

---

## ÍNDICE

---



---

**ÍNDICE GENERAL**

---

INTRODUCCIÓN.....	44
<b>1 ANTECEDENTES .....</b>	<b>1</b>
<b>2 CONTAMINACIÓN MICROBIANA DEL AGUA Y SALUD PÚBLICA.....</b>	<b>2</b>
2.1 TRATAMIENTO DEL AGUA POTABLE .....	3
2.2 REUTILIZACIÓN DE AGUAS RESIDUALES TRATADAS .....	6
<b>3 <i>Helicobacter pylori</i> .....</b>	<b>10</b>
3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS .....	11
3.2 SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL.....	12
3.3 MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>Helicobacter</i> .....	13
3.4 MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE <i>Helicobacter pylori</i> . .....	14
3.5 ETIOPATOGENIA.....	15
3.6 FACTORES IMPLICADOS EN LA PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR <i>Helicobacter pylori</i> .....	17
3.6 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i> .....	22
3.7 TRATAMIENTO DE LA DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i> Y DESARROLLO DE RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS .....	23
3.8 EPIDEMIOLOGÍA.....	24
3.9 MODO DE TRANSMISIÓN .....	27
3.10 ESTADO VIABLE NO CULTIVABLE (VBNC) .....	30

<b>4</b>	<b>BIOPELICULAS.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>OTRAS ESPECIES PATÓGENAS DEL GÉNERO <i>Helicobacter</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>METODOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> .....</b>	<b>38</b>
6.1	DETECCIÓN Y AISLAMIENTO POR CULTIVO.....	40
6.2	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA .....	42
6.3	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR) .....	43
6.4	MODIFICACION DE LA TÉCNICA EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR) PARA DETECTAR ÚNICAMENTE DNA DE CÉLULAS VIABLES .....	45
6.5	HIBRIDACIÓN IN SITU CON SONDAS FLUORESCENTES: FISH Y DVC-FISH .....	47
6.6	ASOCIACIÓN DE LA TÉCNICA DIRECT VIABLE COUNT (DVC) A LA TÉCNICA FISH PARA DETECTAR ÚNICAMENTE DNA DE CÉLULAS VIABLES .....	50
6.7	METAGENÓMICA DE SECUENCIACIÓN DIRIGIDA.....	50
	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>60</b>
	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>64</b>
	<b>OPTIMIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>H. PYLORI</i> EN MUESTRAS AMBIENTALES Y CLÍNICAS. ....</b>	<b>64</b>
<b>1.1</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>71</b>
<b>1.2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>72</b>
1.2.1	CEPA DE REFERENCIA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	72
1.2.2	MEDIOS DE CULTIVO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE <i>H. pylori</i> . ....	72

1.2.3	EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .....	76
1.2.3.1	Tinción de <i>H. pylori</i> con SYTO9-PI .....	77
1.2.3.2	Inoculación de muestras ambientales y clínicas .....	77
<b>1.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
<b>1.4</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>85</b>
CAPÍTULO 2.....		90
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> .....		90
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>92</b>
<b>2.2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>94</b>
2.2.1	CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	94
2.2.2	ESTUDIO DE VIABILIDAD, RECUENTO CELULAR Y ESTADO MORFOLÓGICO .....	94
2.2.3	PRE-TRATAMIENTO CON PMA Y PEMAX™ .....	94
2.2.4	OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PRE-TRATAMIENTO CON PMA Y PEMAX™ .....	95
2.2.5	EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE PMA, PEMAX™ Y UN TAMPÓN ESPECÍFICO COMBINADO CON PEMAX™ DESPUÉS DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN .....	95
2.2.6	ESTUDIO DE LA EFICACIA DE PMA PARA DETECTAR DIFERENTES ESTADOS MORFOLÓGICOS VIABLES DE <i>H. pylori</i> .....	100
2.2.7	EXTRACCIÓN DE DNA .....	101

