

Transmisión de *Helicobacter pylori* a través del agua: estudio de la presencia del patógeno e identificación de formas viables mediante técnicas moleculares



Tesis doctoral
Paula Santiago Cuéllar
Octubre 2016

Directoras
Yolanda Moreno Trigos
M^a Antonia Ferrús Pérez

Universidad
Politécnica de
Valencia

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Programa de Doctorado de Ciencia, Tecnología y Gestión de Alimentos



**Transmisión de *Helicobacter pylori* a través del agua:
estudio de la presencia del patógeno e identificación de
formas viables mediante técnicas moleculares**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Paula Santiago Cuéllar

Directoras:

Dra. Dña. Yolanda Moreno Trigos

Dra. Dña. M^a Antonia Ferrús Pérez

Tutora Académica:

Dra. Dña. Consuelo González Martínez

Valencia, Octubre 2016

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer sinceramente a mis dos directoras de tesis, M^a Antonia Ferrús y Yolanda Moreno, la oportunidad de trabajar con ellas, su esfuerzo y dedicación.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, han sido fundamentales sus conocimientos, sus orientaciones, su persistencia y motivación para mi formación como investigadora.

A los doctores José Luis Alonso e Inmaculada Amorós, por haberme acogido en el IIAMA como una más desde el primer día y por esas aventurillas vividas cada día y al otro lado del mundo, espero sinceramente que éstas continúen.

Durante esta etapa ha pasado mucha gente acompañandome en el camino, algunos se encuentran lejos otros siguen a mi lado, pero todos ellos han dejado algo en mi. Lore, Irene, Albert, Javi, Jorge, Laura, Mariela...gracias por grandes momentos de risas, de compartir momentos de frustración laboratoriana, por disfrutar y celebrar los pequeños triunfos durante estos años, en definitiva gracias por ser mi pequeña familia de bata blanca. Sin importar en dónde estén o si alguna vez llegan a leer esta dedicatoria quiero darles las gracias por formar parte de mi.

A mis cúrcuma's women, poneis color a este laboratorio de largos pasillos blancos. Inma, gracias por tu tiempo incondicional por hacer sentir a la gente del lab esa vida Zen que tanto anhelamos. Yoli, que decirte...gracias por todos estos años y por convertirte en mi amiga, no olvidaré ese movimiento de cabeza sutil cuando nos cruzabamos al comienzo de esta aventura tesimal.

No quisiera olvidar a la gente de este último año por su interés y apoyo incondicional en esta última etapa de finalización de la tesis: Perrunillos gracias por estar ahí!

Y finalmente me gustaria agradecer a mi familia su apoyo continuo en todas mis decisiones, por inculcarme ese espíritu curioso que me ha traído hasta aquí. Gracias por todo!!!!

Agradecimientos

La realización de ésta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos:

“Análisis integrado de riesgos en agua y alimentos para bacterias patógenas emergentes por métodos moleculares: Desinfección, supervivencia y trazabilidad (ref: AGL2008-05275-C03-02/ALI)”. Ministerio de Ciencia e Innovación.

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

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 (1.8×10^3 ; 1.5×10^3 y 6.3×10^3 GU/ mL), las restantes presentaban el Ct por encima del umbral de fiabilidad (>35 ciclos).

Resumen

Aunque el cultivo resultó ser un método poco resolutivo, el método de aislamiento mediante membrana de 0.65 μm , 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 4×10^2 y 1.6×10^3 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*.

Resum

Helicobacter pylori ocupa una posició destacada entre els patògens humans emergents, sent una de les causes més comuns d'infecció crònica bacteriana en la humanitat i estretament relacionada amb l'úlçera pèptica i el càncer gàstric. S'ha suggerit que *H. pylori* pot ser adquirit per diferents vies de transmissió, entre elles l'aigua. La creixent demanda d'aigua a causa de l'augment de la població mundial i la concurrent expansió de la indústria fa necessari l'aprofitament de les aigües residuals depurades. No obstant això, la resistència d'*H. pylori* als tractaments de desinfecció de l'aigua constitueix un risc per a la salut.

De la mateixa manera, *H. pylori* presenta capacitat de resistència a tractaments de potabilització i a concentracions elevades de clor lliure en els sistemes de distribució gràcies a la formació de biopel·lícules, podent-se trobar també en aquests ecosistemes. L'estat viable no cultivable de *H. pylori*, en ambdues matrius, és l'habitual en condicions d'estrès, fent necessari l'aplicació de tècniques moleculars per a la seva detecció i identificació.

En aquesta tesi doctoral s'ha estudiat la presència i viabilitat d'aquest important patògen tant en aigua residual com potable.

Un total de 60 mostres d'aigua residual, incloent mostres de l'entrada del reactor biològic, de la sortida d'aquest i mostres després del tractament terciari de desinfecció amb radiació ultraviolada, es van analitzar per detectar la presència de *H. pylori* mitjançant les tècniques moleculars PCR, q-PCR i FISH i la tècnica tradicional de cultiu en placa.

La tècnica FISH va resultar ser un mètode eficaç i ràpid per a la detecció de *H. pylori* en les aigües residuals i depurades (61.2 %), sense la necessitat d'un pas previ d'enriquiment de les mostres. Les tècniques PCR i q-PCR van determinar la presència de *H. pylori* en les mostres, amb percentatges de detecció de les dues del 15 %. Va ser possible quantificar únicament en 3 mostres directes, pertanyents a l'entrada i sortida del reactor (1.8×10^3 ; 1.5×10^3 i 6.3×10^3 GU/mL), les restants presentaven el Ct per sobre del llindar de fiabilitat (> 35 cicles).

Resum

Tot i que el cultiu va resultar ser un mètode poc resolutiu, el mètode d'aïllament mitjançant membrana de 0.65 µm, posat a punt en aquesta tesi doctoral, va resultar eficaç per reduir la microbiota acompanyant i poder obtenir *H. pylori* cultivable per primera vegada a partir d'aigües depurades.

De la mateixa manera, es van analitzar 63 mostres d'aigua potable procedents de 51 fonts públiques d'aigua potable localitzades a la zona litoral de l'Est d'Espanya, i confirmar per primera vegada la presència de cèl·lules viables del patogen en aigües de consum.

Les tècniques FISH i q-PCR van resultar eficaces per a la detecció de *H. pylori* amb unes taxes de detecció de 46 % i 50.8 % respectivament. Per a la detecció de cèl·lules viables de *H. pylori* en aigua potable la tècnica DVC-FISH va resultar ser una eina més efectiva que el PMA-qPCR, amb una taxa de detecció de cèl·lules viables el 38 %. Va ser possible la quantificació de cèl·lules viables obtenint valors compresos entre 4×10^2 i 1.6×10^3 cèl·lules viables d'*H. pylori* /mL. Tot i la dificultat de conrear el patogen, es va identificar *H. pylori* en una mostra després de l'enriquiment de 24 hores.

La detecció de mutacions en el 23S, específiques en la resistència a la claritromicina va indicar que el 41.6 % de les mostres d'aigua residual i el 17.4 % de les mostres d'aigua potable presentaven *H. pylori* amb aquest potencial.

Els resultats obtinguts confirmen la capacitat de *H. pylori* de sobreviure als tractaments de depuració de l'aigua en una estació de depuració d'aigües residuals, el que hauria de ser considerat en avaluar el risc potencial de la seva reutilització per al reg. D'altra banda, *H. pylori* es troba en els sistemes de distribució d'aigua potable, per la qual cosa el consum d'aquestes pot representar un risc per a la salut humana, ja que són una possible via de transmissió del patogen. La presència de *H. pylori* resistent a la claritromicina en l'ambient, evidència la necessitat de monitoritzar un control eficaç del patogen, ja que l'aigua pot suposar un risc per a l'expansió de les resistències, i els consegüents errors terapèutics en la pràctica clínica.

Donat el paper de l'aigua en la transmissió d'*H.pylori*, confirmat en aquesta tesi doctoral, es proposen els protocols establerts, principalment el mètode DVC-FISH, com validables per al control ambiental eficient de *H. pylori*.

Abstract

Helicobacter pylori occupies a prominent position among emerging human pathogens, one of the most common causes of chronic bacterial infection in humanity and closely linked to peptic ulcers and gastric cancer. It has been suggested that *H. pylori* can be acquired by different routes of transmission, including water. The growing demand for water due to increasing world population and the concurrent expansion of the industry necessitates the use of treated wastewater. However, *H. pylori* resistance to water disinfection treatment constitutes a risk to health.

Similarly, *H. pylori* has resilience to water purification treatments and at high concentrations of free chlorine in distribution systems by biofilm formation, it also being possible to find in these ecosystems. The VBNC state of *H. pylori* in both matrices is the usual in stress conditions, necessitating the application of molecular techniques for detection and identification.

In this thesis we have studied the presence and viability of this important pathogen in both wastewater and drinking water.

A total of 60 wastewater samples, including samples of the biological reactor inlet, the outlet of this one and samples after tertiary ultraviolet disinfection treatment, were analyzed for the presence of *H. pylori* by PCR, q-PCR and FISH and the traditional cultivable technique.

The FISH technique proved to be an effective and rapid method for the detection of *H. pylori* in waste and debugged water (61.2 %), without the need for a preliminary step enrichment of samples. The PCR and q-PCR techniques determined the presence of *H. pylori* in the samples, with detection rates of both 15 %. It was possible to quantify only in 3 direct samples belonging to the reactor inlet and outlet (1.8×10^3 ; 1.5×10^4 and 6.3×10^5 GU/mL), the other samples had the Ct above the threshold of reliability (> 35 cycles).

Although the culture turned out to be a not fully resolutive method, the method of isolation by $0.65 \mu\text{m}$ membrane, tuned in this thesis, was effective in reducing the accompanying microbiota and to obtain cultivable *H. pylori* for the first time from debugged water.

Abstract

Similarly, 63 drinking water samples from 51 public drinking water sources located on the coastal area in Eastern Spain, were analyzed and could be confirmed for the first time the presence of viable cells of the pathogen in drinking water.

FISH and q-PCR techniques were effective for detecting *H. pylori* with detection rates of 46 % and 50.8 % respectively. For detection of viable cells of *H. pylori* in drinking water DVC-FISH technique it proved to be a more effective tool than the PMA-qPCR, with a detection rate of 38 % viable cells. Quantitation of viable cells was possible by obtaining values between 4×10^2 and 1.6×10^3 viable cells of *H. pylori*/mL. Despite the difficulty of culturing the pathogen *H. pylori* it was identified in a sample after 24 hours enrichment.

Detection of mutations in the 23S, in specific resistance to clarithromycin, indicated that 41.6% of the samples of wastewater and 17.4% of drinking water samples had *H.pylori* with this potential resistance.

The results confirm the ability of *H. pylori* to survive the water purification treatments in a wastewater treatment plant, it should be considered when evaluating the potential risk in reuse for irrigation. Moreover, *H. pylori* is found in the distribution systems of drinking water, so its consumption may be a risk to human health, since they are a possible route of transmission of the pathogen. The presence of clarithromycin-resistant *H. pylori* in the environment, show the need to monitor effective control of the pathogen, since water can pose a risk to the expansion of resistance and consequent therapeutic failures in clinical practice.

Given the role of water in the transmission of *H. pylori*, confirmed in this thesis, the established protocols are proposed, mainly the DVC-FISH method, as they can be validated for an efficient environmental control of *H. pylori*.

ÍNDICE GENERAL

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>12</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 <i>HELICOBACTER PYLORI</i> 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>

Índice General

1.4. Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante PCR y q-PCR	55
1.4.1. Extracción de ADN genómico	55
1.4.2. Iniciadores	56
1.4.3. Condiciones de amplificación de la PCR tradicional	57
1.4.4. Condiciones de amplificación mediante PCR a tiempo real (q-PCR)	58
1.4.4.1. Puesta a punto del método de q-PCR	58
1.4.4.2. Análisis cuantitativo: Curva patrón para la cuantificación de <i>H. pylori</i>	61
1.4.4.3. q-PCR de <i>H. pylori</i> a partir de muestras	64
1.5. Detección e identificación mediante Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	65
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	<u>103</u>
1. MATERIAL Y MÉTODOS	
1.1. Procesado de las muestras de agua potable	<u>104</u>
1.1.1. Origen de las muestras	<u>104</u>
1.1.2. Protocolo de procesado de muestras	<u>104</u>
1.1.2.1. Evaluación del método de recuperación de <i>H. pylori</i> tras filtrado	<u>104</u>
1.1.2.2. Procesado de las muestras	<u>107</u>
1.2. Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i> por cultivo	<u>108</u>
1.2.1. Evaluación de los métodos de eliminación de microbiota acompañante	<u>108</u>
1.2.1.1. Separación inmunomagnética	<u>108</u>
1.2.1.2. Tratamiento de choque ácido	<u>111</u>
1.2.2. Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i> a partir de muestras	<u>113</u>
1.3. Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante q-PCR	<u>113</u>
1.3.1. Extracción de ADN genómico	<u>113</u>
1.3.2. Condiciones de amplificación mediante PCR a tiempo real (q-PCR)	<u>114</u>
1.3.3. Detección de ADN de células viables: Pretratamiento con Propidio Monoazida de muestras inoculadas	<u>115</u>
1.3.4. q-PCR y PMA-qPCR de <i>H. pylori</i> a partir de muestras	<u>117</u>
1.4. Detección de células viables de <i>H. pylori</i> mediante DVC-FISH	<u>118</u>
1.4.1 Metodología de la técnica DVC-FISH	<u>118</u>
1.4.2. Detección de formas viables en agua mediante DVC-FISH	<u>120</u>
2. RESULTADOS	
2.1. Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i> por cultivo	<u>122</u>
2.1.1. Evaluación del método de recuperación de <i>H. pylori</i>	<u>122</u>
2.1.2. Aislamiento e identificación por cultivo	<u>123</u>
2.2. Detección e identificación de <i>H. pylori</i> mediante q-PCR	<u>125</u>
2.3. Detección e identificación de células viables de <i>H. pylori</i>	<u>127</u>

Índice General

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>	13
Figura 2.	Distribución de la infección de <i>H. pylori</i> en la población mundial, vinculada con el grado de desarrollo económico	16
Figura 3.	Diagrama de una separación inmunomagnética	28
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	33
Figura 5.	Termociclador con sistema de capilares	35
Figura 6.	LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System	36
Figura 7.	Mecanismo de acción del SYBR Green I	38
Figura 8.	Esquema del protocolo general de la técnica FISH	39
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	41
Figura 10.	Mecanismo de acción del Propidio Monoazida	44
Figura 11.	“Realpure Spin Food-Stool Bacteria kit”	56
Figura 12.	Curva de fusión: Descenso brusco de la fluorescencia	60
Figura 13.	Representación del pico de fusión que muestra la T_m	60
Figura 14.	Curva patrón obtenida con el método “Second Derivate Maximum”	62
Figura 15.	Curvas de amplificación de las distintas concentraciones de ADN de <i>H. pylori</i> mostrando tres réplicas de cada patrón	64
Figura 16.	Colonias de <i>H. pylori</i> sobre Agar Dent (A). Detalle de las colonias (B)	74
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)	75
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)	76
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	77

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.	Tm 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 <i>clpR</i> mix (A). Hibridación con sonda HPYL-LNA (B). Hibridación con sondas HPYL-LNA y <i>clpR</i> 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 <i>vacA</i> 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>

ABREVIATURAS

- * ADN: Ácido Desoxiribonucleico.
- * ASC: Agar Sangre de Caballo
- * BSA: Seroalbúmina bovina
- * C:N : Relación Carbono/ Nitrogeno
- * CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
- * Ct: Punto de corte (Cycle thershold)
- * dNTP: Deoxinucleótido trifosfato.
- * DVC: Direct Viable Count
- * EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales
- * EDTA: Ácido entilendiaminotetracético
- * EPA: Environmental Protection Agency (Agencia de Protección del Medio Ambiente)
- * EPSA: Entidad Pública de Saneamiento de Aguas
- * EPSAR: Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales.
- * FISH: Hibridación *in situ* con Sondas Fluorescentes
- * fg: fentogramo
- * g: Gramos
- * GB: Gonococcal Broth
- * GU: Unidades Genómicas
- * G1P: Glucosa-1-fosfato
- * IARC: International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer)
- * L: Litro
- * LNA: Locked Nucleic Acid (Ácidos Nucleicos Cerrados)
- * M: Molar
- * MgCl₂: Cloruro de Magnesio
- * mL: Mililitro
- * mM: Milimolar
- * MO₂: Microaerofilia.
- * NaCl: Cloruro de Sodio

Índice General. Abreviaturas

- * NCTC: National Collection of Type Culture
- * ng: Nanogramo
- * OMS: Organización Mundial de la Salud
- * ONU: Organización de las Naciones Unidas
- * pb: Pares de bases
- * PBS: Tampón fosfato salino
- * PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
- * PFA: Paraformaldehído
- * PMA: Propidio Monoazida
- * pmol: Picomol
- * q-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real
- * rpm: Revoluciones por minuto.
- * RNA: Ácido Ribonucleico
- * rRNA: Ácido Ribonucleico ribosómico
- * SDS: Dodecil Sulfato Sódico
- * SFB: Suero Fetal Bovino
- * TAE: Tris-acético-EDTA
- * TBE: Tris-borate-EDTA
- * TE: Tris- EDTA
- * Tm: Temperatura de fusión (melting temperature)
- * u.f.c.: Unidades formadoras de colonias.
- * USFDA: U.S.Food and Drug Administration
- * UV: Ultravioleta
- * V: Voltio
- * VNC: Viable No Cultivable
- * µg: Microgramo
- * µl: Microlitro

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Contaminación de agua y alimentos por microorganismos patógenos

El control de riesgos biológicos originados por bacterias o virus patógenos en el agua y los alimentos supone un importante reto para la promoción de la salud y la prevención en Salud Pública.

A nivel mundial, las enfermedades transmitidas a través de aguas y alimentos contaminados representan un problema que en las últimas décadas se ha complicado considerablemente. Entre los factores determinantes se pueden señalar, entre otros, el crecimiento de la población, la urbanización en los países subdesarrollados, la pobreza, la limitación de recursos naturales y la demanda de producción de alimentos.

Durante siglos el hombre ha utilizado los recursos hídricos, tanto superficiales como subterráneos, si bien su aprovechamiento no afectaba de modo decisivo al ciclo hídrico. La industrialización, el crecimiento de la población y las exigencias crecientes de la sociedad han incrementado de manera espectacular los usos del agua, incidiendo negativamente en su calidad y en su capacidad natural de autopurificación. La naturaleza, a través del ciclo del agua, actúa limpiándola como si fuese un filtro natural; sin embargo, en la actualidad este proceso natural no es suficiente para eliminar todos los vertidos contaminantes existentes en ella. Un agua de calidad que satisfaga las necesidades humanas es un recurso cada vez más escaso, y su posesión constituye un factor esencial de civilización, ya que es un recurso básico de valor insustituible para la vida

La escasez de recursos hídricos naturales en zonas áridas y semiáridas, como es el caso de las regiones mediterráneas, constituye un grave problema para la población asentada en ellas, en las que el incremento de la población unido a una escasa pluviometría, irregularmente distribuida en el tiempo, y a unos limitados recursos superficiales, están llevando al agotamiento o al deterioro irreversible de los recursos subterráneos. Por otra parte, muchos de los ríos que sirven como fuentes de agua potable transportan cantidades variables de aguas de desecho, que se ven incrementadas en los periodos en los que el caudal disminuye. La rápida urbanización de los países desarrollados y de los que se encuentran en vía de desarrollo ha dado lugar a problemas graves en el suministro de agua y en la eliminación de desechos.

Debido a la creciente demanda de fuentes de agua utilizable, por el aumento de la población mundial y la continua expansión de la industria, la reutilización de las aguas residuales urbanas se

perfila como una fuente adicional de agua merecedora de ser tenida en cuenta en la gestión global de los recursos hídricos.

Las aguas residuales sin tratar suponen un foco de contaminación importante para el medio ambiente, por lo que se hace necesaria la depuración de éstas para su posterior vertido o reutilización. El acceso a fuentes mejoradas de agua potable y un mayor control de los vertidos de aguas residuales domésticas han sido los mayores logros alcanzados por la comunidad internacional en los últimos 10 años. Más de 2.5 mil millones de personas han obtenido suministros desde 1990, y un 91% de la población mundial goza ahora de agua potable de mejor calidad, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, www.who.int, junio 2015).

En países en vías de desarrollo el agua juega un gran papel en la transmisión de enfermedades causadas por microorganismos (Akcam *et al.*, 2000). La principal razón de esta situación es el alto coste que representa la puesta a punto de procesos de tratamiento y el mantenimiento de infraestructuras apropiadas que permitan el control sanitario, (Langford, 2005).

La construcción de sistemas de saneamiento y potabilización de agua ha supuesto un triunfo en la lucha contra enfermedades de transmisión hídrica. Pero el agua potable que circula por estos sistemas de distribución en los centros urbanos en ocasiones presenta niveles de contaminación, aunque bajos, de patógenos y sustancias causantes de enfermedades. Por ello, se hace necesario una continua vigilancia de los sistemas de distribución de agua potable para evitar riesgos en la salud de la población que la consume (Ingerson-mahar y Reid, 2012). Esto está forzando a los suministradores y a la comunidad investigadora a mejorar el control de la calidad del agua dentro de los sistemas de distribución y a buscar nuevas alternativas de tratamiento (Cohn *et al.*, 2002).

2. Papel del agua en la transmisión de enfermedades infecciosas

2.1. Las aguas residuales

Las aguas residuales se pueden definir como aquellas que de forma natural o por uso de la población representan un peligro y deben ser desechadas (Espigares y Pérez, 1985). Si bien los

sistemas de recolección de aguas residuales han disminuido el riesgo para la Salud Pública en los centros urbanos, con esta práctica sólo se transportan los desechos recogidos a algún destino elegido, donde se aplican tratamientos de depuración (Anejo D.1) antes de descargarlos en el medioambiente.

El factor que más influye sobre el proceso de depuración del agua residual es su composición (Metcalf y Eddy, 2003). En este sentido, la procedencia de un agua residual es un aspecto determinante de gran parte de sus características físicas, químicas y biológicas. Según su origen, las aguas residuales pueden ser clasificadas en: domésticas o urbanas, industriales, agropecuarias, de origen incontrolado (vertidos ilegales, infiltraciones) y pluviales. Las aguas que son objeto de estudio en el presente trabajo son las aguas de origen doméstico o urbano.

Las aguas residuales de origen doméstico tienen una composición muy variada debido a la naturaleza de la población residente. La mayor parte de la contaminación tiene su origen en los excrementos humanos y animales y, en menor proporción, en las aguas resultantes del lavado de ropa, preparación de alimentos y duchas. Por otra parte, las aguas pluviales o de lavado de calles de las zonas urbanas aportan también una carga importante de contaminación por el arrastre de materia sólida inorgánica en suspensión y materia orgánica soluble e insoluble (Espigares y Pérez, 1985). La elevada cantidad de materia orgánica presente en las aguas residuales ofrece un sustrato idóneo para el desarrollo de toda clase de microorganismos, muchos de los cuales son causantes de enfermedades (Metcalf y Eddy, 2003).

La mayoría de los países, con mayor o menor grado de industrialización tienen grandes problemas para garantizar un adecuado suministro de agua, así como para asegurar la protección de las fuentes de suministro frente a la creciente contaminación de las aguas. Estos problemas en su conjunto han servido como catalizadores al concepto de regeneración y reutilización del agua y lo han elevado a un plano de gran importancia, considerándolo como una prioridad en el ámbito internacional. (Seguí, 2004).

Uno de los usos más comunes es el empleo de aguas residuales para riego agrícola. Sin embargo, el riego con aguas residuales no tratadas o sometidas a un proceso de depuración ineficiente ha provocado la aparición de brotes epidémicos importantes a lo largo del último siglo. En Jerusalén, la epidemia de cólera de 1970 se atribuyó a vegetales que habían sido regados con agua residual. En 1984, en Santiago de Chile, se produjo una epidemia de fiebre tifoidea asociada a cultivos hortícolas

Introducción General

para ensalada regados con agua de río que recibía aguas residuales (Searle, 1987). En Camboya, entre julio de 2004 y mayo de 2005 se llevó a cabo en Phnom Penh una investigación del nivel de contaminación de coliformes termotolerantes, huevos de helmintos y protozoos parásitos en *Iponema aquatica*, vegetal de origen acuático consumido por la población y cultivado con agua procedente del lago Boeng Cheung Ek, el cual recibe los vertidos de aguas residuales de las poblaciones cercanas. Se encontraron elevadas concentraciones de los tres patógenos estudiados en las muestras tratadas con aguas residuales. Se concluyó que el consumo de estos vegetales fue la causa de la aparición de brotes epidémicos en la zona (Tuan *et al.*, 2005).

La reutilización de aguas residuales exige, por tanto, la adopción de medidas de protección de la Salud Pública, ya que en todo proceso de recuperación y reutilización de aguas residuales existe riesgo por exposición a agentes infecciosos. Así pues, el tratamiento de las aguas residuales para su reutilización tiene como enfoque principal la reducción de dichos agentes, sean bacterias, virus, protozoos o helmintos, además de la eliminación de malos olores u otras sustancias que pudiesen tener un efecto negativo durante su reutilización. El riesgo de contaminación biológica dependerá de que el microorganismo esté presente en las aguas residuales en cantidades significativas, de que sobreviva en esas condiciones ambientales conservando su poder infeccioso, así como de los diferentes usos de las aguas (Calduch-Broseta *et al.*, 2003).

El estudio de brotes de enfermedades de transmisión hídrica, está limitado por la ausencia de muestras coprológicas de los individuos afectados y por la falta de técnicas de detección de microorganismos no convencionales, como métodos de rutina, que permitan identificar el agente causal del brote. A pesar de la gran cantidad de datos relativos al autocontrol y vigilancia de la calidad sanitaria del agua, y de vigilancia epidemiológica, los estudios de incidencia y prevalencia de enfermedades asociadas al agua de uso humano, red de distribución, instalación de riesgo o agua recreativa, se ven limitados por la falta de información, completa y consistente, necesaria para poder asociar territorialmente los casos (Seguí, 2004).

El patógeno de referencia con el que se establece la calidad de las aguas es *Escherichia coli*. Se determina la presencia y concentración de éste microorganismo en las aguas tratadas y, según la legislación vigente de cada región o país, se establecen los límites admisibles para determinar la calidad de las aguas. Sin embargo, la comunidad científica advierte que la detección y cuantificación de *E. coli* no es suficiente para definir la calidad de algunos tratamientos de las aguas residuales, su

reutilización o su vertido al medioambiente, puesto que algunos patógenos son resistentes a los tratamientos convencionales de depuración, incluyendo la cloración (Salgot *et al.*, 2006). Diversos autores sugieren que la legislación debería contemplar la determinación de un mayor número de microorganismos patógenos para llevar a cabo el control de la desinfección de las aguas residuales (Salgot *et al.*, 2006).

Hoy en día no existe una legislación comunitaria para todos los estados miembros de la Unión Europea. Países como Francia, Turquía o regiones como Andalucía, Cataluña, las Islas Baleares o Sicilia siguen los criterios de calidad establecidos por la OMS; mientras que otros países del mediterráneo como Italia, Israel o Chipre han elaborado sus propias normas de regulación de las aguas, siguiendo las medidas más conservadoras que establece los Criterios de la Reutilización de Agua de California (California's Water Recycling Criteria) (Brissaud, 2008). De igual forma, existen otros países mediterráneos, como Bosnia, Albania, Croacia Malta, Mónaco, Marruecos, Egipto y Grecia, que no tienen regulación frente a estas aguas residuales (Brissaud, 2008).

La reutilización de aguas residuales en España está regulada por el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas (BOE 92/2007), el cual impone a las autoridades sanitarias participar en la elaboración y ejecución de la legislación sobre aguas, por lo que en su articulado prevé su intervención en aquellos aspectos de la reutilización de aguas no contemplados en las especificaciones técnicas y que podrían suponer un riesgo para la salud de los ciudadanos. Con el Real Decreto 1620/2007 se cumple con el objetivo general de la Ley General de Sanidad, sobre la necesaria participación de las Administraciones competentes en este ámbito, mediante la vigilancia sanitaria, la promoción y la mejora de los sistemas que permiten alcanzar parámetros de calidad de las aguas compatibles con la salud de la población.

2.2. El agua potable

El acceso al agua está reconocido por la ONU (Organización de las Naciones Unidas) como un derecho económico, social y cultural; y conseguir la mejor calidad del agua para poder suministrarla a la población es una de las principales demandas de las sociedades avanzadas. Pero por desgracia no todos los habitantes del mundo pueden acceder al agua potable con tanta facilidad. La calidad del

Introducción General

agua potable es una cuestión que preocupa en países de todo el mundo, por su repercusión en la salud de la población.

El agua de bebida salubre (agua potable), según la OMS, no ocasiona ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda una vida, teniendo en cuenta las diferentes sensibilidades que pueden presentar las personas en las distintas etapas de su vida. El término se aplica al agua que ha sido tratada para consumo humano según unos estándares de calidad determinados por las autoridades locales e internacionales (OMS, www.who.int, junio, 2014).

El agua potable es un producto que se “fabrica” a partir de agua natural o cruda captada en ríos, lagunas, pozos o manantiales. Estas aguas pueden contener cantidades apreciables de polvo, polen, microorganismos, esporas y productos químicos tóxicos. Debido a esto, es de suma importancia realizar un tratamiento de potabilización al agua (descrito en el Anejo E.1) antes del consumo humano, para evitar que sea un riesgo para la salud.

Actualmente la normativa española que rige la calidad del agua de consumo humano es el Real Decreto 1120/2012, del 20 de julio, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (BOE 207/2012), que supone la trasposición de la Directiva 98/83/CE, de 3 de noviembre de 1998 del Parlamento Europeo.

En España el consumo medio de agua de los hogares en los últimos años se estima entre 120-130 litros de agua por habitante y día, según la Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento (AEAS) y la Asociación Española de Empresas Gestoras de los Servicios de Agua y Poblaciones (AGA) (OMS, www.who.int, junio, 2015). De estos, se consumen como bebida tan sólo entre 2 y 3 litros.

Por todo ello y teniendo en cuenta que el agua es una vía de transmisión de enfermedades infecciosas, es imprescindible el adecuado control de la eficacia del tratamiento depurador de las aguas residuales y el proceso de potabilización, así como el control de la calidad del agua a lo largo de las redes de distribución que suministran el agua para consumo, con el fin de evitar brotes infecciosos a la población y la aparición de focos de contaminación ambiental.

3. *Helicobacter pylori*, patógeno acuático emergente

3.1. Antecedentes históricos y situación taxonómica actual

A finales del siglo XIX se realizaron las primeras descripciones de microorganismos espirales en el estómago de animales. Durante una ponencia en 1881, Rappin mencionó que había observado una bacteria espiral en el estómago canino, a la que denominó *Spirocheta rappini*. En 1893, Bizzozero publicó varios dibujos de organismos espirales en el estómago de perros, que hoy conocemos como *Helicobacter heilmannii*. Tres años después, Salomon presentó un informe bacteriológico de organismos espirales, probablemente *Helicobacter felis*, en el estómago de perros y gatos, incluyendo su estructura flagelar, motilidad y manejo en el laboratorio (Blum, 1997).

En 1939, Doenges, tras realizar autopsias a un gran número de adultos jóvenes, encontró organismos espirales en el 40% de los estómagos; probablemente se trataba de *Helicobacter pylori*. Marshall y Warren, en 1982 lograron el primer cultivo de *Campylobacter pyloridis*, el actual *Helicobacter pylori* (Marshall y Warren, 1983), hecho que revolucionó la ciencia de la gastroenterología, y por el que se les concedió el Premio Nobel de Medicina en octubre de 2005. *H. pylori* está hoy en día considerado como el agente infeccioso más extendido en humanos, se distribuye a lo largo de todo el mundo y se estima que alrededor de la mitad de la población humana está infectada con este patógeno.

El camino hasta su clasificación taxonómica actual ha sido largo. En 1989, análisis del rRNA y estudios ultraestructurales dieron como resultado el establecimiento del género *Helicobacter*, transfiriéndose las especies *Campylobacter pylori* (anteriormente *Campylobacter pyloridis*) y *Campylobacter mustelae* (anteriormente *Campylobacter pylori subesp. mustelae*) al mismo (Goodwin *et al.*, 1989). Las claves para adscribir microorganismos al género fueron: bacterias curvadas Gram-negativas, móviles mediante un flagelo envainado, capaces de formar estructuras cocoides, microaerófilas, quimiorganótrofas, incapaces de fermentar u oxidar carbohidratos, con crecimiento óptimo a 37 °C e incapaces de crecer a 25 °C (Percival *et al.*, 2004).

Según la clasificación descrita en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology on line*, (Euzéby, 2016), el género *Helicobacter*, junto con *Sulfurimonas*, *Thiovulum* y *Wolinella*, se agrupan formando la familia *Helicobacteraceae* (Vandamme, 2000), que junto a la familia *Campylobacteraceae*,

Nautiliaceae e *Hydrogenimonaceae* conforman el orden Campylobacterales de las ϵ -Proteobacterias (Trust *et al.*, 1994). La Tabla 1 muestra la taxonomía de *Helicobacter*.

