K., Mistry, R., Segal, I., Yuang, Y., Gao, H., Alarcon, T., Brea, M.K., Ito, Y., Kersulyte, D., Lee, H.K., Gong, Y., Goodwin, A., Hoffmann P.S., Berg, D.E. 2000. Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 182(18): 5082-5090. doi: 10.1128/JB.182.18.5082-5090.2000.

Jiang, X., Doyle, M.P. 2002. Optimizing enrichment culture conditions for detecting *Helicobacter pylori* in foods. *J Food Prot* 65(12): 1949-1954. doi: 10.4315/0362-028x-65.12.1949.

Jiang, X., Doyle, M.P. 1998. Effect of environmental and substrate factors on survival and growth of *Helicobacter pylori*. *J Food Prot* 61(8): 929-933. Doi: 10.4315/0362-028X-61.8.929.

Jin, Y., Yip, H.K., Samaranayake, J.H., Yau, J.Y., Samaranaya, L.P. 2003. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 41(7): 2961-2967. doi:10.1128/JCM.41.7.2961-2967.2003.

Johnson, C.H., Rice, E.W., Reasoner, D.J. 1997. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Appl Environ Microbiol* 63(12): 4969-4970.

Joosten, M., Flahou, B., Meyns, T., Smet, A., Arts, J., De Cooman, L., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. 2013. Case report: *Helicobacter susi* infection in a pig veterinarian. *Helicobacter* 18(5): 392-6. doi: 10.1111/hel.12054.

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(6): e39315. doi: 10.1371/journal.pone.0039315.

K

Kageyama, C., Sato, M., Sakae, H., Obayashi, Y., Kawahara, Y., Mima, T., Matsushita, O., Yokota, K., Mizuno, M., Okada, H. 2019. Increase in antibiotic resistant *Helicobacter pylori* in a University Hospital in Japan. *Infect Drug Resis*, 12: 597–602. Doi: 10.2147/IDR.S196452

- Kakiuchi, T., Okuda, M., Hashinguchi, K., Imamura, I., Nakayama, A., Matsuo, M., 2019. Evaluation of a novel stool antigen rapid test kit for detection of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Microbiol* 57(3): e01825-18. doi: 10.1128/JCM.01825-18.
- Kalavrouziotis, I.K., Kokkinos, P., Oron, G., Fatone, F., Bolzonella, D., Vatyliotou, M., Fatta-Kassinos, D., Koukoulakis, P.H., Varnavas, S.P. 2013. Current status in wastewater treatment reuse and research in some Mediterranean countries. *Desalin Water Treat* 1-16. doi: 10.1080/19443994.2013.860632.
- Kalyuzhnaya, M.G., Lapidus, A., Ivanova, N., Copeland, A.C., McHardy, A.C., Szeto, E., Salamov, A., Grigoriev, I.V., Suci, 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(9): 1029-1034. doi: 10.1038/nbt.1488.
- 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(3): 672-684. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06078.x.
- Karagin, P., Stenram, U., Wadström, T., Ljungh, A. 2010. *Helicobacter* species and common gut bacterial DNA in gallbladder with cholecystitis. *World J Gastroenterol* 16: 4817-4822. doi: 10.3748/wjg.v16.i38.4817.
- Keilberg, D., Ottemann, K.M. 2016. How *Helicobacter pylori* senses, targets, and interacts with the gastric epithelium. *Environ Microbiol* 18: 791-806. doi: 10.1111/1462-2920.13222.
- Khan, A., Farooqui, A., Kazmi, S.U. 2012. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water of Karachi, Pakistan. *J Infect Dev Ctries* 6(3): 251-255. doi:10.3855/jidc.2312.
- 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(8): 1358-1373. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.010.
- Kim, S.Y., Chung, J.W. 2020. Best *Helicobacter pylori* Eradication Strategy in the Era of Antibiotic Resistance. *Antibiotics* 9(8):436. Doi: 10.3390/antibiotics9080436
- Kimura, N. 2006. Metagenomics: access to unculturable microbes in the environment. *Microbes Environment* 21(4): 1358-373. doi: 10.1264/jsme2.21.201.
- Kirs, M., Harwood, V.J., Fildler, A.E., Gillespies, P.A., Fyfe, W.R., Blackwood, A.D., Cornelisen, C.D. 2011. Source tracking faecal contamination in an urbanized and a rural waterway in the Nelson-Tasman region, New Zealand. *New Zealand. J Mar Fresh Res* 45(1): 43-58. doi: 10.1080/00288330.2010.535494.
- Klindworth, A., Pruedde, 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 Acids Res* 41(1): e1. doi: 10.1093/nar/gks808.
- Kogure, K., Simidu, U., Taga, H. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol* 25: 415-420.

Bibliografía

Kopylova, E., Noé, L., Touzet, H. 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28: 3211-3217.

Korkmaz, H., Kesli, R., Karabagli, P., Terzi, Y. 2013. Comparison of the diagnostic accuracy of five different stool antigen tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 18(5): 384-391. doi: 10.1111/hel.12053.

Koutchma, T. 2008. UV Light for processing Foods. *IUVA News*. 10(4): 24-29.

Kragh, M.L., Truelstrup, H.L. 2020. Initial transcriptomic response and adaption of *Listeria nobocytogenes* to desiccation on food grade stainless steel. *Frontiers in Microbiology* 10: 3132. Doi: 10.3389/fmicb.2019.03132.

Krogfelt, K.A., Lehours, P., Mégraud, F. 2005. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 10(S1): 5-13. doi:10.1111/j.1523-5378.2005.00341.x.

Krüger, N.J., Bhaler, C., Iwobi, A., Huber, I., Ellbroek, L., Appel B., Stinggl, K. 2014. "Limits of Control"-crucial parameters for a reliable quantification of viable *Campylobacter* by real time. *Plos One* 4(9): 2e88108. doi: 10.1371/journal.pone.0088108.

Krumbiegel, P., Lehmann, I., Alfreider, A., Fritz, G. J., Boeckler, D., Rolle-Kampzyk, U., Richter, M., Jorks, S., Muller, L., Richter, M. W., Herbarth, O. 2004. *Helicobacter pylori* determination in non-municipal drinking water and epidemiological findings. *Isot Environ Health Stud* 40(1): 75-80. doi: 10.1080/10256010310001639868.

Kumaraswamy, R., Amha Y.M., Anwar, M.Z., Henschel, A., Rodrigues, J., Ahmand, F. 2014. Molecular analysis for screening human bacterial pathogens in municipal wastewater treatment and reuse. *Environ Sci Tec* 48: 11610-11619. doi: 10.1021/es502546t.

Kwon, Y.H., Kim, J.Y., Kim, N., Park, J.H., Nam, R.H., Lee, S.M., Kim, J.W., Kim, J.M., Park, J.Y., Lee, D.H. 2017. Specific mutations of penicillin-binding protein 1A in 77 clinically acquired amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* strains in comparison with 77 amoxicillin-susceptible strains. *Helicobacter* 22: e12437. doi: 10.1111/hel.12437.

L

Lagier, J.C., Edouard, D., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., Raoult, D. 2015. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 28(1): 208-236. doi: 10.1128/CMR00110-14.

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(10): 4677-4681.

Lazarova, V., Asano, T., Bahri, A., Anderson, J. 2013. Milestone in Water Reuse: The Best Success Stories. *IWA*. doi: 10.2166/9781780400716.

