

## Resumen

*Helicobacter pylori* ocupa una posición destacada entre los patógenos humanos emergentes, siendo una de las causas más comunes de infección crónica bacteriana en la humanidad y estrechamente relacionada con la úlcera péptica y el cáncer gástrico. Se ha sugerido que *H. pylori* puede ser adquirido por diferentes vías de transmisión, entre ellas el agua. La creciente demanda de agua debido al aumento de la población mundial y a la concurrente expansión de la industria hace necesario el aprovechamiento de las aguas residuales depuradas. Sin embargo, la resistencia de *H. pylori* a los tratamientos de desinfección del agua constituye un riesgo para la salud.

De igual forma, *H. pylori* presenta capacidad de resistencia a tratamientos de potabilización y a concentraciones elevadas de cloro libre en los sistemas de distribución gracias a la formación de biopelículas, pudiéndose encontrar también en estos ecosistemas. El estado viable no cultivable de *H. pylori*, en ambas matrices, es el habitual en condiciones de estrés, haciendo necesario la aplicación de técnicas moleculares para su detección e identificación.

En esta tesis doctoral se ha estudiado la presencia y viabilidad de este importante patógeno tanto en agua residual como potable.

Un total de 60 muestras de agua residual, incluyendo muestras de la entrada del reactor biológico, de la salida de éste y muestras tras el tratamiento terciario de desinfección con radiación ultravioleta, se analizaron para detectar la presencia de *H. pylori* mediante las técnicas moleculares PCR, q-PCR y FISH y la técnica tradicional de cultivo en placa.

La técnica FISH resultó ser un método eficaz y rápido para la detección de *H. pylori* en las aguas residuales y depuradas (61.2 %), sin la necesidad de un paso previo de enriquecimiento de las muestras. Las técnicas PCR y q-PCR determinaron la presencia de *H. pylori* en las muestras, con porcentajes de detección de ambas del 15 %. Fue posible cuantificar únicamente en 3 muestras directas, pertenecientes a la entrada y salida del reactor ( $1.8 \times 10^3$ ;  $1.5 \times 10^4$  y  $6.3 \times 10^4$  GU/ mL), las restantes presentaban el Ct por encima del umbral de fiabilidad ( $>35$  ciclos).

Aunque el cultivo resultó ser un método poco resolutivo, el método de aislamiento mediante membrana de  $0.65 \mu\text{m}$ , puesto a punto en esta tesis doctoral, resultó eficaz para reducir la microbiota acompañante y poder obtener *H. pylori* cultivable por primera vez a partir de aguas depuradas.

De igual modo, se analizaron 63 muestras de agua potable procedentes de 51 fuentes públicas de agua potable localizadas en la zona litoral del Este de España, pudiendo confirmar por primera vez la presencia de células viables del patógeno en aguas de consumo.

Las técnicas FISH y q-PCR resultaron eficaces para la detección de *H. pylori* con unas tasas de detección de 46 % y 50.8 % respectivamente. Para la detección de células viables de *H. pylori* en agua potable la técnica DVC-FISH resultó ser una herramienta más efectiva que el PMA-qPCR, con una tasa de detección de células viables del 38 %. Fue posible la cuantificación de células viables obteniendo valores comprendidos entre  $4 \times 10^2$  y  $1.6 \times 10^3$

células viables de *H. pylori* /mL. A pesar de la dificultad de cultivar el patógeno, se identificó *H. pylori* en una muestra tras el enriquecimiento de 24 horas.

La detección de mutaciones en el 23S, específicas en la resistencia a la claritromicina, indicó que el 41.6% de las muestras de agua residual y el 17.4 % de las muestras de agua potable presentaban *H. pylori* con dicho potencial.

Los resultados obtenidos confirman la capacidad de *H. pylori* de sobrevivir a los tratamientos de depuración del agua en una estación de depuración de aguas residuales, lo que debería ser considerado al evaluar el riesgo potencial de su reutilización para el riego. Por otra parte, *H. pylori* se encuentra en los sistemas de distribución de agua potable, por lo que el consumo de éstas puede representar un riesgo para la salud humana, puesto que son una posible vía de transmisión del patógeno. La presencia de *H. pylori* resistente a la claritromicina en el ambiente, evidencia la necesidad de monitorizar un control eficaz del patógeno, ya que el agua puede suponer un riesgo para la expansión de las resistencias, y los consiguientes fallos terapéuticos en la práctica clínica.

Dado el papel del agua en la transmisión de *H. pylori*, confirmado en esta tesis doctoral, se proponen los protocolos establecidos, principalmente el método DVC-FISH, como validables para el control ambiental eficiente de *H. pylori*.