Tabla 1. Taxonomía del género *Helicobacter*

DOMINIO	BACTERIA
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	Epsilonproteobacteria
Orden I	Campylobacterales
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>
Genero II	<i>Sulfurimonas</i>
Género III	<i>Thiovulum</i>
Género IV	<i>Wolinella</i>
Familia III	<i>Nautiliaceae</i>
Familia IV	<i>Hydrogenimonaceae</i>

Euzéby, 2016 (LPSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. [www. baterio.net](http://www.baterio.net))

Dentro del género *Helicobacter*, las especies pueden clasificarse en dos grupos en función de su reservorio, el estómago o el intestino. Existen algunas especies como *H. aurati*, *H. bilis* y *H. muridarum*, que pueden ser aisladas tanto del estómago como del intestino.

Las Tablas 2 y 3 muestran las distintas especies del género, según el reservorio donde se encuentran y los hospedadores de los que se han aislado.

Tabla 2. Especies intestinales del género *Helicobacter*

NOMBRE	HOSPEDADOR	REFERENCIA
<i>H. aurati</i>	hamsters	Patterson <i>et al.</i> (2002)
<i>H. bilis</i>	ratones, perros y hombre	Fox <i>et al.</i> (1997)
<i>H. canadensis</i>	hombre	Fox <i>et al.</i> (2002)
<i>H. canis</i>	perros, hombre	Stanley <i>et al.</i> (1994)
<i>H. cholecystus</i>	hamsters	Franklin <i>et al.</i> (1997)
<i>H. cinaedi</i>	hombre, hamsters y macacos	Totten <i>et al.</i> (1988); Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<i>H. equorum</i>	caballos	Moyarert <i>et al.</i> (2007)
<i>H. fennelliae</i>	hombre	Totten <i>et al.</i> (1988); Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<i>H. ganmani</i>	ratones, perros y hombre	Robertson <i>et al.</i> (2001)
<i>H. hepaticus</i>	ratones, perros y hombre	Fox <i>et al.</i> (1994)
<i>H. macacae</i>	monos	Fox <i>et al.</i> (2013)
<i>H. mesocricetorum</i>	hamsters	Simmons <i>et al.</i> (2000)
<i>H. muridarum</i>	ratones, ratas	Lee <i>et al.</i> (1992)
<i>H. pametensis</i>	aves, cerdos	Dewhirst <i>et al.</i> (1994)
<i>H. pullorum</i>	pollos, hombre	Stanley <i>et al.</i> (1995)
<i>H. rodentium</i>	ratones	Shen <i>et al.</i> (1997)
<i>H. trogonum</i>	ratas	Mendes <i>et al.</i> (1996)
<i>H. typhlonius</i>	ratones	Franklin <i>et al.</i> (2002)
<i>H. valdiviensis</i>	pájaros	Collado <i>et al.</i> (2014)

Euzéby, 2016 (LPSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. www.bacterio.net)

Tabla 3. Especies gástricas del género *Helicobacter*

NOMBRE	HOSPEDADOR	REFERENCIA
<i>H. acinonychis</i>	guepardos	Eaton <i>et al.</i> (1993)
<i>H. baculiformis</i>	gatos	Baele <i>et al.</i> (2008)
<i>H. bizzozeronii</i>	perros	Hänninen <i>et al.</i> (1996)
<i>H. cynogastricus</i>	perros	Van de Bulck <i>et al.</i> (2006)
<i>H. felis</i>	gatos, perros	Paster <i>et al.</i> (1991)
<i>H. heilmannii</i>	gatos, hombre	Smet <i>et al.</i> (2012)
<i>H. himalayensis</i>	marmotas	Hu <i>et al.</i> (2015)
<i>H. mustelae</i>	hurones	Fox <i>et al.</i> (1988); Goodwin <i>et al.</i> (1989)
<i>H. nemestriae</i>	macacos	Bronsdon <i>et al.</i> (1991)
<i>H. pylori</i>	hombre, macacos	Marshall <i>et al.</i> (1985); Goodwin <i>et al.</i> (1989)
<i>H. salomonis</i>	perros	Jalava <i>et al.</i> (1997)
<i>H. suis</i>	cerdos	Baele <i>et al.</i> (2008)

Euzéby, 2016 (LPSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. www.bacterio.net)

Las especies descritas en las tablas 2 y 3 son especies validadas para el género *Helicobacter*. Actualmente existen otras especies que no cumplen los criterios para ser consideradas como especies, en muchos de los casos debido a la imposibilidad de obtener su cultivo, por lo que pasan a ser *Candidatus*. La categoría *Candidatus* se propuso para designar provisionalmente especies de procariontes de descripción incompleta (Murray y Stackebrandt, 1995). Actualmente encontramos como especies *Candidatus* del género *Helicobacter* a *H. marmotae* (Fox *et al.*, 2006), *H. mastomyrimus* (Shen *et al.*, 2006), *H. brantae* (Fox *et al.*, 2006), *H. anseris* (Fox *et al.*, 2006) y *H. centorum* (Harper *et al.*, 2006).

3.2. Morfología y características fisiológicas del género *Helicobacter*

El género *Helicobacter* agrupa 31 especies, caracterizadas por ser bacilos Gram-negativos, helicoidales, espirales o rectos, de 0.3-1.0 μm de ancho y de 1.5-5 μm de largo. Presenta extremos redondeados y cuando son curvados muestran periodicidad espiral (Vandamme *et al.*, 1991). Pueden tener un único flagelo polar (*H. cinaedi* y *H. fenneillae*) o múltiples flagelos laterales, unipolares o bipolares (*H. pylori*), con una protuberancia terminal, de 30 μm de longitud y 2.5 nm de grosor, confiriéndoles movilidad. Todos los flagelos son envainados. Se ha sugerido que la vaina del flagelo es una adaptación para vivir y moverse a través de la mucosa y protegerse contra el ácido del estómago (Owen, 1993).

Son bacterias microaerófilas, con metabolismo de tipo respiratorio. No utilizan carbohidratos. En los medios de cultivo típicos para helicobacters originan, tras 2-5 días de incubación a 37 °C, colonias no pigmentadas, translúcidas, de 1-2 mm de diámetro. Crecen a 30 °C pero no a 25 °C. Son catalasa y oxidasa positivo. Producen H_2S y no son capaces de hidrolizar el hipurato. Las especies gástricas son productoras de ureasa. Su contenido en G+C varía entre 35 y 44% (Vandamme *et al.*, 1991).

Helicobacter 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 aparece como bacilos cortos espirales o en forma de S, de 0.5 a 1 μm de ancho y aproximadamente 3 μm de largo (Figura 1). Las bacterias cultivadas *in vitro* son menos espirales y aparecen más como bacilos curvados. Presentan de 4 a 6 flagelos polares envainados. En cultivos viejos aparecen formas cocoides (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).

El nicho ecológico de *H. pylori*, la mucosa gástrica, 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 lumen del estómago es mucho más bajo, con valores de entre 1 y 4, condiciones que desnaturalizan la mayoría de las proteínas. *H. pylori* sobrevive a estas condiciones ya que es capaz de tamponar el pH en su zona más próxima, debido a que sintetiza la enzima ureasa (peso molecular 550 kDa) que junto con el cofactor níquel, catalizan la hidrólisis de la

urea del jugo gástrico, formando dióxido de carbono y amoníaco ($(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$). El amoníaco actúa como neutralizador de la acidez, aumentando el pH de alrededor de la bacteria y permitiendo que el microorganismo sea capaz de sobrevivir en la mucosa gástrica a pesar de la acidez del lumen.



Figura 1. Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori* (ASM MicrobeLibrary)

3.3. Etiopatogenia

H. pylori se asocia específicamente con la mucosa gástrica produciendo una gastritis de tipo inflamatorio. Sin embargo, en la mayoría de los casos esta inflamación resulta asintomática (Dunn *et al.*, 1997). La presencia de *H. pylori* está asociada también a la aparición de gastritis crónica de tipo superficial y/o úlcera gástrica, aunque no todos los pacientes afectados de gastritis inflamatoria desarrollan finalmente úlcera gástrica. Kreiss *et al.* (1995), establecieron que una compleja interacción entre distintos mecanismos, como son los factores de virulencia, la respuesta por parte del hospedador y factores ambientales, se erigen como conductores hasta el proceso final de la úlcera. Los síntomas más comunes cuando los individuos presentan manifestaciones clínicas de gastritis o úlcera son náuseas, dolor abdominal, acidez o sangrado. La mayoría de los síntomas desaparecen rápidamente tras la erradicación de la bacteria mediante terapias con antibióticos.

Hoy en día existe controversia sobre el mecanismo de infección de *H. pylori* en el ser humano. Se conoce que el hospedador desarrolla una respuesta inmune que es inefectiva para eliminar esta bacteria, pero que puede tener un papel fundamental en la evolución de la infección hacia distintas formas clínicas tan variadas como una gastritis superficial leve a una ulceración gastroduodenal (Pakodi *et al.*, 2000)

Existen también factores genéticos del hospedador que aumentan o disminuyen el riesgo de la infección. Parece ser que algunos individuos pueden ser más susceptibles a presentar úlcera péptica tras el desarrollo de gastritis activa por *H. pylori* (Wyatt, 1992). Los antígenos del grupo sanguíneo de Lewis están asociados con la adhesión a la superficie de las células epiteliales (Boren *et al.*, 1993). Un estudio con más de 3000 varones daneses sugiere que el riesgo de desarrollo de úlcera péptica está asociado con los tipos Le (a+b) y ABH (Hein *et al.*, 1997).

Si *H. pylori* permanece en la mucosa gástrica durante años puede conducir a la producción de cáncer gástrico (Cover y Blaser, 1995). *H. pylori* es en la actualidad la única bacteria con acción carcinógena demostrada. En 1994 fue clasificado como carcinógeno humano de Clase I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, por su estrecha relación con el cáncer gástrico y el linfoma gástrico de tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosas). El informe GLOBOCAN 2012 publicado por la IARC, con datos del año 2012 a nivel mundial sobre incidencia, prevalencia (1,3 y 5 años) y mortalidad por cáncer de los 28 tipos más frecuentes de 184 países, establece que el cáncer gástrico es la tercera causa más común de muertes relacionadas por el cáncer en el mundo (Ferlay, *et al.*, 2014).

Recientemente, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), presentó un estudio en el que se señalaba como una prioridad mundial establecer estrategias de prevención del cáncer gástrico mediante la erradicación de *H. pylori* (IARC, *Helicobacter pylori* Working Group, 2014). También ha surgido una nueva hipótesis sobre la relación entre infección en la niñez y el riesgo del cáncer gástrico en adultos, lo que ha llevado a propugnar la necesidad de programas preventivos para reducir la infección en niños y adolescentes (Iwanczak, *et al.*, 2014). A pesar de ello, la misma IARC señala que en estos momentos ningún país ha implementado ningún tipo de estrategia de prevención, debido en gran parte al desconocimiento existente sobre su epidemiología.

Introducción General

H. pylori se ha relacionado con un aumento en el riesgo de padecer múltiples enfermedades extragástricas, tales como Diabetes Mellitus, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, adenoma y adenocarcinoma de colon, enfermedades oculares, como la retinopatía serosa central idiopática, y enfermedades autoinmunes como tiroiditis, Síndrome de Sjogren o urticaria crónica (Mauget-Faysse, *et al.*, 2002; Cotticelli, *et al.*, 2006; Dorer *et al.*, 2009; Papagiannakis, 2013; Axon, 2014; Eusebi *et al.*, 2014; Pereira and Medeiros, 2014; Wang *et al.*, 2014). Incluso se ha postulado un aumento del riesgo de abortos espontáneos e hiperemesis gravídica en pacientes infectadas por cepas CagA+ (Iwanczak, *et al.*, 2014). Muchos de estos estudios epidemiológicos son contradictorios, y en otras ocasiones la asociación estadística es demasiado débil para ser considerada probada.

Las relaciones más sólidamente fundamentadas se encuentran entre la infección por cepas CagA+ y el aumento de riesgo de parecer enfermedad coronaria, la producción de Trombocitopenia Primaria Idiopática (en la que la erradicación de *H. pylori* es un tratamiento de rutina, que consigue la mejoría clínica en el 60% de los casos y la remisión total durante periodos superiores a 7 años hasta en el 25%) de anemia ferropénica y de avitaminosis B12 (O'Connor, 2014).

Hasta el momento, lo que conocemos sobre los mecanismos de patogenicidad del microorganismo nos lleva a pensar que probablemente su intervención en estas enfermedades sea indirecta, mediante el desencadenamiento de fenómenos inflamatorios sistémicos. Sin embargo, aún se está lejos de conocer exactamente con qué enfermedades se relaciona, por qué mecanismos interviene en su producción y qué nivel de riesgo aporta la infección (Eusebi, 2014; Lin and Koskella, 2015).

Dado que la infección por *H. pylori* constituye un problema sanitario, con una alta prevalencia a nivel mundial, definir claramente cuál es el mejor tratamiento farmacológico presenta gran relevancia clínica (Suerbaum *et al.*, 2002). Una de las terapias de erradicación de *H. pylori* más extendida es la terapia OCA, que consiste en el suministro de Omeprazol (20mg/12h) como antisecretores, y Claritromicina (500 mg/ 12 h) y Amoxicilina (1g/ 24h) como antibióticos, durante 7 días. A los pacientes alérgicos a la Amoxicilina se les suministra en sustitución Metronidazol (500mg/12h). En los últimos años se están realizando estudios sobre el efecto del uso de probióticos combinados con las terapias triples de primera línea, OCA. Du *et al.* (2012), observaron en sus estudios que el pre-tratamiento con *L. acidophilus*, *S. faecalis* y *B. subtilis* durante dos semanas antes de la terapia triple mejoraba la tasa

de erradicación de *H. pylori*, de 60.8 % a 79.5 %, indicando un efecto beneficioso de los probióticos en el tratamiento de erradicación del patógeno.

3.4. Epidemiología y transmisión

La infección por *H. pylori* es una de las infecciones crónicas más comunes en la humanidad (Graham *et al.*, 1991). Desde el descubrimiento de la existencia en el hombre de la infección causada por *Helicobacter pylori*, en 1983, se han efectuado en diferentes localizaciones numerosos estudios epidemiológicos, con los objetivos de determinar la prevalencia de la infección, identificar factores de riesgo que pudiesen participar en su adquisición y detectar el modo de transmisión. De este modo, se ha estimado que esta infección afecta al menos al cincuenta por ciento de la población mundial. En general, dos patrones epidemiológicos básicos definen su extensión: en los países con precarias condiciones higiénico-sanitarias se presentan tasas elevadas de infección en la infancia (70-80 %), mientras que en la mayor parte de los países desarrollados la infección se concentra en la edad adulta, con una prevalencia entre el 10 y el 60 % (Bassily *et al.*, 1999). Percival *et al.* (2004) indicaron que el riesgo de infección, en ambos casos, va disminuyendo a lo largo de generaciones sucesivas.

Algunos estudios han descrito una serie de factores que están asociados a un aumento del riesgo dentro de la comunidad (Malaty y Niren, 2003; Michel y Mégraud, 2002; Eusebi, 2014). Los principales fueron la edad y la clase social, encontrándose una mucosa gástrica normal en el 50 % de los sujetos menores de 30 años, pero sólo en el 20 % de los mayores de 60 años. El 65 % de los sujetos pertenecientes a clases sociales altas mostraban una histología normal, comparados con el 27.5% de las clases bajas (Graham *et al.*, 1991).

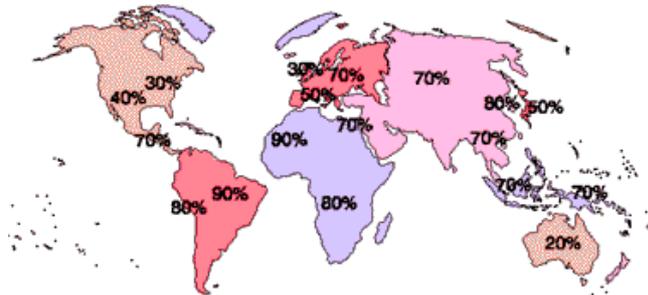


Figura 2. Distribución de la infección de *H. pylori* en la población mundial, vinculada con el grado de desarrollo económico, (www.helico.com, 2014).

Estas notables diferencias posiblemente puedan explicarse por una mayor facilidad para el contagio de la infección en poblaciones que reúnen ciertas características, como peor higiene y hacinamiento.

El hecho de que la infección de *Helicobacter pylori* esté tan extendida a nivel mundial sugiere que *H. pylori* puede ser adquirido por múltiples vías, y plantea la posibilidad de diferentes rutas de transmisión, entre ellas, oral-oral, gastro-oral, fecal-oral, alimentos y agua (Percival *et al.*, 2009).

Transmisión persona-persona

Una de las rutas que se ha establecido como la más probable sería el contacto directo persona-persona, siendo las posibles vías de propagación de *H. pylori* la vía oral-oral, la vía gastro-oral y la vía fecal-oral.

Algunos autores sugieren que la ruta oral-oral se limita a la transmisión intrafamiliar, debido al hecho de que cepas procedentes de miembros pertenecientes a la misma familia son genéticamente indistinguibles, mientras que cepas aisladas de personas no relacionadas entre sí presentan perfiles únicos (Marshall, 2000). Sin embargo, otros autores opinan que la cavidad oral es el principal reservorio extragástrico y la ruta oral-oral la principal forma de dispersión del microorganismo (Nabwera y Logan, 1999).

Song *et al.* (2000) demostraron la presencia de *H. pylori* en la placa dental por PCR y la confirmaron por secuenciación. También se ha confirmado la presencia por PCR de *H. pylori* en el jugo gástrico y la saliva. Éstos y otros estudios sugieren que la placa dental y la saliva podrían ser reservorios de *H. pylori*, pero el fallo en el cultivo del microorganismo plantea problemas, ya que la presencia de ADN de la bacteria no implica que el microorganismo esté viable.

La inadecuada esterilización de endoscopios y tubos nasogástricos podría ser una fuente de transmisión gastro-oral. Se ha demostrado que *H. pylori* es capaz de adherirse al plástico usado en los endoscopios y no se elimina tras repetidos lavados con tampón fosfato salino (Dunn *et al.*, 1997).

Thomas *et al.* (1992) realizaron un estudio, en Gambia, en el que analizaron las heces de 23 niños de edades comprendidas entre 3 meses y 2 años, y obtuvieron cultivo de microorganismos espirales microaerófilos y ureasa positivos en 9 de las 23 muestras de heces analizadas. Kelly *et al.* (1994) fueron capaces de cultivar *H. pylori* de heces de 12 de 25 pacientes positivos para *H. pylori* en Inglaterra. Los cultivos puros de *H. pylori* obtenidos se confirmaron genotípicamente mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Estos y otros estudios apoyaron la hipótesis de la transmisión fecal-oral.

Transmisión por alimentos

En los últimos años, varios estudios han abordado el papel de la alimentación en la transmisión de *H. pylori*. Los principales alimentos analizados han sido leche y verduras. Jiang y Doyle (2002) comprobaron que *H. pylori* puede sobrevivir en leche cruda esterilizada inoculada con 10^6 u.f.c./mL durante 6 días. En 2012, Rahimi y Kheirabadi realizaron un estudio, en Irán, sobre la presencia de *H. pylori* en leche cruda de vaca, oveja, cabra, camello y búfalo. Detectaron la presencia del gen *ureC* de *H. pylori* mediante PCR, en 56 de las 448 muestras analizadas (12.5%). En ninguno de los casos se consiguió el aislamiento de la bacteria.

Se ha descrito que los individuos que consumen verduras son más propensos a adquirir *H. pylori*. Dicha asociación sugiere la posible presencia de *H. pylori* en el agua utilizada para el riego de las hortalizas. Además, hay que remarcar que hoy en día existe una demanda creciente de consumo

de vegetales con un mínimo proceso de tratamiento de la materia prima. Atapoor *et al.*, en 2014, detectaron la presencia de *H. pylori* en vegetales de procedencia iraní. De 460 vegetales muestreados detectaron mediante la técnica de PCR el gen *ureC* en 50 de las muestras e identificaron colonias de *H. pylori* en el 9.56% de las muestras analizadas, confirmándolas por PCR. Determinaron que los vegetales a los que no se les realizaba tratamiento de lavado presentaban diferencias significativas ($p < 0,5$) con respecto a los vegetales que se les realizaba tratamientos antes del consumo y concluyeron que vegetales como espinaca, albahaca, perejil, puerro y rábano podían estar contaminados con *H. pylori*; sugiriendo que su contaminación podía proceder de agua de riego contaminada, de estiércol procedente de animales y de contaminación del suelo por parte del patógeno. Estudios como éste apoyaría la necesidad de contemplar el agua como una vía de transmisión de *H. pylori* a los alimentos y finalmente al hombre.

Al contemplar como una de las vías de transmisión de *H. pylori* el agua, se han realizado estudios sobre la presencia de *H. pylori* en moluscos. Fernández *et al.* (2007) realizaron un estudio sobre la detección de *H. pylori* en agua de mar, en plancton y en moluscos, concretamente en ostras, procedentes de tres regiones diferentes de Venezuela, mediante PCR y cultivo en placa. Detectaron la presencia de ADN de *H. pylori* en las tres zonas muestreadas y en las diferentes matrices analizadas y concluyeron que los moluscos podrían actuar como vehículos de transmisión de *H. pylori*, dado que se ingieren crudos, en aquellas zonas que presenten contaminación por el patógeno.

Transmisión por aguas

Aunque el nicho natural de *H. pylori* es el estómago humano, para su transmisión indirecta el organismo necesita sobrevivir en el medio ambiente externo. Mientras que la principal ruta de transmisión queda lejos de estar clara, la prevalencia de la infección por *H. pylori* muestra una fuerte correlación con el acceso al agua. La transmisión de *H. pylori* por el agua puede ser particularmente importante en regiones del mundo donde la calidad del agua es baja, pudiendo ocasionar la diferencia de prevalencia de *H. pylori* entre países desarrollados y en vías de desarrollo (Bunn *et al.*, 2002).

Se han realizado numerosos estudios epidemiológicos para determinar el poder del agua como fuente de transmisión de *H. pylori*. Bunn *et al.* (2002) realizaron estudios en 65 niños nacidos en una

zona rural de Keneba, en Gambia, donde la disponibilidad de agua se redujo inesperadamente y se procedió al empleo de aguas superficiales como agua de bebida. Durante el primer año, la proporción de niños infectados por *H. pylori* aumentó de tal forma que el 85% de los bebés dieron positivo al test de la urea. Cuando la calidad del agua y la accesibilidad fue restaurada, *H. pylori* fue adquirido a una edad más avanzada. Se realizaron análisis de las fuentes de abastecimiento de agua y, a pesar de que no se consiguió cultivar la bacteria a partir de las biopelículas, sí se detectó ADN de *H. pylori*, sugiriendo su presencia en los sistemas de almacenaje del agua.

El único precedente de aislamiento mediante cultivo de *H. pylori* a partir de agua no tratada fue el trabajo publicado por Lu *et al.*, 2001, en el que se analizaron muestras procedentes de la Ciudad de Juárez, México, empleando la técnica de PCR y cultivo para la detección de *H. pylori*. Obtuvieron aislados de *H. pylori* en un 17% de las muestras analizadas, confirmándolos mediante PCR del 16S ADN.

H. pylori sobrevive durante periodos de tiempo más largos en concentraciones salinas fisiológicas, bajas temperaturas y valores de pH entre 5.8 y 6.9 (Shahamat *et al.*, 1993). Los ríos, arroyos y lagos tienen una cierta capacidad tamponadora al disolver gases y minerales, lo que puede prevenir rápidas fluctuaciones de pH, posibilitando la presencia de *H. pylori* y la contemplación del medio ambiente como nicho de *H. pylori* (Fujimura *et al.*, 2004).

Moreno *et al.* (2003) analizaron muestras procedentes de dos ríos y muestras de agua residual con el fin de detectar la presencia de *Helicobacter pylori* mediante el uso de la técnica molecular FISH (Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes). Tras la realización del estudio detectaron la presencia de *H. pylori* en dos de las muestras procedentes de río y en una procedente de aguas residuales, constatando que *H. pylori* puede encontrarse en el ambiente bajo condiciones desfavorables para su desarrollo.

Fujimura *et al.* (2004) analizaron 24 muestras de agua procedentes de distintos puntos de cuatro ríos de Japón, y consiguieron detectar ADN de *H. pylori* mediante PCR. Este estudio apoya la teoría de que *H. pylori* puede sobrevivir en ambientes naturales como ríos y lagos, durante periodos de tiempo prolongados, por lo que podrían ser posibles reservorios y vías de transmisión del patógeno.

Boehnke *et al.* (2015) realizaron un estudio en el que demostraron la supervivencia de *H. pylori* en el agua y su capacidad infectiva en ratones. El estudio consistió en dar de beber a ratones sanos agua contaminada con concentraciones de *H. pylori* de 10^3 - 10^6 ufc/L. Tras los ensayos se observó que los ratones que habían ingerido el agua contaminada por *H. pylori* presentaban infección, mientras que los ratones que habían estado aislados de este tipo de alimentación no presentaban *H. pylori* en su organismo, demostrando que el agua es una vía de transmisión de *H. pylori*. Los ensayos no reflejaban condiciones ambientales reales, puesto que el agua utilizada para la inoculación del patógeno era estéril a su inicio, por lo que todavía está en cuestión si las variables como microbiota acompañante, pH, concentración C:N o temperatura son determinantes para que se produzca una infección de *H. pylori* en el ser humano.

Los niveles de cloro en sistemas de distribución de agua potable oscilan entre 0.1 y 0.3 mg/L. En tratamientos inadecuados, interrumpidos o intermitentes, es posible que no se produzca una adecuada inactivación de *H. pylori* para prevenir la entrada y persistencia de la bacteria dentro de los sistemas de distribución de agua, suponiendo un riesgo de infección para los individuos que consuman estas aguas tratadas de forma deficiente (Baker *et al.*, 2002). En Pakistán, se detectó *H. pylori* en sus sistemas de distribución de agua alrededor de la ciudad Karachi, mediante el análisis por PCR (Khan *et al.*, 2012). Watson *et al.* (2004), en Inglaterra, detectaron la presencia de ADN de *H. pylori* mediante PCR en grifos de escuelas, en bocas de riego y embalses. También intentaron, sin éxito, el aislamiento del patógeno por cultivo según Lu *et al.* (2001), acoplado un sistema de separación inmunomagnética. Los autores detectaron un mayor número de muestras positivas en ADN de *H. pylori* en muestras que presentaban biopelículas. Sus hallazgos refuerzan la evidencia de que *H. pylori* puede ser transmitido a través del agua potable. Sin embargo, existen muy pocas evidencias de que las células viables pueden sobrevivir a los tratamientos de desinfección realizados para conseguir un buen mantenimiento de las aguas potables en los sistemas de distribución (Santiago *et al.*, 2014).

Es razonable sugerir que *H. pylori* puede estar presente en aguas cuando la enumeración de coliformes en medios selectivos indique que el agua es potable. Es más, es concebible que *H. pylori* sea capaz de persistir durante largos periodos de tiempo en sistemas de distribución de agua que contengan bajos niveles de cloro residual. Esto está reforzado por estudios que demuestran que *H. pylori* puede ser más resistente al cloro libre que *E. coli* (Johnson *et al.*, 1997). Moreno *et al.* (2007) realizaron un estudio sobre la supervivencia y viabilidad de *H. pylori* a concentraciones elevadas de

cloro libre. Para ello, expusieron al patógeno a una concentración de 0.96 mg/L de cloro libre durante varios tiempos control. Observaron que *H. pylori* perdía su capacidad de crecimiento sobre medios de cultivo pasados 5 minutos. Sin embargo, mediante las técnicas moleculares FISH y PCR observaron que un porcentaje elevado de las células pasaban a forma viable pero no cultivable. Concluyeron, por tanto, que *H. pylori* puede sobrevivir a concentraciones elevadas de cloro libre y que los tratamientos de desinfección en aguas potables podrían ser ineficientes para la eliminación de éste patógeno de las redes de distribución.

H. pylori es capaz de sobrevivir en biopelículas cuando crece bajo altas condiciones de C:N (Percival *et al.*, 2004). La formación de biopelículas es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en este ambiente les ofrece ventajas importantes: les protege frente a la acción de los agentes adversos, ven incrementada la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento y además posibilita la transferencia de material genético (Donlan, 2002). Todas estas circunstancias pueden incrementar su capacidad de supervivencia. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias de la biopelícula (Donlan, 2002). Giáo *et al.* (2008) observaron que *H. pylori* formaba biopelículas tras 24 horas de encontrarse en un ambiente desfavorable. No consiguieron cultivar células de *H. pylori* desde las biopelículas, pero si lo detectaron mediante FISH, aunque no se pudiera determinar la viabilidad del mismo. 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 predación por protozoos (Watson *et al.*, 2004).

Actualmente hay autores que concluyen que, debido a la baja tasa de supervivencia de *H. pylori* en el agua, es posible que las amebas de vida libre constituyan un refugio para *H. pylori*, proporcionando la capacidad de sobrevivir a los diferentes tratamientos de desinfección que se realiza al agua y posibilitando así la transmisión a los seres humanos (Winięcka-Krusnell *et al.*, 2002; Smith, 2012; Moreno-Mesonero *et al.*, 2014).

Como puede observarse, en los poco más de 20 años que han transcurrido desde la descripción de *H. pylori*, el enorme esfuerzo investigador dedicado al conocimiento sobre su epidemiología y transmisión se ha traducido en notables avances para la salud. Sin embargo, todavía hay aspectos de este microorganismo y de su relación con los humanos que son desconocidos o no están

perfectamente definidos. Ello justifica la necesidad de continuar efectuando estudios acerca de esta infección.

3.5. Estado viable no cultivable (VNC)

El concepto de Viable No Cultivable (VNC) se ha aplicado a un gran número de bacterias entéricas, como *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, etc., para indicar la incapacidad de reproducción de éstas ante ciertas situaciones estresantes, como una estrategia de supervivencia.

Los factores capaces de inducir esta transición al estado VNC son la privación de nutrientes y la baja osmolaridad, exposición a antibióticos, la escasez o exceso de oxígeno, los cultivos prolongados, los conservantes comúnmente usados en alimentos o industrias agrícolas (Nilsson *et al.*, 2002, Jiang *et al.*, 1998) y la temperatura. Este último factor medioambiental se considera el principal responsable del desarrollo de las formas VNC (Philips, 2001), a pesar de que las bajas o altas temperaturas no afectan a todas las especies por igual.

Los primeros investigadores que se encontraron estas formas en sus estudios postularon que el estado VNC es un estado de reposo de las bacterias no esporuladas (Colwell y Grimes, 2000). Dave y Penrose (1978) mostraron evidencia de viabilidad de células de coliformes en estado VNC, en muestras de agua de mar, mediante la determinación de sus niveles de ATP (Colwell y Grimes, 2000). Colwell *et al.* (2000) estudiaron el estado VNC de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, y determinaron que las células de *E. coli* procedentes de muestras de agua de mar que se encontraban en el estado VNC no crecían en medios de cultivo, pero sí presentaban respuesta al tratamiento con ácido nalidixico según Kogure *et al.* (1979). Xu *et al.* (1984) propusieron también que el estado VNC es un estado de latencia de las células que les confiere la capacidad de sobrevivir y persistir en el medio ambiente en condiciones adversas.

Para Shirai *et al.* (1991) una célula de bacteria que no crece en placas de cultivo está muerta. Sin embargo, distintos autores, entre ellos González *et al.* (1992), Oliver (2000, 2005 y 2010) y Colwell (2000), sugirieron que una célula bacteriana se debería considerar muerta solo cuando pierde su

integridad celular. Según este concepto, una célula en estado VNC, aunque pierde su capacidad para crecer en medios de cultivo, puede mantener su viabilidad (Signoretto *et al.*, 2000).

Las diferencias que presentan las células en estado VNC frente a las células viables cultivables son de tipo fisiológico y molecular: diferencias en su morfología celular, composición de la pared y membrana celular, en su metabolismo, en la expresión génica, en resistencias físicas y químicas, en propiedades de adherencia y en su potencial virulento (Li *et al.*, 2014). Las células VNC sufren cambios morfológicos, reduciendo el tamaño de la célula y en la mayoría de los casos adquiriendo forma cocoide. Este proceso se atribuye a una estrategia para minimizar los requerimientos energéticos de la célula. El cambio a forma cocoide es un parámetro que debe ser observado con otros cambios en la célula para establecer el estado VNC, ya que por sí solo no debe tomarse como determinante (Pinto *et al.*, 2013).

