

INTRODUCCIÓN GENERAL

| | |
|---|-----------|
| 1. Contaminación de agua y alimentos por microorganismos patógenos | <u>1</u> |
| 2. Papel del agua en la transmisión de enfermedades infecciosas | <u>2</u> |
| 2.1. Las aguas residuales | <u>2</u> |
| 2.2. El agua potable | <u>5</u> |
| 3. <i>Helicobacter pylori</i>, patógeno acuático emergente | <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> |
| 4. Técnicas para la detección e identificación de <i>H. pylori</i> | <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

| | |
|---|-----------|
| OBJETIVOS | <u>49</u> |
| 1. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 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 |
| 2. RESULTADOS | |
| 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 |
| 3. DISCUSIÓN | 91 |

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

| | |
|--|-----|
| OBJETIVOS | 103 |
| 1. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 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 |
| 2. RESULTADOS | |
| 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 |
| 3. DISCUSIÓN | 137 |
| DISCUSIÓN GENERAL | 147 |
| CONCLUSIONES | 155 |
| BIBLIOGRAFÍA | 159 |
| ANEJOS | 179 |

ANEJOS

| | | |
|-----------------|--|------------|
| ANEJO A. | Medios de cultivo | |
| | A.1. Medios sólidos | <u>179</u> |
| | A.2. Caldos de cultivo | <u>182</u> |
| ANEJO B. | Reactivos y Soluciones | |
| | 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> |
| ANEJO C. | Iniciadores y condiciones de amplificación del 16S rDNA | <u>190</u> |
| ANEJO D. | Estaciones de Depuración de Aguas Residuales (EDAR) | |
| | D.1. Fases del proceso de depuración de aguas residuales | <u>191</u> |
| ANEJO E. | Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) | |
| | E.1. Fases del proceso de potabilización de agua | <u>193</u> |

ÍNDICE DE TABLAS

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

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 1. | Micrografía electrónica de <i>Helicobacter pylori</i> | <u>13</u> |
| Figura 2. | Distribución de la infección de <i>H. pylori</i> en la población mundial, vinculada con el grado de desarrollo económico | <u>16</u> |
| Figura 3. | Diagrama de una separación inmunomagnética | <u>28</u> |
| Figura 4. | Representación gráfica del aumento de la fluorescencia (ΔR_n) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de C_T | <u>33</u> |
| Figura 5. | Termociclador con sistema de capilares | <u>35</u> |
| Figura 6. | LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System | <u>36</u> |
| Figura 7. | Mecanismo de acción del SYBR Green I | <u>38</u> |
| Figura 8. | Esquema del protocolo general de la técnica FISH | <u>39</u> |
| Figura 9. | Estructura del monómero de LNA B: Base; Z: grupo terminal (OH); Z*: grupo de enlace internucleosídico (OH); Y: CH ₂ ; X: grupo constitutivo O, S, NR | <u>41</u> |
| Figura 10. | Mecanismo de acción del Propidio Monoazida | <u>44</u> |
| Figura 11. | “Realpure Spin Food-Stool Bacteria kit” | <u>56</u> |
| Figura 12. | Curva de fusión: Descenso brusco de la fluorescencia | <u>60</u> |
| Figura 13. | Representación del pico de fusión que muestra la T_m | <u>60</u> |
| Figura 14. | Curva patrón obtenida con el método “Second Derivate Maximum” | <u>62</u> |
| Figura 15. | Curvas de amplificación de las distintas concentraciones de ADN de <i>H. pylori</i> mostrando tres réplicas de cada patrón | <u>64</u> |
| Figura 16. | Colonias de <i>H. pylori</i> sobre Agar Dent (A). Detalle de las colonias (B) | <u>74</u> |
| Figura 17. | 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> |
| Figura 18. | 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> |
| Figura 19. | 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> |
| Figura 20. | 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> |
| Figura 21. | Curvas de amplificación del gen <i>vacA</i> para <i>H. pylori</i> en muestras de agua residual | <u>80</u> |
| Figura 22. | T_m de los iniciadores <i>vacA</i> , en muestras de agua residual | <u>80</u> |
| Figura 23. | 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> |

| | | |
|-------------------|---|------------|
| Figura 24. | 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> |
| Figura 25. | 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> |
| Figura 26. | 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> |
| Figura 27. | 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> |
| Figura 28. | Crecimiento bacteriano en Medio Dent-C de muestras directas de agua potable. M18 (A). M43 (B) | <u>123</u> |
| Figura 29. | 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> |
| Figura 30. | Tm de los iniciadores vacA en muestras de agua potable | <u>125</u> |
| Figura 31. | Curvas de amplificación del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de agua potable | <u>126</u> |
| Figura 32. | 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> |
| Figura 33. | 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> |
| Figura 34. | Célula viable de <i>H. pylori</i> hibridada con la sonda EUB 338 | <u>130</u> |
| Figura 35. | Célula viable de <i>H. pylori</i> hibridada con la sonda específica HPYL-LNA | <u>130</u> |
| Figura 36. | 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> |
| Figura 37. | Diagrama de bloques del proceso de depuración de agua residual (EPSA) | <u>192</u> |
| Figura 38. | Diagrama de bloques del proceso de potabilización de agua (Aysa) | <u>195</u> |

ÍNDICE DE PROTOCOLOS

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