- Lebeaux, D., Ghigo, J.M., Beloin, C. 2014. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 78: 510-543. doi: 10.1128/MMBR.00013-14.
- Lee, A., Hazel, S.L., Rourke, J., Kouprach, S. 1988. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun* 56(11): 2843-2850. doi: 10.1128/IAI.56.11.2843-2850.1988.
- Lee, E.S., Lee, M.H., Kim, B.S. 2015. Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable *Mycobacterium fortuitum* after chlorine, ozone, and ultraviolet disinfection. *Int J Food Microbiol* 210: 143-148. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.019.
- Leja, M., Axon, A., Brenner, H. 2016. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 21: 3-7.
- 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(10): 2881-2884. doi:10.1016/S0002-9270(99)00487-6.
- Lewis, K. 2007. Persister cells, dormancy, and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5: 48-56.
- Li, D., Tong, T., Zeng, S., Lin, Y., Wu, S., He, M. 2014. Quantification of viable bacteria in wastewater treatment plants by using propidium monoazide combined with quantitative PCR (PMA-qPCR). *J Environ Sci* 26: 299-306. doi: 10.1016/S1001-0742(13)60425-8.
- Li, X., Yan, Z., Xu, J. 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiol* 149: 353-362.
- 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.
- Lin, W., Li, S., Zhang, S., Yu, X. 2016. Reduction in horizontal transfer of conjugative plasmid by UV irradiation and low-level chlorination. *Water Res* 91: 331-330. doi: 10.1016/j.watrs.2016.01.020.
- Linke, S., Len, J., Gemein, S., Exner, M., Gebel, L. 2010. Detection of *Helicobacter pylori* in biofilm by real-time PCR. *Int J Hyg Environ Health* 231(3): 176-182. doi: 10.1016/j.ijheh.2010.03.006.
- Liu, Ds., Wang, Yh., Zhu, Zh., Zhang, SH., Zhu, X., Wan, Jh., Lu, Nh., Xie, Y. 2019. Characteristics of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: data from four different populations. *Antimicrob Resist Infect Control* 8, 192. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0632-1>
- 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(7): e2689. doi: 10.1371/journal.pone.0002689.
- Liu, Y., Mustapha, A. 2014. Detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR. *Int J Food Microbiol* 170: 48-54. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.026.

Bibliografía

- Lleò, 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(9): 2313-2320. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01345.x.
- Lockard, V. G., Boler, R. K. 1970. Ultrastructure of a spiraled micro-organism in the gastric mucosa of dogs. *Am J Vet Res* 31(8): 1453-1462.
- Loera, M., Ramírez, C., Avelar, F.J., Guerrero, A.L. 2012. Biopelículas multiespecie: asociarse para sobrevivir. *Investigación y Ciencia* 54: 49-56.
- 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(9): 2659-2671. doi: 10.1111/1462-2920.12250.
- Loret, J.F., Greub, G. 2010. Free-living amoebae, biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health* 213(3): 167-175. doi: 10.1016/j.ijheh.2010.03.004.
- Lottspeich, C., Schwarzer, A., Panthel, K., Koletzko, S., Russmann, H. 2007. Evaluation of the novel *Helicobacter pylori* ClarisRes real-time PCR assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of *H. pylori* in stool specimens from symptomatic children. *J Clin Microbiol* 45(6): 1718-22. doi: 10.1128/JCM.00103-07.
- LØvdal, T., Hovda, M.B., Bjorkblom, B., Moller, S.G. 2011. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *J Microbiol Methods* 85(2): 164-169.
- Lu, X., Zhang, X.X., Wang, Z., Huang, Z., Wang, Y., Liang, W., Tan, Y., Liu, B., Tang, J. 2015. Bacterial pathogens and community composition in advanced sewage treatment systems revealed by Metagenomics analysis based on High-Throughput Sequencing. *PLOS ONE* 10(5): e0125549 doi: 10.1371/journal.pone.0125549
- Lu, Y., Redlinger, T.E., Avitivia, R., Galindo, A., Goodman, K. 2002. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl Environ Microbiol* 68(3): 1436-1439. doi: 10.1128/AEM.68.3.1436-1439.2002.
- Lunov, O., Zablotskii, V., Churpita, O., Chánová, E., Syková, E., Dejneka, A. 2014. Cell death induced by ozono and various non-thermal plasmas: therapeutic perspectives and limitations. *Sci Rep* 4: 7129. doi: 10.1038/srep07129.
- Luo, J.F., Lin, W.T., Guo, Y. 2010. Method to detect only viable cells in microbial ecology. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 377-384.
- 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(6): 623-627. doi: 10.1097/00042737-200012060-00008.
- Lyu, S., Zhang, W., Fan, Y., Jiao, W. 2016. Wastewater reclamation and reuse in China: opportunities and challenges. *J Environ Sci* 39: 86e96. doi: 10.106/j.jes.2015.11.012.

M

Madiga, M., Martikno, J., Parker. 2004. Biología de los Microorganismos. *Pearson-Prentice Hall*. ISBN 97884205367988420536792.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Inter J Food Microbiol* 72(1-2): 107-113. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00624-9.

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C.A., Atherton J., Axon, A.T., Bazzoli, F., Gensini, G.F., Gisbert, J.P., Graham, D.Y., Rokkas, T., El-Omar, E.M., Kuipers, E.J. 2016. European *Helicobacter* and microbiota study group and consensus panel. Management of *Helicobacter pylori* infection-the maastrich V/ Florence consensus Report; *Gut* 66:6-30

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 selected fecal bacteria. *Microbiol* 149: 269-277. doi: 10.1099/mic.0.25975-0.

Marshall, B.J. 2001. One hundred years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease. 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., Armstrong J.A., Francis G.J., Nokes N.T., Wee S.H. 1987. Antibacterial action of bismuth in relation to *Campylobacter pyloridis* colonization and gastritis. *Digestion* 37: 16-30.

Marshall B.J., Warren, R.J. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1:1311-1315.

Martínez-Carrillo, D.N., Atrisco-Morales, J., Hernández-Pando, R., Reyes-Navarrete, S., Betancourt-Linares, R., Cruz-del Carmen, I., Ilades Aguiar, B., Román-Román, A., Fernández-Tilapa, G. 2014. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. *Rev Gastroenterol Mex* 79: 220-228. doi: 10.1016/j.rgm.2014.10.003.

Martínez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldegue, X., Blanca, J.E., Blanc, M., Ponte, C., Soriano, F., Darfeuille-Michaud, A., Garcia-Gil, L.J. 2009. Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol* 9: 2002. doi: 10.1186/1471-2180-9-202.

Martins, K.B., Ferreira, A.M., Pereira, V.C., Pinheiro, L., Oliveira, A., Cunha, M.L.R.S. 2019. In vitro Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of *Staphylococcus saprophyticus* Isolated from Patients With Urinary Tract Infections. *Front. Microbiol.* 10:40. doi: 10.3389/fmicb.2019.00040

Marugán, J., van Grieken, R., Pablos, C., Sordo, C. 2010. Analogies and differences between photocatalytic oxidation of chemicals and photocatalytic inactivation of microorganisms. *Water Res* 44(3): 789-796. doi:10.1016/j.watres.2009.10.022.

Mateo, M.R., Toja, Y.L., Barreo, M.J.A., Navarro, D.M. 2019. La huella hídrica en el ciclo urbano del agua. *Tecnoaqua*.

Bibliografía

- Mateos-Muñoz, B., Pérez-de-la-Serna, J., Ruiz-de-León, A., Serrano-Falcón, B., Casabona-Francés, S., Velasco-Cerrudo, A., Rey-Díaz-Rubio, E. 2013. Enterohepatic *Helicobacter* other than *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig* 105(8): 477-84. doi: 10.4321/s1130-0108/2013/105/8/477-485.
- 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(5): e2305. doi: 10.1371/journal.pone.0002305.
- McGee, D., Geore, S., Trainor, E., Hortonm, K., Hildebrandt, E., Testerman, L. 2011. Cholesterol enhances *Helicobacter pylori* resistance to Antibiotics and LL-37. *Antimicrob Agents Ch* 55(6): 2897-2904. doi: 10.1128/AAC.00016-11.
- Mckillip, J.L., Jaykus, L.A., Dracke, M., 1998. rRNA stability in heat-killed and UV irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 64(11): 4264-4268. doi: 10.1128/AEM.64.11.4264-4268.1998.
- Ménard, A., Smet, A., 2019. Review: Other *Helicobacter* species. *Helicobacter* 24: e12645. doi: 10.1111/hel.12645.
- Mendoza, S.M.D., Vera, M.S.S. 2010. Formación de trihalometanos y la manera más factible de su eliminación en el sistema de agua potable. Universidad Técnica de Manabí Facultad de Ciencias Matemáticas Físicas y Químicas Manabí Ecuador. *Tesis de licenciatura*. 102pp
- Mercier, C., Boyer, F., Bonin, A., Coissa, E. 2013. SUMATRA and SUMACLUST: Fast and exact comparison and clustering of sequences. <https://git.metabarcoding.org/obitools/sumatra/wikis/home/>.
- Metcalf y Eddy. 2003. Wastewater Engineering, Treatment and Reuse. 4th Edition, McGraw-Hill, New York.
- Miendje, Deyi, V.Y., Van den Borre, C., Fontaine, V. 2010. Comparative evaluation of 3 selective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies under routine conditions. *Diagn Microbol Infec Dis* 68(4): 474-476. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.009.
- Misba, L., Zaidi, S., Khan, A.U. 2017. A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram-negative bacterial biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 18: 24-33.
- Mishra, R.R., Tewari, M., Shukla, H.S. 2010. *Helicobacter* species and pathogenesis of gallbladder cancer. *Hepatob Pancreat Dis Int* 9: 129-134.
- Mitchell, H.M., Rocha, G.A., Kaakoush, N.O., O'Rourke, J.L., Queiroz, D.M.M. 2014. The family *Helicobacteraceae*. In, Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-3904-9_275.
- Mizoguchi, H., Fujioka, T., Nasu, M. 1999. Evidence for viability of coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 34: 32-36.

Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., Montecucco, C. 1998. Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* 187: 135-140. doi: 10.1084/jem.187.1.135.

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. doi: 10.1186/1471-230X-14-61.

Montero-Campos, V., Arias-Cordero, S., Valdés-Rodríguez, B., Jarquín-Cordero, M. 2015. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* by Real Time PCR in drinking water-environmental and public health risk significance. *J Med Microbiol* 5: 118-127. doi: 10.4236/ojmm.2015.53015.

Moreno-Mesonero, L., Hortelano, I., Moreno, Y., Ferrús, M.A., 2020. Evidence of viable *Helicobacter pylori* and other bacteria of public health interest associated with free-living amoebae in lettuce samples by next generation sequencing and other molecular techniques. *J Food Microbiol* 318: 108477. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2019.108477>.

Moreno, Y., Pérez, R., Ramirez, M.J., Calvet, X., Santiago, P., Ferrús, M.A. 2015. Rapid identification of viable *H. pylori* Cells in feces by DVC-FISH. *JSM Gastroenterol Hepatol* 3(3): 1049.

Moreno, Y., Ferrús, M.A. 2012. Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter* 17(5): 327-332. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00961.x.

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(15): 3490-3496. doi: 10.1016/j.watres.2007.05.020.

Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J.L., Ferrús, M.A., Hernández, M., Hernández, J. 2003. Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 69(2): 1181-1186. doi: 10.1128/AEM.69.2.1181-1186.2003.

Moreno, Y., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Jiménez, A., Hernández, J. 2003a. Use of fluorescent *in situ* hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Wat Res* 37(9): 2251-2256. doi: 10.1016/S0043-1354(02)00624-3.

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(1): 1537.

Morgan, J.L., Darling, A.E., Eisen, J.A. 2010. Metagenomic sequencing of an in vitro-simulated microbial community. *PLoS One* 16: e10209. doi: 10.1371/journal.pone.0010209.

Morgan, D.R., Mathewson, J.J., Freedman R., Kraft, W.G. 1990. Evaluation of a selective enrichment technique for the isolation of *Campylobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 54: 303-306.

Moter, A., and Göbel, U. B. 2000. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 41(2): 85-112. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00152-4.

Mounaouer, B., Abdennaceur, H. 2012. Ultraviolet radiation for microorganism inactivation in wastewater. *J Environ Prot* 3: 194-202.

Bibliografía

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. doi: 10.1186/1678-9199-20-51.

N

Nakamura, M., Øverby, A., Michimae, H., Matsui, H., Takahashi, S., Mabe, K., Shimoyama, R., Sasaki, M., Terao, S., Kamada, T., Yanaka, A., Iwamoto, J., Tanabe, S., Tarim A., Nasu, S., Suzukim H., Murayama, S.Y. 2019. PCR analysis and specific immunohistochemistry revealing a high prevalence of non-*Helicobacter pylori* Helicobacters in *Helicobacter pylori*-negative gastric disease patients in Japan: High susceptibility to an Hp eradication regimen. *Helicobacter* 25: e12700. Doi: 10.1111/hel.12700.

Nam, S., Kwon, A., Kim, M.J., Chae, J.C., Maeng, P.J., Park, J.G., Lee, G.C. 2011. Selective detection of viable *Helicobacter pylori* using ethidium monoazide or propidium monoazide in combination with real-time polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 55: 841-846. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00388.x.

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. doi: 10.1016/B978-0-12-407863-5.00019-8.

Nazar, C.J. 2007. Biofilms bacterianos. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* 67(1): 12. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071848162007000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es 5.

Ndèye, Y., Badiane, N., Ezékiel, B., Aliou, G., Mountakha, S., Mamadou, K., Alain, B. 2008. Impact of irrigation water quality on soli nitrifying and total bacterial communities. *Biol Fertil Soils* 44: 797-803. doi: 10.1007/s00374-008-0285-3.

Neben-von-Caron, G., Stephens, P.J., Hewitt, C.J., Powell, J.R., Badley, R.A. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods* 42: 97-114.

Ng, C.G., Loke, M.F., Goh, K.L., Vadivelu, J., Ho, B. 2017. Biofilm formation enhances *Helicobacter pylori* survivability in vegetables. *Food Microbiol* 62: 68-76. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.010.

Nicolette, J., Dakoulas, E., Pant, K., Crosby, M., Kondratiuk, A., Murray, J., Sonders, P., Kulkarni, R., Jayakumar, G., Mathur, M., Patel, A., Vicente, R., Datta, K., Kolaja, K. 2018. A comparison of 24 chemicals in the six-well bacterial reverse mutation assay to the standard 100-mm Petri plate bacterial reverse mutation assay in two laboratories. *Regul Toxicol Pharmacol* 100: 134-160. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.10.005.

Nilius, M., Ströhle, A., Bode, G., Malferttheiner, P. 1993. Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. *Zentralbl Bakteriol* 280: 259-272.

Nilson. I., Lindgren, S., Eriksson, S., Wadström, T. 2000. Serum antibodies to *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori* in patients with chronic liver diseases. *Gut* 46(3): 410-414. doi: 10.1136/gut.46.3.410.

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(1): 11-19. doi: 10.1128/AEM.68.1.11-19.2002.

Nkuipou-Kenfack, E., Engel, H., Fakh, S., Nocker, A. 2013. Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. *J Microbiol Methods* 93: 20-21.

Nocker, A., Shah, M., Dannenmann, B., Schulze-Osthoff, K., Wingender, J., Probst, A.J. 2018. Assessment of UV-C induced water disinfection by differential PCR-based quantification of bacterial DNA damage. *J Microbiol Methods* 149: 89-95. doi: 10.1016/j.mimet.2018.03.007.

Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D., Camper, A.K. 2007. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbiology ecology. *Appl Environ Microbiol* 73(16): 5111-5117. doi: 10.1128/AEM.02987-06.

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(3): 1997-2004. doi: 10.1128/AEM.72.3.1997-2004.2006.

Nurgaliev F.M. 2020. Detection of *Helicobacter suis* bacteria in pigs of different age groups. *Vet Sci Today*. (4):266-271. doi: 10.29326/2304-196X-2020-4-35-266-271.

O

OCDR, Banco Mundial. 2012. "Evaluación de políticas nacionales de educación, La educación superior en Colombia".

Olczak, A., Seyler, R., Olson, J., Maier, R. 2003. Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. *Infect Immun* 71: 580-583. doi: 10.1128/IAI.71.1.580-583.2003.

Oliver, J.D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34(4): 415-425. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.

Oliver, J.D., Dagher, M., Linden, K. 2005. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *J Water Health* 3: 249-257.

Oliver, J.D. 2005a. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43(1): 93-100.

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.

Ormerod, K.J., Redman, S., Kelley, S. 2019. Public perceptions of potable water reuse, regional growth, and water resources management in the Reno-Sparks area of northern Nevada, USA. *City Environ Interact* 2, 10014. Doi: 10.1016/j.cacint.2019.100015.