Las células pueden presentar cambios en la composición de proteínas, ácidos grasos y peptidoglicanos de la membrana celular. Es el caso de *Vibrio vulnificus*, que en el estado VNC presenta en su membrana un incremento en el porcentaje de ácidos insaturados y ácidos con menos de 16 carbonos y cambios significativos en el porcentaje de ácidos hexadecanoicos, hexadecenoicos y octadecanos (Day y Oliver, 2004). *Enterococcus faecalis* presenta un incremento en el porcentaje de enlaces peptidoglicanos en la composición de su membrana celular en estado VNC (Signoretto *et al.*, 2004).

Las células viables pero no cultivables también sufren una ralentización en su metabolismo y presentan perfiles de expresión génica diferentes a los perfiles de células que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial (Shleeva *et al.*, 2004).

El principal problema que produce la presencia de este estado VNC es la imposibilidad de aislar estas bacterias y la dificultad de detectarlas por cultivo, lo que supone que el potencial de transmisión a través de reservorios medioambientales pueda estar infravalorado.

H. pylori en el ambiente puede encontrarse en el estado VNC, en el que adquiere forma cocoide no cultivable pero metabólicamente activa (Bode *et al.*, 1993). En el estado cocoide se observa una pequeña disminución en el contenido de ADN, aunque permanece su integridad (Moreno *et al.*, 2007). Además, *H. pylori* en estado VNC mantiene la actividad ureasa, reduce las sales de tetrazolio y

muestra un patrón similar de proteínas al de las formas helicoidales de la bacteria (Bode *et al.*, 1993; Nilius *et al.*, 1993). También mantiene los genes *ureA* y *ureB*, *cagA* y *vacA*. Wang *et al.* (2004) demostraron que la secuencia del gen *vacA* en las formas cocoides coincide con la de las formas helicoidales de *H. pylori*, presentando en ambas formas la capacidad de expresión de la proteína VacA. El mantenimiento y expresión de estos genes apoyaría el posible papel de las formas VNC como agentes transmisores de la infección (Hulten *et al.*, 1998, Velázquez *et al.*, 1999).

Muchas de las especies que pueden permanecer en el ambiente en el estado de latencia VNC tienen la capacidad de revertir éste estado, volviendo a ser cultivables una vez las condiciones adversas se vuelven óptimas para su desarrollo (Bates y Oliver, 2004). Saito *et al.* (2012) estudiaron el comportamiento de las formas cocoides de *H. pylori* en la línea celular MKN-28, células que asemejan el epitelio gástrico humano. Tras los ensayos observaron que penetraban en las células MKN-28, por lo que concluyeron que las formas cocoides de *H. pylori* no son células pasivas sino que pueden infectar activamente las células epiteliales gástricas del hombre, demostrando que estas formas viables no cultivables son formas infectivas.

En general, tras los estudios de los últimos años se admite que el estado de viable pero no cultivable de las células es una herramienta de supervivencia que les confiere la capacidad de persistir en ambientes adversos. Esto representa un factor de riesgo para la Salud Pública y la producción de alimentos cuando se trata de bacterias patógenas. Por ello, cada vez es más necesario el desarrollo de técnicas capaces de detectar estas bacterias en el estado VNC para prevenir posibles focos de contaminación y evitar las infecciones en el ser humano (Li *et al.*, 2014).

4. Técnicas para la detección e identificación de *Helicobacter pylori*

El método de aislamiento por cultivo es la técnica de elección para detectar cualquier microorganismo patógeno, ya que no solo permite asegurar su presencia, sino que su cultivabilidad se considera prueba fehaciente de su capacidad infectiva. En la actualidad, el método de cultivo sigue siendo el "Gold-standard" para la validación de cualquier otra metodología alternativa (EPA, 2015). Por otra parte, y de acuerdo a los postulados de Koch, la infectividad de una muestra contaminada por un

microorganismo, solo se considera probada si éste es capaz de crecer en un medio de cultivo apropiado (Madigan *et al.*, 2003).

Sin embargo, la elección de un medio apropiado, los requerimientos gaseosos, el tiempo necesario para su crecimiento y la pérdida de cultivabilidad debido a las condiciones de estrés, son los principales problemas derivados de la utilización del método por cultivo para la detección de diversos microorganismos. Para evitar estas limitaciones se han desarrollado metodologías alternativas (métodos genotípicos) de diagnóstico rápido y seguro, basadas en el análisis de los ácidos nucleicos (Engberg *et al.*, 2000). Entre estos, destacan dos técnicas moleculares, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por su extrema sensibilidad y versatilidad, y la técnica de Hibridación *in situ* con Sondas Fluorescentes (FISH), puesto que permite examinar las secuencias de ácidos nucleicos dentro de las células, sin alterar su morfología o la integridad de sus compartimentos.

4.1. Detección y aislamiento por cultivo

El método tradicional por excelencia para la detección e identificación de microorganismos es la observación de su crecimiento en sustancias nutritivas preparadas en el laboratorio. La capacidad de recuperación de bacterias a partir de una muestra viene determinada principalmente por la técnica empleada, la naturaleza de la muestra, el número de microorganismos presentes en ella y el estado fisiológico de las células presentes.

Para el aislamiento a partir de muestras altamente contaminadas, como es el caso de las muestras ambientales o de alimentos, es necesaria una primera fase de enriquecimiento, que consiste en incubar la muestra en un medio líquido selectivo, para eliminar parte de la microbiota acompañante, durante un periodo de 24-48 horas en las condiciones ambientales adecuadas, según el tipo de microorganismo. En el caso de *Helicobacter pylori*, se incuba en condiciones de microaerofilia (10 % de dióxido de carbono, 5 % de oxígeno y 85% de nitrógeno) a una temperatura de 37 °C durante 24-48 horas.

Los medios de cultivo basan su utilidad en la combinación de antibióticos para inhibir el crecimiento de la microbiota acompañante, y la adición de nutrientes para estimular el crecimiento del

Introducción General

microorganismo a detectar. El aislamiento se consigue con la técnica de siembra por triple estría en medios de cultivos sólidos. Una vez se obtienen colonias del patógeno, se siembran en un medio de mantenimiento para conseguir un cultivo masivo. Posteriormente se realizan los ensayos para su identificación.

Se han empleado una gran variedad de medios de cultivo, selectivos o no selectivos, para el aislamiento de helicobacters gástricos. Uno de los medios más usados para el primer aislamiento en muestras de biopsia fue el medio de Skirrow, que contiene Agar Brucella Sangre suplementado con trimetoprim, vancomicina, polimixina B y anfotericina B (Eaton *et al.*, 1991). Otros autores emplean el medio Agar Sangre de Caballo, que contiene Agar Blood Columbia con un 5 % de sangre de caballo, suplementado con la mezcla de antibióticos propuesta por Dent (Dent *et al.*, 1987), con vancomicina, lactato de trimetoprim, cefsulodina y anfotericina B.

También se emplea un medio comercial para el aislamiento selectivo de *H. pylori*, Agar Pylori® (Biomérieux, Francia) que contiene peptona de caseína, peptona de soja, extracto de carne, NaCl, agar, plasma de caballo, polyvitex y una mezcla de antibióticos.

Debido a las dificultades en el aislamiento de *Helicobacter* en muestras de heces o ambientales, diversos autores han intentado mejorar estos medios de cultivo, para permitir un mejor aislamiento de las bacterias, sobre todo en muestras muy contaminadas, como es el caso de aguas o alimentos.

Jiang y Doyle (2002) realizaron estudios para evaluar la supervivencia y crecimiento de *H. pylori* en medios de enriquecimiento, probando distintos suplementos como mucina, sulfato férrico o piruvato sódico, lo que aumenta el nivel de microorganismos detectados. Degnan *et al.* (2003) desarrollaron un nuevo medio con una nueva mezcla de suplementos de crecimiento al que añadieron anfotericina B, polimixina B y un indicador rojo fenol para detectar la producción de ureasa. Fernández *et al.* (2006) realizaron estudios para ver la selectividad de dicho medio selectivo en muestras de agua de mar y moluscos, y concluyeron que era apropiado para el aislamiento de *H. pylori* en muestras de agua de mar.

A pesar de todas estas modificaciones, todavía no existe ningún medio óptimo para el aislamiento de *Helicobacter* en muestras ambientales, ya que la microbiota acompañante enmascara, en caso de que lo hubiera, el crecimiento de *H. pylori*.

Para favorecer la eliminación de esta microbiota se han desarrollado técnicas alternativas, utilizadas previamente al cultivo en medio sólido. Dos de las técnicas de eliminación de microbiota acompañante más usadas en el aislamiento de *H. pylori* son la separación inmunomagnética (IMS) y el tratamiento ácido.

Separación inmunomagnética (IMS)

La separación inmunomagnética (IMS) es una técnica rápida y fiable para la separación de patógenos en muestras heterogéneas, como sangre, alimentos y muestras fecales (Olsvik *et al.*, 1994). La IMS utiliza partículas superparamagnéticas (Fe_2O_3 y Fe_3O_4) que están cubiertas con una delgada envoltura de polímeros, encerrando el material magnético. Esto proporciona una superficie apropiada para la adsorción de varias moléculas de reactivos. Según la aplicación que se le quiera dar a la IMS existen distintos ligandos: anticuerpos, una proteína o antígeno, sondas de ADN o ARN o cualquier otra molécula con afinidad para la muestra diana que se desee aislar.

Las perlas magnéticas sensibilizadas con anticuerpos para antígenos de superficie de la bacteria se usan para separar y concentrar microorganismos de la muestra. El proceso de separación consta de dos pasos fundamentales: en el primero, la suspensión que contiene las bacterias diana se mezcla con las perlas magnéticas sensibilizadas. De esta forma se produce la unión anticuerpo-antígeno (complejo magnético) alrededor de las perlas magnéticas y las bacterias se adhieren a las perlas, formando agregados en un extremo del tubo gracias a la acción de un imán. En el segundo paso, el complejo magnético se lava varias veces para eliminar los contaminantes no deseados, incluyendo posibles inhibidores de la PCR que pudieran encontrarse en la muestra. La flexibilidad del sistema permite aislar prácticamente cualquier diana, dependiendo del ligando específico empleado. Para muchas de las aplicaciones no es necesario revertir la unión de la molécula diana, ya que se puede emplear ésta directamente unida a la perla inmunomagnética. A esta estrategia se le llama aislamiento positivo (Yakub and Stadterman-Knauer, 2004).

La estrategia de una separación de aislamiento negativo consiste en que la muestra de interés es obtenida por eliminación de los componentes no deseados presentes en una muestra heterogénea. El sobrenadante que contiene la muestra diana intacta se recupera para posteriores análisis y ensayos.

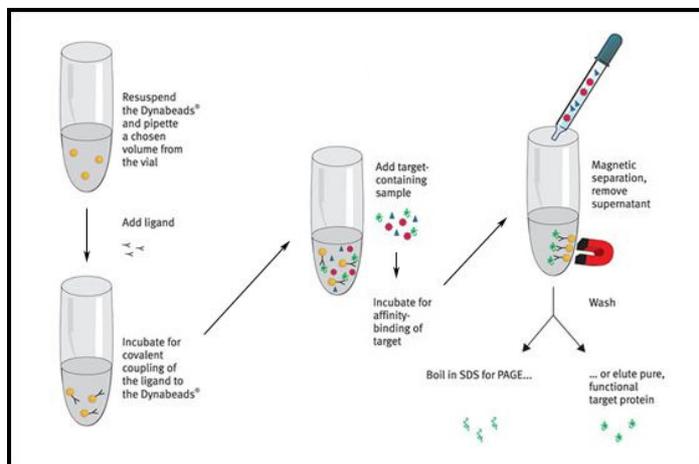


Figura 3. Diagrama de una separación inmunomagnética (www. Invitrogen.com)

La técnica IMS se utiliza como paso previo para la detección de microorganismos por métodos moleculares o por cultivo. Puede combinarse con técnicas como la Hibridación *in situ* con Sondas Fluorescentes (FISH) o la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), obteniéndose una mayor eficiencia en el diagnóstico de algunas bacterias, virus y parásitos. También se puede realizar un cultivo en placa de los complejos magnéticos para la obtención de colonias del microorganismo diana (Yakub and Stadterman-Knauer, 2004).

Esta técnica, asociada a la PCR, ha mostrado resultados muy prometedores para la detección de *E. coli* O157:H7 (Fu *et al.*, 2004), *Salmonella enterica* (Mercanoglu y Griffiths, 2005) y *Listeria monocytogenes* (Amagliani *et al.*, 2006). Enroth y Engstrand en 1995, detectaron en heces y agua, ADN de *Helicobacter pylori*, mediante la aplicación de la técnica de IMS y posterior PCR. Osaki *et al.* (1997) emplearon este método para el aislamiento de *H. pylori* de muestras fecales de ratones. Tras la separación inmunomagnética en heces, detectaron *H. pylori*, pero no lo consiguieron cultivar.

Lu *et al.* (2002) consiguieron aislar *H. pylori* a partir de agua municipal no tratada de la Ciudad Juárez en México, usando la separación inmunomagnética para concentrar las células, utilizando anticuerpos monoclonales de ratón, anti-IgG de *Helicobacter pylori* sobre Dynabeads M-280 (DynaL Corp) y posterior siembra en agar Columbia con sangre. Este trabajo demostró por primera vez la presencia de *H. pylori* en el medio ambiente, así como la posibilidad de su cultivo.

Watson *et al.* (2004) emplearon la técnica de IMS para reducir el nivel de microbiota acompañante presente en muestras de agua potable de grifos públicos y bocas de riego de Inglaterra con el fin de mejorar la detección de helicobacters, entre ellos *H. pylori*, mediante la técnica de cultivo. Los resultados obtenidos indicaban que la IMS no mejoraba específicamente la recuperación de *H. pylori* u otros helicobacters.

Tratamiento ácido

Helicobacter pylori es capaz de producir determinadas enzimas que le sirven para sobrevivir y colonizar la mucosa gástrica. Entre estas se encuentra la ureasa, que hidroliza la urea y origina dióxido de carbono y amoníaco, mediante la reacción $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$, creando un microambiente alcalino y permitiendo que *H. pylori* sobreviva en condiciones ácidas (Hong *et al.*, 2003).

Nilsson *et al.* (2002) observaron que formas cocoides de *H. pylori* no presentaban una reducción en ATP cuando se realizaba una incubación durante 4-12 horas de éste patógeno en medio GB, diseñado para *Nisseria gonorrhoeae*, con un 5 % de suero de caballo acidificado hasta pH 5 con un contenido de 5mM de urea, lo que demostraría que *H. pylori* es capaz de sobrevivir en ambientes acidificados en forma viable no cultivable como mecanismo de supervivencia.

Shao *et al.* (2008) estudiaron el perfil proteico, mediante MALDI-TOF-MS, que presentaban cepas de *H. pylori* cuando se les sometía a ambientes acidificados. Observaron que las cepas del patógeno presentaban perfiles proteicos que se diferenciaban en 36 proteínas, todas implicadas en el metabolismo de la hidrólisis de la urea, respecto a los perfiles proteicos de las cepas de *H. pylori* no sometidas a ambientes con pH ácidos, lo que demuestra que *H. pylori* es capaz de adaptar su metabolismo para sobrevivir en ambientes ácidos.

Esta característica distintiva se puede utilizar para favorecer el aislamiento de *H. pylori* frente a otras bacterias presentes en el agua y las biopelículas, mediante la reducción del pH de la suspensión bacteriana antes del cultivo.

Brick *et al.* (2004) observaron que las cepas de *H. pylori* H509 y H4780 presentaban tolerancia a condiciones ácidas, obteniendo una recuperación de *H. pylori* en cultivo en medio Dent sin diferencias significativas entre los distintos tiempos de exposición (0, 1, 2.5, 5 y 10 minutos) de las cepas del patógeno al ambiente ácido. Otras cepas de *H. pylori*, tales como H899, H5027 y H502, mostraban una menor tolerancia, puesto que la recuperación mediante cultivo disminuía conforme el tiempo de exposición al ácido aumentaba. Concluyeron que las distintas cepas de *H. pylori* presentan niveles de tolerancia a condiciones de acidez diferentes y que la presencia de concentraciones de sustancias ácidas posiblemente son inductoras del paso de la bacteria al estado de viable no cultivable, como indicaba Nilsson *et al.* (2002).

4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las bases para el método de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos fueron establecidas en 1981 por Kleppe, quien describió una síntesis extensiva de ADN catalizada por ADN polimerasas. Pero fue K. Mullis, científico de la compañía Cetus, quien en 1983 desarrolló un proceso de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos, apoyándose en la teoría de la síntesis automatizada de oligonucleótidos, patentándola en 1987 (Mullis, 1990).

La PCR es un método enzimático que permite copiar de forma exponencial una zona concreta de un genoma, pudiéndose obtener millones de copias de ella. Este proceso se lleva a cabo cíclicamente. En la primera etapa (**desnaturalización**) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello, se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97 °C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya. En el segundo paso (**hibridación**) los iniciadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que se desea amplificar. En la tercera etapa (**elongación**) se produce la síntesis de una cadena sencilla, produciéndose un fragmento de doble cadena por complementariedad, en la dirección 5' → 3' mediante

la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio, siguiendo la cadena molde.

Una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original: al final del segundo ciclo se tienen 4, al final del tercero 8, y así sucesivamente. Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica. Los productos de la PCR, llamados amplicones, se detectan normalmente por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan en forma de bandas bajo luz ultravioleta.

Entre las ventajas de esta técnica destacan su sencillez, rapidez y sensibilidad. Además, se requiere muy poco material biológico de partida, mientras que la mayoría de análisis químicos precisan de grandes cantidades.

Debido a la sencillez de la técnica, su uso en los laboratorios clínicos ha supuesto una revolución en el concepto de la detección microbiológica. Problemas tales como la dificultad de detección de determinados virus y la imposibilidad de aislamiento de algunos microorganismos por su dificultad o incapacidad para desarrollarse *in vivo*, pueden obviarse mediante la PCR, lo que ha hecho que esta técnica suponga una alternativa a veces obligada para su uso en microbiología. Además, la versatilidad de esta técnica ha permitido su aplicación a otros campos de interés económico como es el caso de la medicina forense, identificación genética o control de calidad de las industrias (Kabir, 2004).

Un aspecto importante para el éxito de la PCR es el diseño de los iniciadores. Son moléculas de ADN monocatenario de entre 15 y 30 nucleótidos que la polimerasa emplea para comenzar a polimerizar, de forma que el punto de inicio de la síntesis de nuevas moléculas de ADN lo establece la posición del iniciador. Es condición indispensable que los iniciadores sean específicos del ADN que se vaya a amplificar. En la mayoría de los casos, conocer la secuencia completa del microorganismo de interés es muy complicado y por lo tanto es habitual recurrir a la información recopilada por otros investigadores y almacenada en bases de datos. La recopilación de varias secuencias de 16S y del 23S en los bancos de datos es una excelente ayuda a los investigadores en el desarrollo de nuevos iniciadores para la detección mediante PCR (Bou *et al.*, 2011).

La PCR se ha empleado en una gran cantidad de estudios para detectar *Helicobacter* en un variado tipo de muestras: placa dental y saliva (Song *et al.*, 2000); heces (Kelly *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2002); leche cruda (Doyle, 2002; Rahimi y Kheirabadi, 2012); vegetales (Atapoor *et al.*, 2014) y moluscos (Fernández *et al.*, 2007). Existen diversos trabajos en los que ha sido detectado *H. pylori* en aguas superficiales y residuales mediante PCR (Hulten *et al.*, 1996; Horiuchi *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2003; Krumbiegel *et al.*, 2004). El gen de la ureasa de *H. pylori* es uno de los genes que más se ha empleado en muestras ambientales, resultando muy sensible y específico (Kabir, 2004). Otros iniciadores usados en muestras ambientales incluyen secuencias del ADN 16S (Hulten *et al.*, 1996; Bunn *et al.*, 2002), el gen que codifica para la adhesina BabA (Horiuchi *et al.*, 2001) y los genes de virulencia *cagA* y *vacA* (Mazar-Hiriart *et al.*, 2001).

Nayak *et al.* (2007) realizaron un estudio de monitorización de *H. pylori* en aguas residuales de East Lansing, Estados Unidos. Para su detección emplearon la técnica de q-PCR y los iniciadores *vacA*. Obtuvieron un 84% de muestras positivas en la detección del patógeno utilizando los iniciadores *vacA* para la detección del gen *vacA* en aguas residuales.

En estudios que se ha detectado *H. pylori* mediante los genes *ureA*, los resultados obtenidos no han sido tan favorables (Janzon *et al.*, 2009; Essawi *et al.*, 2013; El-Sharouny *et al.*, 2015).

En la tecnología PCR se están produciendo continuos avances. El objetivo es conseguir que la técnica llegue a ser automatizada en todas sus fases y que sea altamente específica y sensible a la vez.

4.3. PCR cuantitativa a Tiempo Real (q-PCR)

Antes de la introducción de técnicas a tiempo real era común tomar datos periódicamente durante la PCR para la cuantificación del ADN presente en la muestra.

Hoy en día existen metodologías que permiten esta cuantificación en cada ciclo de amplificación: en la PCR a Tiempo Real o PCR Cuantitativa (q-PCR) la amplificación y el análisis ocurren al mismo tiempo. Es una herramienta poderosa, simple y rápida, y está destinada a sustituir a muchas técnicas tradicionales en los laboratorios de microbiología.

La fluorescencia es el indicador elegido para la PCR cuantitativa. Esta técnica detecta la señal de fluorescencia emitida tras la excitación del o los fluoróforos utilizados, ciclo por ciclo, durante el proceso de amplificación, siendo esta señal proporcional al número de copias generadas en cada ciclo (Figura 4). Estableciendo el nivel umbral sobre la señal de fluorescencia basal, es posible determinar el ciclo en el que se inicia la fase exponencial de la amplificación del ADN (ciclo umbral, C_T), el cual está relacionado directamente con la cantidad de ADN diana inicial y es el parámetro utilizado en la cuantificación (Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996; Nazarenko *et al.*, 1997).

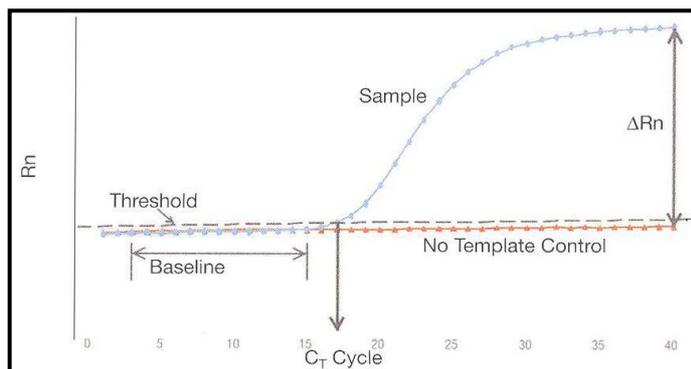


Figura 4. Representación gráfica del aumento de la fluorescencia (ΔR_n) con respecto al número de ciclos de la PCR y determinación del valor de C_T (Roche, Francia, www.roche.com)

Esta técnica puede emplearse para dos tipos de detección: En la detección cualitativa, los ciclos de temperatura se emplean para amplificar las moléculas diana, de forma que puedan ser fácilmente detectadas. La fluorescencia de las sondas unidas al ADN se monitoriza en cada ciclo de PCR. Las reacciones son reconocidas como positivas por algoritmos que analizan los cambios de fluorescencia en cada ciclo. En la detección cuantitativa, la construcción de una curva estándar o recta patrón a partir de concentraciones conocidas de ADN diana permite la cuantificación de la muestra problema, mediante la interpolación de los valores obtenidos.

La tasa de crecimiento del producto de amplificación es conocida como “eficiencia” de la PCR. La eficiencia depende básicamente de los iniciadores y de las condiciones de temperatura de la reacción y se define como el número de copias en el ciclo $n+1$ dividido por el número de copias en el

Introducción General

ciclo n . Una reacción con eficiencia del 100% (equivaldría a 2) duplicaría el ADN cada ciclo de amplificación. La eficiencia de una reacción de amplificación se aproxima a 2 durante la fase exponencial de la mayoría de las reacciones bien optimizadas.

En los dispositivos actuales para q-PCR la amplificación y la detección de fluorescencia se desarrollan en un mismo tubo. Éste no se abre nunca durante el proceso, y el uso de dUTP y Uracil-DNA glicosilado impide todo riesgo de contaminación. Además, dada la detección fluorimétrica de los amplificadores, no se requiere electroforesis, lo que evita los problemas de contaminaciones derivados de la apertura de los tubos (Wilhelm y Pingoud, 2003; McKillip y Drake, 2004). Así pues, la PCR a tiempo real puede integrar la detección y cuantificación de microorganismos en un solo ensayo de forma rápida y eficaz.

El instrumento empleado para realizar los análisis de PCR a Tiempo Real es el termociclador a tiempo real, que consiste en una cabina de enfriamiento, una cámara de calor, un fluorímetro, rotores, mandos electrónicos y fuente de energía (Figura 5). Estos elementos están montados sobre una base de aluminio que garantiza la estabilidad.

Los datos de las medidas de fluorescencia se transmiten desde y al ordenador a través de una interfaz de serie. Los usuarios introducen los datos, las muestras y el protocolo experimental en el ordenador y éste transmite los datos al termociclador. El ordenador también monitoriza las temperaturas y las señales de fluorescencia durante la PCR.

Existen diversos tipos de termocicladores en el mercado: algunos utilizan como soporte de la reacción tubos capilares de cristal, mientras que otros usan micropocillos de plástico. En los termocicladores que poseen capilares la reacción tiene una superficie de volumen óptima que garantiza un rápido equilibrio entre el aire y los componentes de la reacción. Además, el cierre individual de cada capilar con un tapón minimiza el riesgo de contaminación. Por otro lado, los pocillos de plástico tienen paredes suaves, finas y uniformes que también garantizan una transferencia de calor precisa y están insertados en placas que son delgadas, flexibles y fáciles de cortar y manipular con menor riesgo de ruptura.

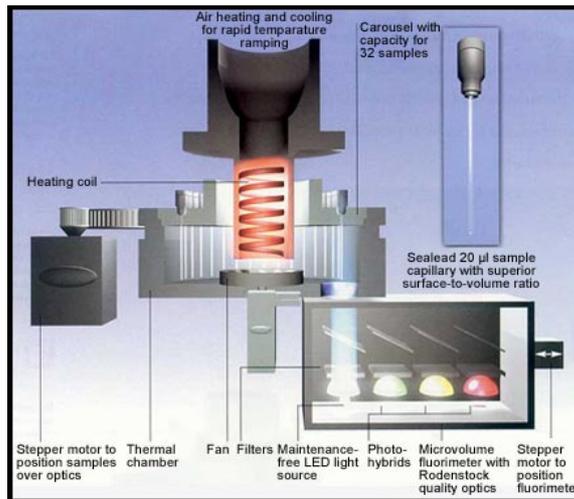


Figura 5. Termociclador con sistema de capilares (www.genemol.org)

Uno de los más extendidos, y el que se ha empleado en este trabajo, es el LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System (Roche, Francia) (Figura 6). Este instrumento, que utiliza tubos capilares para la reacción de PCR, emplea para la detección un fluorímetro de tres canales. Un diodo azul (LED) con una emisión máxima de 470 nm sirve como fuente de energía para la excitación de las muestras. La fluorescencia se detecta a 530 nm, 640 nm y 710 nm, con la ayuda de fotohíbridos. Estos tres canales de detección permiten el marcaje de las muestras con varios fluorocromos, lo que posibilita el trabajo con PCR múltiple y la detección de 2 o incluso más genes simultáneamente. Los nuevos termocicladores LightCycler® poseen 6 canales de detección, permitiendo así el análisis a varias longitudes de onda de emisión (530, 555, 610, 640, 670 y 705 nm), lo que posibilita la medida de emisiones de cuatro fluorocromos distintos.

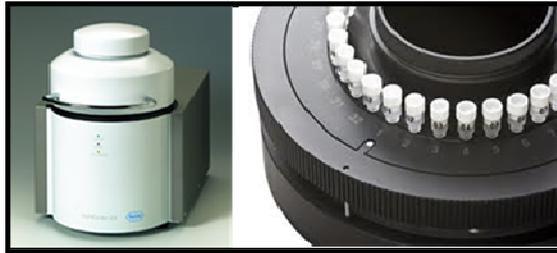


Figura 6. LightCycler® 2.0 Real-Time PCR System (Roche, Francia, www.roche.com)

El sistema permite el empleo de distintos protocolos para la incorporación y detección de la fluorescencia (www.roche-mb.com). La detección de fluorescencia puede realizarse mediante sistemas inespecíficos o específicos de secuencia (Lee *et al.*, 2004):

Sistemas específicos: Sondas de hibridación

En los sistemas específicos de secuencia se utilizan sondas marcadas con fluoróforos, cuya diana se encuentra en el producto de amplificación, constituyendo un elemento más para conseguir la especificidad deseada. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente entre las moléculas. El método utiliza fluoróforos que actúan como donadores o aceptores de fotones y están unidos a una o varias sondas. Las sondas de hibridación específicas más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas tipo “molecular beacons” y las sondas FRET (Lejona *et al.*, 2006).

Sistemas inespecíficos: Agentes intercalantes

Esta metodología se basa en el uso de fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El incremento de ADN en cada ciclo de la PCR se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Entre los fluorocromos utilizados se encuentran el bromuro de etidio (Higuchi *et al.*, 1993; Le Pecq y Paoletti, 1996; Wittwer *et al.*, 1997), el

YOPRO® y YoYo® (Ogura *et al.*, 1994; Ishiguro *et al.*, 1995), el SYBR® Green I y el SYBR Green Gold. También se han descrito otra molécula intercalante, BEBO, de características similares al SYBR® Green I (Bengtsson *et al.*, 2003).

Uno de los más usados por su facilidad de utilización y disponibilidad comercial, y que ha sido utilizado en este trabajo, es el SYBR Green I (Figura 7). La excitación de la molécula se produce con luz azul a una longitud de onda de 480 nm y el espectro de emisión es comparable al de la fluoresceína, con un máximo de 520 nm. La fluorescencia del colorante unido al ADN es 1000 veces superior que cuando está libre y por tanto es muy adecuado para la monitorización del aumento del producto de amplificación durante la PCR (Wittwer *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1998).

El uso de agentes intercalantes permite además, comprobar que el producto de amplificación es el esperado: Cada fragmento de amplificación tiene una temperatura de fusión (T_m) característica, que es aquella temperatura a la cual el 50 % del ADN amplificado se ha desnaturalizado o liberado de la doble cadena. Esta temperatura depende sobre todo de la longitud y de la composición de las bases (contenido en G + C) del fragmento de amplificación.

La T_m será la misma para todos los productos de PCR obtenidos con un determinado par de iniciadores, y es característica de cada amplicon, independientemente de las condiciones de la PCR. Por tanto, de la medida de la T_m durante la PCR se obtiene una curva de fusión que permite comprobar la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR (Ririe *et al.*, 1997), así como comprobar la ausencia de productos de amplificación de PCR inespecíficos que podrían inferir en la cuantificación (Simpson *et al.*, 2000).

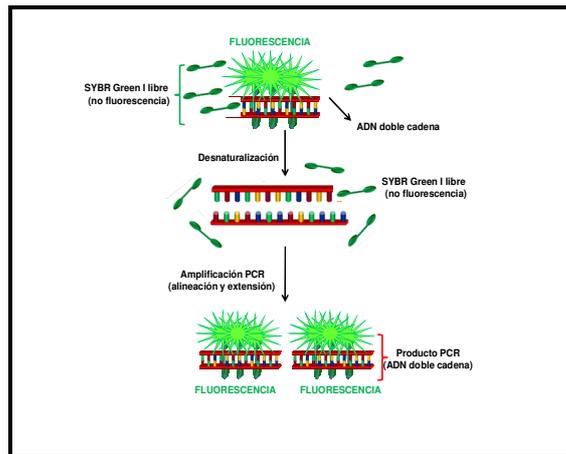


Figura 7. Mecanismo de acción del SYBR Green I (Roche, Francia, www.roche.es)

4.4. Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

La técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) combina la precisión de la genética molecular con la información visual de la microscopía, lo cual permite la identificación y visualización de la célula microbiana individual dentro de su microhábitat natural o dentro de tejido enfermo.

La hibridación *in situ* con sondas fluorescentes fue desarrollada independientemente por dos grupos de investigación (Pardue y Gall, 1969; John *et al.*, 1969). El ADN o ARN 28S marcado radiactivamente fue hibridado con preparaciones citológicas realizadas con oocitos de *Xenopus* y detectado por micro-autorradiografía. Desde entonces la técnica ha sido modificada para el estudio de evolución cromosómica y estudios citogenéticos de una gran variedad de especies. Finalmente fue introducido en la bacteriología por Giovannoni *et al.* (1988), quienes fueron los primeros en usar sondas de oligonucleótidos marcadas radiactivamente para la detección microscópica de bacterias.

Posteriormente los marcadores radiactivos fueron sustituidos por colorantes fluorescentes. Comparadas con las radioactivas, las sondas fluorescentes son más seguras, ofrecen una mejor resolución y no necesitan pasos adicionales. Además, las sondas fluorescentes pueden marcarse con

colorantes de distinta longitud de onda de emisión, permitiendo la detección de varias secuencias con un paso simple de hibridación (Pernthaler y Amann, 2004).