2.2.8	DETECCION E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR).....	101
2.2.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	103
<b>2.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>104</b>
2.3.1.	OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PRE-TRATAMIENTO CON PMA y PEMAX™ .....	104
2.3.1.1	Determinación de la concentración óptima de ambos intercalantes. ....	104
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 .....	108
2.3.2.1	Exposición de <i>H. pylori</i> a etanol al 70%. ....	108
2.3.2.2	Inactivación de las células de <i>H. pylori</i> con 100 ppm de hipoclorito de sodio. ....	109
2.3.2.3	Tratamiento de <i>H. pylori</i> con peróxido de hidrógeno al 5%. ....	109
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> .....	111
<b>2.4</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>114</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>		<b>119</b>
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. ....		119
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>121</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>123</b>
3.2.1	CEPAS DE REFERENCIA Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	123

3.2.2	ORIGEN DE LAS MUESTRAS.....	124
3.2.3	PROCESADO DE LAS MUESTRAS .....	124
3.2.4	CULTIVO DE <i>Helicobacter</i> spp. ....	126
3.2.5	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. y <i>H. pylori</i> MEDIANTE FISH y DVC-FISH	126
3.2.5.1	Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH) .....	126
3.2.5.2	Detección de Células Viables mediante DVC-FISH .....	129
3.2.6	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	129
3.2.6.1	Extracción de DNA.....	129
3.2.6.2	Condiciones de amplificación.....	129
3.2.7	ANÁLISIS POR METAGENÓMICA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. ....	130
3.2.7.1	Evaluación de iniciadores .....	130
3.2.7.2	Secuenciación de una comunidad artificial.....	132
3.2.7.3	Identificación de <i>Helicobacter</i> spp. y <i>H. pylori</i> en muestras ambientales.....	132
3.2.7.4	Análisis bioinformático.....	133
<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>135</b>
3.3.1	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. Y <i>H. pylori</i> POR CULTIVO.....	135
3.3.2	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. Y <i>H. pylori</i> MEDIANTE FISH y DVC-FISH	137
3.3.3	DETECCIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR .....	138

3.3.4	DETECCIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRIGIDA DAS.....	142
3.3.4.1	Evaluación de iniciadores para la amplificación de <i>Helicobacter</i> spp. ....	142
3.3.4.2	Identificación de <i>Helicobacter</i> spp. en muestras de aguas residuales tratadas.....	146
<b>3.4</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>152</b>
CAPÍTULO 4.....		158
OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE <i>H. PYLORI</i> . ....		158
<b>4.1</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>160</b>
<b>4.2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>161</b>
4.2.1	CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	161
4.2.2	EXTRACCIÓN DEL DNA .....	164
4.2.3	OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE <i>H. pylori</i> .....	164
4.2.3.1	Condiciones de amplificación.....	164
4.2.4	DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE <i>H. pylori</i> EN MUESTRAS AMBIENTALES .....	164
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>164</b>
4.3.1	OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE <i>H. pylori</i> .....	164
4.3.2	DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE <i>H. pylori</i> EN MUESTRAS AMBIENTALES .....	164



<b>4.4 DISCUSIÓN .....</b>	<b>164</b>
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>165</b>
<b>DETECCIÓN DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> EN MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO Y MOLECULARES.....</b>	<b>165</b>
<b>5.1 OBJETIVO.....</b>	<b>179</b>
<b>5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>179</b>
5.2.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS.....	179
5.2.2 PROCESADO DE LAS MUESTRAS .....	179
5.2.3 CULTIVO DE <i>H. pylori</i> .....	179
5.2.4 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR .....	179
5.2.4.1 Extracción de DNA.....	179
5.2.4.2 qPCR específica de <i>H. pylori</i> .....	179
5.2.5 IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. EN HECES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA (DAS).....	179
5.2.6 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON SONDAS FLUORESCENTES (FISH).....	179
5.2.7 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> VIABLE MEDIANTE DVC-FISH .....	179
<b>5.3 RESULTADOS .....</b>	<b>179</b>
5.3.1 DETECCIÓN MEDIANTE CULTIVO .....	179
5.3.2 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR .....	179