Bibliografía

Orta de Velásquez, M.T., Yáñez Noguez, I., Casasola Rodríguez, B., Román Román, P.I. 2016. Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Environ Techn* 8: 39. doi: 10.1080/09593330.2016.1210680.

Otter, J.A., Vickery, K., Walker, J.T., Pulcini, E., Stoodley, P., Goldenberd, S.D., Skeld, J.A.G., Chewins, J., Yezli, S., Edgeworth, J.D. 2015. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *J Hospital Infection* 89(1): 16-27. doi: 10.1016/j.jhin.2014.09.008.

Oulas, A., Pavlouidi, 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. doi: 10.4137/BBI.S12462.

Øverby, A., Murayama, S.Y., Matsui, H., Nakamura, M. 2016. In the Aftermath of *Helicobacter pylori*: Other *Helicobacters* rising to become the next gastric epidemic? *Dig* 93(4): 260-5. doi: 10.1159/000445399.

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.

Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I. Mazurkiewica, E., Jemakow, K. 2020. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 1871–1881. doi: 10.1007/s00253-020-10349-w.

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. doi: 10.1186/1471-2180-13-257.

Pan, Y., Breidt, F. Jr. 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol* 73(24): 8028-8031. doi: 10.1128/AEM.01198-07.

Park, S.R., Mackay, W.G., Reid, D.C. 2001. *Helicobacter* spp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Res* 35(6): 1624-1626. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00582-0.

Parsek, M.R., Greenberg, E.P. 2005. Sociomicrobiology, the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 13: 27-33. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.007.

Parsonnet, J., Shmueli, H., Haggerty, T. 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *Clinical investigation* 282(23).

Pathak, S., Awuh, J.A., Leversen, N.A., Flom T.H., Asio, B. 2012. Counting mycobacteria in infected human cells and mouse tissue: a comparison between qPCR and CFU. *Plos One* 7: e3491. doi: 10.1371/journal.Pone.0034931.

- Pedrero, F., Klavrouziotis, I., Alarcón, J.J., Houkoulakis, P., Asano, T. 2010. Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture review of some practices in Spain and Greece. *Agric Water Mnag* 97: 1233-1241. doi: 10.1016/j.agwat.2010.03.003.
- Pedrero, F., Mounzer, O., Alarcón, J.J., Nicolás, E. 2013. The viability of irrigating mandarin trees with saline reclaimed water in a semi-arid Mediterranean region: a preliminary assessment. *Irrigat Scien* 31: 759-768. doi: 10.1007/s00271-012-0359-8.
- Pellicano, R., Ménard, A., Rizzetto, M., Mégraud, F. 2008. *Helicobacter* species and liver diseases: association or causation?. *Lancet Infect Dis* 8(4): 254-260. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70066-5.
- Penesyan, A., Gillings, A., Paulsen, I.T. 2015. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in Biofilm communities. *Molecules* 20(4): 5286-5298. doi: 10.3390/molecules20045286.
- Percival, R., Chalmers, M., Embrey, M., Hunter, P.R., Sellwood, J., Wyn-Jones, P. 2004. Microbiology of waterborne disease. *Microbiological aspects and risks 2nd edition*. doi: 10.1016/C2010-0-67101-X.
- Percival, S., Yates, M.V., Williams, D.W., Chalmers, R.M., Gray, N.F. 2014. *Helicobacter pylori*. In: Microbiology of waterborne disease. microbiological aspects and risks. 2nd ed. London_ Elsevier 119-153. ISBN: 978-0-12-415846-7.
- Percival, S.L., Suleman, L. 2014. Biofilms and *Helicobacter pylori*, dissemination and persistence within the environment and host. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5: 122-132. doi: 10.4291/wjgp.v5.i3.122.
- Pereira, R.P.A., Peplies, J., Brettar, I., Höfle, M. 2017. Development of a genus-specific next generation sequencing approach for sensitive and quantitative determination of the *Legionella* microbiome in freshwater systems. *BMC Microbiol* 17: 79. doi: 10.1186/s12866-017-0987-5.
- Petersen, R.F., Harrington, C.S., Kortegaard, H.E., On, S.L.W. 2007. A PCR-DGGE method for detection and identification of *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* and related *Epsilonbacteria* and its application to saliva samples from humans and domestic pets. *J Appl Microbiol* 103: 2601-2615. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03515.x.
- Phillips, C.A. 2001. *Arcobacters* as emerging human pathogens. *Food Control* 12(1): 1-6. doi: 10.1016/S0956-7135(00)00024-4.
- Pinto, D., Santos, M. A., and Chambel, L. 2015. Thirty years of viable but nonculturable state research, unsolved molecular mechanisms. *Crit Rev Microbiol* 4: 61-76. doi: 10.3109/1040841X.2013.794127.
- 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(4): 345-349. doi: 10.1016/j.resmic.2005.09.003.
- Poms, R.E., Tatini, S.R. 2001. Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4 °C. *Inter J Food Microbiol* 63(3): 281-286. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00441-4.

Bibliografía

Q

Qiao, M., Yuanyuan, Q., Wenli, S., Zhaojing, Z., Jingwei, W., Ziyan, L., Duanxing, L., Huijie, L., Jiti, Zhou. 2015. Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresour Technol* 179: 436-443. doi: 10.1016/j.biortech.2014.12.041.

Quaglia, N.C., Dambrosio, A., Normanno, G., Celano, G.V. 2009. Evaluation of a nested-PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene (*glmM*) for the detection of *Helicobacter pylori* from raw milk. *Food Control* 20(2): 119-123. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.02.010.

Quaglia, N. C., & Dambrosio, A. 2018. *Helicobacter pylori*: A foodborne pathogen?. *World J Gastroenterol* 24(31): 3472–3487. doi: 10.3748/wjg.v24.i31.3472

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. *Microbial Ecol* 54(4): 771-777. doi: 10.1007/s00248-007-9242-1.

Quiroga, A.J., Cittelly, D.M., Bravo, M.M. 2005. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomed* 25: 325-334.

R

Rader, B.A., Campagna, S.R., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., Guillemin, K. 2007. The quorum-sensing molecule autoinducer 2 regulates motility and flagellar morphogenesis in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 189: 6109-6117. doi: 10.1128/JB.00246-07.

Rahimi, E., Kheirabadi, E.K. 2012. Detection of *Helicobacter pylori* in bovine, buffalo, camel, ovine, and caprine milk in Iran. *Foodborne Pathog Dis* 9(5): 453-456. doi: 10.1089/fpd.2011.1060.

Ranjbar, R., Khamesipour, F., Jonaidi-Jafari, N., Rahimi, E. 2016. *Helicobacter pylori* isolated from Iranian drinking water, *vacA*, *cagA*, *iceA*, *oipA* and *babA2* genotype status and antimicrobial resistance properties. *FEBS open Bio* 6: 433-441. doi: 10.1002/2211-5463.12054.

Rappin. 1887. Contribution à l'étude des bactéries de la bouche à l'état normal et dans la fièvre typhoïde. PhD tesis Collège de France, Nantes.

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(3): 326-330. doi: 10.1590/S0074-02762010000300015.

Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49: 1-7.

