

## INTRODUCCIÓN GENERAL

<b>1. Contaminación de agua y alimentos por microorganismos patógenos</b>	<u>1</u>
<b>2. Papel del agua en la transmisión de enfermedades infecciosas</b>	<u>2</u>
2.1. Las aguas residuales	<u>2</u>
2.2. El agua potable	<u>5</u>
<b>3. <i>Helicobacter pylori</i>, patógeno acuático emergente</b>	<u>7</u>
3.1. Antecedentes históricos y situación taxonómica actual	<u>7</u>
3.2. Morfología y características fisiológicas del género <i>Helicobacter</i>	<u>11</u>
3.3. Etiopatogenia	<u>13</u>
3.4. Epidemiología y transmisión	<u>15</u>
3.5. Estado viable no cultivable (VNC)	<u>22</u>
<b>4. Técnicas para la detección e identificación de <i>H. pylori</i></b>	<u>24</u>
4.1. Detección y aislamiento por cultivo	<u>25</u>
4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	<u>30</u>
4.3. PCR cuantitativa a Tiempo Real (q-PCR)	<u>32</u>
4.4. Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	<u>38</u>
4.5. Detección de células viables por métodos moleculares	<u>42</u>
4.5.1. Detección de ADN de células viables mediante PCR	<u>43</u>
4.5.2. Detección de células viables mediante DVC-FISH	<u>44</u>
4.5.3. Resistencia de <i>H. pylori</i> a la claritromicina	<u>45</u>

## CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE *HELICOBACTER PYLORI* EN AGUA RESIDUAL

<b>OBJETIVOS</b>	<u>49</u>
<b>1. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
1.1. Cepas utilizadas en el estudio y condiciones de cultivo	<u>50</u>
1.2. Procesado de las muestras de agua residual	<u>51</u>
1.2.1. Origen de las muestras	<u>51</u>
1.2.2. Protocolo de procesado de muestras	<u>51</u>
1.3. Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i> por cultivo	<u>52</u>
1.3.1. Evaluación de los medios de cultivo	<u>52</u>
1.3.2. Metodología de cultivo	<u>53</u>
1.3.3. Identificación molecular de las colonias	<u>54</u>
1.4. Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante PCR y q-PCR	<u>55</u>
1.4.1. Extracción de ADN genómico	<u>55</u>
1.4.2. Iniciadores	<u>56</u>
1.4.3. Condiciones de amplificación de la PCR tradicional	<u>57</u>
1.4.4. Condiciones de amplificación mediante PCR a tiempo real (q-PCR)	<u>58</u>
1.4.4.1. Puesta a punto del método de q-PCR	<u>58</u>
1.4.4.2. Análisis cuantitativo: Curva patrón para la cuantificación de <i>H. pylori</i>	<u>61</u>
1.4.4.3. q-PCR de <i>H. pylori</i> a partir de muestras	<u>64</u>
1.5. Detección e identificación mediante Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	<u>65</u>

1.5.1. Fijación de las muestras	65
1.5.2. Condiciones de hibridación	66
1.5.3. Sondas de hibridación	67
1.5.4. FISH de <i>H. pylori</i> a partir de muestras	69
<b>2. RESULTADOS</b>	
2.1. Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i> por cultivo	73
2.1.2. Identificación de las colonias	74
2.1.2.1. Identificación fenotípica	74
2.1.2.2. Identificación genotípica	75
2.2. Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante PCR	78
2.2.1. Detección mediante PCR tradicional	78
2.2.2. Detección mediante q-PCR	79
2.3. Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante FISH	81
2.3.1. Detección de <i>H. pylori</i> resistente a la claritromicina mediante FISH	83
2.4. Eficiencia de los métodos moleculares FISH, PCR y q-PCR y cultivo en la detección de <i>H. pylori</i> en muestras de agua residual	84
<b>3. DISCUSIÓN</b>	91

## CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE *HELICOBACTER PYLORI* EN AGUA POTABLE

<b>OBJETIVOS</b>	103
<b>1. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
1.1. Procesado de las muestras de agua potable	104
1.1.1. Origen de las muestras	104
1.1.2. Protocolo de procesado de muestras	104
1.1.2.1. Evaluación del método de recuperación de <i>H. pylori</i> tras filtrado	104
1.1.2.2. Procesado de las muestras	107
1.2. Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i> por cultivo	108
1.2.1. Evaluación de los métodos de eliminación de microbiota acompañante	108
1.2.1.1. Separación inmunomagnética	108
1.2.1.2. Tratamiento de choque ácido	111
1.2.2. Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras	113
1.3. Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante q-PCR	113
1.3.1. Extracción de ADN genómico	113
1.3.2. Condiciones de amplificación mediante PCR a tiempo real (q-PCR)	114