5.3.3 IDENTIFICACIÓN DE <i>Helicobacter</i> spp. EN HECES MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA (DAS).....	179
5.3.4 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE FISH y DVC-FISH.....	179
5.3.5 DETECCIÓN DE <i>H. pylori</i> RESISTENTE A LA CLARITROMICINA MEDIANTE FISH Y DVC-FISH.....	179
<b>5.4 DISCUSIÓN .....</b>	<b>179</b>
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>180</b>
<b>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. ....</b>	<b>180</b>
<b>6.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>199</b>
<b>6.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>199</b>
6.2.1 FORMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS .....	199
6.2.1.1 Cepa de referencia y Condiciones de Cultivo .....	199
199	
6.2.1.2 Formación de Biopelículas en microplacas .....	199
6.2.1.3 Cuantificación de biopelículas con Cristal Violeta (CV) .....	199
6.2.2 TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN .....	199
6.2.2.1 Crecimiento bacteriano y formación de biopelículas.....	199
6.2.2.2 Tratamiento con radiación UV .....	199
6.2.2.3 Tratamiento con hipoclorito de sodio.....	199

6.2.2.4	Análisis y modelización de los resultados .....	199
6.2.3	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR.....	199
6.2.1	Extracción de DNA genómico .....	199
6.2.2	qPCR Específica de <i>H. pylori</i> .....	199
6.2.3	Detección e identificación de células viables de <i>H. pylori</i> mediante PMA-qPCR .....	199
6.2.4	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>H. pylori</i> EN BIOPELÍCULAS MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR).....	199
6.2.4.1	Toma de muestras.....	199
6.2.4.2	Tratamiento de las muestras .....	199
6.2.4.3	qPCR .....	199
<b>6.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>199</b>
6.3.1	FORMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN MICROPLACAS .....	199
6.3.2	TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN .....	199
6.1	Tratamiento con UV .....	199
6.2	Tratamiento con hipoclorito de sodio.....	199
6.3	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN E <i>H. pylori</i> MEDIANTE qPCR EN MUESTRAS DE BIOPELÍCULAS .....	199
6.4	DISCUSIÓN .....	199
	CONCLUSIONES.....	200
	BIBLIOGRAFÍA.....	255

ANEXOS..... 297

## ÍNDICE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Taxonomía del género <i>Helicobacter</i> . Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001). .....	13
<b>Tabla 2:</b> Principales factores de virulencia de <i>H. pylori</i> asociados con la enfermedad.....	21
<b>Tabla 3:</b> Tasa de recuperación de <i>H. pylori</i> de todos los medios de cultivo para cada una de las matrices y diluciones ensayadas. ....	84
<b>Tabla 4:</b> Condiciones de qPCR para la detección de <i>H. pylori</i> . .....	102
<b>Tabla 5:</b> 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.....	105
<b>Tabla 6:</b> Efectos del PMA, PEMAX™ y el Tampón específico en combinación con el PEMAX™ en células viables de <i>H. pylori</i> . ....	107
<b>Tabla 7:</b> 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. ....	110
<b>Tabla 8:</b> 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.....	113
<b>Tabla 9:</b> Bacterias utilizadas para determinar la especificidad de los iniciadores in vitro. ....	123
<b>Tabla 10:</b> Secuencias de los iniciadores HSF y HS2R. ....	130
<b>Tabla 11:</b> Condiciones de la PCR para la detección de <i>Helicobacter</i> spp. ....	131
<b>Tabla 12:</b> Condiciones de la PCR establecidas para el secuenciador Illumina MiSeq. ....	133
<b>Tabla 13:</b> Detección de <i>Helicobacter</i> spp. y <i>H. pylori</i> en muestras de aguas residuales destinadas para riego, mediante técnicas moleculares y DAS. ....	140