- Reisner, A., Krogfelt, K.A., Klein, B.M., Zechner, E.L., Molin, S. 2006. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* 188(10): 3572-3581. doi: 10.1128/JB.188.10.3572-3581.2006.
- Reuben, R.C., Roy, P.C., Sarkar, S.L., Ha, S.D., Jahid, I.K. 2019. Multispecies interactions in biofilms and implications to safety of drinking water distribution system. *Microbiol Biotechnol Lett* 47(4): 473-486. doi: 10.4014/mbl.1907.07007.
- Rhead, J.L., Letley, D.P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M.A., Hosseini, M.E., Atherton, J.C. 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterol* 133: 926-936. doi: 10.1053/j.gastro.2007.06.056.
- Richards, C.L., Broadaway, S.C., Eggers, M.J., Doyle, J., Pyle, B.H., Camper, A.K., Ford, T.E. 2018. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria in drinking water and associated biofilms on the crow reservation, Montana, USA. *Microbiol Ecol* 76: 52-63. doi: 10.1007/s00248-015-0595-6.
- 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.
- Rizvanoz, A.A., Haertlé, T., Bogomolnaya, L., Talebi, A., Abadi, B. 2019. *Helicobacter pylori* and its antibiotic heteroresistance: a neglected issue in published guidelines. *Frontiers in Microbiology* 10: 1796. doi: 10.3389/fmicb.2019.01796.
- Rodríguez, R., Suescún, G. 2013. Applications and inconvenient of Fluorescence in situ hybridization technique (FISH) in the identification of microorganisms. *Revista Salud Uninorte* 29: 327-340.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F. 2016. VSERARCH: a versatile open-source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584.
- Romo, C., Coria-Jiménez, R. 2010. *Helicobacter pylori*, un modelo de bacteria carcinogénica. *Revista de especialidades Médico-Quirúrgicas* 15.
- Ross, M.G., Russ, C., Costello, M., Hollinger, A., Lennon, N.J., Hegarty, R., Nusbaum, C., Jaffe, D.B. 2013. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Gen Biol* 14: R51. doi: 10.1186/gb-2013-14-5-r51.
- Rousselon, N., Delgenes, J.P., Godon, J.J. 2004. A new real time PCR (TaqMan PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. *J Microbiol Methods* 59(1): 15-22. doi:10.1016/j.mimet.2004.05.007.
- Ruppert, K.M., Kline, R.J., Rahman, Md.S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (Edna) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17: e00547. Doi: 10.1016/j.gecco.2019.e00547.

S

Sabbagh, P., Mohammadnia-Afrouzi, M., Javanian, M., Babazadeh, A., Koppolu, V., Vasigala, V.R., Nouri, H.R., Ebrahimpour, S. 2019. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection; ideals, options, and limitation. *Eur J Microbiol Infect Dis* 38: 55-56. doi:10.1007/s10096-018-3414-4.

Safaei, H.G., Rahimi, E., Zandi, A., Rashidipour, A. 2011. *Helicobacter pylori* as a zoonotic infection: the detection of *H. pylori* antigens in the milk and feces of cows. *J Res Med Sci* 16(2): 184–187.

Salama, N.R. 2020. Cell morphology as a virulence determinant: lessons from *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Microbiology* 54:11-17. doi: 10.1016/j.mib.2019.12.002.

Sakudo, A., Miyagi, H., Horikawa, T., Yamashiro, R., Misawa, T. 2018. Treatment of *Helicobacter pylori* with dielectric barrier discharge plasma causes UV induced damage to genomic DNA leading to cell death. *Chemosphere* 200, 366-372, ISSN 0045-6535. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.02.115.

Salomon H. 1896. Ueber das spirillum saugtiermagens und sien verhalten zu den belegzellen (abstract 1). *Zentralbl. Bakterio* 19: 433–442.

Santiago, D. 2020. Descripción y dimensionamiento de una estación de tratamiento de agua potable (ETAO). <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/42228>.

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. doi: 10.1111/hel.12205.

Sato, F., Saito, N., Konishi, K., Shoji, E., Kato, M., Takeda, H., Sugiyama, T., Asaka, M. 2003. Ultrastructural observation of *Helicobacter pylori* in glucose supplemented culture media. *J Med Microbiol* 52: 675-679. doi: 10.1099/jmm.0.05146-0.

Savoldi, A., Carrar, E., Graham, D., Conti, M., Tacconelli, E. 2018. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in world health organization regions. *Gastroenterol* 155(5): 1371-1388.e17. doi: 10.1053/j.gastro.2018.07.007.

Scaltsky, I.C., Aranda, K.P., Garcia, G.T, Gonçalves, M.E., Cardoso, S.R., Iriya, K., Silva, N.P. 2001. Application of real-time PCR stool assay for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8(4): 309-12. doi: 10.1111/j.1523-5378.2011.00845.x.

Scaturro M, Fonatna S, Dell'eva I, Helfer F, Marchio M, Stefanetti M.A, Cavallaro M, Miglietta M, Montagna M.T, De Giglio O, Cuna T, Chetti L, Bucci-Sabattini M.A., Carlotti M, Viggiani M, Stenico A, Romanin E, Bonanni E, Ottaviano C, Franzin L, Avanzini C, Demarie V, Corbella M, Cambieri P, Marone P, Rota M.A. 2016. A multicenter study of viable PCR using propidium monoazide to detect *Legionella* in water samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 85: 283-288. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.009.

Schabereiter-Gurtner, C., Hirschl, A.M., Dragosics, B., Hufnagl, P., Puz, S., Kocách, Z., Rotter, M., Makristathis, A. 2004. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 42(10): 4512-4518. doi: 10.1128/JCM.42.40.4512-4518.2004.

- Schloss, P., Gevers, D., Westcott, S. 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-Based studies. *Plos One* 6: e2731 doi: 10.1371/journal.pone.0027310.
- Schmalstig, A.A., Benoit, S.L., Misra, S.K., Sharp, J.S., Maier, R.J. 2018. Noncatalytic Antioxidant Role for *Helicobacter pylori* Urease. *J. Bacteriol.* doi: 10.1128/JB.00124-18.2018.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne. 2012. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *J Applied Microbiol* 113(5): 1014-1026. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Seminago, R., Castaño, E., Amador, A. 2015. Genomics more than genes. <https://www.researchgate.net/publication/264852891>.
- Servetas, S.L., Carpenter, B.M., Haley, K.P., Gilbreath, J.J., Gaddy, J.A., Merrell, D.S. 2016. Characterization of key *Helicobacter pylori* regulators identifies a role for ArsRS in biofilm formation. *J Bacteriol* 198: 2536-2548. doi: 10.1128/JB.00324-16.V.
- Sgoyras, D.N., Trang, T.T., Yamaoka, Y. 2015. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 20(1): 8-16. doi: 10.1111/hel.12251.
- Shahamat, M., Mai, U.E.H., Paszko-Kolva, C., Colwell, R.R. 1991. Effect of selected antibiotics on *Helicobacter pylori*. *Gen Meet Am* 10: 343.
- Shahamat, M., Mai, U., Paszko-Kolva, C., Kessel, M., Colwell, R.R. 1993. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl Environ Microbiol* 59: 1231-1235.
- Sharpton, T.J. 2014. An introduction to the analysis of shotgun metagenomics data. *Front Plant Sci* 16: 209. doi: 10.3389/fpls.2014.00209.
- Shibayama, K., Nagasawa, M., Ando, T., Minami, M., Wachino, J., Suzuki, S., Arakawa, Y. 2006. Usefulness of adult bovine serum for *Helicobacter pylori* culture media. *J Clin Microbiol* 44(11): 4255-4257. doi: 10.1128/JCM.00477-06.
- Shiota, S., Suzuki, R., Yamaoka, Y. 2013. La importancia de los factores de virulencia en *Helicobacter pylori*. *J Dig Dis* 14(7): 341-4349. doi: 10.1111 / 1751-2980.12054.
- 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(5): 1953-1959. doi: 10.1128/aem.66.5.1953-1959.2000.
- Sisto, F., Brenciaglia, M.I., Scaltrito, M.M., Dubini, F. 2000. *Helicobacter pylori*, ureA, cagA and vacA expression during conversion to the coccoid form. *Int J Antimicrob Agents* 15(4): 277-282. doi: 10.1016/S0924-8579(00)00188-6.
- Sjomina, O., Pavlova, J., Niv, Y., Leja, M. 2018. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 23(S1). doi: 10.1111/hel.12514.
- Skirrow. M.B. 1997. *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *Br Med J* 2: 9-11. doi: 10.1136/bmj.2.6078.9.