La técnica FISH detecta secuencias de ácidos nucleicos mediante una sonda marcada con cromóforos fluorescentes, que hibrida específicamente con la secuencia complementaria sin dañar la célula. El proceso incluye los siguientes pasos: fijación del espécimen, preparación de la muestra (incluyendo pasos específicos previos de tratamiento), hibridación con sondas para la detección de sus respectivas secuencias blanco, pasos de lavado para eliminar las sondas no unidas, montaje, visualización y documentación de los resultados (Moreno *et al.*, 2001).

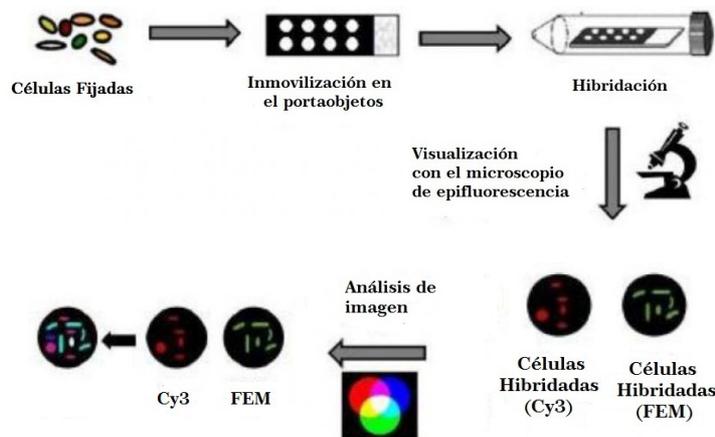


Figura 8. Esquema del protocolo general de la técnica FISH

Como diana se emplea una región del ARN ribosómico 16S o 23S, por su estabilidad genética, su estructura, en la que coexisten regiones conservadas con regiones variables, y su alto número de copias, lo que permite una amplificación de la señal fácilmente detectable.

Esta técnica se ha convertido en una herramienta potente, rápida y sensible para la detección e identificación de microorganismos en diferentes ambientes microbianos (Amman *et al.*, 1995). Presenta

Introducción General

ventajas sobre otros métodos, como la PCR o la detección con anticuerpos, ya que no requiere un cultivo previo ni extracción de ácidos nucleicos, ni surgen problemas de uniones inespecíficas ni sustancias inhibitoras que dificulten la hibridación.

La mayor limitación del método es la sensibilidad, en función de la propia sonda y de la matriz donde se esté hibridando. El método utilizado para el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla parece que ejercen una importante influencia en la intensidad de la señal (Fuchs *et al.*, 2001).

La parte más crítica de esta técnica es el diseño de las sondas, que deben ser suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que queremos detectar en presencia de otras, en muchos casos con moléculas de ARNr muy homólogas. La accesibilidad de la sonda al ARNr es diferente según la molécula de ARNr de la que se trate (23S o 16S) y la zona del mismo de la que sea complementaria, lo que hay que tener en cuenta en el diseño de la sonda. El tamaño de las sondas oscila entre 15 y 30 pares de bases y las más cortas son las que presentan una mayor accesibilidad, pero pueden llevar menos marcadores (Fuchs *et al.*, 2001).

Hay diferentes métodos de marcaje de las sondas. El marcaje fluorescente directo es el más utilizado, rápido, barato y fácil, ya que no requiere ningún paso posterior de detección tras la hibridación. Una o más moléculas de colorante fluorescente se unen al oligonucleótido, bien químicamente durante la síntesis a través de un enlace amino en el extremo 5' terminal de la sonda, o enzimáticamente, utilizando una transferasa terminal que une los nucleótidos marcados fluorescentemente al extremo 3' terminal. Los fluorocromos de última generación emiten una señal fluorescente más intensa y son mucho más estables frente a la luz (Ammann *et al.*, 1990).

El uso de sondas FISH modificadas tipo LNA (Locked Nucleic Acid) para la hibridación *in situ* hace posible aumentar la especificidad y la sensibilidad de unión con las regiones de ARNr, debido a sus excelentes propiedades térmicas. Las sondas LNA son sondas con una modificación en su anillo de ribosa. Esta modificación consiste en la formación de un puente 2'O - 4'C, que confiere a la sonda un aumento en la estabilidad térmica, así como un aumento en la especificidad. 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 ARN-ADN, lo que le confiere mayor estabilidad en condiciones de hibridación más restrictivas y por tanto más selectivas.

El uso de sondas LNA hace posible que la temperatura de fusión pueda alcanzar valores elevados aun tratándose de fragmentos cortos y 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 ADN en la detección de fragmentos de ARN (Rune *et al.*, 2005).



Figura 9. Estructura del monómero de LNA. B: Base; Z: grupo terminal (OH); Z*: grupo de enlace internucleosídico (OH); Y: CH₂; X: grupo constitutivo O, S, NR.

Para asegurar la especificidad de las sondas y por tanto una óptima hibridación, los dos parámetros determinantes son la temperatura y la concentración de formamida en el tampón de hibridación. En la mayoría de los protocolos, la temperatura de hibridación se mantiene constante y es la concentración de formamida lo que va a dar lugar a unas condiciones más o menos astringentes. La formamida hace que disminuya la temperatura de anillamiento de las sondas mediante el debilitamiento de los puentes de hidrógeno entre los duplex ADN-ADN y ADN-ARN, entre 0.6-0.72 °C por porcentaje utilizado, incrementando el nivel de astringencia (Moter y Göbel, 2000).

Al aumentar el nivel de astringencia de la reacción mediante la adición de formamida se consigue una reducción de la hibridación inespecífica, favoreciendo la visualización en el análisis microscópico. (Rodríguez, 2011).

El empleo de la técnica FISH para la detección de *Helicobacter* en muestras ambientales no está muy estudiado. Moreno *et al.* (2003) la emplearon para la detección de *H. pylori* en agua de río y aguas residuales, comparando su eficacia con métodos culturales y PCR, detectando más muestras positivas que mediante PCR.

4.5 Detección de células viables por métodos moleculares

Las primeras definiciones de viabilidad de una población celular se referían a la proporción de células capaces de multiplicarse tras la incubación en condiciones microbiológicas estándar. Se consideraría que una bacteria está muerta cuando no muestra crecimiento visible en un medio bacteriológico en un tiempo determinado. El método clásico para determinar la viabilidad es, por tanto, el recuento en placa (Villarino *et al.*, 2000; EPA 2015). Esta definición de viabilidad celular cuenta con muchas limitaciones, puesto que no todas las especies bacterianas de muestras ambientales pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio. Además, en el estado Viable pero No Cultivable (VNC) las células habrían perdido su capacidad de formar colonias bajo condiciones de análisis, por lo que no serían detectadas (Haq *et al.*, 1996).

Por ello, ha sido necesario desarrollar varios métodos alternativos para determinar la viabilidad celular. Algunos métodos se basan en la demostración de actividad metabólica, como la reducción de sales de tetrazolio como indicador de un transporte activo de electrones (Rodríguez *et al.*, 1992), la detección de actividad esterasa mediante el uso de un sustrato fluorogénico (Reynolds y Fricker, 1999), o del consumo de sustratos (Rahman *et al.*, 1994). Otros autores centran sus ensayos de viabilidad en la demostración de la integridad de la membrana celular (Virta *et al.*, 1998) o la presencia de ácidos nucleicos (ADN o ARN) mediante PCR (Islam *et al.*, 1993) o FISH (Kamer *et al.*, 1997).

Desde hace dos décadas, la técnica Live/Dead, basada en el recuento de células vivas y muertas mediante microscopía rápida y seguimiento del estado fisiológico de las células, se usa para observar la integridad de la membrana celular. Este método emplea marcadores de ácidos nucleicos como el fluorocromo SYTO9, molécula de pequeño tamaño que es capaz de penetrar a través de la membrana de las bacterias, proporcionando fluorescencia verde (Emisión: 514 nm). A su vez emplea también el fluorocromo PI (Yoduro de Propidio), incapaz de atravesar la membrana celular, por lo que sólo penetra en las células que presentan la membrana dañana, consideradas células no viables, proporcionando fluorescencia roja (Emisión: 617 nm).

Sin embargo, esta técnica presenta en ocasiones resultados controvertidos: Stiefel *et al.* (2015) determinaron que factores externos como condiciones ambientales o el estadio fisiológico de las células podían influir en los recuentos SYTO9/PI. Observaron que en ocasiones el PI no sustituía la unión SYTO9-ácidos nucleicos por ser ésta muy estable, por lo que células no viables se mostraban

con fluorescencia verde, contabilizándolas en los recuentos como viables a pesar de tener daños en la membrana celular. Ya Berney *et al.*, en 2007, realizaron estudios sobre la eficiencia de la técnica SYTO/PI en la detección de bacterias presentes en muestras de agua y concluyeron que la técnica LIVE/DEAD es una técnica de cribado rápida, la cual debe ser confirmada por otras técnicas con mayor fiabilidad.

4.5.1. Detección de ADN de células viables mediante PCR

Las técnicas PCR y q-PCR tienen una alta sensibilidad de detección de microorganismos pero poseen la desventaja de no poder discriminar entre células viables y no viables. Para solucionar la detección por PCR o q-PCR de células viables se han desarrollado diferentes tipos de métodos, como el uso de un agente intercalante del ADN, el fluoróforo **Propidio Monoazida (PMA)** (Nam *et al.*, 2011). La membrana celular es impermeable al agente intercalante PMA, por lo que éste se unirá selectivamente con el ADN de las células cuyas membranas están dañadas, y por tanto no sean viables (Figura 8). El PMA es capaz de ser ligado fotoquímicamente al ADN por un enlace covalente de nitrógeno-carbono estable. Ésta modificación del ADN inhibe la acción de la polimerasa, por lo que el ADN de las células comprometidas, no viables, no es amplificado en la q-PCR o PCR (Lee and Ponce, 2011). Por lo tanto, mediante el uso de las técnicas PCR o q-PCR después del tratamiento con PMA, la detección, identificación y cuantificación, teóricamente, se limita a las células con membranas celulares intactas, consideradas células viables (Nocker *et al.*, 2007).

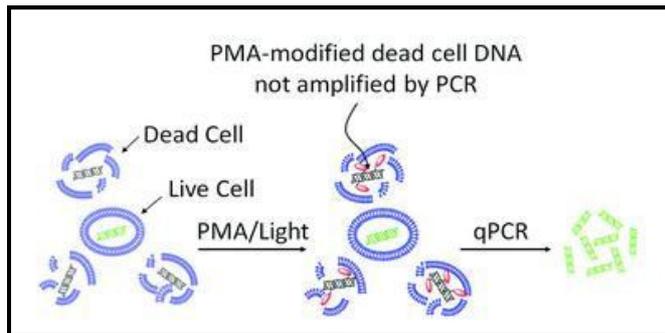


Figura 10: Mecanismo de acción del Propidio Monoazida (Biotium, US-CA)

Existe controversia en la definición de células viables, puesto que algunos autores establecen dicha definición a células que presentan únicamente integridad de membrana, mientras que otros autores establecen que además las células debe presentar actividad metabólica. Nocker y Camper, en el 2009, advirtieron que la técnica de q-PCR combinada con PMA es una técnica rápida para detectar integridad de la membrana celular pero que se debería combinar con otras técnicas de viabilidad para determinar la actividad metabólica de la célula y así descartar la posible detección de células que mantienen su integridad de membrana pero no su actividad metabólica.

4.5.2. Detección de células viables mediante DVC-FISH

En 1979 Kogure *et al.* propusieron un método para la enumeración de bacterias viables en un ambiente marino natural, al que denominaron **Direct Viable Count (DVC)**. El método se basa en la incubación de las muestras con nutrientes y un agente antimicrobiano. Este agente actúa como un inhibidor específico de la síntesis de ADN, con lo que se previene la división celular sin afectar a otras actividades metabólicas. Las células pueden por lo 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 nalixídico, ácido pipemídico y ciprofloxacino) (Barcina *et al.*, 1995).

Este método original presenta dos dificultades para la aplicación en comunidades complejas: En primer lugar, en un microambiente real hay bacterias que son resistentes al agente antimicrobiano

empleado y por lo tanto serían capaces de crecer sin la formación de células elongadas. En segundo lugar, es difícil discriminar entre células elongadas y células que no lo están. Las células elongadas pueden ser más pequeñas que la media de la población y por lo tanto enmascarar las células que se están buscando (Coullier *et al.*, 1994; Fabian *et al.*, 1996).

La combinación de los ensayos de DVC, que incrementarían los niveles intracelulares de ARNr, con el análisis mediante FISH dirigido a secuencias diana específicas del gen 16S ARNr o 23S ARNr de la bacteria que se desea detectar, solucionaría las dificultades de identificación y discriminación entre células viables y no viables. La combinación de la incubación DVC con la técnica FISH permite la detección específica, que aporta la hibridación de las sondas fluorescentes de ADN, con la diferenciación entre las células viables de las no viables, que es aportado por la diferente elongación de las mismas. Villarino *et al.* (2000) emplearon el método DVC-FISH para la detección de células viables de *E. coli*. Mostraron que células inactivadas con bajas dosis de radiación UV, que habían perdido la cultivabilidad, eran capaces de elongarse, mostrando un estado viable.

Moreno *et al.* (2007), concluyeron que la aplicación de la técnica DVC-FISH puede proporcionar un método rápido y específico para detectar e identificar células viables de *H. pylori* en muestras ambientales.

4.5.3. Resistencia de *H. pylori* a la claritromicina

La claritromicina y el metranidazol son los antibióticos más frecuentemente usados en la terapia de erradicación de *H. pylori*. Sin embargo, la resistencia a la claritromicina ha aumentado en los últimos años, lo que ha provocado una disminución en la velocidad de su erradicación (Vallejos *et al.*, 2007; Zhang, 2015).

El mecanismo de acción de la claritromicina consiste en inhibir la síntesis de proteínas al unirse directamente al ARN ribosomal 23S. Análisis genéticos realizados demuestran la aparición de diversas mutaciones puntuales en el dominio V de este gen, específicamente, en la región que afecta la actividad peptidil-transferasa. Dichas mutaciones generan una disminución de la capacidad de unión

Introducción General

del antibiótico al ribosoma, de modo que la síntesis de proteínas no se ve inhibida (Vallejos, *et al.*, 2007).

La detección de estas mutaciones se utiliza en microbiología clínica para la detección de las formas resistentes de *H. pylori* mediante técnicas moleculares (Trebesius, *et al.*, 2000).

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

OBJETIVOS

El aumento de la población y expansión de la industria en las últimas décadas ha provocado una creciente demanda de agua, ocasionando la necesidad del aprovechamiento de aguas residuales depuradas.

La resistencia de algunas bacterias patógenas a los tratamientos convencionales de depuración y desinfección del agua constituye un riesgo para la salud puesto que, vehiculizadas por estas aguas depuradas reutilizadas, pueden llegar al hombre, bien sea a través de las aguas superficiales o por el consumo de vegetales regados con estas aguas.

Helicobacter pylori ocupa una posición destacada entre los patógenos humanos emergentes. Se ha sugerido que puede alcanzar las aguas residuales ya que se elimina por vía fecal, aunque existe controversia sobre su potencial de transmisión por esta vía. Por ello, es necesario el estudio de la presencia de *H. pylori* en aguas residuales durante el proceso de depuración y tras finalizar los tratamientos de desinfección antes de su reutilización.

El mayor problema para la detección e identificación de *H. pylori* reside en la dificultad de aislarlo por cultivo. Esto se debe a que es capaz de adquirir el estado VNC en el cual pierde la capacidad de crecimiento en medios de cultivo sintéticos aunque siga activo. Se hace necesario, por tanto, la aplicación de métodos moleculares alternativos más eficaces para su detección. Entre los métodos moleculares podemos destacar la Hibridación *in situ* con Sondas Fluorescentes (FISH) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa tradicional y a tiempo real (PCR y q-PCR).

A pesar de la dificultad del cultivo de *H. pylori*, se continua actualmente investigando en la obtención de medios de cultivo más adecuados para la obtención de colonias de este patógeno.

En base a lo expuesto se propone como objetivo principal:

Estimar la capacidad de supervivencia de la especie *H. pylori* al tratamiento de depuración más habitual en nuestra área geográfica, determinando su presencia mediante diferentes técnicas moleculares, PCR, q-PCR y FISH, además de las tradicionales de cultivo.

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. Cepas utilizadas en el estudio y condiciones de cultivo

Para la realización de este estudio se emplearon un total de 13 cepas de referencia. Entre ellas se incluyeron cepas del género *Helicobacter* y cepas representantes de especies bacterianas presentes de forma habitual en aguas, procedentes de la National Collection of Type Cultures, Reino Unido (NCTC) y de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Tabla 4: Cepas utilizadas en el estudio

BACTERIA	CEPA- ORIGEN
<i>Arcobacter cibarius</i>	NCTC 11885
<i>Escherichia coli</i>	CECT 4558
<i>Helicobacter pylori</i>	NCTC 11637
<i>Helicobacter pylori</i>	NCTC 11638
<i>Helicobacter pylori</i>	B6 (cepa de biopsia mucosa gástrica/colección UPV)
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910T
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 936
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 4032
<i>Pseudomonas sp.</i>	CECT 4355
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	CECT 4138
<i>Salmonella typhimurium</i>	NCTC 12117
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 511
<i>Vibrio vulnificus</i>	CECT 529

Las condiciones óptimas de crecimiento para *H. pylori* son 37 °C durante 24-48 horas en condiciones de microaerofilia (MO₂) (5 % O₂, 10 % CO₂ y 85 % N₂).

El cultivo de las cepas de *H. pylori* se llevó a cabo en Agar Sangre de Caballo (ASC) (Anejo A.1). Una vez comprobada la pureza de las cepas, éstas se conservaron por triplicado a -20 °C y -80 °C en viales con caldo nutritivo N° 2 (Oxoid, Inglaterra, ref. CM67) adicionado con glicerol (Anejo A.2).

1.2. Procesado de las muestras de agua residual

1.2.1. Origen de las muestras

Se analizaron un total de 60 muestras de agua residual, recogidas durante 9 meses, provenientes de dos Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) localizadas en la Comunidad Valenciana. Las EDARs fuente de las muestras de estudio depuran aguas residuales constituidas por aguas residuales domésticas e industriales. Una de ellas depura un caudal de 36.500 m³/ día, siendo el caudal depurado de la segunda de 45.000 m³/día. Ambas constan de las siguientes fases en su proceso de depuración: un pretratamiento, constituido por rejillas, mallas para retención de materiales gruesos y finos, tamizador, tanque de homogenización, desarenador y desengrasador; un tratamiento primario formado por un tratamiento físico-químico y una decantación; un tratamiento secundario mediante reactores biológicos para el tratamiento con fangos activos; y por último, un tratamiento terciario consistente en desinfección por radiación ultravioleta. En el Anejo D.1 se describen las etapas de un proceso de depuración de aguas residuales.

Las muestras se tomaron en 20 muestreos a lo largo de 9 meses. Cada uno de ellos incluía una muestra de la entrada al reactor biológico, una a la salida de éste y una tercera tras el tratamiento terciario de desinfección con radiación ultravioleta (Tabla 16).

1.2.2. Protocolo de procesado de muestras

Para el prefiltrado del agua se emplearon filtros estériles de 9 cm de diámetro (Whatman, Maidstone, Inglaterra) de tamaño de poro de 1 µm. El prefiltrado se realizó mediante el uso de embudos de cerámica estériles (9 cm de diámetro) acoplados a matraces con salida lateral, donde se recogió el material filtrado, para la posterior filtración sobre membranas de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0.45 µm (Whatman, Maidstone, Inglaterra) y centrifugación para la concentración y recuperación de las bacterias.

Para la evaluación de la presencia de *H. pylori* se analizaron las muestras directamente e introduciendo un paso previo de enriquecimiento:

Capítulo 1: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Residual

Se centrifugó un volumen de 100 mL de agua residual y agua ya depurada a 4000 rpm durante 30 minutos. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 mL de PBS 1X (Anejo B.2). La muestra se dividió en alícuotas de 1 mL, para posteriores análisis mediante técnicas moleculares y cultivo, denominando a esta muestra como muestra directa.

Se filtraron 100 mL de muestra de agua residual y agua ya depurada a través de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45 μm (Whatman, Maidstone, Inglaterra) que se transfirieron asépticamente a matraces con 100 mL de caldo de enriquecimiento selectivo para *H. pylori*, incubándose en las condiciones idóneas para el patógeno.

El caldo de enriquecimiento para *H. pylori* fue caldo Brucella adicionado con suplemento Dent (Anejo A.2). La incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas en microaerofilia.

Tras la incubación se recogieron alícuotas de 1 mL para su posterior análisis mediante técnicas moleculares y cultivo, denominándose a estas muestras como muestras enriquecidas.

Tanto las técnicas de detección por cultivo como las moleculares se llevaron a cabo en los dos tipos de muestras. A excepción de la qPCR, que se realizó únicamente en las muestras directas con el fin de realizar detección y cuantificación simultáneamente.

1.3. Aislamiento e identificación de *H. pylori* por cultivo

1.3.1. Evaluación de los medios de cultivo

Para la realización de este ensayo se empleó la cepa *Helicobacter pylori* NCTC 11637 (Tabla 4). La cepa se cultivó en ASC en condiciones óptimas durante 72 horas. Tras el periodo de incubación, se preparó un inóculo inicial en PBS 1X y se realizó el recuento en placa, mediante la siembra de 100 μL de diluciones seriadas de la suspensión celular en ASC, para conocer la concentración inicial del inóculo.

Los medios evaluados en el ensayo fueron: Agar Dent, compuesto por Agar Base Selectivo para *Campylobacter* (Merk, ref. 2248) con un 10 % de sangre desfibrinada de caballo, suplementado con la

mezcla de antibióticos propuesta por Dent *et al.* (1987) (Anejo A.1); Agar Dent modificado, al que se le adicionó un 5 % de suero fetal bovino (SFB, Sigma, ref. NA4637, España) sin la adición de sangre desfibrinada de caballo y Agar Pylori® (Biomérieux, Francia) (Anejo A.1).

A partir del inóculo inicial de la cepa NCTC 11637 se realizaron diluciones seriadas, de las cuales se sembraron 100 µL, por triplicado, en Agar Dent, Agar Dent modificado con SFB 5 % y en Agar Pylori®. Todas las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia, a 37 °C durante 72 h.

1.3.2. Metodología de cultivo

Para el aislamiento de *H. pylori* tanto a partir de muestra directa como después del enriquecimiento se utilizaron los medios Agar Dent y Agar Pylori® (Biomérieux, Francia). Se utilizaron 2 procedimientos de siembra distintos:

El primer método consistió en siembras en triple estría sobre los medios selectivos, incubándolo a 37 °C durante 48-72 horas en condiciones de microaerofilia.

En el segundo método se utilizó una modificación de la técnica utilizada por Ceelen *et al.* (2006), depositando una membrana estéril de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0.65 µm (Whatman, Maidstone, Inglaterra) sobre los medios selectivos. Sobre las membranas se añadieron 100 µL de muestra, dejándose durante 20 minutos a temperatura ambiente en condiciones de aerobiosis. Posteriormente se retiraron las membranas de las placas, que se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas, en condiciones de microaerofilia.

Tras la incubación, una parte de cada una de las colonias sospechosas se fijó con paraformaldehído según el protocolo descrito en el apartado 1.5.1 de este capítulo, y el resto se sembró en ASC para conseguir cultivo puro. Después de 24-48 horas a 37 °C en MO₂, una parte del cultivo se resuspendió en PBS 1X para su posterior identificación y el resto se congeló a -80 °C.

Para la identificación, se realizó tinción Gram de todos los posibles aislados de *H. pylori*. Se sembraron en Agar Urea (Anejo A.1) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones óptimas para *H. pylori* para comprobar la actividad ureasa.

1.3.3. Identificación molecular de las colonias

Debido a la falta de un sistema de pruebas bioquímicas para la identificación, los cultivos también se confirmaron mediante FISH y PCR con posterior secuenciación.

Tras la extracción de ADN (apartado 1.4.1) procedente del cultivo, se realizó la concentración del material genético con el fin de favorecer la amplificación. Para ello, 150 μ L del ADN se precipitaron por adición de 2 volúmenes de etanol frío al 95 % (v/v) y tras mezcla por inmersión, se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 rpm en centrifuga refrigerada a 5 °C. Se eliminó el etanol, invirtiendo los microtubos, a temperatura ambiente. Posteriormente, el ADN concentrado se resuspendió en 15 μ L de tampón TE (Anejo B.4) y se realizó la PCR, en las condiciones descritas posteriormente (apartados 1.4.3 y 1.4.4) para la detección de un fragmento de los genes *vacA* y 16S ADNr (Anejo C).

A continuación, se realizó la secuenciación de las dos cadenas del producto de PCR generado, para confirmar la identificación. La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

Previamente a la secuenciación, todos los productos de PCR fueron purificados mediante el sistema comercial "GenElute PCR Clean-up" (Sigma-Aldrich, Francia), basados en microcolumnas de afinidad de ADN. Se siguió el protocolo establecido por el fabricante. Brevemente, consiste en primer lugar en la hidratación de la microcolumna con 0.5 mL de la Solución de Preparación de la Columna y posterior centrifugación durante 30 segundos a 12.000 rpm. A continuación se añaden a la microcolumna Solución de Unión y producto de PCR en proporción 5:1 (5v/1v) y se centrifuga durante 1 minuto a 12.000 rpm.

A continuación se realiza el lavado del ADN mediante la adición de 0.5 mL de Solución de Dilución de Lavado y se centrifuga a máxima velocidad durante 1 minuto. Se retira el contenido del tubo de recogida y se centrifuga la microcolumna durante 5 minutos a máxima velocidad para eliminar cualquier resto de las soluciones añadidas. Finalmente, la microcolumna se incorpora a un tubo nuevo de 1.5 mL y se añaden 50 μ L de Solución de Elución. Tras 1 minuto a temperatura ambiente se centrifuga durante 3 minutos a 12.000 rpm.

Tras la purificación del ADN las muestras se llevan a secuenciar de forma inmediata o se mantienen a 4 °C durante 24 h.

1.4. Detección e identificación de *H. pylori* mediante PCR y q-PCR

1.4.1. Extracción de ADN genómico

Se empleó el sistema de extracción de ADN “Realpure Spin Food Stool Bacterias kit” (Durviz, Paterna, España). Este incluye los productos necesarios para la extracción del ADN en bacterias, diferenciando entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El procedimiento se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de agua o de los caldos de enriquecimiento, se centrifugan a 14.000 rpm durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspende en 300 µL de tampón de Lisis/Unión, añadiéndose 20 µL de Proteínasa K. El propósito de este tratamiento es lisar las células y facilitar la eliminación de los restos proteicos mediante la digestión con Proteínasa K. Se mezcla la muestra por inversión y se incuba a 70 °C durante 10 minutos. A continuación se utilizan microcolumnas con membranas de fibra de vidrio para la purificación, según el protocolo (Figura 11), y finalmente se eluye el ADN y se conserva a -20 °C.

Para comprobar que la extracción de ADN se realizó correctamente, se preparó un gel de agarosa al 1.5 %, en tampón TAE 1X (Anejo B.4). Se realizó la electroforesis del gel a 100 V durante 30 minutos. Al finalizar, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 15 minutos y la presencia de ADN se comprobó por visualización a la luz ultravioleta.

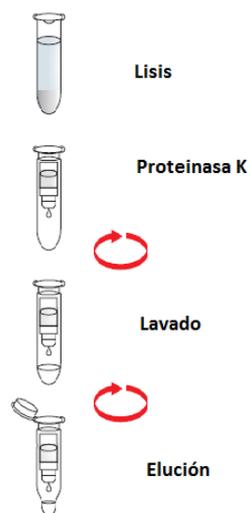


Figura 11: “Realpure Spin Food-Stool Bacteria kit” (Durviz, Paterna, España)

1.4.2. Iniciadores

Se seleccionaron 2 regiones para la detección específica de *H. pylori*. Para la amplificación de un fragmento de 398 pb del gen 16S ADN de *H. pylori* se emplearon los iniciadores HP1 y HP2 cuyas secuencias fueron descritas por Choi *et al.* (2001). El otro par de iniciadores, vacAR y vacAF, descritos por Nilsson *et al.* (2002), amplifican un fragmento de 394 pb del gen *vacA* de *H. pylori*.

Tabla 5: Secuencias de los iniciadores HP

Nomenclatura iniciadores 16S	Secuencias de nucleótidos
HP1	5'-CCT AAC CAA TTG AGC CAA GAA G-3'
HP2	5'-CTT TCT AAC ACT AAC GCC CTC A-3'

Tabla 6: Secuencias de los iniciadores vacA

Nomenclatura iniciadores vacA	Secuencias de nucleótidos
vacAF	5'-GGC ACA CTG GAT TTG TGG CA-3'
vacAR	5'- CTC TCG CTT GAT TGG ACA GA-3'

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) e *in vitro* mediante amplificación de las cepas de referencia mencionadas en la tabla 4.

1.4.3. Condiciones de amplificación de la PCR tradicional

Para la puesta a punto de todas las reacciones de PCR se probaron diversas concentraciones de MgCl₂ e iniciadores. Las concentraciones de MgCl₂ ensayadas fueron de 1, 1.5, 2, 3, y 4 mM y las concentraciones de iniciadores evaluadas fueron 0.2, 0.4, y 0.6 mM.

Cada una de las combinaciones de reactivos se ensayó bajo las condiciones de amplificación establecidas por Piqueres *et al.* (2006):

Tabla 7. Condiciones de la PCR para la detección de *H. pylori*

Nombre Programa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:mm:ss)
Desnaturalización.	1	95	0:05:00
Desnaturalización	33	94	0:01:00
Unión de iniciadores		57	0:01:00
Extensión del producto		72	0:01:00
Extensión Final		72	0:05:00
Enfriamiento	1	4	Continuo

Capítulo 1: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Residual

Tras la realización de los ensayos se estableció que la concentración de $MgCl_2$ óptima, a la que la amplificación presentaba mayor eficiencia visual y no aparecían bandas inespecíficas, era de 1.5 mM y las concentraciones de ambos pares de iniciadores, de 0.2 mM.

Finalmente se estableció para ambas reacciones de amplificación (HP1/HP2; vacAR/vacAF) las mismas concentraciones de reactivos: 2.5 μL de Tampón 10X (Anejo B.4), 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada iniciador, 0.5 mM de DNTPs, 5 U del enzima *Taq* polimerasa y 5 μL de ADN molde de cada muestra, en un volumen final de 50 μL .

En todos los casos, un volumen de 10 μL del producto resultante de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en tampón TAE 1X a 100 V durante 50 minutos. En los geles se incluyó un marcador de pesos moleculares (Anejo B.4) para poder estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados. Finalmente, los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz (UV) tras teñirlos con bromuro de etidio a una concentración del 1%.

En cada ensayo se incluyó un control negativo, en el que el ADN se reemplazó por agua ultrapura, y un control positivo, con ADN procedente de cepas de referencia de *H. pylori*.

1.4.4. Condiciones de amplificación mediante PCR a tiempo real (q-PCR)

Se emplearon los iniciadores vacAR/vacAF, ya que amplifican una secuencia con un tamaño que está dentro del rango óptimo para la PCR a tiempo real (100-500 pares de bases). Por otra parte, en el genoma de *H. pylori* se encuentra una única copia del gen *vacA*, lo que nos permite realizar una determinación cuantitativa.

1.4.4.1. Puesta a punto del método de q-PCR

Se procedió a la puesta a punto de la q-PCR evaluando diferentes temperaturas de unión de los iniciadores (desde 62 °C hasta 72 °C) y tiempos de extensión (desde 10 hasta 20 segundos) con ADN procedente de las cepas de referencia citadas en la tabla 4.

Para poner a punto el método de detección de *H. pylori* mediante PCR a tiempo real se siguieron los protocolos experimentales del manual "LightCycler Operator's Manual Version 4.05" (www.Roche-mb.com).

Unos valores se mantuvieron constantes para todos los protocolos de amplificación con LightCycler, mientras que otros dependían del ADN diana y de los iniciadores. Así pues, estos parámetros tuvieron que ser ajustados para la combinación específica ADN diana-iniciador usados en este proceso.

Se obtuvieron las curvas de fusión, que muestran el descenso brusco de la fluorescencia a una temperatura de fusión (T_m) determinada. Esto se debe a que la doble cadena de ADN se separa liberando las moléculas del agente intercalante SYBR Green I introducidas entre la misma durante los ciclos de amplificación (Figura 12). La temperatura de fusión indica el momento en que la mitad de las dos hebras de ADN independientes se encuentran unidas nuevamente formando ADN bicatenario después del proceso de desnaturalización y amplificación, coincidiendo con la liberación de la mitad de las moléculas de colorante de la doble cadena de ADN (Somma *et al.*, 1996). La T_m será la misma para todos los productos de PCR obtenidos con un determinado par de iniciadores, siendo ésta específica para el fragmento amplificado. El área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto de amplificación obtenido. Mediante SYBR-Green I se confirma la amplificación de la diana específica a través de este análisis, ya que cuando se obtienen varios productos se detectan varios picos con T_m diferentes, lo que proporciona la caracterización del producto amplificado.