<b>Tabla 14:</b> 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.....	145
<b>Tabla 15:</b> 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.....	151
<b>Tabla 16:</b> Cepas utilizadas en el estudio.....	161
<b>Tabla 17:</b> Secuencias de los iniciadores para la amplificación de los genes de virulencia y resistencia de <i>H. pylori</i> .....	164
<b>Tabla 18:</b> Condiciones de la PCR para la amplificación del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> .....	164
<b>Tabla 19:</b> Condiciones de amplificación de PCR para el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> .....	164
<b>Tabla 20:</b> Condiciones de la PCR para la amplificación del gen de resistencia <i>pbp1A</i> de <i>H. pylori</i> .....	164
<b>Tabla 21:</b> Condiciones de amplificación para el gen de resistencia <i>rdxA</i> de <i>H. pylori</i> .....	164
<b>Tabla 22:</b> 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> .....	164
<b>Tabla 23:</b> Resultados de los análisis para la detección de <i>H. pylori</i> en agua residual, potable y de riego.....	164
<b>Tabla 24:</b> 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. ....	179
<b>Tabla 25:</b> Detección de <i>H. pylori</i> mediante qPCR, FISH, DVC-FISH, Secuenciación, y DAS en muestras clínicas. ....	179
<b>Tabla 26:</b> Tiempo de exposición de las células planctónicas, calculado a partir de la dosis de radiación UV. ....	199
<b>Tabla 27:</b> Tiempo de exposición de células sésiles, calculado a partir de la dosis de radiación UV. ....	199

## índice

<b>Tabla 28:</b> Características del agua desionizada autoclavada, utilizada para los experimentos con Cloro. *DQO: demanda química de oxígeno. ....	199
<b>Tabla 29:</b> Condiciones de qPCR para la detección de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> . ....	199
<b>Tabla 30:</b> Densidad óptima alcanzada por las células de <i>H. pylori</i> , suspendidas en el medio de cultivo en las microplacas. ....	199
<b>Tabla 31:</b> 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> . ....	199
<b>Tabla 32:</b> 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 SkanIt. I. Incubación bajo condiciones anaeróbicas y limitación nutricional. ....	199
<b>Tabla 33:</b> 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 SkanIt. Incubación bajo condiciones aeróbicas y limitación nutricional. ....	199
<b>Tabla 34:</b> 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 SkanIt. Placas incubadas a 15 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional. ....	199
<b>Tabla 35:</b> 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 SkanIt. Placas incubadas a 5 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional. ....	199

**Tabla 36:** Parámetros de la distribución de Weibull para células planctónicas de *H. pylori* expuestas a diferentes influencias de radiación UV..... 199

**Tabla 37:** Parámetros estadísticos de la inactivación de células planctónicas de *H. pylori* con radiación UV..... 199

**Tabla 38:** Parámetros de la distribución de Weibull para Biopelículas de *H. pylori* expuestas a diferentes dosis de radiación UV..... 199

**Tabla 39:** Parámetros estadísticos de la inactivación de formación biopelículas de *H. pylori* con radiación UV..... 199

**Tabla 40:** Inactivación de *H. pylori* con Hipoclorito de sodio a 1,2 mg/mL y temperatura de incubación de 15 °C..... 199

**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..... 199

**Tabla 42:** Inactivación de *H. pylori* con una concentración de hipoclorito de sodio de 1,2 mg/mL a 25 °C..... 199

**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..... 199

**Tabla 44:** Detección de *H. pylori* en Biopelículas mediante qPCR..... 199

**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). ..... 2

**Figura 2:** Proceso de una Planta de Tratamiento de Agua Potable Convencional PTAP (SPENA Group). ..... 5

**Figura 3:** Diagrama de bloques del proceso de depuración de una EDAR (EPSAR; <http://www.epsar.gva.es/sanejament/instalaciones/buscador-edar.aspx>). ..... 10