Bibliografia

- Skowron, K., Hulisz, K., Gryń, G., Olszewska, H., Wiktorczyk, N., Paluszak, Z. 2018. Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes* biofilm formed on various surfaces. *Int Microbiol* 21: 23–33. doi: 10.1007/s10123-018-0002-5
- Smith, S.I., Oyedeji, K.S., Arigbabu, A.O., Cantet, F., Megraud, F., Ojo, O.O., Uwaifo, A.O., Otegbayo, J.A., Ola, S.O., Coker, A.O. 2004. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol* 10(13): 1958-1960. doi: 10.3748/wjg.v10.i13.1958.
- Song, Q., Zirnstein, W., Swaminathan, B., Gold, B. 2001. Pretreatment with urea-hydrochloric acid enhances the isolation of *Helicobacter pylori* from contaminated specimens. *J Clin Microbiol* 39: 1967-1968. doi: 10.1128/JCM.39.5.1967-1968.2001.
- Sörberg, M., Nilsson, M., Hanberger, H., Nilsson, L.H. 1996. Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 216-219.
- 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(2): 121-126. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00481.x.
- Steele, T.W., McDermott, S.N. 1984. Technical note: the use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces. *Pathology* 6: 263-5. doi: 10.3109/00313028409068535.
- Steer, H. W., Colin-Jones, D. G. 1975. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. *Gut* 16(8): 590-597. doi: 10.1136/gut.16.8.590.
- Šterbenc, A., Jarc, E., Poljak, M., Homan, M. 2019. *Helicobacter pylori* virulence genes. *World J Gastroenterol* 25(33), 4870–4884. Doi: 10.3748/wjg.v25.i33.4870.
- Stevens, A.H., Childers, D., Fox-Powell, M., Nicholson, N., Jhoti, E., Cockell, S.C. 2019. Growth, Viability, and Death of Planktonic and Biofilm *Sphingomonas desiccabilis* in Simulated Martian Brines. *Astrobiology* 19:1, 87-98. Doi: 10.1089/ast.2018.1840.
- Stevenson, T.H., Lucia, L.M., Acuff, G.R. 2000. Development of a selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. *App Environ Microbiol* 66(2): 723-727. doi: 10.1128/aem.66.2.723-727.2000.
- Stevenson, T.H., Castillo, A., Lucia, L.M., Acuff G.R. 2000. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Lett Appl Microbiol* 30: 192-196.
- Straub, T.M., Chandler, D.P. 2003. Towards a unified system for detection of waterborne pathogens. *J Microbiol Methods* 53(2): 185-97. doi: 10.1016/s0167-7012(03)00023-x.

T

Tabatabaei, M. 2012. Application of molecular and cultural methods for identification of *Helicobacter* spp. in different animal sources. *Glob Vet* 8(3): 292-297.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud* 2: 70-72.

Tegtmeyer, N., Wessler, S., Backert, S. 2011. Role of cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J* 278(8): 1190-1202.

Testerman, T.L., Conn, P.B., Mobley, H.L.T., McGee, D.J. 2006. Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media. *J Clin Microbiol* 44: 1650-1658. doi: 10.1128/JCM.44.5.1650-1658.2006.

Thomsen, R., Nielsen, P.S., Jensen, T.H. 2005. Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes. *RNA* 11(11): 1745-1748. doi: 10.1261/rna.2139705.

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(4): 868-873. doi: 10.2166/wh.2014.171.

Tombola, F., Morbiato, L., DelGiudice, G., Rappuoli, R., Zoratti, M., Papini, E. 2001. *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea a diffusion across epithelia. *J Clin Invest* 108(6): 929-937. doi: 10.1172/JCI13045.

Tominaga, K., Hamasaki, N., Watanabe, T., Uchida, T., Fujiwara, Y., Takaishi, O., Higuchi, K., Arakawa, T., Ishii, E., Kobayashi, K., Yano, I., Kuroki, T. 1999. Effect of culture conditions on morphological changes of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 34: 28-31.

Tongtawee, T., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Dechsukhum, C., Leeanansaksiri, W., Loyd, R.A. 2016. *Helicobacter pylori* infection. *Asian Pac J Cancer Prev* 17(4): 1631-5. doi: 10.7914/APJCP.2016.17.4.1631.

Torti, A., Lever, M.A., Jørgensen, B.B. 2015. Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Mar Genomics* 24(3): 185-196. doi: 10.1016/j.margen.2015.08.007.

Trebesius, K., Pamthel, K., Strobel, S., Vogt, K., Faller, G., Kirchner, T., Kist, M., Heesemann, J., Hass, R. 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridization. *Gut* 46(5): 608-614. doi: 10.1136/gut.46.5.608.

Tsuchido, T., Katsui, N., Takeuchi, A., Takano, M., Shibasaki, I. 1985. Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Appl Environ Microbiol* 50: 298-303.

Tsuchiya, Y., Loza, E., Villa-Gomez, G., C Trujillo, C., Baez, S., Asai, t., Ikoma, T., Endoh, K., Nakamura, K. 2018. Metagenomics of microbial communities in gallbladder bile from patients with gallbladder cancer or cholelithiasis. *Asian Pac J Cancer Prev* 19(4), 961-967.

Bibliografía

Turutoglu, H., Mudul, S. 2002. Investigation of *Helicobacter pylori* in raw sheep milk samples. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49(6): 308-309. doi: 10.1046/j.1439-0450.2002.00557.x.

U

Ulrich, H., Klaus, D., Irmgard, F., Annette, H., Juan, L.P., Regine, S.J. 2005. Microbiological investigations for sanitary assessment of wastewater treated in constructed wetlands. *Water Res* 39(20): 4849-58. doi: 10.1016/j.watres.2004.07.020.

V

Valasek, M.A., Repa, J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 29: 151-159. doi: 10.1152/advan.00019.2005.

Van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 30(9): 418-426. doi: 10.1016/j.tig.2014.07.001.

Van Tongeren, S.P., Slaets, J.P., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W. 2005. Fecal microbiota composition and frailty. *Appl Environ Microbiol* 71: 6438-6442. doi: 10.1128/AEM.71.10.6438-6442.2005.

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. *Int J Syst Bacteriol* 41(1): 88-103. doi: 10.1099/00207713-41-1-88.

Vécsei, A., Innerhorfer, A., Graf, U., Binder, C., Giczi, H., Hammer, K., Bruckdorfer, A., Hirschi, A.M., Makristathis, A. 2010. Stool polymerase chain reaction for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8(3): 309-12. doi: 10.1016/j.cgh.2009.12.002.

Vesga, F.J., Moreno, Y., Ferrús, M.A., Campos, C., Trespalacios, A.A. 2018. Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants in Bogotá, Colombia, using cultural and molecular techniques. *Int J Hyg Environ Health* 221: 595-601. doi: 10.1016/j.ijheh.2018.04.010.

Vicente-Sánchez, J., Nicolás, E., Pedrero, F., Alarcón, J.J., Maestre-Valero, J.F., Fernández, F. 2014. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates detrimental effects of saline reclaimed water in lettuce plants. *Mycorrhiza* 24: 339-348. doi: 10.1007/s00572-013-0542-7.

Vierheilig, J., Savio, D., Ley, R.E., Mach, R.L., Farnleitner, A.H., Reischer, G.H. 2015. Potential applications of next generation DNA sequencing of 16S rRNA gene amplicons in microbial water quality monitoring. *Water Sci Technol* 72(11): 1962-72. doi: 10.2166/wst.2015.40.

Vincent, P. 1995. Transmission and acquisition of *Helicobacter pylori* infection, evidence, and hypothesis. *Biomed Pharmacotherapy* 49: 11-18. doi: 10.1016/0753-3322(96)82572-8.

Vivaldi, G.A., Camposeo, S., Mastro, M.A., Lacolla, G., Lonigro, A., Rubino, P. 2015. Effect of irrigation with different municipal wastewaters on ripening indexes and chemical components of nectarine fruits. *Acta Horticulture* 1084: 57. doi:10.17660/ActaHortic.2015.1084.57.

Vondrakova, L., Turonova, H., Scholtz, V., Pazlarova, J., Demnerova, K. 2018. Impact of various killing methods on EMA/PMA-qPCR efficacy. *Food Control* 85: 23-28. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.09.013.

W

WAAP (Programa Mundial de las Naciones Unidas de Evaluación de los Recursos Hídricos) /ONU Agua. 2018.

Wagner, M., Loy, A. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr Opin Biotechnol* 13: 218-227. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00315-4.

Walsh, E.J., Moran, A.P. 1997. Influence of medium composition on the growth and antigen expression of *Helicobacter pylori*. *J Appl Microbiol* 83: 67-75.

Wang, H., Masters, S., Edwards, M.A., Falkinham, J.O., Pruden, A. 2014. Effect of disinfectant, water age, and pipe materials on bacterial and eukaryotic community structure in drinking water biofilm. *Environ Sci Technol* 48: 1426-1435.