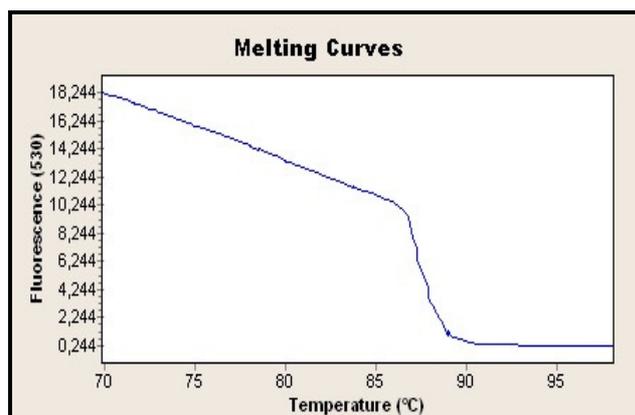


Figura 12. Curva de fusión: Descenso brusco de la fluorescencia

El software LightCycler 4.0 transforma los datos de fluorescencia de forma que muestra una representación visual más intuitiva de la temperatura de fusión.

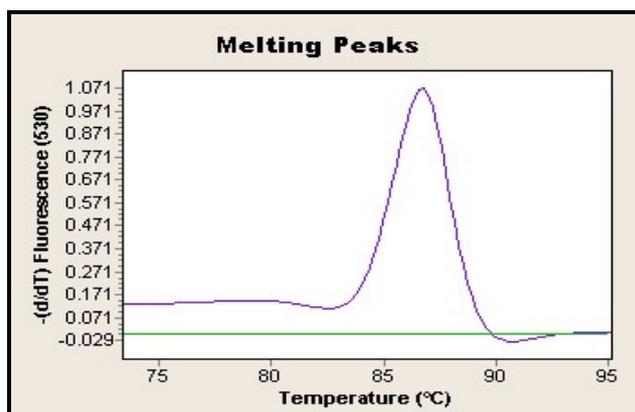


Figura 13. Representación del pico de fusión que muestra la T_m

Las condiciones óptimas de la q-PCR se establecieron probando diferentes concentraciones de iniciadores (0.2, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.8 mM) y de MgCl₂ (1, 2, 3, 4 y 5 mM). La reacción se llevó a cabo empleando el sistema comercial “LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I” (Roche, ref.: 03 003 230 001).

Finalmente, tras los ensayos con las diferentes condiciones de amplificación y concentraciones de reactivos estudiadas, se establecieron los siguientes parámetros como óptimos para la detección de *H. pylori* con los iniciadores vacA: 1.6 µL de MgCl₂ (50mM), 0.5 µL de cada uno de los iniciadores a 20 mM, 2 µL de la Master Mix (SYBR Green I) y 2 µL de ADN molde de cada muestra, en un volumen final de 20 µL. Estas condiciones se aplicaron posteriormente a las diferentes muestras analizadas en esta tesis.

Tabla 8. Condiciones de la q-PCR para la detección de *H. pylori*

Nombre Programa	Ciclos	Tipo análisis	Temperatura (°C)	Tiempo (h:mm:ss)	Rampa T ^a (°C/s)	Modo Adquisición
Desnat.	1	Ninguno	95	0:10:00	20	Ninguno
Amplif.	40	Cuantificación	95	0:00:10	20	Ninguno
			62	0:00:05	20	Ninguno
			72	0:00:16	20	Sencilla
Fusión	1	Curvas fusión	95	0:00:00	20	Ninguno
			72	0:00:15	20	Ninguno
			95	0:00:00	0.1	Continuo
Enfriam.	1	Ninguno	40	0:00:30	20	Ninguno

1.4.4.2. Análisis cuantitativo: Curva patrón para la cuantificación de *H. pylori*

Para realizar el análisis cuantitativo del ADN presente en las muestras es necesario definir una curva patrón. Para ello, se emplean valores de fluorescencia comparables de diferentes muestras con concentraciones conocidas, determinando los llamados puntos de corte (Ct, cycle threshold). Estos puntos de corte representan el número de ciclos en los que los niveles de fluorescencia son mayores a

la fluorescencia de fondo y se le puede asignar un valor. Este número de ciclos específicos (y por consiguiente el punto de corte) es dependiente de la cantidad inicial del ADN diana en la muestra. Con cantidades mayores de material inicial serán necesarios menos ciclos para alcanzar el valor específico de fluorescencia.

Existen dos métodos para realizar el análisis cuantitativo con el software del Light Cycler versión 4.05: el método "Fit Points" y método "Second Derivate Maximum". Ambos métodos están referidos a la fase logarítmica, ya que sólo esta fase permite asumir que las reacciones de PCR de todas las muestras ocurren bajo condiciones comparables. Ambos métodos son apropiados para la cuantificación, aunque emplean algoritmos ligeramente diferentes para el cálculo de los puntos de corte.

En este trabajo se realizó el análisis de la cuantificación por q-PCR mediante el método "Second Derivate Maximum". Éste permite un cálculo automático, no hay influencia del ruido de fondo, es más rápido y presenta una gran reproducibilidad. El usuario indica qué muestras va a emplear como patrones, y sus concentraciones respectivas. El programa automáticamente muestra la curva patrón (Figura 14) junto con la eficiencia de la reacción y el error cometido en su cálculo.

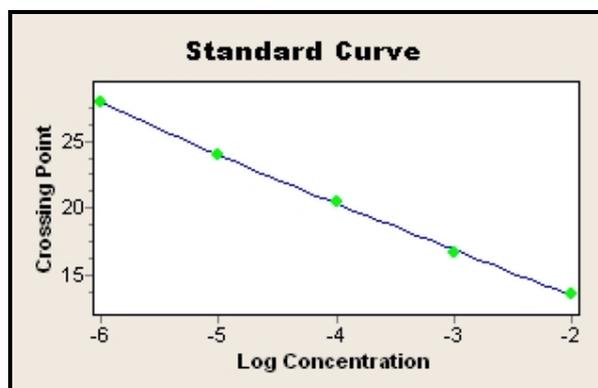


Figura 14. Curva patrón obtenida con el método "Second Derivate Maximum"

En la curva patrón, la concentración de las muestras patrón se enfrenta con los puntos de corte de las muestras. El eje de las X representa el logaritmo de la concentración inicial de ADN, y el eje de las Y representa el punto de corte para cada concentración, medido en ciclos. El valor del punto de corte (Ct) es inversamente proporcional a la concentración de ADN (Somma *et al.*, 1996).

La inclinación de la curva patrón indica la rapidez con la que la concentración de ADN aumenta con los ciclos de amplificación. Una reacción de amplificación teóricamente perfecta tendría una eficiencia de "2". En la práctica, las reacciones suelen tener una menor eficiencia.

Para la realización de la curva patrón se utilizó como inóculo una suspensión de un cultivo en fase exponencial de crecimiento de la cepa NCTC 11637 de *H. pylori*. Se realizó recuento en placa, mediante diluciones seriadas en ASC, para conocer su concentración inicial.

A partir de 1 mL del inóculo inicial se procedió a la extracción del ADN genómico (apartado 1.4.1). A continuación, se cuantificó el ADN mediante el sistema Nanodrop 1000® (Thermo Fisher Scientific, Alemania) y Qubit™ fluorometer® (Invitrogen, Turner BioSystems, España), siguiendo en ambos sistemas de medición las instrucciones del método comercial.

Tras la medición de la concentración de ADN se generaron diluciones seriadas y de cada una de ellas se realizó la q-PCR y se elaboró la curva patrón obteniéndose las concentraciones de ADN para los distintos valores de Ct.

El gen *vacA* es un gen constitutivo, presente en todas las cepas de *H. pylori*, que se encuentra en el cromosoma de *H. pylori* en una sola copia (Bernard *et al.*, 2005).

Se representaron gráficamente los puntos de corte con la concentración de ADN, obteniendo así las curvas patrón para la cuantificación, así como el límite de detección teórico del método.

Además, se calculó el número más probable de unidades genómicas de acuerdo con la cantidad medida de ADN, según Linke *et al.* (2010): el peso del genoma de *H. pylori* (1667.867pb) se calculó de acuerdo con el peso medio de pares de bases (1.096 E21 g/pb) para determinar el número más probable de genomas de *H. pylori* dentro de la cantidad medida del ADN.

$$\text{* Unidades genómicas (GU)} = \frac{\text{Concentración de ADN (fg)}}{\text{Masa genómica}^a}$$

^a En el caso de *H. pylori* para el gen *vacA*, este valor equivale a 1.76 fg

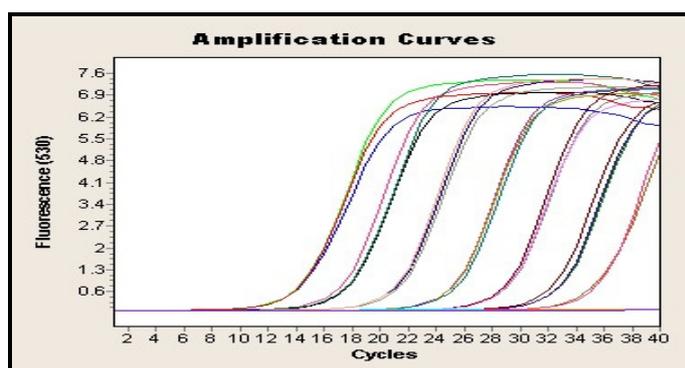


Figura 15. Curvas de amplificación de las distintas concentraciones de ADN de *H. pylori* mostrando tres réplicas de cada patrón

1.4.4.3. q-PCR de *Helicobacter pylori* a partir de muestras

A partir de las muestras directas, se realizó la q-PCR de acuerdo con las condiciones previamente establecidas. En cada reacción de amplificación se incluyó un control negativo en el que el ADN se reemplazó por agua ultrapura y un control positivo en el que el ADN procedía de cepas de referencia de *H. pylori*.

La especificidad de la reacción se comprobó con el cálculo de la T_m . Para los iniciadores *vacA* empleados la T_m calculada fue de 85 °C.

Los productos de q-PCR se recogieron de los capilares por centrifugación para analizarlos por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, en tampón TBE 1X a 100 V durante una hora y 30 minutos, comprobando la presencia de banda específica de los productos de amplificación de la q-PCR. Los geles se tiñeron con “GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain” (Biotium, Hayward CA. ref.: 41003) (Anejo B.4), colorante fluorescente de ácidos nucleicos con alta sensibilidad y estabilidad y con menor toxicidad que el bromuro de etidio. En los geles se incluyó un marcador de 100 pb de peso molecular con el fin de poder estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados.

Los productos de q-PCR de las muestras que dieron positivas en la amplificación también se confirmaron mediante secuenciación, tal y como se describen en el apartado 1.3.3 de este capítulo.

1.5. Detección e identificación mediante Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

Para la detección e identificación de *H. pylori* mediante Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes se realizó el protocolo establecido por Moreno *et al.* (2001), descrito a continuación:

1.5.1. Fijación de las muestras

Para llevar a cabo la fijación de las células se tomó una alícuota de 1 mL de muestra a analizar. A continuación se procedió a su centrifugación (8 minutos-8000 rpm). El precipitado se resuspendió en PBS 1X. Al tratarse de una bacteria Gram-negativa se añadió paraformaldehído (PFA, Anejo B.3) en proporción 1:3 y se mantuvo durante 3 horas a 4 °C. El propósito de este tratamiento es generar una delgada malla que mantiene la estructura interna celular y la cohesión tisular, puesto que el PFA establece enlaces covalentes con los grupos amino libres presentes en las proteínas y forma puentes cruzados entre sí y con las proteínas adyacentes. Su objetivo es detener el proceso autolítico de las células y conservarlas, en la medida de lo posible, en el estado en que se encontraban durante la vida.

Por lo tanto, es un método histológico destinado a facilitar la obtención de preparaciones duraderas que conserven su estructura morfológica.

A continuación se procedió a dos lavados de las muestras con PBS 1X para eliminar el PFA y, tras los mismos, se resuspendió el precipitado con etanol absoluto y PBS 1X en una proporción 1:1 y se almacenó a -20 °C (Moreno *et al.*, 2001).

1.5.2. Condiciones de hibridación

Un volumen de 5 µL de las muestras fijadas se depositó sobre los pocillos de los portaobjetos de hibridación, tratados previamente con gelatina (Anejo B.3). A continuación, se dejaron secar al aire, y se procedió a realizar tres deshidrataciones sucesivas, sumergiendo el portaobjetos en volúmenes de 100 mL de etanol a concentraciones de 50, 80 y 100 %, durante 3 minutos en cada uno.

Una vez secos, cada uno de los pocillos se cubrió con 10 µL de tampón de hibridación (0.9 M/L NaCl, 0.01 % SDS, 20 mM/L Tris-HCl y X% formamida, pH 7.6) (Anejo B.3) conteniendo 50 ng de sonda marcada con el correspondiente fluorocromo.

Para obtener una óptima hibridación, se pueden modificar las condiciones de hibridación para que éstas sean más astringentes. El nivel de astringencia se puede ajustar variando tanto la concentración de formamida o la temperatura de hibridación. La formamida tiene como función debilitar los puentes de hidrogeno de los duplex ADN-ADN y ADN-ARN, por lo que la unión entre las bases nucleicas debe ser altamente específica para evitar el desanillamiento.

El portaobjetos se introdujo en posición horizontal en un tubo de 50 mL, en el que se introdujo previamente una base de papel de celulosa humedecida con el mismo tampón de hibridación. La reacción se llevó a cabo a 46 °C y en oscuridad según Moreno *et al.* (2001). El tiempo de hibridación fue de 2 horas.

A continuación, se procedió al lavado del portaobjetos con una solución de lavado (20 mM/L Tris-HCl, 0.01 % SDS, 5mM/L EDTA) (Anejo B.3) atemperada a 48 °C, primero vertiendo una pequeña cantidad sobre el mismo para arrastrar el tampón de hibridación y a continuación, sumergiéndolo en 50

mL de la misma para eliminar el resto de sonda que no se hubiera unido al ARNr. El tiempo de lavado fue de 15 minutos, manteniéndose a 48 °C en oscuridad. Al tampón de lavado se le añadió una concentración de NaCl condicionada por el porcentaje de formamida utilizado en la hibridación (Anejo B.3).

Tras los 15 minutos de lavado, los portaobjetos se lavaron con agua ultrapura y se secaron al aire en oscuridad. A continuación, se montaron con FluoroGuard Antifade Reagent® (Bio-Rad) (Anejo B.3), entre cubre y portaobjetos, para reducir la pérdida de fluorescencia de las sondas cuando la muestra está siendo visionada, y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Las fotografías se realizaron con la cámara DP-10 de Olympus.

1.5.3. Sondas de hibridación

En todas las hibridaciones se empleó una combinación de tres sondas EUB338 (Tabla 9), complementarias de una región del ARNr 16S del dominio *Eubacteria* como control positivo, ya que hibridan con todas las bacterias que pueden estar presentes en una muestra (Amann *et al.*, 1995).

Tabla 9. Secuencias de las sondas EUB338-I-I-III

Nomenclatura Sondas EUB338	Secuencia de nucleótidos
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'

Capítulo 1: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Residual

Las sondas EUB338 fueron sintetizadas y marcadas por TIB MOLBIOL (Berlin, Alemania), con tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate (TRICT), que emite en el espectro del rojo (520 nm), o con 5 (6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide éster (FLUOS), que emite en el espectro del verde (495 nm).

SONDA HPYL. Para la detección de *H. pylori* mediante hibridación *in situ*, se empleó la sonda HPYL diseñada por Moreno *et al.* (2001), complementaria a una región específica del ARNr 16S. La secuencia de la sonda es la siguiente:

Tabla 10. Secuencia de la sonda HPYL

Nomenclatura Sondas	Secuencia de nucleótidos
HPYL	5'-CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC-3'

Para aumentar la eficiencia de la reacción de hibridación, se diseñó una sonda LNA basada en la misma secuencia, sintetizada por EXIQON (Woburn, USA):

Tabla 11. Secuencia de la sonda HPYL-LNA

Nomenclatura Sondas	Secuencia de nucleótidos
HPYL-LNA	5'-CTG GAG AGA C+TAA GCC C+TCC-3'

La concentración de formamida añadida a la solución de hibridación tanto para la sonda HPYL como la HPYL-LNA fue del 30%.

En la detección de genes de resistencia a la claritromicina, la combinación de sondas utilizadas en el proceso fueron la sonda específica HPYL-LNA, para determinar la presencia de *H. pylori*, y el mix

CLAR, constituido por las sondas CLAR-I, CLAR-II y CLAR-III (Trebesius *et al.*, 2000) para la detección de las mutaciones en el 23S que le dotan de resistencia al antibiótico. El porcentaje de formamida utilizado fue del 30 %.

Tabla 12. Secuencias de las sondas CLAR-I-II-III

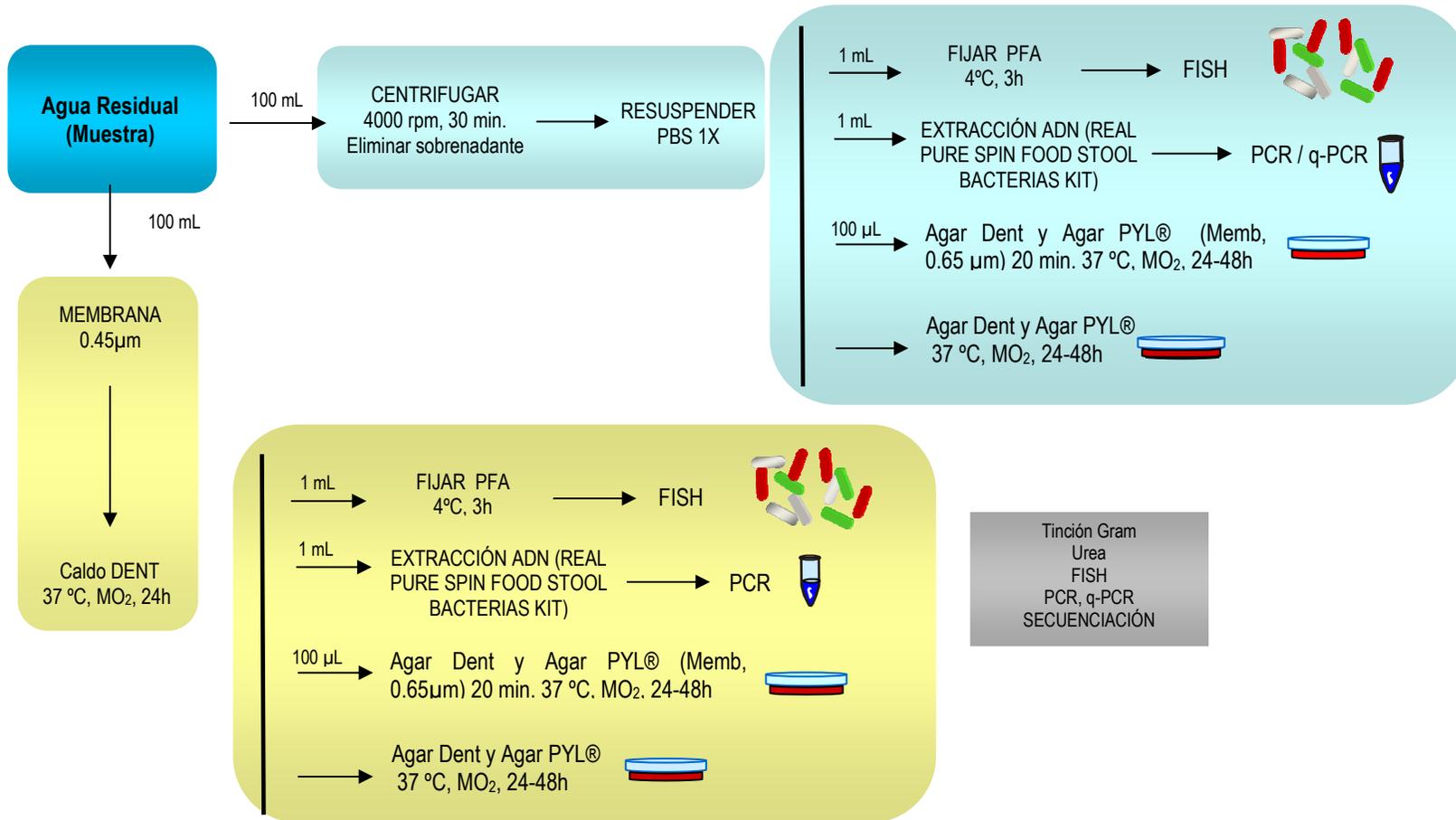
Nomenclatura Sondas	Secuencia de nucleótidos
CLAR-I	5'-CGG GGT CTT CCC GTC TT-3'
CLAR-II	5'-CGG GGT CTC TCC GTC TT-3'
CLAR-III	5'-CGG GGT CTT GCC GTC TT-3'

1.5.4 FISH de *H. pylori* a partir de muestras

La hibridación *in situ* con sondas fluorescentes se realizó a partir de alícuotas de 1 mL de las muestras a analizar, directas y enriquecidas, siguiendo el protocolo descrito previamente en este capítulo. La hibridación se llevó a cabo con las sondas EUB338 I-II-III y HPYL-LNA, según el protocolo descrito en el apartado 1.5.2.

En cada proceso de hibridación se incorporó en un pocillo del portaobjetos gelatinizado células fijadas de la cepa NCTC 11637 de *H. pylori* como control positivo.

Para la detección de cepas de *H. pylori* que presentaran en sus genes 23S ARNr mutaciones de resistencia a la claritromicina, se realizó la hibridación de las muestras con las sondas HPYL-LNA y el mix CLAR I-II-III, a una concentración de formamida de 30 %. Del mismo modo que en los ensayos anteriores, en cada hibridación se incorporó como control positivo la cepa NCTC 11637, que presenta en el 23S ARNr la mutación de resistencia a la claritromicina (UK Standards for Microbiology Investigations, 2015).



Protocolo 1. Detección de *H. pylori* en agua procedente de depuradora, mediante técnicas moleculares y cultivo

2. RESULTADOS

2.1. Aislamiento e identificación de *H. pylori* por cultivo

Cuando se evaluaron los medios de cultivo específicos, se observó crecimiento de colonias de *H. pylori* en todas las placas, tanto en los medios de cultivo Agar Dent ($2-3.1 \times 10^5$ ufc/100 mL) y Agar Dent modificado con SFB 5 % ($4-3.6 \times 10^4$ ufc/100 mL) como en el medio Agar Pylori® (Biomèrieux, Francia) ($1.6-2.4 \times 10^5$ ufc/100 mL). La concentración del inóculo inicial desde el que se realizaron las siembras fue de 10^7 ufc/mL.

Los resultados obtenidos tras el recuento de colonias sobre la superficie de los medios de cultivo, mostraron que, tanto en el medio Agar Dent como en Agar Pylori® se recuperaba un orden logarítmico más que en las placas con el medio Agar Dent modificado con SFB 5 %. Por esta razón todos los aislamientos a partir de muestras se realizaron en Agar Dent y Agar Pylori® con dos metodologías de siembra diferentes.

De la muestra M1 a la M21 se realizó siembra en triple estría sobre los medios selectivos mencionados. A partir de las muestras directas no se obtuvieron colonias sospechosas. Sin embargo, tras el enriquecimiento de las muestras se observaron en Agar Dent a partir de 3 muestras, 5 presuntas colonias de *H. pylori*. Estas colonias presentaban un velo de crecimiento de microbiota acompañante que imposibilitó la purificación de las mismas en resiembras posteriores en ASC. *H. pylori* se pudo identificar a partir de las colonias originales, mediante tinción Gram, prueba de la ureasa y FISH del cultivo mixto.

Ya que el protocolo utilizado para el análisis de las muestras M1 a la M21 no resultó efectivo para el aislamiento de la bacteria, de la muestra M22 a la M60 la metodología de siembra fue mediante el uso de membrana, tal como se describe en el apartado 1.3.2., con ambos medios selectivos.

Se identificaron 10 colonias sospechosas de *H. pylori* a partir de 7 muestras directas: en Agar Pylori se obtuvieron 6 colonias, pertenecientes a 4 muestras; y desde Agar Dent, las 4 colonias restantes, que pertenecían a 3 muestras (Tabla 13). Tras enriquecimiento se observó una única y presunta colonia a partir de Agar Pylori, que correspondía a la muestra M26, procedente de la salida del reactor biológico (Tabla 13).

Las resiembras en ASC para la purificación de las colonias presentaban menor crecimiento de microbiota acompañante, por lo que fue posible recoger cultivo para la posterior purificación, identificación por PCR y congelación en viales con glicerina a -80 °C. La identificación de *H. pylori* se realizó de nuevo mediante tinción Gram, prueba de la ureasa y FISH a partir de las colonias del cultivo mixto.

2.1.2. Identificación de las colonias

2.1.2.1. Identificación fenotípica

Las 5 presuntas colonias obtenidas mediante siembra en triple estría, a partir de Agar Dent (Figura 16), a pesar de la contaminación presentaban características típicas de las colonias de *H. pylori*; esto es, colonias translúcidas con un diámetro entre 1-2 mm. En la tinción Gram de todas ellas se pudo observar la presencia de bacilos Gram-negativos, cortos, con forma helicoidal y recta, morfología que se corresponde con la del género *Helicobacter*. La prueba de la ureasa fue negativa para todas las colonias.

Las 11 colonias sospechosas obtenidas mediante siembra sobre membrana presentaron también las características típicas de colonias de *H. pylori*. Tras tinción Gram se observaron bacilos Gram-negativos con la morfología ya descrita del género *Helicobacter*. La prueba de la ureasa fue positiva para dos de las colonias.

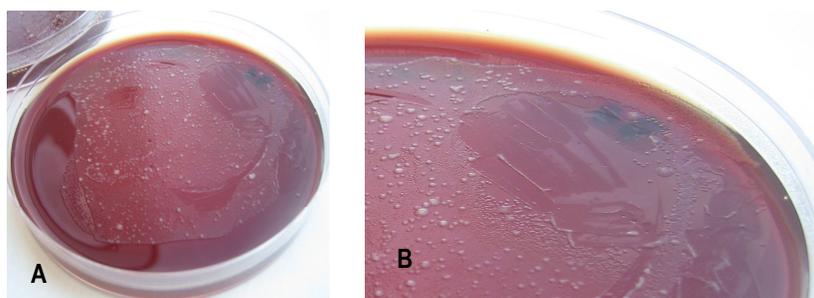


Figura 16. Colonias de *H. pylori* sobre Agar Dent (A). Detalle de las colonias (B).

2.1.2.2. Identificación genotípica

FISH: Se procedió a la detección e identificación de *H. pylori* a partir de los 16 cultivos mixtos que incluían las colonias características del patógeno y en los que se había determinado la presencia de bacterias Gram-negativas con su morfología típica, mediante la técnica FISH. Para ello se fijaron y se hibridaron con las sondas HPYL-LNA y EUB 338. Tras la observación al microscopio de epifluorescencia se confirmó que las 5 colonias obtenidas por siembra en triple estría y las 11 mediante siembra sobre membrana contenían células de *H. pylori* (Figura 17 y 18), por lo que se confirmó mediante dicha técnica que todas las colonias características, a pesar de no poder purificarse, pertenecían a *H. pylori*.

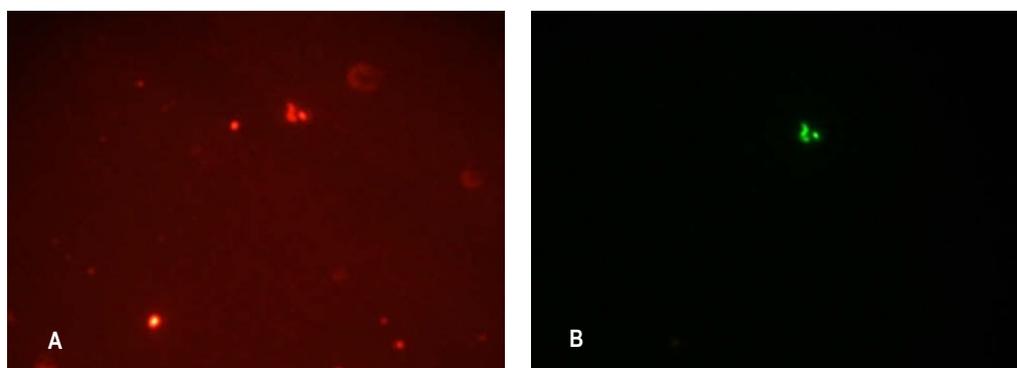


Figura 17. Identificación de *H. pylori* en la muestra directa M31, siembra sobre membrana. Hibridación con la sonda EUB 338 (A). Hibridación con la sonda HPYL-LNA (B)

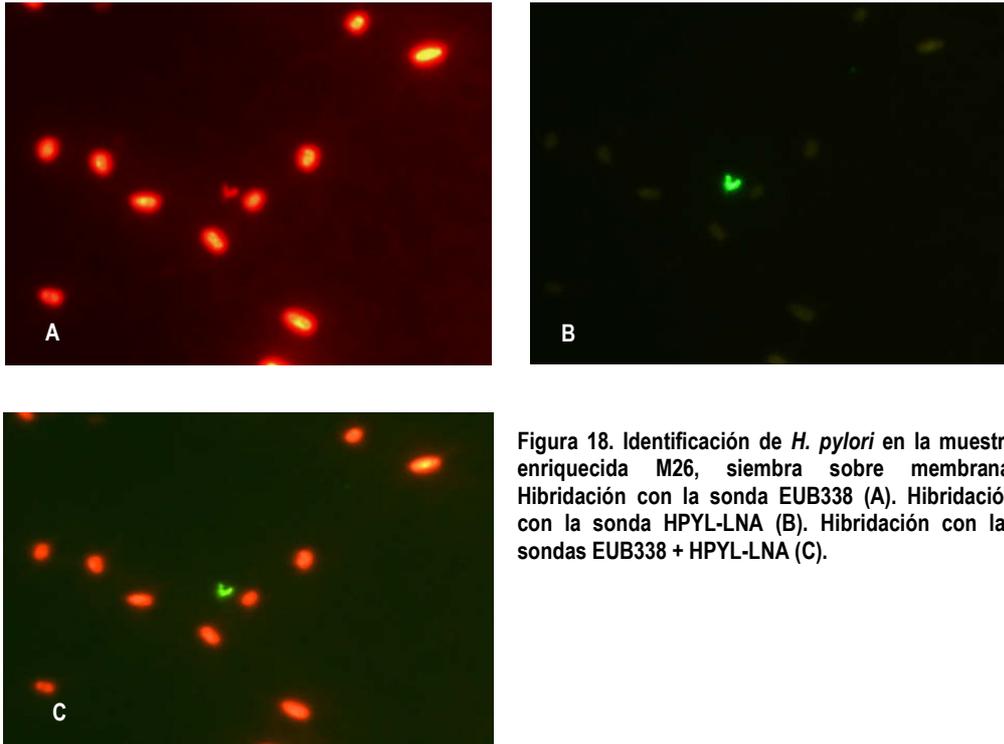


Figura 18. Identificación de *H. pylori* en la muestra enriquecida M26, siembra sobre membrana. Hibridación con la sonda EUB338 (A). Hibridación con la sonda HPYL-LNA (B). Hibridación con las sondas EUB338 + HPYL-LNA (C).

PCR. Se analizaron por PCR las 16 colonias obtenidas. Se observó que sólo en 5 de las colonias (31,3 %) se amplificaba el fragmento de 394 pb específico de *H. pylori* (Figura 19). Las colonias identificadas procedían de muestras directas, con metodología de siembra sobre membrana, concretamente M31 y M40 de la entrada del reactor biológico y M41 de la salida de éste (Tabla 13).

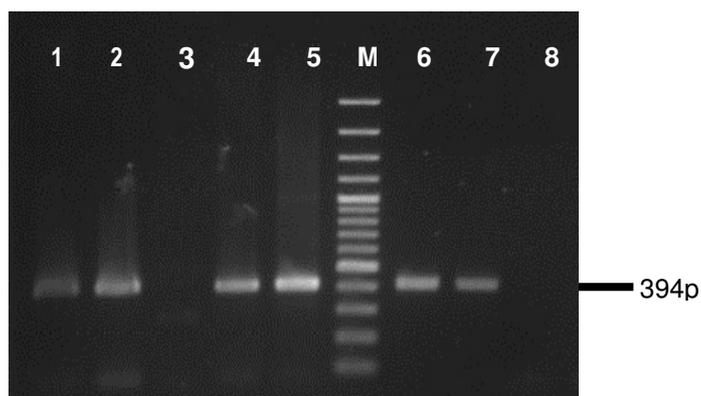


Figura 19. Identificación de los aislados de *H. pylori* por PCR. 1:M31; 2: M40; 4: M40; 5:M41; M: Marcador 100 pb; 6: M41; 7: Control positivo; 8: Control negativo.