1.3.3. Detección de ADN de células viables: Pretratamiento con Propidio Monoazida de muestras inoculadas	115
1.3.4. q-PCR y PMA-qPCR de <i>H. pylori</i> a partir de muestras	117
1.4. Detección de células viables de <i>H. pylori</i> mediante DVC-FISH	118
1.4.1 Metodología de la técnica DVC-FISH	118
1.4.2. Detección de formas viables en agua mediante DVC-FISH	120
<b>2. RESULTADOS</b>	
2.1. Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i> por cultivo	122
2.1.1. Evaluación del método de recuperación de <i>H. pylori</i>	122
2.1.2. Aislamiento e identificación por cultivo	123
2.2. Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante q-PCR	125
2.3. Detección e identificación de células viables de <i>H. pylori</i>	127
2.3.1. Detección de ADN de células viables de <i>H. pylori</i> mediante PMA-qPCR	130
2.3.2. Detección de células viables de <i>H. pylori</i> mediante DVC-FISH	130
2.3.3. Detección de <i>H. pylori</i> resistente a la claritromicina mediante FISH	131
<b>3. DISCUSIÓN</b>	137
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	147
<b>CONCLUSIONES</b>	155
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	159
<b>ANEJOS</b>	179

## ANEJOS

<b>ANEJO A.</b>	<b>Medios de cultivo</b>	
	A.1. Medios sólidos	<u>179</u>
	A.2. Caldos de cultivo	<u>182</u>
<b>ANEJO B.</b>	<b>Reactivos y Soluciones</b>	
	B.1. Generación de microaerofilia	<u>183</u>
	B.2. Aislamiento	<u>183</u>
	B.3. Hibridación <i>in situ</i> (FISH)	<u>184</u>
	B.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	<u>188</u>
<b>ANEJO C.</b>	<b>Iniciadores y condiciones de amplificación del 16S rDNA</b>	<u>190</u>
<b>ANEJO D.</b>	<b>Estaciones de Depuración de Aguas Residuales (EDAR)</b>	
	D.1. Fases del proceso de depuración de aguas residuales	<u>191</u>
<b>ANEJO E.</b>	<b>Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAP)</b>	
	E.1. Fases del proceso de potabilización de agua	<u>193</u>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Taxonomía del género <i>Helicobacter</i>	<u>8</u>
<b>Tabla 2.</b>	Especies intestinales del género <i>Helicobacter</i>	<u>9</u>
<b>Tabla 3.</b>	Especies gástricas del género <i>Helicobacter</i>	<u>10</u>
<b>Tabla 4.</b>	Cepas utilizadas en el estudio	<u>50</u>
<b>Tabla 5.</b>	Secuencias de los iniciadores HP	<u>56</u>
<b>Tabla 6.</b>	Secuencias de los iniciadores vacA	<u>57</u>
<b>Tabla 7.</b>	Condiciones de la PCR para la detección de <i>H. pylori</i>	<u>57</u>
<b>Tabla 8.</b>	Condiciones de la q-PCR para la detección de <i>H. pylori</i>	<u>61</u>
<b>Tabla 9.</b>	Secuencias de las sondas EUB338-I-I-III	<u>67</u>
<b>Tabla 10.</b>	Secuencia de la sonda HPYL	<u>68</u>
<b>Tabla 11.</b>	Secuencia de la sonda HPYL-LNA	<u>68</u>
<b>Tabla 12.</b>	Secuencias de las sondas CLAR I-II-III	<u>69</u>
<b>Tabla 13.</b>	Identificación de las colonias de <i>H. pylori</i>	<u>78</u>
<b>Tabla 14.</b>	Resultados de la detección directa de <i>H. pylori</i> en muestras de agua residual según la técnica empleada	<u>85</u>
<b>Tabla 15.</b>	Resultados de la detección tras enriquecimiento de <i>H. pylori</i> en muestras de agua residual según la técnica empleada	<u>85</u>
<b>Tabla 16.</b>	Detección de <i>H. pylori</i> mediante FISH, PCR, q-PCR y cultivo en placa, en muestras de agua residual	<u>87</u>
<b>Tabla 17.</b>	Resultados del recuento de células viables recuperadas tras las diferentes metodologías de procesamiento de membrana de filtración	<u>122</u>