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. doi: 10.1128/AEM.01617-12.

Wang, X., Sturegård, E., Rupar, R., Nilsson, H.O., Aleljung, P.A., Carlén, B., Willén, R., Wadström, T. 1997. Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 46(8): 657-663. doi: 10.1099/00222615-46-8-657.

Wang, Y.K., Kuo, F.C., Liu, C.J., Wu, M.C., Shih, H.Y., Wang, S.S., Wu, J.Y., Kuo, C.H., Huang, Y.K., Wu, D.C. 2015. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection, current options, and developments. *World J Gastroenterol* 21: 11221-1235. doi: 10.3748/wjg.v21.i40.11221.

Waskito, L.A., Salama, N.R., Yamaoka, Y. 2018. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 23(1): e12516. doi: 10.1111/hel.12516.

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(4): 690-698. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02360.x.

Weissensteiner, T., Nolan, T., Bustin, S.A., Griffin, H.G., Griffin, A. 2003. PCR technology: current innovations. 2nd. Published by CRC Press LLC: USA, 30.

Wen, S., Moss, S.F. 2009. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 282(1): 1-8. doi: 10.1016/j.canlet.2008.11.016.

Westblom, T., Bhatt, B. 1999. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. In currents topics in Microbiology and Immunology. N° 241" Gastrointestinal disease and *Helicobacter pylori*, pathophysiology, diagnosis and treatment. Eds. Westblom, Czinn, Nedrud. Springer. R.W Compans, Atlanta/Georgia. P. 215-236.

Williams, J.C., McInnis, K.A., Testerman, T.L. 2008. Adherence of *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces is influenced by serum. *Appl Environ Microbiol* 74: 1255-1258. doi: 10.1128/AEM.01958-07.

Bibliografía

Wilson, I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *App Environ Microbiol* 63: 3741-3751.

Windham, I.H., Servetas, S.L., Whitmire, J.M., Pletzer, D., Hancock, R.E.W., Merrell, D.S. 2018. *Helicobacter pylori* biofilm formation is differentially affected by common culture conditions, and proteins play a central role in the biofilm matrix. *Appl Environ Microbiol* 84: e00391-18. Doi:10.1128/AEM.00391-18.

Wingender, J., Flemming, H.C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health* 214(6): 417-423. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.05.009.

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.

Whitmire J.M., Merrell D.S. 2019. *Helicobacter pylori* Genetic Polymorphisms in Gastric Disease Development. In: Kamiya S., Backert S. (eds) *Helicobacter pylori in Human Diseases*.

Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1149. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/5584_2019_365.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271.

Wong, E.H.J., Ng, C.G., Goh, K.L., Vadivelu, J., Ho, B., Loke, M.F. 2018. Metabolomic analysis of low and high biofilm-forming *Helicobacter pylori* strains. *Sci Rep* 8: 1409. doi: 10.1038/s41598-018-19697-0

Wongphutorn, P., Chomvarin, C., Sripa, B., Namwat, W., Faksri, K. 2018. Detection and genotyping of *Helicobacter pylori* in saliva versus stool samples from asymptomatic individuals in Northeastern Thailand reveals intra-host tissue-specific *H. pylori* subtypes. *BMC Microbiol* 18: 10. doi: 10.1186/s12866-018-1150-7.

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(4): 713-739. doi: 10.1128/CMR.00011-10.

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(6): e35294. doi: 10.1371/journal.pone.0035294.

Wyss, O., Neumann, M.G., Scocolofsky, M.S., 1961. Development and germination of the *Azotobacter cyst*. *J Biophys Biochem Cytol* 10(4), 555-565. [doi: 10.1083/jcb.10.4.555](https://doi.org/10.1083/jcb.10.4.555).

WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas). 2017. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas residuales, El recurso desaprovechado. París, UNESCO. Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos (unesco.org).

X

Xie, X., Liu, N., Ping, J., Zhang, Q., Zheng, X., Liu, J. 2018. Illumina MiSeq sequencing reveals microbial community in HA process for dyeing wastewater treatment fed with different co-substrates. *Chemosphere* 201: 578-585. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.025.

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. doi: 10.1155/2014/757941.
- Yamamoto, S., Uemura, N., Okamoto, S., Yamaguchi, S., Mashibam H., Tachikawa, T. 2000. A new rapid test for detecting anti-*Helicobacter pylori* antibody excreted into urine. *Helicobacter* 5(3): 160-164. doi: 10.1046/j.1523-5378.2000.00025.x.
- Yamaoka, Y. 2008. Increasing evidence of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. *J Infect Dev Ctries* 2(3): 174-181.
- Yamaoka, Y., Graham, D.Y. 2014. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. *Future Oncol* 10: 1487-1500. doi: 10.2217/fon.14.29.
- Yang, Y.J., Wu, J.J., Sheu, B.S., Kao, A.W., Huang, A.H. 2004. The *rdxA* gene plays a more major role than *frxA* gene mutation in high-level metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan. *Helicobacter* 9(5): 400-407. doi: 10.1111 / j.1083-4389.2004.00270.x.
- Yañez, M.A, Nocker, A., Soria-Soria, E., Múrtula, R., Martínez, L., Catalán, V. 2011. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J Microbiol Methods* 85(2): 124-130. doi: 10.1016/j.mimet.2011.02.004.
- Yasunaga, A., Yoshida, A., Morikawa, K., Nakamura, S., Soh, I., Awano, S., Ansai, T. 2013. Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and in vitro biofilms by qPCR combined with propidium monoazide. *BMC Microbiol* 13: 157. doi: 10.1186/1471-2180-13-157. PMID: 23848601.
- Ye, L., Zhang, T. 2013. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 2681–2690. doi: 10.1007/s00253-012-4082-4.
- Ye, L., Zhang, T. 2011. Pathogenic bacteria in sewage treatment plants as revealed by 454 pyrosequencing. *Environ Sci Technol* 45(17): 7173-7173. doi: 10.1021/es201045e.
- Yeo, Y.H., Shiu, S., Ho, H.J., Zou, B., Lin, J.T., Wu, M.S., Liou, J.M., Wu, C.Y. 2018. First line *Helicobacter pylori* eradication therapies in countries with high and low clarithromycin resistance: a systematic review and network meta-analysis. *Gut* 67: 20-27
- Yingzhi, L., Redlinger, T.E., Avitia, R., Galindo, A., Goodman, K. 2002. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl Environ Microbiol* 68(3): 1436-1439. doi: 10.1128/AEM.68.3.1436-1439.2002.
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kamiya, S. 2015. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its involvement for antibiotic resistance. *Biomed Research International* 914791. doi: 10.1155/2015/914791.

Bibliografía

Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Zamn, C., Hanawa, T., Kamiya, S. 2010. Assessment of in vitro biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 25(1): 90-94. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.06213.x.

Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., Hanawa, T., Kamiya, S. 2009. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol* 9: 197. doi: 10.1186/1471-2180-9-197.

Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud, a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 1613-1617. doi: 10.1099/ijsem.0.001755.

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(6): 670-679. doi: 10.1002/bit.20347.

Yufei, L., Qingping, Z., Juan, W., Shuwen, L. 2018. Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in VBNC state by PMA- Combined real-time quantitative PCR coupled with confirmation of respiratory activity. *Food Control* 91:85-91. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.03.037.

Z

Zamani, M., Vaheldi, A., Maghdouri, Z., Shokri-Shirvani, J. 2017. Role of food in environment transmission of *Helicobacter pylori*. *Capian J Intern: 8(3)*: 146-252. doi: 1022088/cjm8.3.146.

Zhang, W.; Deng, X.; Zhou, X.; Hao, Y.; Li, Y. 2018. Influence of *Helicobacter pylori* culture supernatant on the ecological balance of a dual-species oral biofilm. *J. Appl. Oral Sci* 26: e20170113. Doi: 10.1590/1678-7757-2017-0113.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A. 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina Pired-End read merge. *Bioinformatics* 30(5): 614-620. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593.

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(7): 2140-2148. doi:10.1016/j.watres.2012.01.030.