Para confirmar definitivamente los resultados obtenidos mediante PCR se realizó la purificación del producto de amplificación, tal y como se describe en el apartado 1.3.3 de material y métodos de este mismo capítulo, y se secuenció. Los resultados obtenidos verificaron, tras el alineamiento de la secuencia del producto con las secuencias contenidas en las bases de datos del Gen Bank mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), que el fragmento amplificado a partir de todas las muestras, presentaba una homología con el gen *vacA* que codifica la proteína vacuolizante de *H. pylori* en un 99-100 %.

Tabla 13. Identificación de las colonias de *H. pylori*

MUESTRA	COLONIAS	UREA	FISH	PCR	SECUENCIACIÓN
M11	HcDT	--	Positivo	ND	ND
M11	HcDT	--	Positivo	ND	ND
M18	HcDT	--	Positivo	ND	ND
M18	HcDT	--	Positivo	ND	ND
M20	HcDT	--	Positivo	ND	ND
M22	HaPM	--	Positivo	ND	ND
M25	HaDM	--	Positivo	ND	ND
M26	HcPM	--	Positivo	ND	ND
M27	HaDM	Positivo	Positivo	ND	ND
M28	HaPM	--	Positivo	ND	ND
M28	HaPM	--	Positivo	ND	ND
M31	HaPM	Positivo	Positivo	Positivo	100%
M40	HaPM	--	Positivo	Positivo	100%
M40	HaPM	--	Positivo	Positivo	99%
M41	HaDM	--	Positivo	Positivo	100%
M41	HaDM	--	Positivo	Positivo	100%

Nomenclatura de las colonias: H: *Helicobacter pylori*; a: muestra directa; c: muestra tras enriquecimiento; P: Agar Pylori®; D: Agar Dent; T: siembra en triple estría; M: siembra sobre membrana de 0.65 µm; ND: no detectado

2.2. Detección e identificación de *H. pylori* mediante PCR

2.2.1. Detección mediante PCR tradicional

Como se describe en el apartado 1.4.3, para la detección específica de *Helicobacter pylori* se utilizaron los iniciadores HP1 y HP2, mediante los cuales no se consiguió ningún resultado positivo, tanto de muestras directas como de muestras enriquecidas. Para mejorar la efectividad de la reacción se incluyó en los reactivos de la PCR seroalbúmina bovina (BSA) con el fin de aumentar la estabilidad de la enzima Taq-polimerasa en presencia de inhibidores. No se obtuvo cambio alguno en los resultados, dando todas las muestras negativas por PCR con los iniciadores HP1 y HP2.

La utilización de los iniciadores vacAR/vacAF, sin embargo, generó resultados positivos (Figura 20): Se detectó ADN de *H. pylori* en 3 de las muestras directas: dos correspondían a la entrada del reactor biológico y la restante al punto de recogida después del tratamiento terciario. Tras el enriquecimiento de las muestras, 5 de ellas fueron positivas. Tres de éstas correspondían a la entrada del reactor biológico, y habían resultado negativas previamente al enriquecimiento; una a la salida y la restante, a una muestra recogida tras el tratamiento terciario. Únicamente se detectó ADN de *H. pylori* tanto en su muestra directa como enriquecida en la muestra M49, correspondiente a la entrada del reactor. Por tanto el porcentaje de detección mediante PCR de *H. pylori* fue del 15 % (9/60).

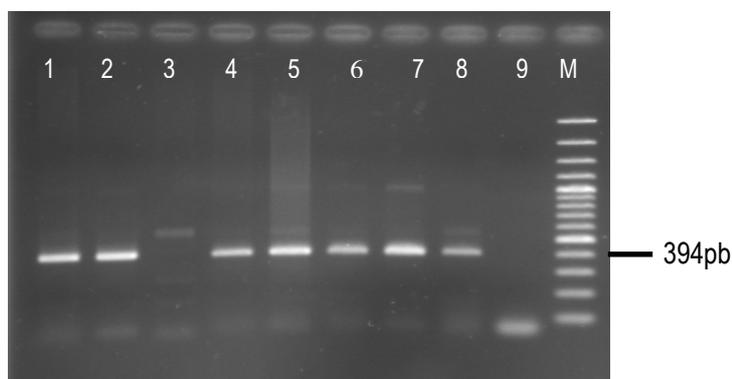


Figura 20. Detección de *H. pylori* en muestras de agua residual enriquecidas (PCR). 1: M5; 2: M24; 4: M28; 5: M31; 6: M34; 7: M49; 8 Control positivo; 9: Control negativo; M: Marcador de 100 pb.

2.2.2. Detección mediante q-PCR

En el análisis mediante q-PCR con los iniciadores vacAR/vacAF se detectó la presencia de *H. pylori* en 9 muestras directas (Tabla 16). Seis de las muestras positivas procedían de la entrada del reactor, 2 muestras de la salida de éste y la restante tras el tratamiento terciario. Todas las muestras presentaron la T_m específica de *H. pylori* para los iniciadores vacA. El porcentaje de detección mediante q-PCR de *H. pylori* fue del 15% (9/60). Se realizó la secuenciación de todos los productos de PCR de las 9 muestras positivas. El alineamiento de la secuencia del producto con las secuencias contenidas en las bases de datos del Gen Bank mediante el programa BLAST (Stephen *et al.*, 1997)

permitió verificar que el fragmento amplificado a partir de todas las muestras presentaba una homología del 99-100 % con el gen *vacA* de *H. pylori*.

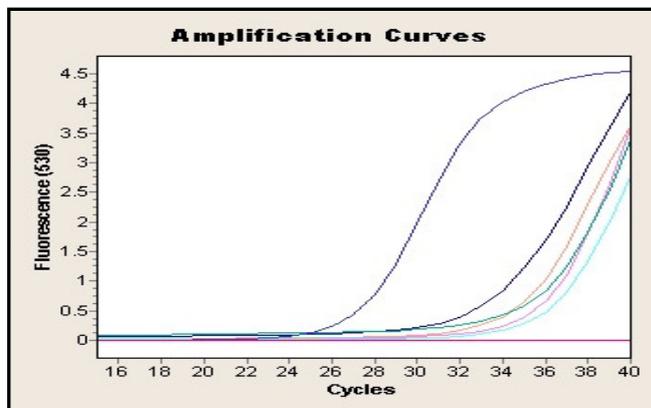


Figura 21. Curvas de amplificación del gen *vacA* de *H. pylori* en muestras de agua residual

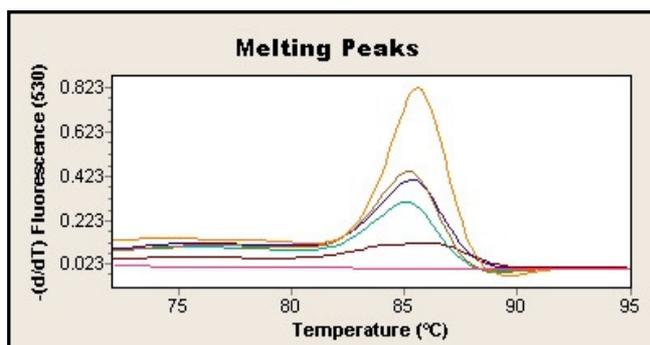


Figura 22. T_m de los iniciadores *vacA*, en muestras de agua residual

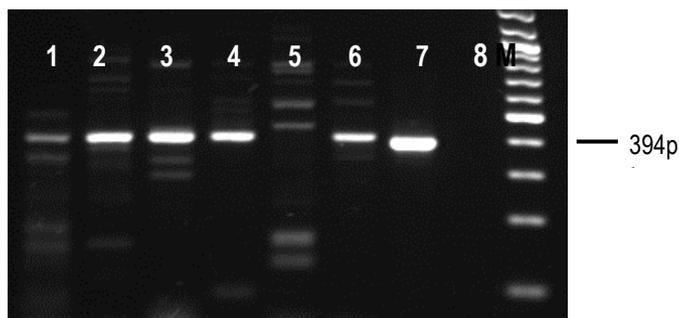


Figura 23. Detección directa de *H. pylori* en muestras (q-PCR). 1: M27; 2: M28; 3: M29; 4: M31; 6: M40; 7 Control positivo; 8: Control negativo; M: Marcador de 100 pb.

En 3 de las muestras positivas se cuantificó la concentración de ADN de *H. pylori* en equivalentes genómicos. Las cuantificaciones de las 3 muestras se encontraban en el orden logarítmico de un $\log/\mu\text{L}$, siendo estas 1.8×10 ; 1.5×10 y 6.3×10 unidad genómicas (Tabla 16).

En las muestras restantes positivas la concentración se encontraba por debajo del límite de detección de la técnica y no se pudo cuantificar la presencia de *H. pylori*, ya que el valor del Ct estaba por encima del umbral de fiabilidad (>35 ciclos).

2.3. Detección e identificación de *H. pylori* mediante FISH

A pesar de que la especificidad de las sondas HPYL (Moreno *et al.*, 2003) había sido ensayada en estudios anteriores, presentando señal positiva sólo con la especie *H. pylori*, su especificidad se constató de nuevo con cepas de referencia (Tabla 4).

La sonda HPYL presentaba un nivel de fluorescencia bajo y una pérdida rápida de fluorescencia durante la visualización en el microscopio de epifluorescencia. Por ello, se diseñó una sonda LNA, que resultó igual de específica a una concentración de formamida del 30 % y generó mayor intensidad de fluorescencia.

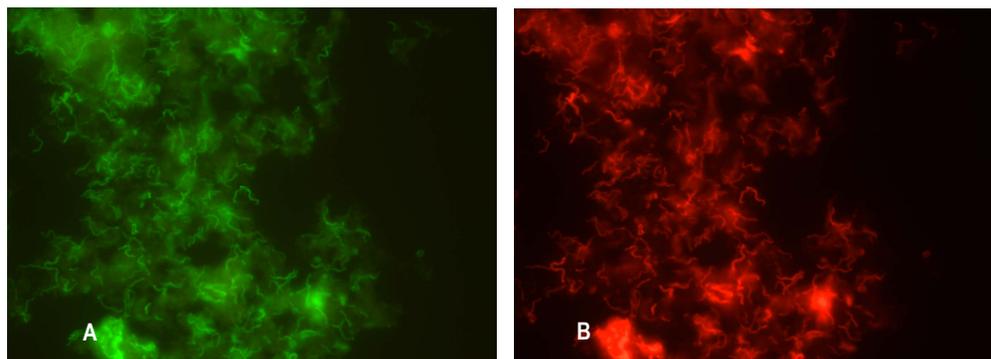


Figura 24. Hibridación con sondas HPYL-LNA de *H. pylori* (controles positivos). Hibridación de la cepa NCTC 11637 de *H. pylori* con sondas HPYL-LNA marcadas con fluoróforos FAM (A). Hibridación de la cepa NCTC 11637 de *H. pylori* con sondas EUB338- I-II-II marcadas con fluoróforo CY3 (B).

El análisis mediante FISH mostró la presencia de *H. pylori* en 37 de las 60 muestras directas (Figura 25; Tabla 16), 15 procedentes de la entrada al reactor biológico, 11 de su salida y 11 procedentes del tratamiento terciario (Tabla 16). El porcentaje de detección por FISH fue del 61.6 % (37/60) en las muestras directas.

A partir de las muestras enriquecidas en caldo Dent no se obtuvieron mejores resultados, ya que tras el enriquecimiento las muestras presentaban una alta carga microbiana (Figura 26) que enmascaraba la posible presencia de las células de *H. pylori*. Se observaron únicamente 4 muestras positivas de las 60 ensayadas. Dos de ellas correspondientes a la entrada del reactor, una a la salida de éste y la restante a la salida del tratamiento terciario. El porcentaje de detección en este caso fue del 6.66 % (4/60).

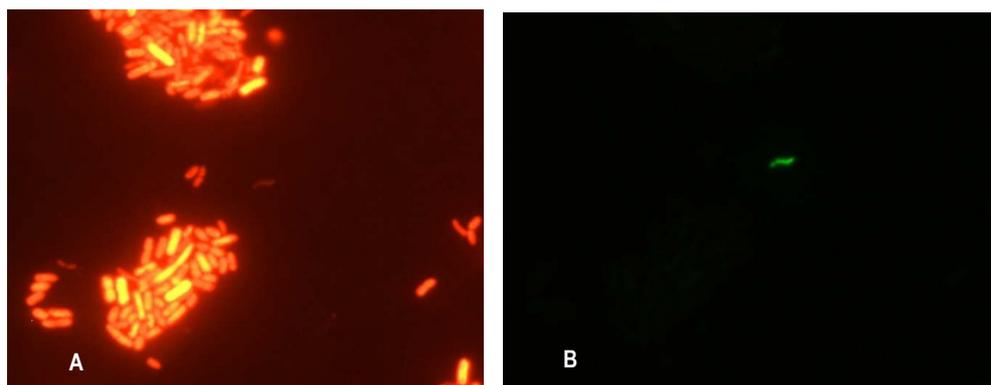


Figura 25. Detección directa de *H. pylori* en muestra por FISH. Sondas EUB338 (A). Sonda HPYL-LNA específica para *H. pylori* (B).

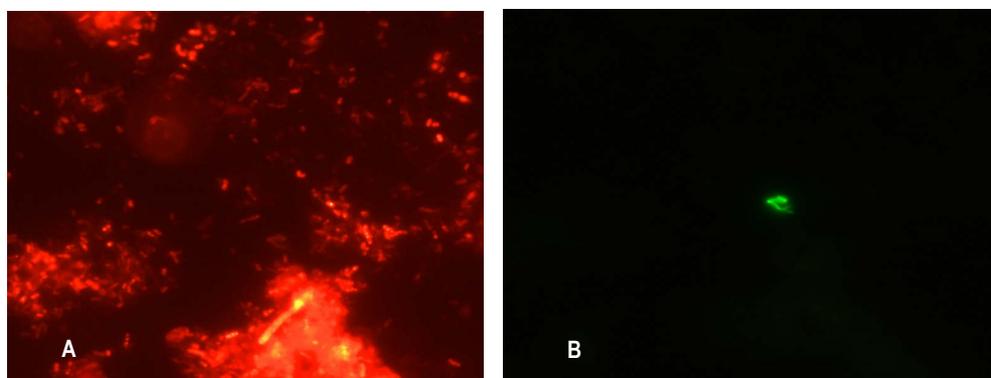


Figura 26. Detección de *H. pylori* en muestra enriquecida por FISH. Sondas EUB338 (A). Sonda HPYL-LNA específica para *H. pylori* (B).

2.3.1. Detección de *H. pylori* resistente a la claritromicina mediante FISH

A partir de las muestras positivas con la sonda HPYL-LNA se comprobó si las células detectadas presentaban resistencia a la claritromicina. Para ello se realizó la hibridación con las sondas CLAR I-II-III (claR mix), con una concentración de formamida del 30 %.

Todas las hibridaciones se realizaron a partir de muestras directas, donde se había observado previamente una mayor eficiencia en la detección de *H. pylori* por FISH. En 25 de las muestras positivas para *H. pylori* la hibridación con las sondas específicas de las regiones que presentaban las mutaciones en el gen 23S que determinan la resistencia, también resultó positiva. El porcentaje de muestras con resistencia a la claritromicina fue, por tanto, del 41.6 % (25/60) del total analizado.

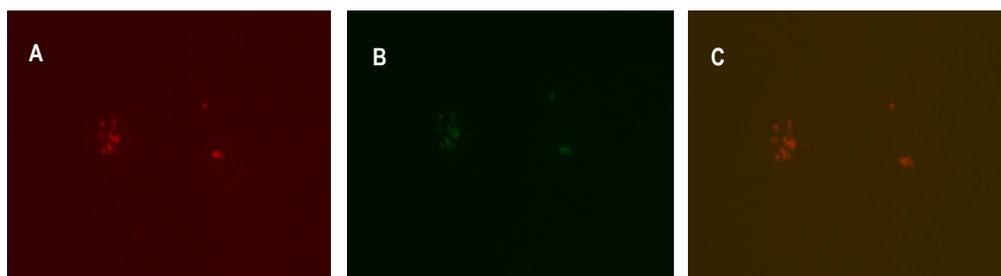


Figura 27. Detección de *H. pylori* resistente a la claritromicina por FISH. Hibridación con sondas claR mix (A). Hibridación con sonda HPYL-LNA (B). Hibridación con sondas HPYL-LNA y claR mix (C).

2.4. Eficiencia de los métodos moleculares FISH, PCR y q-PCR y cultivo en la detección de *H. pylori* en muestras de agua residual.

H. pylori fue detectado en el 61.6 % de las muestras de agua directas cuando fue utilizada la técnica FISH como método de detección. Cuando el análisis se llevó a cabo sobre las muestras enriquecidas en caldo Dent, el número de positivos por esta misma técnica disminuyó considerablemente al 6.6 % (4/60).

Mediante cultivo, el porcentaje de detección en muestras directas fue del 11.6 % (7/60) y tras enriquecimiento, del 6.6 % (4/60).

La detección mediante q-PCR de *H.pylori* fue positiva en un 15 % de las muestras directas. La PCR tradicional mostró unos porcentajes de detección del 6.6 % en muestras directas y un 10 % tras enriquecimiento.

Capítulo 1: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Residual

H. pylori fue detectado en 44 muestras de las 60, independientemente del método de detección empleado. Concretamente 17 muestras de la entrada del reactor biológico (28.3 %), otras 15 de la salida del mismo (25 %) y 12 tras el tratamiento terciario (20 %) (Tabla 16).

Tabla 14: Resultados de la detección directa de *H. pylori* en muestras de agua residual según la técnica empleada

Muestras Directas (Positivos/Totales)				
Origen	FISH	PCR	q-PCR	Cultivo
Entrada reactor biológico	15/20 (75 %)	3/20 (15 %)	6/20 (30 %)	5/20 (25 %)
Salida reactor biológico	11/20 (55 %)	0/20 (0 %)	2/20 (10 %)	1/20 (5 %)
Salida desinfección UV	11/20 (55 %)	1/20 (5 %)	1/20 (5 %)	1/20 (5 %)
Totales	37/60 (61.6 %)	4/60 (6.6 %)	9/60 (15 %)	7/60 (11.6 %)

Tabla 15: Resultados de la detección tras enriquecimiento de *H. pylori* en muestras de agua residual según la técnica empleada

Muestras Enriquecidas (Positivos/Totales)			
Origen	FISH	PCR	Cultivo
Entrada reactor biológico	2/20 (10 %)	4/20 (20 %)	0/20 (0%)
Salida reactor biológico	1/20 (5 %)	1/20 (5 %)	3/20 (15%)
Salida desinfección UV	1/20 (5 %)	1/20 (5 %)	1/20 (5%)
Totales	4/60 (6.6 %)	6/60 (10 %)	4/60 (6.6%)

TABLA RESULTADOS TOTALES EN AGUAS RESIDUALES

Tabla 16: Detección de *H.pylori* mediante FISH, PCR, q-PCR y cultivo en muestras de agua residual

MUESTRA	PUNTO	DIA FILTRADO	FISH				PCR		q-PCR	CULTIVO	
			DIRECTA	RTO. DIRECTA (ufc/100mL)	Claritromicina	ENRIQ.	DIRECTA	ENRIQ.	DIRECTA (GU/mL)	DIRECTA	ENRIQ.
M1	E	11/5/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2	S		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3	T		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4	E	25/5/2011	*	4.6 x 10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M5	S		*	8.1 X10 ⁴	*	-	-	*	-	-	-
M6	T		*	6.9 X10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M7	E	17/6/2011	*	4.6 x 10 ⁴	*	*	-	-	-	-	-
M8	S		*	6.9 X10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M9	T		*	4.6 x 10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M10	E	1/7/2011	*	4.6 x 10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M11	S		-	-	-	-	-	-	-	-	*
M12	T		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M13	E	15/7/2011	*	6.9 x10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M14	S		*	4.6 X10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M15	T		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M16	E	9/9/2011	*	3.4 X10 ⁴	*	*	-	-	-	-	-
M17	S		-	-	-	*	-	-	-	-	-
M18	T		*	1,2X10 ⁴	*	*	-	-	-	-	*
M19	E	29/9/2011	*	4.6 x 10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M20	S		-	-	-	-	-	-	-	-	*
M21	T		*	4.6 X10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M22	E	21/10/2011	*	6x10 ³	*	-	-	-	-	*	-
M23	S		*	3.6x10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M24	T		ND	-	-	-	-	*	-	-	-
M25	E	5/11/2011	-	-	-	-	-	-	-	*	-
M26	S		-	-	-	-	-	-	-	-	*

Continuación Tabla 16			FISH				PCR		q-PCR	CULTIVO	
MUESTRA	PUNTO	DIA FILTRADO	DIRECTA	RTO. DIRECTA (ufc/100mL)	Clarithromicina	ENRIQ.	DIRECTA	ENRIQ.	DIRECTA (GU/mL)	DIRECTA	ENRIQ.
M27	T		*	-	-	-	*	-	*	*	**
M28	E	4/11/2011	*	3x10 ⁴	-	-	-	*	18,35	*	-
M29	S		*	1.8x10 ⁴	-	-	-	-	13,92	-	-
M30	T		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M31	E	18/11/2011	*	5x10 ³	-	-	-	*	*	*	-
M32	S		*	4.8x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-
M33	T		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M34	E	2/12/2011	*	1.2x10 ⁴	*	-	-	*	-	-	-
M35	S		*	1.8x10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M36	T		*	1.8x10 ⁴	*	-	-	-	-	-	-
M37	E	16/12/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M38	S		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M39	T		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M40	E	19/11/2011	*	-	*	-	-	-	*	*	-
M41	S		*	-	*	-	-	-	-	*	-
M42	T		*	-	*	-	-	-	-	-	-
M43	E	3/12/2011	*	<10 ³	-	-	-	-	-	-	-
M44	S		*	3.6x10 ⁴	*	-	-	-	63,63	-	-
M45	T		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M46	E	17/12/2011	*	6x10 ³	*	-	-	-	*	-	-
M47	S		*	1x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-
M48	T		*	1.8x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-
M49	E	13/1/2012	ND	-	-	-	*	*	*	-	-
M50	S		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M51	T		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M52	E	3/2/2012	*	-	-	-	*	-	-	-	-
M53	S		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M54	T		*	-	-	-	-	-	-	-	-
M55	E	14/1/2012	*	-	-	-	*	-	*	-	-
M56	S		*	-	*	-	-	-	-	-	-

Continuación Tabla 16

MUESTRA	PUNTO	DIA FILTRADO	FISH				PCR		q-PCR	CULTIVO	
			DIRECTA	RTO. DIRECTA (ufc/100mL)	Claritromicina	ENRIQ.	DIRECTA	ENRIQ.	DIRECTA (GU/mL)	DIRECTA	ENRIQ.
M57	T		*	-	-	-	-	-	-	-	-
M58	E	4/2/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M59	S		-	-	-	-	-	-	-	-	-
M60	T		*	-	*	-	-	-	-	-	-

E: Entrada Reactor (Tras el tratamiento primario)
 S: Salida Reactor (Tras el tratamiento secundario)
 T: Salida del Terciario (Tras el tratamiento de UV)

-: Negativo (Ausencia)
 *: Positivo (Presencia)
 ND: no detectado

3. DISCUSIÓN

Las políticas medioambientales están avanzando hacia una reutilización de los recursos hídricos, sobre todo en zonas donde la escasez de agua es cada vez más evidente. En España el uso de las aguas depuradas está regulado por el Real Decreto 1620/2007 en el que “se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas”. En este se contempla el uso de este tipo de aguas para el riego de cultivos. El aprovechamiento del agua depurada para el riego se muestra como una alternativa muy eficaz, siempre que se mejoren los tratamientos en las depuradoras con un posterior paso de desinfección ya que, en caso contrario, ésta se convertiría en un potencial vehículo de transmisión de los patógenos presentes en la misma a través del riego. En el caso de *H. pylori*, está demostrado que sobrevive en las hortalizas que han sido irrigadas con aguas contaminadas con éste patógeno durante largos periodos de tiempo (Piqueres *et al.*, 2006), entrañando un importante riesgo para la salud.

Con el fin de poder establecer la capacidad de supervivencia *H. pylori* al tratamiento de depuración, este trabajo se ha centrado en detectar *H. pylori* en diferentes puntos de una EDAR: la entrada del reactor biológico, la salida de éste y tras la desinfección con radiación ultravioleta. El primero de los puntos de muestreo nos indicaba la presencia inicial del patógeno, el segundo establecía la eficiencia de la depuración biológica en los reactores y el tercero nos proporcionaba información sobre la eficiencia del tratamiento terciario de desinfección con radiación UV.

El agua residual contiene una cantidad de sólidos en suspensión y heterogeneidad de microorganismos elevada, por lo que se hace necesario implementar o tratar este tipo de muestras con metodologías para facilitar la recuperación y el aislamiento de las bacterias en estudio. Uno de los grandes problemas del aislamiento de *H. pylori* a partir de aguas residuales es que, aunque se encuentre presente en las muestras, al ser de crecimiento lento y no existir un medio de cultivo lo suficientemente selectivo, las colonias de éste quedan cubiertas por el crecimiento de la microbiota acompañante. Además, esta bacteria se encuentra en porcentajes muy bajos en este tipo de muestras, por lo que se hace necesaria la concentración de las mismas.

En la actualidad no existe una metodología estándar para el procesado de muestras de agua residual, además de no existir obligatoriedad legislativa para la detección e identificación de *H. pylori*.

Capítulo 1: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Residual

Esto ha generado multitud de estudios en los que se describe diversas metodologías en la fase de procesado inicial de este tipo de agua (Hulten, *et al.*, 1998; Fujimura, *et al.*, 2004; Fukusima, *et al.*, 2006; Fu, *et al.*, 2010).

En este trabajo se incorporó un paso de prefiltrado a través de filtros estériles de tamaño de poro de 1 μm , con el fin de separar los sólidos en suspensión de las bacterias presentes en las muestras de agua residual. La posibilidad de eliminar los sólidos en suspensión evita la colmatación de las membranas con tamaño de poro pequeño (0.65 μm -0.45 μm), y reduce los tiempos de filtración de grandes volúmenes de muestra. Además, se reduce el ruido de fondo en el caso de la técnica FISH, mejorando el análisis visual de las muestras. La incorporación de la fase de prefiltrado redujo el tiempo de procesado de filtración de las muestras brutas, facilitando la posterior concentración y recuperación del patógeno estudio.

Para la concentración de patógenos a partir de muestras de agua las dos técnicas más frecuentemente utilizadas son la centrifugación y la filtración (Fukusima *et al.*, 2006). La principal limitación que presenta la técnica de centrifugación es la de concentrar las bacterias de grandes volúmenes de muestra líquida puesto que conlleva mucho tiempo y recursos.

La técnica de filtración consiste en pasar la muestra líquida a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.45 o 0.22 μm para retener las bacterias. Los problemas que presenta esta técnica es la posible pérdida de bacterias a la hora de transferirlas desde la membrana (filtro) al tampón o al caldo diluyente para su posterior análisis y la colmatación de las membranas si las muestras a filtrar presentan un elevado contenido de sólidos en suspensión. La colmatación ocasionaría el uso de varias membranas en el filtrado de una única muestra, con la consiguiente pérdida en la recuperación de las bacterias en cada una de ellas.

Por tanto, la elección de la metodología de concentración de bacterias a partir de aguas residuales depende de la composición de las muestras. En este trabajo, se concentraron las bacterias en las muestras directas mediante centrifugación; y en muestras con enriquecimiento mediante filtración sobre membrana. La incorporación de las membranas al caldo de enriquecimiento facilita el desprendimiento de las bacterias de la membrana al caldo.

Debido a la complejidad de las muestras y a la falta de un sistema estandarizado de detección, las aguas se analizaron mediante cuatro técnicas, con el fin de obtener la máxima eficacia de detección. Se usaron tres técnicas moleculares, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa tradicional (PCR), la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (q-PCR) y la técnica de Hibridación *in situ* con Sondas Fluorescentes (FISH). La cuarta técnica realizada fue el método tradicional de cultivo en placa.

La detección e identificación de patógenos mediante PCR depende en gran medida de la especificidad de los iniciadores utilizados en la reacción de amplificación (Somma *et al.*, 1996). Para la detección de *H. pylori* se utilizaron en un primer momento los iniciadores HP1 y HP2 diseñados por Choi *et al.* (2001). La elección de los mismos se realizó por pertenecer a la región del 16S del gen ADNr, fragmento que pertenece a una región de ADN muy conservada en todas las células. Esto significa que las secuencias de organismos se puedan alinear con precisión, haciendo que las diferencias sean fáciles de detectar.

Todas las muestras resultaron negativas para la amplificación del fragmento de 398 pb del gen 16S ADNr, amplificado por los iniciadores HP1/HP2, con lo que se incorporó seroalbúmina bovina (BSA) a los reactivos de la PCR para estabilizar la enzima Taq-polimerasa frente a los posibles inhibidores de la PCR presentes en las aguas residuales (Kreader, 1996). A pesar de que se esperaba una mejora en los resultados, estos fueron los mismos.

Puesto que en aguas residuales, donde hay material fecal humano, hay una mayor probabilidad de presencia de *H. pylori* (Lu *et al.*, 2001) y nuestro equipo ya lo había detectado con anterioridad (Moreno *et al.*, 2001), se optimizó nuevamente la técnica PCR por si la falta de positivos se debía a la baja eficiencia de ésta. La segunda optimización de la reacción se realizó con los iniciadores vacAR y vacAF, que amplifican el gen que codifica la proteína vacuolizante Vac, presente en todas las cepas de *H. pylori* (Nilsson *et al.*, 2002). En las muestras directas se obtuvieron 4 muestras positivas. Tras enriquecimiento de las muestras se detectó presencia de *H. pylori* en 6 de éstas. Y en una de las muestras fue detectado tanto en muestra directa como tras enriquecimiento. El hecho de detectar *H. pylori* en un mayor número de muestras sometidas a un enriquecimiento previo y no hacerlo en las directas muestra la necesidad de incluir un paso de enriquecimiento para la detección de *H. pylori* en aguas residuales mediante PCR. Con el enriquecimiento se diluyen los posibles inhibidores de la PCR

que pueden encontrarse en el agua, diluyendo de igual modo el ADN de bacterias muertas de *H. pylori*, que podría ocasionar falsos positivos (Kabir, 2004).

Tras los resultados obtenidos mediante PCR tradicional con los iniciadores vacAR y vacAF, se realizó la puesta a punto de la PCR a tiempo real (q-PCR) para estos mismos par de iniciadores. La q-PCR es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10^7 equivalentes genómicos de la secuencia blanco) (Brechtbuehl *et al.*, 2001) y rapidez en la visualización del producto, ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Además, permite la cuantificación del ADN presente en la muestra.

Los resultados confirmaron una mayor sensibilidad de la q-PCR frente a la PCR tradicional, puesto que se detectó la presencia de *H. pylori* en 9 muestras directas, e incluso en 3 de ellas fue posible realizar la cuantificación de los equivalentes genómicos de *H. pylori* presentes en las muestras.

A pesar de que la q-PCR presentaba un límite de detección de 10 equivalentes genómicos, en 6 de las muestras positivas no se pudo cuantificar la presencia de *H. pylori*, ya que el valor del Ct estaba por encima del umbral de fiabilidad (>35 ciclos).

Cabe destacar que mediante q-PCR se detectó la presencia de *H. pylori* en los tres puntos de muestreo de una EDAR a partir de muestras directas, lo que denota que este patógeno se encuentra presente en las aguas residuales y que puede ser resistente a los procesos de depuración aplicados a estas aguas.

La técnica FISH presenta una elevada sensibilidad y especificidad en la formación del complejo ADN-ARN, además no presenta inhibición causada por la presencia de sustancias inhibitorias en las muestras. En la actualidad no es una técnica muy utilizada en muestras ambientales para la detección de *H. pylori*. Moreno *et al.* (2001) la emplearon para la detección de *H. pylori* en agua de río y aguas residuales, comparándola con las técnicas de PCR y cultivo. Los resultados revelaron una mayor eficacia en la detección del patógeno mediante FISH en este tipo de muestras ambientales.

Una de las mayores limitaciones de la técnica FISH es la baja intensidad de la señal de fluorescencia debida a hibridación inespecífica y al abundante ruido de fondo en muestras ambientales.

Por ello, para la detección de *H. pylori* mediante FISH se diseñó una sonda LNA, basada en la sonda HPYL, para optimizar la eficiencia de la hibridación (Rune *et al.*, 2006).

Las sondas tipo LNA (Locked Nucleic acid), son sondas con una modificación en su anillo de ribosa, lo que le confiere mayor sensibilidad en muestras complejas que requieren condiciones de hibridación restrictivas. En nuestro trabajo, se comprobó que la sonda HPYL-LNA funcionaba a concentraciones de formamida del 30%, generando una elevada intensidad de fluorescencia.