## índice

<b>Figura 4:</b> Micrografía electrónica de <i>Helicobacter pylori</i> (ASM MicrobeLibrary.org).....	14
<b>Figura 5:</b> Historia natural de la infección por <i>H. pylori</i> (Romo <i>et al.</i> , 2010).....	16
<b>Figura 6:</b> Representación esquemática del gen <i>vacA</i> .....	20
<b>Figura 7:</b> Prevalencia de <i>H. pylori</i> . <a href="https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html">https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html</a> .....	25
<b>Figura 8:</b> Prevalencia de <i>H. pylori</i> en Europa. <a href="https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html">https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html</a> . ....	26
<b>Figura 9:</b> Micrografía electrónica de barrido que muestra la forma cocoide de <i>Helicobacter pylori</i> (Azevedo <i>et al.</i> , 2007).....	33
<b>Figura 10:</b> Formación de biopelículas (Campuzano <i>et al.</i> , 2018). ....	34
<b>Figura 11:</b> Métodos de detección de la qPCR: TaqMan y SyBr Green (Seminago <i>et al.</i> , 2015).....	44
<b>Figura 12:</b> Cinética de amplificación de la PCR.....	45
<b>Figura 13:</b> 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. ....	46
<b>Figura 14:</b> Diagrama de Flujo de un típico procedimiento de FISH (Rodríguez <i>et al.</i> , 2013).....	48
<b>Figura 15:</b> Estructura del monómero de LNA y su conformación especial (Wengel <i>et al.</i> , 2003).....	49
<b>Figura 16:</b> 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 <a href="http://medicalplanzone.com/bacterial-artificial-chromosome/">http://medicalplanzone.com/bacterial-artificial-chromosome/</a> .....	52

<b>Figura 17:</b> 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).	53
<b>Figura 18:</b> 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 <a href="http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html">www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html</a> .	56
<b>Figura 19:</b> Esquema de trabajo en Qiime (Caporaso <i>et al.</i> , 2010).	58
<b>Figura 20:</b> Recuento de células vivas de <i>H. pylori</i> en muestras inoculadas.	77
<b>Figura 21:</b> Tinción GRAM de <i>H. pylori</i> cultivado en el medio de cultivo HPA <sub>1</sub> .	78
<b>Figura 22:</b> Protocolo de cultivo para la detección e identificación de <i>H. pylori</i> en diferentes matrices inoculadas.	80
<b>Figura 23:</b> Recuperación de células de <i>Helicobacter pylori</i> en los medios de cultivo ADPB (A) y CM <sub>3</sub> (B) a partir del inóculo de 10 <sup>3</sup> UFC/mL.	81
<b>Figura 24:</b> Recuperación de células de <i>Helicobacter pylori</i> en medio de cultivo AD a partir del inóculo de 10 <sup>2</sup> UFC/mL.	82
<b>Figura 25:</b> Protocolo de pre-tratamiento con PMA, PEMAX <sup>TM</sup> y un tampón específico combinado con PEMAX <sup>TM</sup> para la detección de células viables de <i>H. pylori</i> .	99
<b>Figura 26:</b> 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.	104
<b>Figura 27:</b> 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).	112

## índice

<b>Figura 28:</b> Protocolo para la detección e identificación de <i>H. pylori</i> y <i>Helicobacter</i> spp., en aguas residuales. ....	125
<b>Figura 29:</b> Tinción Gram de las colonias sospechosas de <i>Helicobacter</i> spp. ....	135
<b>Figura 30:</b> Colonias sospechosas de <i>Helicobacter</i> spp. (A) en Agar selectivo Dent. Purificación de las posibles colonias en Agar Sangre Piruvato(B). ....	136
<b>Figura 31:</b> Identificación de colonias sospechosas de <i>Helicobacter</i> spp. por PCR. 1: Control positivo <i>H. pylori</i> 11637 NCTC; 2, 3 y 4: colonia sospechosa. 5: Control negativo; M: marcador.....	137
<b>Figura 32:</b> 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. ....	139
<b>Figura 33:</b> 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. ....	143
<b>Figura 34:</b> 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. ....	143
<b>Figura 35:</b> Distribución de los filos más abundantes del promedio de las muestras de aguas residuales (%). ....	146
<b>Figura 36:</b> Distribución de filos presentes en las muestras de aguas residuales analizadas (%). ....	147
<b>Figura 37:</b> Distribución de las clases bacterianas más abundante del promedio de las muestras de aguas residuales. ....	148
<b>Figura 38:</b> Distribución de las clases bacterianas más abundantes en las aguas residuales (%). ....	149