Zhang, Y., Zhai, F., Kong, M., Wang, S., Nan, L., Hu, B., Olszewski, M.A., Miao, Y., Ji, D., Jiang, W., Fang, J., Zhang, J., Chen, F., Xiang, P., Wu, Y., Zhao, H. 2016. Validation of a high-throughput multiplex genetic detection system for *Helicobacter pylori* identification, quantification, virulence, and resistance analysis. *Frente Microbiol* 7: 1401. doi: 10.3389/fmicb.2016.01401.

Zou, Q.H., Li, R.Q. 2011. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric mucosa, a meta-analysis. *J Oral Pathol Med* 40(4): 317-324. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01006.x.

ANEXOS

ANEXO A: MEDIOS DE CULTIVO

ANEXO A.1: CALDOS DE CULTIVO

Caldo de Enriquecimiento

- Caldo BBL™ Brucella Broth (BD, ref. 211088).
- 10% de Suero Fetal Bovino (PAA Laboratories GmbH, ref. B11-001).
- *Helicobacter pylori* Suplemento Selectivo “Dent” (Oxoid, ref. SR0147E).

Caldo DVC (DVC)

- Caldo BBL™ Brucella Broth (BD, ref. 211088).
- 5% de Suero Fetal Bovino (PAA Laboratories GmbH, ref. B11-001).
- 0,5 mg/ L de Novobiocina.

Caldo Dent

- Caldo BBL™ Brucella Broth (BD, ref. 211088).
- 5% De Suero Fetal Bovino (PAA Laboratories GmbH, ref. B11-001).
- 3,5 µg/mL de polimixina B.
- *Helicobacter pylori* Suplemento Selectivo “Dent” (Oxoid, ref. SR0147E).

Caldo Brucella, incluye (g/L):

- | | |
|--|-----|
| ○ Digerido enzimátocp de caseína | 10 |
| ○ Cloruro sódico | 5 |
| ○ Digerido enzimático de tejido animal | 10 |
| ○ Glucosa | 1 |
| ○ Extracto de levadura | 2 |
| ○ Hidrógeno sulfito de sodio | 0,1 |

ANEXO B: REACTIVOS Y SOLUCIONES

ANEXO B.1: GENERACIÓN DE MICROAEROFILA

Sobres con mezclas generadoras de microaerofilia (CampyGen™, Oxoid ref. CN35).

Cuando se introduce un sobre en una jarra de 3,5 L y posteriormente esta se cierra, el oxígeno contenido en la misma es absorbido mientras que se genera dióxido de carbono, creando las condiciones microaerófilas adecuadas.

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
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	5,3 g
Agua destilada	1 L

pH 7,2

Disolver los fosfatos y el cloruro sódico por separado Esterilizar por filtración con membranas de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0,45 µm (Whatman, Maidstone, Inglaterra). A continuación, autoclavar a 121 °C durante 15 min. Conservar en condiciones de refrigeración a una temperatura de 4 °C y usar en frío.

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) y agitar. Agregar unas gotas de NaOH 5 M, para ayudar a la disolución del polvo. Retirar de la fuente de calor y añadir 33 mL de PBS 3X. Ajustar el pH a 7,2 con ClH. A continuación, eliminar los posibles cristales mediante filtración y conservar a 4 °C durante un periodo máximo de 48 horas, o a -20 °C durante varias semanas.

- Etanol absoluto (Sigma-Aldrich, ref. 24102).

Gelatinización de los portaobjetos

- Gelatina bacteriológica (Panreac, ref. 403902) 0,1%
- Sulfato potásico cromato (Sigma, ref. C-5926) 0,01%

Calentar el agua destilada hasta 60 °C. Incorporar la gelatina y la sal de cromato y mantener calentando en agitación hasta su completa disolución. Atemperar la solución a unos 45 °C y sumergir en ella los portaobjetos cubiertos en teflón (Marienfeld, ref 9782100). Finalmente, escurrir los portaobjetos y dejar secar a temperatura ambiente.

Deshidratación de las muestras

- **Etanol 50%:** 100 mL Etanol absoluto + 100 mL de agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

Anexos

- **Etanol 80%:** 160 mL Etanol absoluto+ 40 mL de agua destilada. Mantener a temperatura ambiente.
- **Etanol 100%:** Reactivo etanol absoluto grado PRS. Almacenar a temperatura ambiente y en refrigeración a 4 °C para fijación.

Tampón de hibridación

NaCl 5M	360µL (0,9M)
HCl-Tris 1M	40µL (20mM)
SDS 10%	2µL (0,01%)
Formamida (SIGMA F-7503)	XµL (0-50%)
Agua miliQ	completar hasta un volumen final de 2 mL

Mezclar todos los elementos y añadir en último lugar el SDS 10%. Completar hasta 2 mL con agua miliQ y agitar antes de su utilización.

Sondas (50 ng/µL)

- Sonda para *Eubacterias*: **EUB338-I, EUB338-II, EUB338-III** (Tib Molbio®, Alemania).
- Sonda para *Helicobacter pylori*: **HPY-LNA** (Exiqon, E.E.U.U).
- Sonda para *Helicobacter spp*: **HEL717-FAM** (Condolab, España).
- Sonda para las mutaciones en el 23S que dotan a *Helicobacter pylori* de resistencia a la claritromicina **CLAR-I, CLAR-II, CLAR-III** (Condolab, España).

Solución de lavado

NaCl 5M*	(9000-100 µl)
Tris-HCl 1M	1000 µl
SDS 10%	50 µl

EDTA 0,5M**	500 µl
Agua milliQ	completar hasta 50mL

*La concentración de NaCl depende de la concentración de formamida en el tampón de hibridación.

% Fornamida (Tampón de hibridación)	µL de NaCl 0,5 M (Tampón de Lavado)
0	9000
10	4500
20	2150
30	1020
35	700
40	460

**Se añade en caso de que el tampón de hibridación contenga un 20% de formamida o más.

I. 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 a 121 °C durante 15 minutos y por filtración.

II. Tris-HCl 1M (pH 8.0)

Tris Base	121,1g
HCl	42 mL de HCl concentrado
Agua destilada	hasta 100 mL

Anexos

Pesar el Tris Base y añadir a 800 mL de agua destilada. Agregar 42 mL de HCl concentrado y completar con agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL. Finalmente esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y posteriormente por filtración.

III. SDS 10%

SDS	10 g
Agua destilada	100 mL

Mezclar los componentes y esterilizar por filtración.

IV. EDTA 0.5 M

EDTA.2H ₂ O	186,1 g
Agua destilada	1000 mL

Pesar EDTA y añadir en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 con NaOH. Completar con agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 1000 mL. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y filtrar posteriormente.

Visualización al microscopio

- Antirrefractante (FluoroGuard™ Antifade Reagent, Bio-Rad).

ANEXO B.4: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Extracción de DNA

- Muestras ambientales y clínicas: “GeneJET™ Genomic DNA Purification kit”. (ThermoScientific, Germany ref. K0721).
- Biopelículas: Dneasy® PowerSoil® Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania).

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).

(NH₄)₂SO₄ 160 mM

Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C) 670 mM

Estabilizador 0,1%

- **MgCl₂ (50Mm)** (BIOTAQ DNA Polymerase, Bioline ref. 21039).
- **Iniciadores**

Iniciadores para *Helicobacter pylori*

NOMBRE	CASA COMERCIAL
VacAF/VacAR	Tib Molbiol®, Alemania
vacAs1/vacAs2F-vacAs1/vacAs2R	Condolab, España
vacAm1/vacAm2F-vacAm1/vacAm2R	Condolab, España
CagAF/CagAR	Condolab, España
RdxAF/RdxAR	Condolab, España
pbp1AF/pbp1AR	Condolab, España

Iniciadores para *Helicobacter sp.*

NOMBRE	CASA COMERCIAL
HSF/HS2R	Tib Molbiol®, Alemania

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).

Anexos

Pesar la cantidad de agarosa necesaria (1 mg/mL), según el tamaño del gel y disolver en el tampón TBE 1X. Calentar hasta ebullición, agitar y atemperar a 50 °C. A continuación, añadir el 0,01% de GelRed™, en función del tamaño del gel utilizado. Una vez solidificado verter 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).