Mediante FISH con la sonda HPYL-LNA se detectaron 37 muestras directas positivas de las 60 analizadas. En las muestras con un paso previo de enriquecimiento fue complicada la visualización de células hibridadas, debido a la gran cantidad de microbiota acompañante presente en las muestras y al ruido de fondo. Esto demuestra que el caldo Dent no es completamente específico para *H. pylori*, ya que existen otras especies resistentes a estos antibióticos y condiciones, y que el enriquecimiento no favorece la detección de *H. pylori* mediante FISH. Al no ser necesario incluir un paso previo de enriquecimiento, el tiempo empleado en la detección e identificación de éste patógeno mediante FISH en este tipo de muestras se reduce considerablemente (Moreno *et al.*, 2003).

Esta técnica molecular, aunque en general es menos sensible que otras (Moreno *et al.*, 2003) presentó, en vista a los resultados obtenidos en el presente trabajo, una mayor eficiencia que la PCR y la q-PCR para este tipo de matrices ambientales. Además, proporcionó información de las diversas morfologías que adoptan estas bacterias en aguas residuales y depuradas.

La técnica PCR resultó poco efectiva en el caso de muestras directas, siendo el porcentaje de detección del 6.6 % (4/60). De igual modo, en las muestras enriquecidas el porcentaje de detección resultó bajo, con un 10% (6/60). No se observaron diferencias significativas entre la detección en muestras directas y enriquecidas mediante PCR.

La técnica q-PCR, realizada en las muestras directas, presentó mayor sensibilidad que la PCR tradicional, con un porcentaje de detección de *H. pylori*, del 15 % (9/60).

Todos los resultados nos llevan a la conclusión de que el método más eficaz para la detección e identificación de *H. pylori* es la técnica molecular FISH, con un porcentaje de detección del 61.6 % (37/60). Además esta técnica no precisa de un paso previo de enriquecimiento de la muestra, lo que la hace una técnica rápida de detección del patógeno en aguas residuales.

Las técnicas PCR y q-PCR resultaron ser poco eficaces para la identificación de *H. pylori*, aunque los resultados mejoraron al introducir un paso previo de enriquecimiento. Se debe tener en consideración que en la PCR y q-PCR, al ser una reacción enzimática, presenta una alta sensibilidad a la presencia de sustancias que pueden inhibir la reacción. Una mínima cantidad de cualquier sustancia inhibitoria desencadena un falso negativo de la reacción cuando la inhibición es total o una baja sensibilidad por una inhibición parcial (Wilson, 1997; Schrader *et al.*, 2012). Los inhibidores pueden proceder de la propia muestra, de los medios de cultivo utilizados (Ginny *et al.*, 1999), originarse durante el procesado de la muestra o en la extracción de ácidos nucleicos (Opel *et al.*, 2009; Schrader *et al.*, 2012).

H. pylori puede presentar mutaciones en el gen 23S ARNr, ocasionando resistencia a determinados antibióticos como es el caso de la claritromicina. La resistencia a la claritromicina es ampliamente reconocida como el principal factor en el fracaso del tratamiento con terapias que incluyan este antibiótico (Murakami, *et al.*, 2001). Muchos pacientes con infección por *H. pylori*, inicialmente con cepas susceptibles al antibiótico, después de la terapia de erradicación con claritromicina desarrollan cepas resistentes por aparición de la mutación, lo que determina que la infección se haga persistente (Megraud, 1997).

Mediante la técnica FISH y el desarrollo de sondas específicas es posible determinar la presencia de mutaciones en el gen 23S ARNr, lo que permite observar la posible resistencia de *H. pylori* presente en el agua a la claritromicina. Estos resultados aportan gran información sobre la epidemiología del microorganismo y el riesgo de transmisión de cepas resistentes a través del agua. En esta tesis, la técnica FISH con las sondas CLAR I-II-III y HPYL-LNA nos permitió detectar la presencia de cepas resistentes a la claritromicina de *H. pylori* en 25 muestras positivas directas de las 60 analizadas.

Para el aislamiento de *H. pylori* se utilizaron dos medios sólidos específicos: Agar Dent, ampliamente utilizado para todo tipo de muestras, y Agar Pylori®. Muchos autores han intentado desarrollar medios selectivos para el aislamiento de esta bacteria (Stevenson *et al.*, 2000; Degnan *et al.*, 2003) a partir de muestras ambientales altamente contaminadas, pero todavía no se ha obtenido un medio eficaz que lo permita. Diversos estudios afirman que los medios de cultivo habituales podrían ser demasiado ricos en nutrientes, lo que causaría un shock nutricional al pasar el microorganismo de un medio pobre en nutrientes a uno rico (Azevedo *et al.*, 2004). Jiang y Doyle (2002) estudiaron la acción

de diversos suplementos como mucina, sulfato férrico o piruvato sódico, observando un incremento en el nivel de microorganismos detectados en muestras de leche cruda inoculadas artificialmente. Degnan *et al.* (2003) desarrollaron un nuevo medio con una nueva mezcla de suplementos de crecimiento al que añadieron anfotericina B y polimixina B. Fernández *et al.* (2006) comprobaron la selectividad del medio desarrollado por Degnan *et al.*, y concluyeron que era apropiado para el aislamiento de *H. pylori* en muestras de agua de mar.

A pesar de todas estas modificaciones, todavía no existe ningún medio óptimo para el aislamiento de *Helicobacter* en muestras ambientales, ya que la microbiota acompañante enmascara, en caso de que lo hubiera, el crecimiento de *H. pylori*, debido a la falta de selectividad de los mismos.

Con el objetivo de mejorar el medio de cultivo Agar Dent, ampliamente utilizado para el aislamiento de *H. pylori*, se realizó un estudio para observar si la adición de SFB al medio incrementaba el crecimiento de *H. pylori* desde muestras de agua. El suero fetal bovino es ampliamente utilizado para el cultivo celular *in vitro* de las células eucariotas, debido a que tiene un nivel muy bajo de anticuerpos y un alto contenido en factores de crecimiento. Sin embargo, la recuperación de *H. pylori* en medio Agar Dent sin SFB resultó más eficiente que cuando se le adicionaba el suero al medio, posiblemente a consecuencia de una generación de shock nutricional del patógeno por exceso de nutrientes (Azevedo *et al.*, 2004).

Dada la dificultad para aislar *H. pylori* a partir de muestras ambientales, en el presente trabajo se ensayaron dos metodologías distintas de aislamiento por cultivo. En el primero de los métodos, las presuntas colonias procedentes de triple estría, se sembraron en agar sangre para intentar purificarlas. Pero estas placas presentaban un alto crecimiento de microbiota acompañante, que cubría toda su superficie, por lo que se decidió fijar parte del cultivo aunque arrastrase contaminación, para poder identificar células del patógeno por FISH. Dado los altísimos niveles de contaminación inespecífica de estas primeras siembras, se llevó a cabo la modificación del método según Ceelen *et al.* (2006), realizando las siembras sobre membranas estériles de acetato de celulosa (0.65 μm), con la intención de reducir la microbiota acompañante, que no es capaz de pasar a través de ellas, por no tener capacidad de movilidad o forma espiral, características que posee *H. pylori*. La metodología de siembra sobre membrana resultó eficaz para reducir la microbiota acompañante posibilitando la detección de colonias características de *H. pylori*, en varias muestras de agua residual.

Capítulo 1: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Residual

Los métodos por cultivo y pruebas bioquímicas resultaron poco eficaces: las placas presentaban en toda la superficie un velo de microbiota acompañante que enmascaraba la posible identificación de las colonias típicas de *H. pylori*. Solo en 2 de los 16 cultivos mixtos en los que se observaron colonias de *H. pylori*, la prueba bioquímica de la urea fue positiva, probablemente por la inhibición del crecimiento de *H. pylori* por la presencia de otras bacterias en la muestra.

A falta de un sistema comercial de pruebas bioquímicas, y debido sobre todo a que la prueba de la ureasa no había resultado concluyente, se recurrió a la identificación por métodos moleculares. A pesar de que no se consiguió purificar del todo las colonias, sí que se pudo identificar en ellas la presencia del patógeno mediante FISH y amplificación y posterior secuenciación del fragmento del gen *vacA*.

En el análisis por PCR para la detección del gen *vacA*, fue posible la detección del gen en 5 cultivos mixtos con posterior confirmación por secuenciación. Mediante la técnica FISH se detectó la presencia de *H. pylori* en todos los cultivos mixtos.

La técnica FISH resultó ser muy eficaz para la identificación de *H. pylori* en las colonias, puesto que no se necesitó de una resiembra en ASC para confirmar su presencia, lo que nos indica que esta técnica podría reducir mucho el tiempo empleado en la posterior purificación e identificación de colonias y generar resultados incluso cuando hay presencia de microbiota acompañante y la purificación no es posible. El hecho de haber optimizado un protocolo para cultivar *H. pylori* a partir de muestras ambientales e identificar las presuntas colonias a pesar de no haber conseguido aislados es un resultado de gran relevancia, debido a la dificultad que presenta su aislamiento. Anteriormente solo se había conseguido una única vez a partir de este tipo de muestras (Lu *et al.*, 2001).

Los métodos moleculares utilizados para confirmar la identificación de colonias obtenidas por cultivo han demostrado ser enormemente eficaces, y suponen uno de los resultados más novedosos de este trabajo, puesto que mediante la combinación de FISH + PCR + secuenciación, se consiguió la identificación de 5 colonias, demostrando de forma indiscutible que en las aguas residuales existen células viables y cultivables de *H. pylori*.

Este estudio sobre la presencia de *H. pylori* en aguas residuales ha demostrado su capacidad de supervivencia a los distintos tratamientos de una EDAR en las diferentes etapas del proceso de

depuración y desinfección, puesto que se detectó su presencia en todos los puntos de muestreo. Principalmente se detectó en la entrada del reactor biológico, con lo que se puede deducir que las aguas residuales son habituales portadoras de *H. pylori*. Tras la depuración en los reactores no se observó una reducción en la presencia de *H. pylori*, lo cual puede deberse a que sobreviven dentro de los flóculos originados durante el tratamiento, al igual que otros microorganismos (Fu, *et al.*, 2010).

Un resultado a destacar es que tras el tratamiento terciario con radiación ultravioleta se ha detectado la presencia de *H. pylori*, lo que podría deberse al alto caudal de agua tratado, no permitiendo una penetración total de la radiación ultravioleta durante un tiempo suficiente, o bien que el sistema de radiación UV no se encuentre en buenas condiciones de mantenimiento. Por ello, resulta lógica la necesidad de un tratamiento de desinfección alternativo a la radiación ultravioleta, que no fuera tan dependiente de factores externos y que pueda realizar una desinfección completa de las aguas depuradas.

El hecho de haber obtenido cultivos mixtos donde se detectó e identificó *H. pylori* demuestra que el patógeno puede encontrarse en forma cultivable y por tanto infectiva en estas aguas residuales.

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

OBJETIVOS

En base a todos los resultados obtenidos en el capítulo 1 se planteó el estudio de la presencia de *H. pylori* en aguas potables, donde diversos trabajos han sugerido que podría estar presente. Además del estudio de la mera presencia del patógeno en las aguas potables se dio gran importancia a la detección de células viables y por tanto potencialmente infectivas, por ser una vía directa de infección para el hombre.

Los objetivos planteados en este estudio fueron:

En primer lugar, detectar e identificar la presencia de *H. pylori* en fuentes públicas de agua potable, en nuestra zona geográfica, mediante el uso de técnicas moleculares.

En segundo lugar, evaluar su potencial infectivo mediante la detección de células viables utilizando para su detección diferentes técnicas moleculares de viabilidad además de las tradicionales por cultivo.

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. Procesado de las muestras de agua potable

1.1.1. Origen de las muestras

Para la detección de *Helicobacter pylori* en muestras de agua potable se analizaron un total de 63 muestras procedentes de 51 fuentes públicas de agua potable localizadas en la zona litoral del Este de España, recogidas durante un periodo de 9 meses. En 12 de las fuentes se tomaron dos muestras en intervalos superiores a 6 meses.

1.1.2. Protocolo de procesado de muestras

1.1.2.1. Evaluación del método de recuperación de *H. pylori* tras filtrado

La técnica más utilizada para la recuperación de bacterias desde agua potable es la filtración. El mayor problema que presenta la filtración es la posible pérdida de bacterias a la hora de transferirlas desde la membrana al tampón o caldo homogenizador para su posterior análisis. Por ello se realizó un ensayo para evaluar y establecer la metodología más eficiente en la recuperación de *H. pylori* desde la membrana tras la filtración.

Para la realización del ensayo se empleó la cepa NCTC 11637 de *H. pylori*, la cual se cultivó en ASC (Anejo A.1) en condiciones de microaerofilia a 37 °C, durante 72 horas.

Tras la incubación se recogió material celular para realizar una suspensión de células en tampón PBS 1X (Anejo B.2.) estéril. Del inóculo se realizó el recuento en placa, mediante la realización de diluciones seriadas del mismo, en tubos de 9 mL de agua destilada esterilizada. De cada dilución se sembraron 100 µL en placas de ASC, que se incubaron en condiciones óptimas para el patógeno, durante 48 horas, para el posterior recuento.

En el ensayo de recuperación se prepararon tres matraces cada uno con 100 mL de agua potable esterilizada en autoclave a 120 °C. A cada matraz se le inoculó 1 mL del inóculo inicial y se homogenizó mediante agitación. Posteriormente se realizó la filtración del contenido de los matraces a

través de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45 μm (Whatman, Maidstone Inglaterra). A cada una de las tres membranas se le aplicó un tratamiento distinto para la recuperación de *H. pylori*:

1. Metodología de Rotación: La membrana se transfirió asépticamente a un tubo de 50 mL con 10 mL de caldo de enriquecimiento (Caldo Brucella adicionado con un 5 % de Suero Fetal Bovino, SFB). Durante 10 minutos el tubo se mantuvo en rotación para facilitar el desprendimiento de las células al caldo.

2. Metodología de Raspado: La membrana se transfirió asépticamente a un tubo de 50 mL que contenía 10 mL del mismo caldo de enriquecimiento. Posteriormente se realizó un raspado de la membrana con una espátula estéril (Cell Scraper, Corning Incorporated, Costar, México) para facilitar el desprendimiento de las células al caldo.

3. Metodología de Flujo invertido: La membrana se invirtió en la rampa de filtración y se filtraron 20 mL de tampón PBS 1X, recogiendo en un matraz el tampón con las células desprendidas de la membrana. Posteriormente se centrifugó el filtrado y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 10 mL del caldo de enriquecimiento en un tubo de 50 mL.

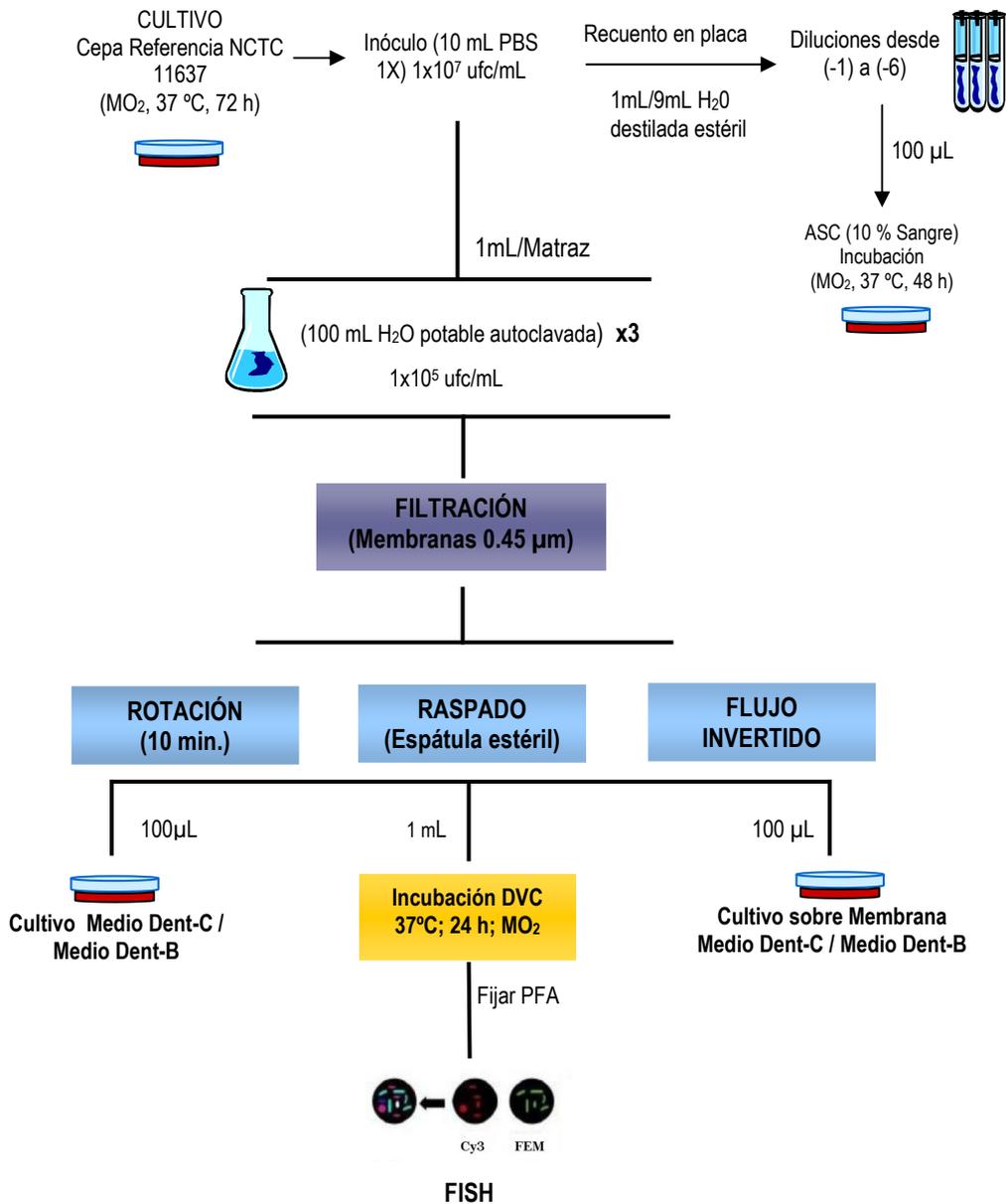
Se recogieron alícuotas de 1mL de cada uno de los tubos de 50 mL para el posterior análisis mediante DVC-FISH (apartado 1.4) y cultivo en placa. Los protocolos seguidos para los diferentes análisis se describen en apartados posteriores.

En este mismo ensayo se evaluó el medio de cultivo en placa más efectivo para la recuperación de *H. pylori*. Se utilizaron dos tipos de bases para elaborar Agar Dent (Anejo A.1): Agar Base Selectivo para *Campylobacter* (Medio Dent-C) y Agar Sangre Columbia (Medio Dent-B). Simultáneamente se utilizaron dos metodologías de siembra diferentes en los dos medios de cultivo a evaluar: sobre membrana de tamaño de poro de 0.65 μm (Whatman, Maidstone, Inglaterra) y mediante siembra en masa.

De las alícuotas de 1mL recogidas de cada uno de los tubo de 50 mL, procedentes de cada método de recuperación, se procedió a la realización de siembras de 100 μL de muestra, en masa y sobre membrana de tamaño de poro de 0.65 μm . En este caso, las placas en las que se había depositado la membrana se mantuvieron a temperatura ambiente en condiciones aerobias durante 20

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable

minutos. Posteriormente se retiró la membrana de las placas de cultivo y se incubaron en condiciones óptimas para *H. pylori*.



Protocolo 2. Recuperación sobre membrana de *H. pylori* tras filtración

1.1.2.2. Procesado de muestras

Se recogió un volumen de 5 litros de cada muestra según el RD1120/2012: Cada boca de salida de las fuentes se limpió con una torunda de algodón impregnada con solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 100 mg/L. Tras la limpieza se dejó correr el agua 5 minutos hasta asegurarse que el agua estancada de las tuberías se eliminara. Se recogió un volumen de 5 litros evitando la contaminación del tapón de la garrafa de muestreo, éstas se etiquetaron y se transportaron hasta el laboratorio para su análisis.

Se cuantificó el cloro libre de todas las muestras mediante el equipo Spectroquant Nova 60® con el sistema comercial Test Cloro de determinación de cloro libre, total y combinado (Merck, ref: 100599; rango de determinación de cloro 0.010- 6.00 mg/L de Cl₂).

Para el procesado directo de las muestras se realizó la filtración de los 5 litros a través de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45 µm (Whatman, Maidstone, Inglaterra) que se transfirieron asépticamente a tubos de 50 mL que contenían 10 mL del medio de enriquecimiento selectivo Caldo Dent. Se procedió al raspado de la membrana para facilitar el desprendimiento de las bacterias desde la membrana al caldo. Seguidamente se recogieron alícuotas para posteriores análisis por q-PCR, PMA-qPCR, DVC-FISH y cultivo, según los protocolos optimizados en este capítulo (Protocolo 7).

Se incluyó un tratamiento de enriquecimiento, incubando el resto del caldo de los tubos de 50 mL a 37 °C durante 24 horas en condiciones de microaerofilia. Transcurrida la incubación se centrifugaron los tubos a 4000 rpm durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1.2 mL de PBS 1X. Posteriormente se recogieron alícuotas para q-PCR y se realizó la siembra sobre medios nutritivos para el aislamiento de *H. pylori*, tal como se describe en el capítulo 1.

1.2. Aislamiento e identificación de *H. pylori* por cultivo

1.2.1. Evaluación de los métodos de eliminación de microbiota acompañante

Dos de las técnicas que se evaluaron para el aislamiento de *H. pylori* a partir de muestras de agua fueron la separación inmunomagnética (IMS) y el tratamiento de choque ácido previamente a la siembra en agar selectivo, con el fin de eliminar la microbiota acompañante presente en las muestras.

1.2.1.1. Separación inmunomagnética

Se emplearon perlas magnéticas sensibilizadas con anticuerpos específicos para *H. pylori*, sobre alícuotas de 1 mL de muestras inoculadas artificialmente con la cepa NCTC 11637 de *H. pylori*

La cepa se cultivó en ASC, incubándola en condiciones de microaerofilia, a 37 °C, durante 72 horas. Tras la incubación, se recogió material celular y se preparó una suspensión en PBS 1X. De éste se realizó recuento en placa en ASC incubando las placas de cultivo en condiciones óptimas para *H. pylori* durante 48 horas, con el fin de obtener la concentración de la suspensión celular inicial.

Se preparó un matraz con 100 mL de agua potable estéril, en la que se inoculó 1 mL de la suspensión celular de la cepa NCTC 11637. Seguidamente el contenido del matraz se filtró sobre membrana con tamaño de poro de 0.45 µm. Tras la filtración, las membranas se rasparon con espátulas estériles sobre 10 mL de PBS 1X, para facilitar el desprendimiento de las células de *H. pylori* al caldo homogenizador. Posteriormente se centrifugaron los 10 mL de PBS 1X a 4000 rpm durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de PBS 1X para realizar la IMS.

La sensibilización de las perlas magnéticas (Dynabeads Dynal, Inc., Oslo, Noruega) se realizó según el protocolo de Enroth *et al.* (1995). Brevemente:

Un volumen de 51.8 µL del anticuerpo anti-*Helicobacter pylori* Ig de conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca. Ref: B0471), a una concentración de 0.32 g/L, se incubó con 500 µL de Dynabeads (6-7 x 10⁸ perlas/mL) durante 24 horas en agitación, a 4 °C.

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable

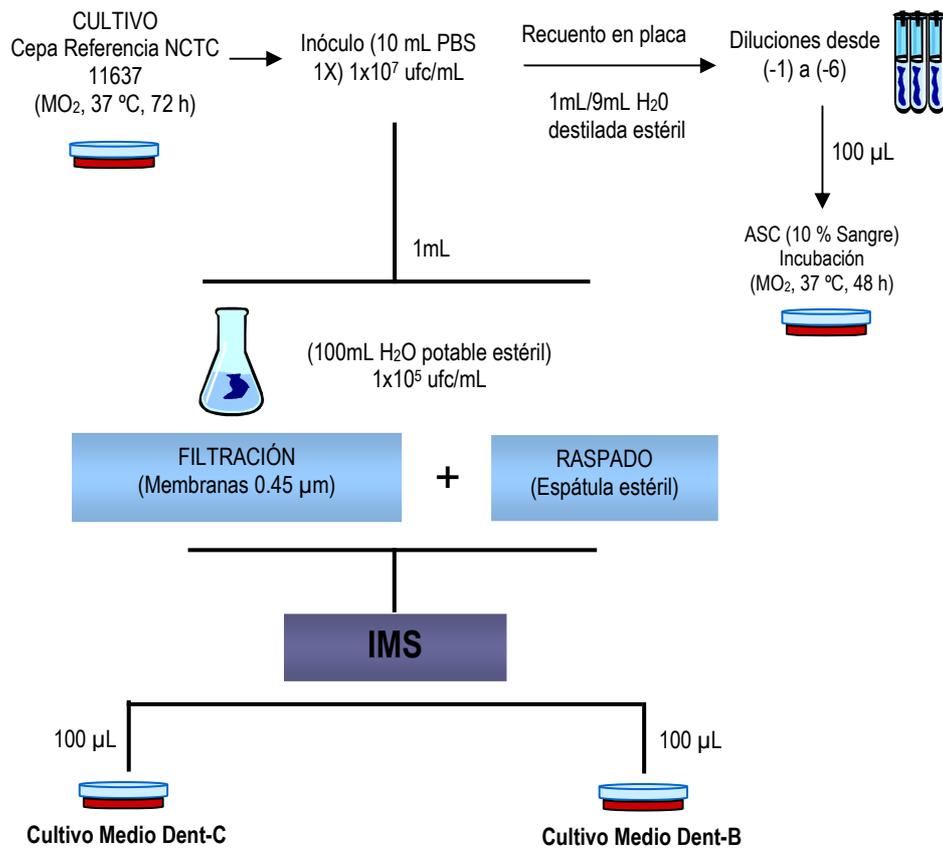
Tras el periodo de incubación se procede a la eliminación del anticuerpo que no se ha unido a las perlas. Para ello se realizan tres lavados en 1 mL de PBS 1X con un contenido de 0.1 % de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma, Saint Louis, USA) agitando a 4 °C, durante 30 minutos cada uno.

Tras el tercer lavado, las perlas sensibilizadas se resuspenden en 500 µL de PBS 1X con un contenido de 1 % de BSA y 0.02 % de azida sódica y se conserva a 4 °C.

Para la realización de la etapa de separación inmunomagnética, se añaden 20 µL de perlas magnéticas sensibilizadas a cada alícuota de 1 mL de muestra. Las muestras con las perlas añadidas se mantienen en agitación durante 45 minutos a 4 °C. Posteriormente se realiza la separación del complejo magnético mediante un imán, se elimina el sobrenadante y se realizan tres lavados de 10 minutos en agitación con 500 µL de PBS 1X + BSA. A continuación las muestras se retiran del imán y el sedimento se resuspende en 1 mL de PBS 1X.

Posteriormente, se realiza la siembra sobre medios de cultivo de las muestras, incubando las placas de cultivo en condiciones óptimas para el patógeno. En este estudio se realizaron siembras en masa de 100 µL de muestra tratada con IMS sobre Medio Dent-C y Medio Dent-B. Ambos se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia.

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable



Protocolo 3: Separación inmunomagnética de *H. pylori* en muestra inoculada artificialmente

1.2.1.2. Tratamiento de choque ácido

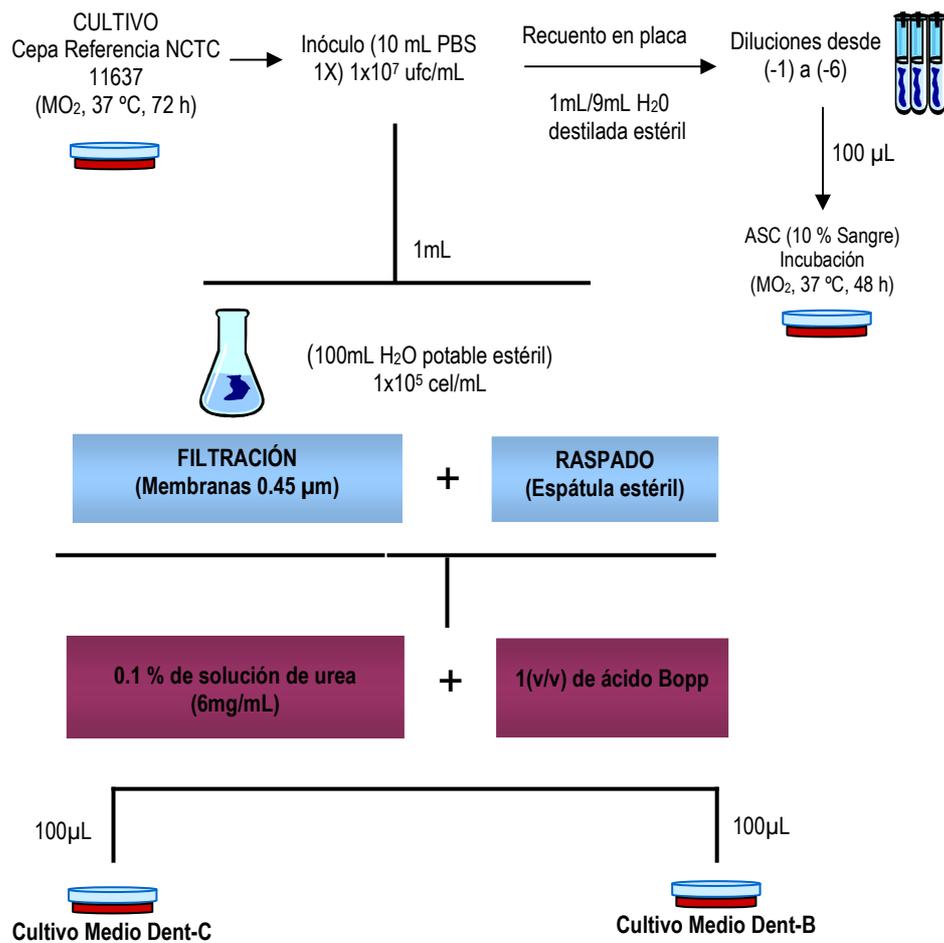
Para la evaluación de la eficacia de la técnica de choque ácido se utilizó la cepa NCTC 11637 de *H. pylori*. Se reconstituyó la cepa de referencia del mismo modo que en el apartado 1.2.1.1. Desde la preparación de la suspensión de células, se realizó la siembra de 100 μL a partir de diluciones seriadas de muestra inoculada artificialmente en medio ASC, antes del tratamiento ácido, con el fin de conocer la concentración de la suspensión de material celular inicial.

Seguidamente se preparó un matraz con 100 mL de agua potable estéril, en la que se inoculó 1 mL de la suspensión de material celular procedente de la cepa NCTC 11637. El contenido del matraz se filtró sobre membrana con tamaño de poro de 0.45 μm . Tras la filtración se procedió a la recuperación de las células de *H. pylori* mediante raspado y se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X.

El tratamiento con ácido consistió en la adición de un volumen de 0.1 % de solución de urea (6mg/ml) a 1 volumen de la muestra e inmediatamente la adición de 1 volumen de ácido de Bopp (Anejo B.2) (Bopp *et al.*, 1981).

A continuación se realizó la siembra de 100 μL mediante las metodologías de siembra en masa y sobre membrana de tamaño de poro de 0.65 μm de las muestras en Medio Dent-C y Medio Dent-B. Las placas permanecieron en incubación en condiciones óptimas para *H. pylori* durante 48 horas.

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable



Protocolo 4. Tratamiento de choque ácido de *H. pylori*, previo a la siembra en medios de cultivo.

1.2.2. Aislamiento e identificación de *H. pylori* a partir de muestras

La metodología seguida para las siembras, tanto desde muestra directa como enriquecida, fue la siembra en masa. Se sembraron 100 μ L en Medio Dent-C por duplicado. Todas las placas de cultivo se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia.

Para la identificación de *H. pylori* a partir de los medios de cultivo se realizó tinción Gram de todas las colonias sospechosas (tamaño de 0.5 a 1.5 mm, redondeadas, convexas y traslúcidas). A falta de un sistema comercial de pruebas bioquímicas para la identificación de *H. pylori*, los cultivos se confirmaron por q-PCR con los iniciadores vacAR/vacAF, secuenciación del 16S ADN y FISH.