<b>Tabla 18.</b>	Resultados de la cuantificación, según técnica, de <i>H. pylori</i> en muestras inoculadas artificialmente	<u>128</u>
<b>Tabla 19.</b>	Detección de <i>H.pylori</i> mediante q-PCR, PMA-qPCR, DVC-FISH, FISH y cultivo, en muestras de agua potable	<u>133</u>
<b>Tabla 20.</b>	Secuencias de los iniciadores 16S rDNA	<u>190</u>
<b>Tabla 21.</b>	Condiciones de amplificación de los iniciadores 27F/1492R	<u>190</u>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Micrografía electrónica de <i>Helicobacter pylori</i>	<u>13</u>
<b>Figura 2.</b>	Distribución de la infección de <i>H. pylori</i> en la población mundial, vinculada con el grado de desarrollo económico	<u>16</u>
<b>Figura 3.</b>	Diagrama de una separación inmunomagnética	<u>28</u>
<b>Figura 4.</b>	Representación gráfica del aumento de la fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de $C_T$	<u>33</u>
<b>Figura 5.</b>	Termociclador con sistema de capilares	<u>35</u>
<b>Figura 6.</b>	LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System	<u>36</u>
<b>Figura 7.</b>	Mecanismo de acción del SYBR Green I	<u>38</u>
<b>Figura 8.</b>	Esquema del protocolo general de la técnica FISH	<u>39</u>
<b>Figura 9.</b>	Estructura del monómero de LNA B: Base; Z: grupo terminal (OH); Z*: grupo de enlace internucleosídico (OH); Y: CH <sub>2</sub> ; X: grupo constitutivo O, S, NR	<u>41</u>
<b>Figura 10.</b>	Mecanismo de acción del Propidio Monoazida	<u>44</u>
<b>Figura 11.</b>	“Realpure Spin Food-Stool Bacteria kit”	<u>56</u>
<b>Figura 12.</b>	Curva de fusión: Descenso brusco de la fluorescencia	<u>60</u>
<b>Figura 13.</b>	Representación del pico de fusión que muestra la $T_m$	<u>60</u>
<b>Figura 14.</b>	Curva patrón obtenida con el método “Second Derivate Maximum”	<u>62</u>
<b>Figura 15.</b>	Curvas de amplificación de las distintas concentraciones de ADN de <i>H. pylori</i> mostrando tres réplicas de cada patrón	<u>64</u>
<b>Figura 16.</b>	Colonias de <i>H. pylori</i> sobre Agar Dent (A). Detalle de las colonias (B)	<u>74</u>
<b>Figura 17.</b>	Identificación de <i>H. pylori</i> en la muestra directa M31, siembra sobre membrana. Hibridación con la sonda EUB 338 (A). Hibridación con la sonda HPYL-LNA (B)	<u>75</u>
<b>Figura 18.</b>	Identificación de <i>H. pylori</i> en la muestra enriquecida M26, siembra sobre membrana. Hibridación con la sonda EUB338 (A). Hibridación con la sonda HPYL-LNA (B). Hibridación con las sondas EUB338 + HPYL-LNA (C)	<u>76</u>
<b>Figura 19.</b>	Identificación de los aislados de <i>H. pylori</i> por PCR. 1:M31; 2: M40; 4: M40; 5:M41; M: Marcador 100 pb; 6: M41; 7: Control positivo; 8: Control negativo	<u>77</u>
<b>Figura 20.</b>	Detección de <i>H. pylori</i> en muestras de agua residual enriquecidas (PCR). 1: M5; 2: M24; 4: M28; 5: M31; 6: M34; 7: M49; 8 Control positivo; 9: Control negativo; M: Marcador de 100 pb	<u>79</u>
<b>Figura 21.</b>	Curvas de amplificación del gen <i>vacA</i> para <i>H. pylori</i> en muestras de agua residual	<u>80</u>
<b>Figura 22.</b>	$T_m$ de los iniciadores <i>vacA</i> , en muestras de agua residual	<u>80</u>
<b>Figura 23.</b>	Detección directa de <i>H. pylori</i> en muestras (q-PCR). 1: M27; 2: M28; 4: M29; 5: M31; 6: M40; 7 Control positivo; 8: Control negativo; M: Marcador de 100 pb	<u>81</u>