<b>Figura 39:</b> Distribución de los géneros bacterianos más abundantes del promedio de las muestras de aguas residuales (%).	149
<b>Figura 40:</b> 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 -	165
<b>Figura 41:</b> 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 -	165
<b>Figura 42:</b> 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	165
<b>Figura 43:</b> 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	164
<b>Figura 44:</b> 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 -	164
<b>Figura 45:</b> 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 -	164
<b>Figura 46:</b> Protocolo de detección de <i>H. pylori</i> en heces mediante técnicas moleculares y cultivo	179
<b>Figura 47:</b> Tm: 84,5-86,5 °C de muestras de heces positivas para el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> .	179
<b>Figura 48:</b> Curva de amplificación del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> , en muestras de heces	179
<b>Figura 49:</b> Protocolo de preparación de suspensiones celulares estandarizadas.	199
<b>Figura 50:</b> Protocolo experimental para estudiar la formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> .	199

## índice

<b>Figura 51:</b> Protocolo de medición de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> .....	199
<b>Figura 52:</b> Protocolo de formación de biopelículas de <i>H. pylori</i> sobre filtro de celulosa de 0,45 $\mu\text{m}$ .....	199
<b>Figura 53:</b> Descripción esquemática del dispositivo utilizado para llevar a cabo la exposición a radiación UV de <i>H. pylori</i> .....	199
<b>Figura 54:</b> Protocolo de tratamiento de células planctónicas de <i>H. pylori</i> con UV-C.....	199
<b>Figura 55:</b> Protocolo de tratamiento de biopelículas de <i>H. pylori</i> con UV-C.....	199
<b>Figura 56:</b> Protocolo de tratamiento de células planctónicas de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio.....	199
<b>Figura 57:</b> Protocolo de tratamiento de biopelículas de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio.....	199
<b>Figura 58:</b> Curva patrón de <i>H. pylori</i> .....	199
<b>Figura 59:</b> Tratamiento con PMA de biopelículas de <i>H. pylori</i> expuestas a tratamientos de desinfección.....	199
<b>Figura 60:</b> Formación de Biopelículas (FB) de <i>H. pylori</i> . Placas incubadas con limitación nutricional a 37 °C, en condiciones anaeróbicas.....	199
<b>Figura 61:</b> Formación de Biopelículas (FB) de <i>H. pylori</i> . Placas incubadas con limitación nutricional 37°C, en condiciones aeróbicas.....	199
<b>Figura 62:</b> Formación de Biopelículas (FB) de <i>H. pylori</i> . Placas incubadas a 15 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.....	199
<b>Figura 63:</b> Formación de Biopelículas (FB) de <i>H. pylori</i> . Placas incubadas a 5 °C en condiciones aeróbicas y limitación nutricional.....	199
<b>Figura 64:</b> Curva de inactivación de células planctónicas de <i>H. pylori</i> a diferentes influencias de dosis de radiación UV.....	199

<b>Figura 65:</b> Efecto de la radiación UV en la supervivencia de células planctónicas de <i>H. pylori</i> . LOD: 2,54 y LOQ: 4,02. ....	199
<b>Figura 66:</b> Curva de inactivación de Biopelículas de <i>H. pylori</i> a diferentes dosis de radiación UV. ....	199
<b>Figura 67:</b> Efecto de la radiación UV en la supervivencia de biopelículas de <i>H. pylori</i> . LOD: 2,64 y LOQ:4,02.....	199
<b>Figura 68:</b> Inactivación de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio a 1,2 mg/mL y temperatura de incubación de 15 °C.....	199
<b>Figura 69:</b> 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. ....	199
<b>Figura 70:</b> 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. ....	199
<b>Figura 71:</b> Inactivación de <i>H. pylori</i> con hipoclorito de sodio a 1,2 mg/mL y temperatura de incubación de 25 °C.....	199
<b>Figura 72:</b> 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. ....	199
<b>Figura 73:</b> una temperatura de incubación de 25 °C. LOQ: 4,02 y LOD: 2,97. ....	199
<b>Figura 74:</b> Curvas de amplificación del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de Biopelículas. ....	199
<b>Figura 75:</b> Tm de los iniciadores <i>vacA</i> en muestras de Biopelículas. ....	199
<b>Figura 76:</b> 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.....	199