<b>Figura 24.</b>	Hibridación con sondas HPYL-LNA de <i>H. pylori</i> (controles positivos). Hibridación de la cepa NCTC 11637 de <i>H. pylori</i> con sondas HPYL-LNA marcadas con fluoróforos FAM (A). Hibridación de la cepa NCTC 11637 de <i>H. pylori</i> con sondas EUB338- I-II-II marcadas con fluoróforo CY3 (B)	<u>82</u>
<b>Figura 25.</b>	Detección directa de <i>H. pylori</i> en muestra por FISH. Sondas EUB338 (A). Sonda HPYL-LNA específica para <i>H. pylori</i> (B)	<u>83</u>
<b>Figura 26.</b>	Detección de <i>H. pylori</i> en muestra enriquecida por FISH. Sondas EUB338 (A). Sonda HPYL-LNA específica para <i>H. pylori</i> (B)	<u>83</u>
<b>Figura 27.</b>	Detección de <i>H. pylori</i> resistente a la claritromicina por FISH. Hibridación con sondas claR mix (A). Hibridación con sonda HPYL-LNA (B). Hibridación con sondas HPYL-LNA y claR mix (C).	<u>84</u>
<b>Figura 28.</b>	Crecimiento bacteriano en Medio Dent-C de muestras directas de agua potable. M18 (A). M43 (B)	<u>123</u>
<b>Figura 29.</b>	Crecimiento bacteriano en Medio Dent-C a partir de muestras de aguas potables tras enriquecimiento. M17 (A). M36 (B). M22, cultivo mixto con colonias de <i>H. pylori</i> (C)	<u>124</u>
<b>Figura 30.</b>	Tm de los iniciadores vacA en muestras de agua potable	<u>125</u>
<b>Figura 31.</b>	Curvas de amplificación del gen vacA de <i>H. pylori</i> en muestras de agua potable	<u>126</u>
<b>Figura 32.</b>	Detección de <i>H. pylori</i> en muestra directas de agua potable por electroforesis en gel de agarosa. 1: M34; 2: M38; 3: M40; 4: M42; 5: M51; 6: M52; 7: M53; 8: M54; 9: M55; 10: M56; 11: Control positivo 12: Control negativo; 13: Marcador de 100 pb.	<u>127</u>
<b>Figura 33.</b>	Hibridación de la cepa NCTC 11637 de <i>H. pylori</i> por FISH. Formamida 30 %. Sonda HPYL-LNA (CY3) (A). Sondas EUB338-I-II-II (FAM) (B)	<u>129</u>
<b>Figura 34.</b>	Célula viable de <i>H. pylori</i> hibridada con la sonda EUB 338	<u>130</u>
<b>Figura 35.</b>	Célula viable de <i>H. pylori</i> hibridada con la sonda específica HPYL-LNA	<u>130</u>
<b>Figura 36.</b>	Detección de <i>H. pylori</i> resistente a la claritromicina por FISH. Hibridación con sondas claR mix (A). Hibridación con sonda EUB 338 (B).	<u>131</u>
<b>Figura 37.</b>	Diagrama de bloques del proceso de depuración de agua residual (EPSA)	<u>192</u>
<b>Figura 38.</b>	Diagrama de bloques del proceso de potabilización de agua (Aysa)	<u>195</u>

## ÍNDICE DE PROTOCOLOS

<b>Protocolo 1.</b>	Detección de <i>H. pylori</i> en agua procedente de depuradora, mediante moleculares y cultivo	<u>71</u>
<b>Protocolo 2.</b>	Recuperación sobre membrana de <i>H. pylori</i> tras filtración	<u>106</u>
<b>Protocolo 3</b>	Separación inmunomagnética de <i>H. pylori</i> en muestra inoculada artificialmente	<u>110</u>
<b>Protocolo 4.</b>	Tratamiento de choque ácido de <i>H. pylori</i> previo a la siembra en medios de cultivo	<u>112</u>
<b>Protocolo 5.</b>	Detección de ADN de células viables de <i>H. pylori</i> mediante PMA-qPCR en muestra inoculada artificialmente	<u>117</u>
<b>Protocolo 6.</b>	Detección de células viables de <i>H. pylori</i> mediante DVC-FISH	<u>119</u>
<b>Protocolo 7.</b>	Detección de <i>H. pylori</i> en agua potable mediante técnicas moleculares y cultivo	<u>121</u>