1.3. Detección e identificación de *H. pylori* mediante q-PCR

1.3.1. Extracción de ADN genómico

Se recogió 1 mL de cada muestra antes y después del enriquecimiento. Se empleó el sistema comercial "GeneJET™ Genomic DNA Purification kit" (Fermentas, Alemania) para realizar la extracción. Este incluye los productos necesarios y el protocolo a seguir para la extracción de ADN en bacterias, diferenciando entre diferentes matrices tales como tejidos, cultivo puro y sangre. Se realizó el procedimiento recomendado por el fabricante:

Las alícuotas de 1 mL se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 μ L de tampón PBS 1X. A continuación a cada una de las alícuotas se adicionaron 200 μ L de solución de Lisis y 20 μ L de proteinasa K, para mejorar la eliminación de las proteínas, y se mezclaron las sustancias mediante agitación con un mezclador de vórtice. Los tubos se incubaron a 56 °C en un baño de calor seco durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 20 μ L de RNAsa, para facilitar la eliminación de ADN libre presente en la muestra, se agitaron y se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, a cada alícuota se adicionaron 400 μ L de alcohol etílico al 50 % y se homogenizó la mezcla mediante pipeta.

El preparado de cada alícuota se transfirió a columnas, insertadas en tubos de recolección, que se centrifugaron a 6000 rpm durante 1 minuto. A continuación las columnas se incorporaron en un nuevo tubo de recolección, se adicionaron 500 μ L de Solución de Lavado I a cada una de éstas y se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el contenido del tubo de recolección, se

adicionaron a las columnas 500 μ L de Solución de Lavado II y se centrifugaron a máxima velocidad durante 3 minutos.

Finalmente, las columnas se incorporaron en tubos nuevos de 1.5 mL y se adicionaron 50 μ L de Solución de Elución en cada una de ellas. Tras 2 minutos de incubación a temperatura ambiente se realizó una centrifugación a 8000 rpm durante 1 minuto, para recuperar el ADN extraído. Este ADN se analizó de forma inmediata o se conservó a -20 °C.

1.3.2. Condiciones de amplificación mediante PCR a tiempo real (q-PCR)

Las condiciones de amplificación para la detección de *H. pylori* por qPCR con los iniciadores vacAR/vacAF fueron las establecidas para la detección del patógeno a partir de aguas residuales (Capítulo 1).

Los productos de amplificación de la q-PCR se recogieron para analizarlos por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, en tampón TBE 1X a 100 V durante una hora y 30 minutos, para comprobar la presencia de la banda específica. Los geles de agarosa se tiñeron con GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward CA. Ref: 41003). En los geles se incluyó un marcador de 100 pb de peso molecular, para poder estimar el tamaño del fragmento de ADN amplificado.

Con el fin de detectar inhibición en la actividad de la enzima Taq-polimerasa por la acción de sustancias presentes en la matriz, se incluyó en los ensayos de q-PCR un duplicado de las muestras, el cual fue inoculado con un volumen y concentración de ADN de *H.pylori* conocida. Para ello, en la mezcla de reactivos de la q-PCR se sustituyó los dos 2 μ L de muestra por: 1 μ L de material genético extraído de la muestra y 1 μ L de ADN de *H.pylori* a una concentración de 10³ GU/mL. A su vez se incorporó un control positivo adicional, conteniendo 1 μ L de agua ultra pura y 1 μ L de ADN de *H.pylori* a una concentración de 10³ GU/ mL. Los puntos de corte (Ct) de las amplificaciones de las muestras inoculadas se compararon con el Ct obtenido en el control positivo, para la detección de inhibición total o parcial de la Taq-ploimerasa.

1.3.3. Detección de ADN de células viables: Pretratamiento con Propidio Monoazida (PMA) de muestras inoculadas

Para detectar y diferenciar el ADN de *H. pylori* perteneciente a células viables se realizó un tratamiento con el agente intercalante Propidio Monoazida (PMA, GenIUL, Barcelona, España), previamente a la extracción del ADN genómico, sobre alícuotas de 1 mL de una suspensión de células de las cepas B6 y NCTC 11637 de *H. pylori*. Para la reconstitución de las cepas de referencia se llevó a cabo la metodología descrita en el apartado 1.2.1.1 de este mismo capítulo. De las suspensiones iniciales de células se realizaron diluciones seriadas y recuento de éstas para conocer la concentración inicial de los inóculos.

El ensayo de detección de ADN de células viables de *H. pylori* con PMA-qPCR se realizó con las dos cepas de referencia de *H. pylori* y por duplicado.

De cada una de las suspensiones de células se prepararon 4 alícuotas de 1 mL para el posterior análisis mediante q-PCR y PMA-qPCR.

Al objeto de evaluar la efectividad del pretratamiento con PMA para detectar células viables, dos de las alícuotas recibieron un tratamiento térmico de 15 minutos a 80 °C previamente al análisis. Las dos alícuotas restantes no sufrieron tratamiento alguno.

Se realizó cultivo en placa en medio ASC desde las alícuotas sin tratamiento y con tratamiento térmico, para determinar la recuperación de células viables en placa.

El pretratamiento con PMA se realizó en una alícuota de 1 mL con tratamiento térmico y otra sin tratar siguiendo el protocolo establecido por Agustín *et al.* (2010):

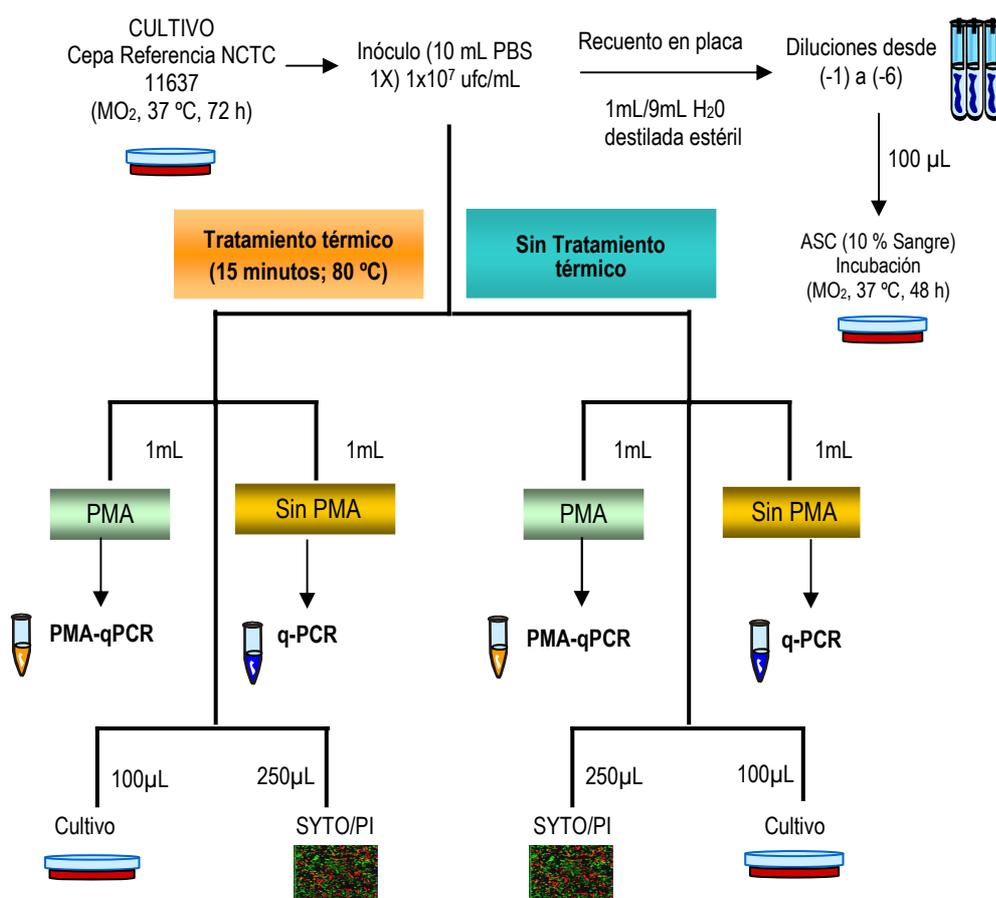
El PMA se disolvió en PBS 1X a pH 7.4 con un 20 % de dimetilsulfóxido para crear una concentración de solución madre de 20 mM, como indica el fabricante. A las alícuotas de 1 mL se adicionaron 25 µL de PMA, obteniéndose una concentración final de 50 µM. Éstas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se realizó la fotoactivación del PMA durante 15 minutos utilizando una lámpara LED Active (GenIUL PhAST Blue), proceso que desencadena la formación de enlaces covalentes entre los grupos azida del compuesto y el ADN. Tras los 15 minutos de fotoactivación se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µL de PBS 1X.

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable

A continuación se procedió a la extracción del ADN genómico de las 4 alícuotas de cada cepa y a su análisis inmediato, o se conservación a -20 °C.

Los resultados se compararon con los obtenidos mediante la tinción diferencial LIVE/DEAD BacLight Kit (Invitrogen, Alemania) utilizando los fluorocromos SYTO9 y yoduro de propidio (PI). La tinción SYTO/PI se realizó tanto en alícuota tratada térmicamente como sin tratar.

Para el análisis por SYTO9/PI se siguió el protocolo establecido por el fabricante. Brevemente: Se recoge 250µL de muestra a la que se le adicionan 3 µL de la mezcla de los reactivos del kit SYTO9/PI en proporción 1:1 y se mantiene la solución en oscuridad durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo se procede a su visualización y recuento en el microscopio de epifluorescencia.



Protocolo 5. Detección de ADN de células viables de *H. pylori* mediante PMA-q-PCR en muestra inoculada artificialmente

1.3.4. q-PCR y PMA-qPCR de *H. pylori* a partir de muestras

De todas las muestras de agua potable, tanto directas como enriquecidas, se recogieron dos alícuotas de 1 mL cada una. A partir de una de ellas, tras la extracción del ADN genómico, se realizó el análisis por q-PCR. La otra alícuota fue sometida a pre-tratamiento con PMA tal como se describe en este mismo capítulo, y posteriormente se realizó extracción del ADN genómico y q-PCR.

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable

La amplificación de los fragmentos específicos del gen *vacA* de *H. pylori* se llevó a cabo mediante el análisis por q-PCR con los iniciadores *vacAR* y *vacAF*. Las condiciones que se emplearon fueron las establecidas en la puesta a punto de la técnica q-PCR, descritas en el capítulo 1.

Los productos de la q-PCR de las muestras positivas para *H. pylori* fueron purificados y secuenciados para confirmar la identificación (capítulo 1).

1.4. Detección de células viables de *H. pylori* mediante DVC-FISH

1.4.1 Metodología de la técnica DVC-FISH

Para verificar la eficacia del protocolo de análisis DVC-FISH descrito previamente por Moreno *et al.* (2007) se emplearon las cepas NCTC 11637 y B6 de *H. pylori*.

Se recogió material celular de cada una de las cepas reconstituidas para realizar dos ensayos simultáneos a partir de cada una de las suspensiones de las cepas de referencia en tampón PBS 1X estéril. De cada una de las suspensiones se realizó recuento en placa para conocer la concentración inicial.

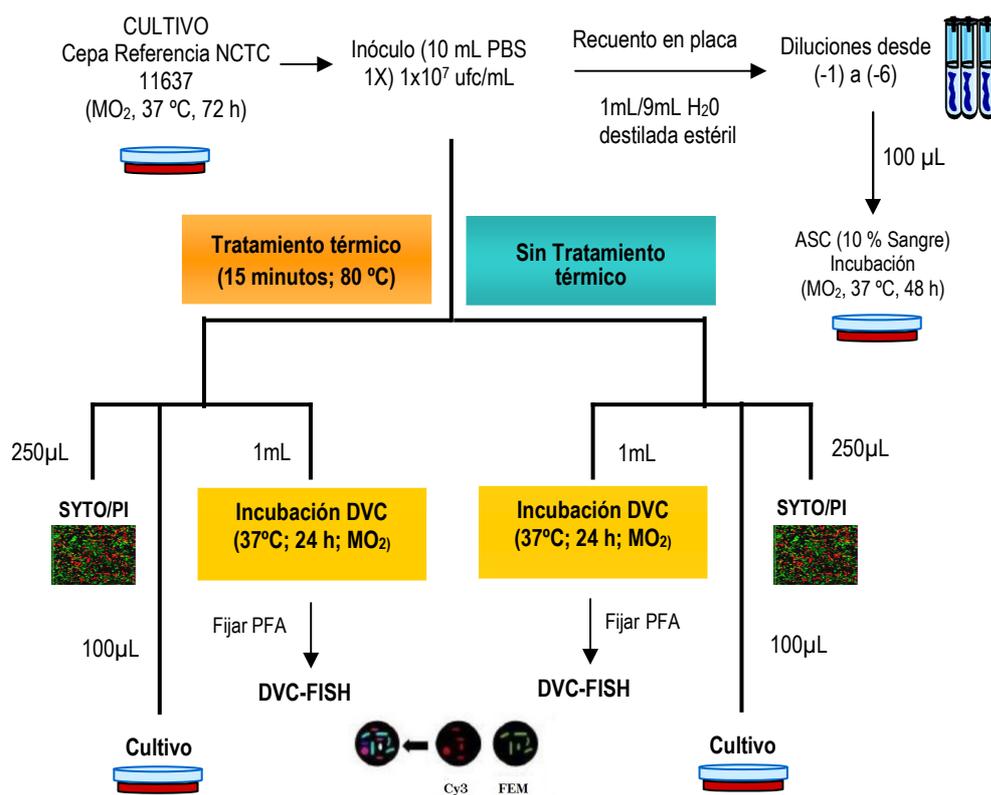
De cada una de las suspensiones celulares se prepararon 2 alícuotas de 5 mL para el posterior análisis mediante DVC-FISH. Para evaluar la efectividad del pretratamiento con caldo DVC (Direct Count Viable), una alícuota de cada ensayo fue sometida a un tratamiento térmico de 15 minutos a 80°C. La alícuota restante no sufrió tratamiento alguno.

De cada una de las alícuotas, con y sin tratamiento térmico, se transfirió un volumen de 1mL a tubos con 9 mL de caldo DVC, constituido por Caldo Brucella adicionado con un 5 % de suero fetal bovino y 0.5 mg/L de novobiocina, que se incubaron durante 24 horas en condiciones óptimas para *H. pylori*.

Tras la incubación, se centrifugaron los 10 mL de cada tubo de DVC a 8000 rpm durante 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1mL de PBS 1X. Las alícuotas de 1 mL se fijaron para el análisis mediante FISH, según el protocolo descrito previamente en esta tesis (capítulo 1). Tras la fijación de las muestras se procedió a la hibridación *in situ*, con un contenido de formamida del 30 % y el uso de las sonda HPYL-LNA específica para *H. pylori* y EUB338 como control positivo de hibridación (Tablas 9 y 11). De cada muestra se realizó la hibridación por duplicado.

Una vez realizadas las hibridaciones se visualizaron los resultados en el microscopio de epifluorescencia.

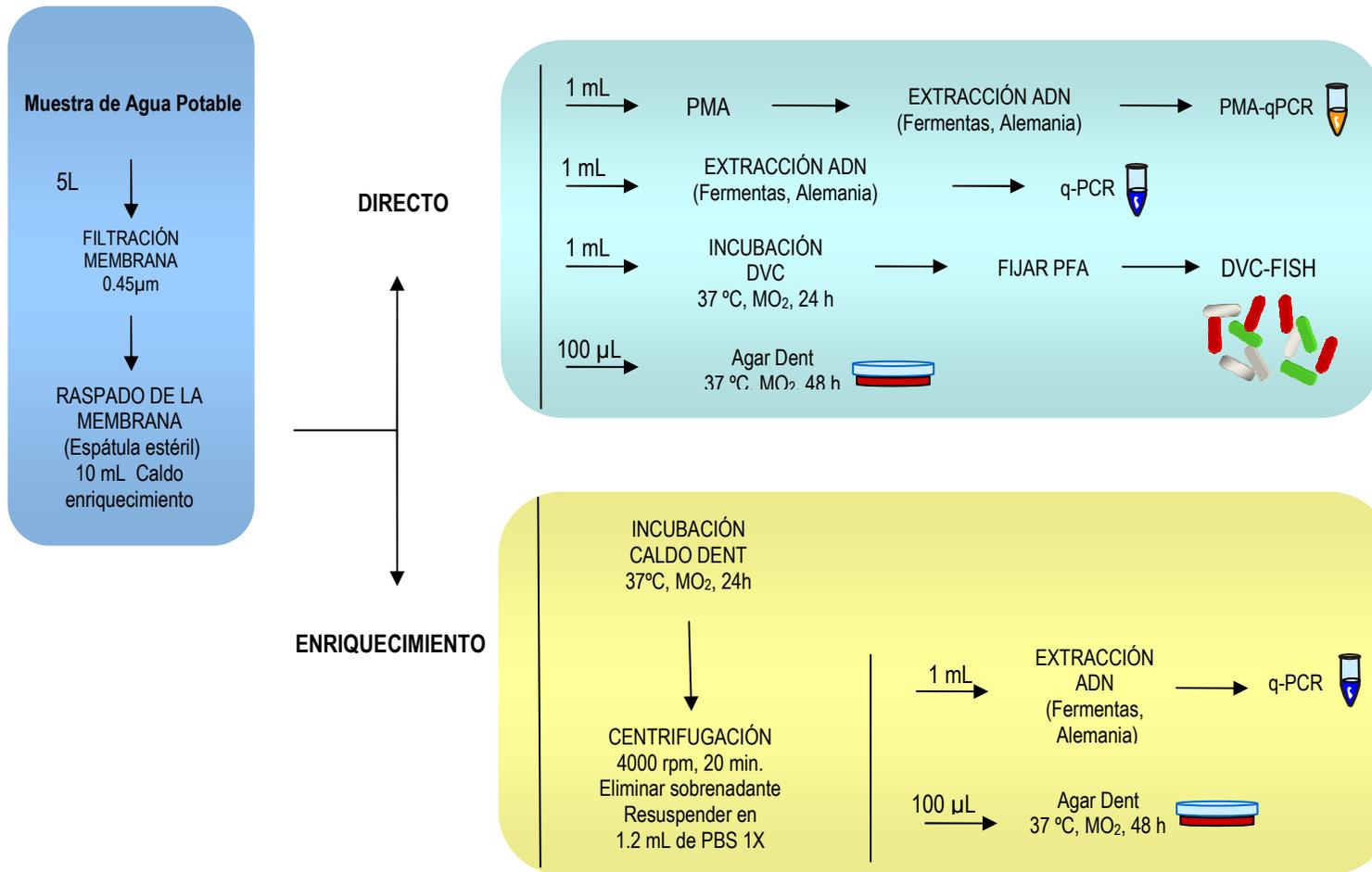
Tal y como se realizó para el ensayo de detección de formas viables con PMA, los resultados se compararon con los obtenidos mediante tinción con los fluorocromos SYTO/PI (LIVE/DEAD BacLight Kit, Invitrogen, Alemania) y recuento en placa.



Protocolo 6. Detección de células viables de *H. pylori* mediante DVC-FISH

1.4.2. Detección de formas viables mediante DVC-FISH en muestras

Con el objetivo de detectar e identificar células viables de *H. pylori*, en muestras de agua potable, durante el procesado de las muestras se recogió de cada una de ellas 1 mL para su análisis mediante DVC-FISH. Para ello, se realizó la incubación DVC y posteriormente la fijación de las células para el análisis mediante FISH (apartado 1.4.1).



Protocolo 7. Detección de *H. pylori* en agua potable mediante técnicas moleculares y cultivo

2. RESULTADOS

2.1. Aislamiento e identificación de *H. pylori* por cultivo

2.1.1. Evaluación del método de recuperación de *H.pylori*

A partir de los recuentos en placa realizados de la suspensión celular se determinó una concentración inicial de 1.09×10^5 ufc/mL en los matraces desde los que se realizó la filtración.

Se probaron 3 metodologías de recuperación de células (rotación, raspado y flujo invertido) tras la filtración. En ninguno de los tres casos con siembra por triple estría se obtuvieron colonias de *H. pylori* en los medios de cultivo estudiados, Medio Dent-C y Medio Dent-B.

Por el contrario, en los tres casos las siembras en masa de 100 μ L presentaban crecimiento de colonias de *H. pylori* en ambos medios (Medio Dent-C y Medio Dent-B). Los resultados mostraban una recuperación del patógeno del orden logarítmico de 10^4 , tanto para DVC-FISH como por cultivo, con la metodología de raspado. Se observó una reducción en las metodologías de rotación y flujo invertido de 2 ordenes logarítmicos.

Dados los resultados, para el análisis de las muestras de agua potable se decidió realizar siembras en masa mediante la metodología de raspado de las membranas de 0.45 μ m con espátulas estériles.

Tabla 17: Resultados del recuento de células viables recuperadas tras las diferentes metodologías de procesado de membrana de filtración

Metodología de recuperación	Recuento DVC-FISH (cel/mL)	Medio Dent-C (ufc/mL)	Medio Dent-B (ufc/mL)
Rotación	$6.9 \times 10^3 - 2.7 \times 10^4$	1.6×10^3	3.8×10^3
Raspado	$3.5 \times 10^4 - 3.9 \times 10^4$	1.5×10^4	2.3×10^4
Flujo invertido	$9.2 \times 10^3 - 2.3 \times 10^3$	8.6×10^3	3.5×10^3

En cuanto a los métodos ensayados para la eliminación de microbiota acompañante, tras la IMS no se obtuvo crecimiento de colonias de *H. pylori*, ni en el Medio Dent-C ni en el Medio Dent-B.

Se realizó una tinción SYTO/PI a partir del raspado de la superficie de las placas para observar el estado de las perlas. La tinción reveló que las células de *H. pylori*, tanto en forma helicoidal como cocoide, no llegaban a formar el complejo magnético con las perlas. El ensayo se repitió en dos ocasiones, con dos marcas comerciales y lotes distintos de cada una de ellas. Las perlas magnéticas fueron sensibilizadas *de novo* en todos los casos, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, previamente a su uso con *H. pylori*, obteniendo siempre los mismos resultados negativos.

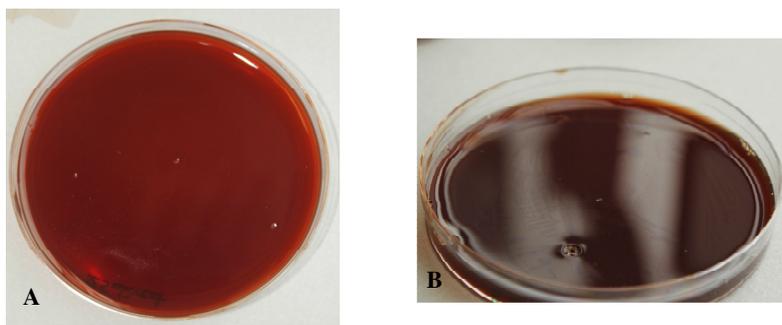
Las placas de cultivo donde se realizó la siembra de *H. pylori* tras el tratamiento de choque ácido no presentaron tampoco ningún crecimiento de colonias.

Ninguna de las dos técnicas de eliminación de microbiota acompañante resultó eficiente en muestras de agua, por lo que se descartó su uso en el protocolo de aislamiento de *H. pylori* en agua potable.

No se observaron diferencias significativas en las tasas de recuperación de células de *H. pylori* con los dos medios de cultivo estudiados, por lo que se decidió el uso del Agar Base Selectivo para *Campylobacter* (Medio Dent-C) para elaborar el medio selectivo de aislamiento de *H. pylori* en todos los ensayos posteriores.

2.1.2. Aislamiento e identificación por cultivo

Del total de las 63 muestras directas de agua potable analizadas, sólo se observó algún tipo de crecimiento bacteriano en un 18% (11/63) de las aguas (Figura 28), pero ninguna presentaba la morfología característica de *H. pylori*.



Figuras 28. Crecimiento bacteriano en Medio Dent-C de muestras directas de agua potable. M18 (A) M43 (B)

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable

Tras enriquecimiento, en un 76.1% (48/63) de las placas de medio de cultivo se observó crecimiento bacteriano (Figura 29). Se detectaron colonias con el aspecto característico de *H. pylori* en un 4.7% (3/63) de las placas. Todas ellas, sin embargo, presentaban un velo de crecimiento de microbiota acompañante que imposibilitó la purificación de las mismas en resiembras posteriores. Por este motivo, tras realizar una tinción Gram para observar su morfología, se recuperó material de los cultivos mixtos para realizar q-PCR y FISH y así poder confirmar la identificación de *H. pylori*.

Tras la identificación molecular por q-PCR mediante la amplificación con los iniciadores vacAR/vacAF y posterior secuenciación, sólo uno de los cultivos mixtos, procedente de la muestra M22 tras enriquecimiento, fue positivo para *H. pylori* (Tabla 19).

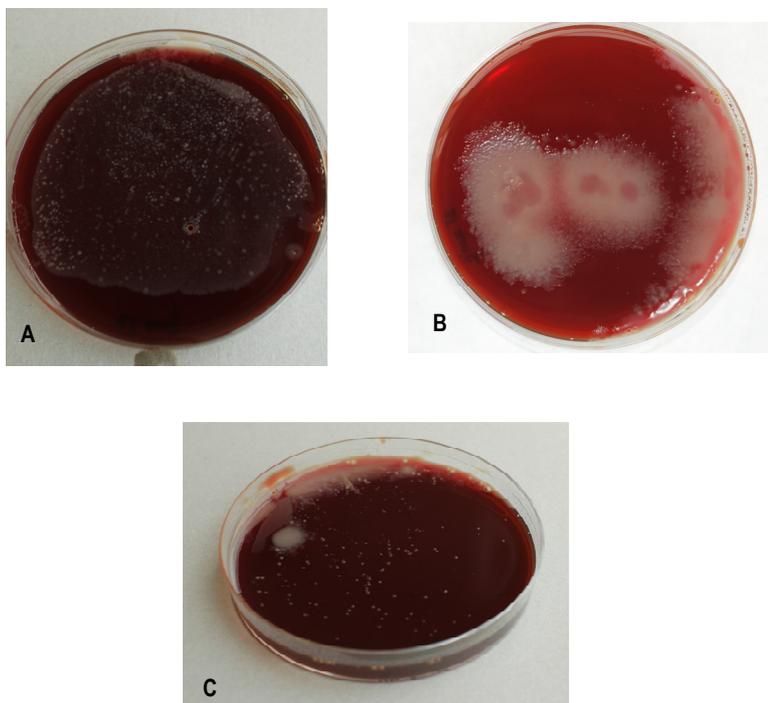


Figura 29. Crecimiento bacteriano en Medio Dent-C a partir de muestras de aguas potables tras enriquecimiento. M17 (A). M36 (B). M22, cultivo mixto con colonias de *H. pylori* (C).

2.2. Detección e identificación de *H. pylori* mediante q-PCR

Del total de las 63 muestras analizadas se obtuvieron 32 muestras positivas para *H. pylori* (Tabla 19). De éstas, 20 muestras fueron positivas tanto en el análisis directo como tras enriquecimiento. De las 12 restantes, 6 resultaron positivas sólo en muestra directa y 6 tras enriquecimiento. Se consideraron potencialmente positivas todas las muestras con valores de T_m comprendidos entre 84.8 y 86 (Figura 30). En 5 de las muestras directas positivas fue posible cuantificar la presencia de *H. pylori*, con valores de C_t dentro del rango de 29 y 33.5 ciclos (Figura 31), correspondientes a concentraciones entre 1.59×10^3 y 1.15×10^2 unidades genómicas /mL (Tabla 19).

En las 27 muestras positivas restantes no se pudo cuantificar la presencia de *H. pylori* ya que el valor del C_t estaba por encima del umbral de fiabilidad (>35 ciclos).

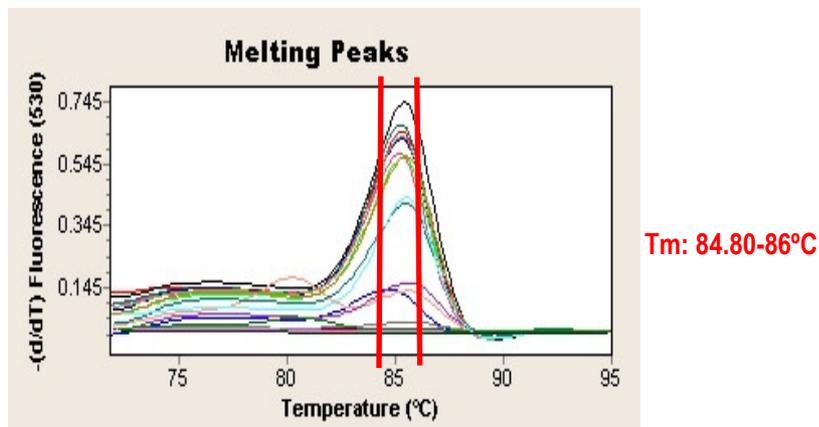


Figura 30. T_m de los iniciadores vacA, en muestras de agua potable

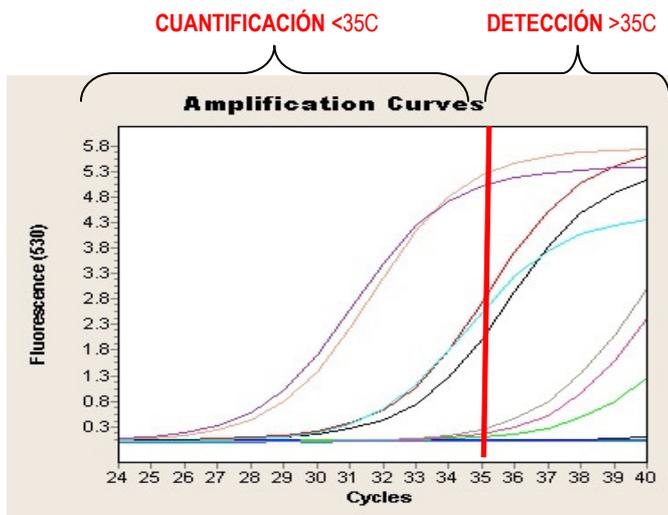


Figura 31. Curvas de amplificación del gen *vacA* de *H. pylori*, en muestras de agua potable

Todos los productos de qPCR fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, observándose la banda correspondiente al fragmento específico de 394 pb de *H. pylori* (Figura 32). A su vez, la secuenciación de los productos de q-PCR confirmó los resultados obtenidos.

El control de presencia de inhibidores de la Taq-polimerasa en la matriz, resultó ser negativa para todas las muestras. La diferencia entre los Ct de las muestras inoculadas y el control positivo no superaba el valor de 1 ciclo, por lo que se detectó la misma cantidad de ADN de *H. pylori* en muestra y control inoculados.

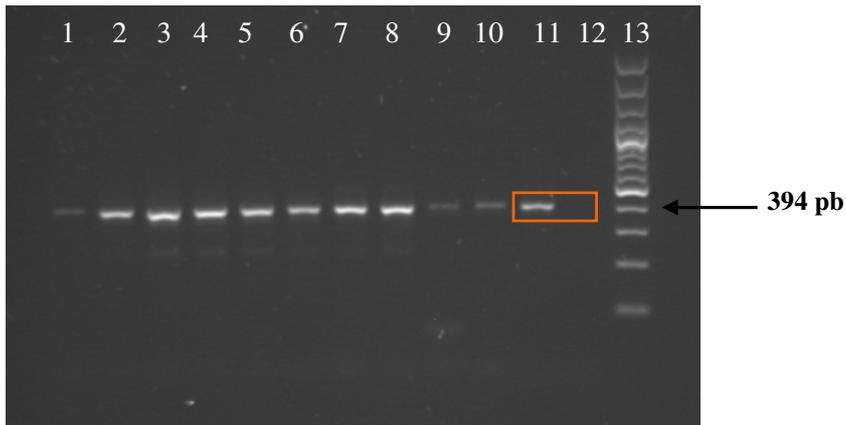


Figura 32. Detección de *H. pylori* en muestra directas de agua potable por electroforesis en gel de agarosa. 1: M34; 2: M38; 3: M40; 4: M42; 5: M51; 6: M52 ; 7: M53; 8: M54; 9: M55; 10: M56; 11: Control positivo 12: Control negativo; 13: Marcador de 100 pb.

2.3. Detección e identificación de células viables de *H. pylori*

Las técnicas ensayadas y aplicadas en este trabajo para la identificación de formas viables de *H. pylori* fueron la técnica q-PCR, combinada con el tratamiento con PMA (PMA-qPCR) y la técnica FISH combinada con el tratamiento DVC (DVC-FISH).

Se realizó un primer ensayo, por duplicado, con dos cepas de referencia de *H. pylori*, comparando los resultados con el marcaje con SYTO/PI y el cultivo. Los resultados de los recuentos en placa mostraron concentraciones iniciales de las suspensiones celulares de 9.6×10^7 ufc/ mL de la cepa NCTC 11637 y 7.6×10^7 ufc/mL de la cepa aislada de biopsia B6.

En la tabla 18 se observan los resultados obtenidos para las diferentes técnicas utilizadas.

Tabla 18. Resultados de la cuantificación, según técnica, de *H. pylori* en muestras inoculadas artificialmente

Ensayo	Cepa de referencia	SYTO9 (cel/mL)	DVC-FISH (cel/mL)	CULTIVO (ufc/mL)	PMA-qPCR (GU/mL)	q-PCR (GU/mL)
1	NCTC 11637 (Trat. Térmico)	2.05x10 ⁵	ND	ND	6.5x10 ²	1.56x10 ⁵
	NCTC 11637	2.65x10 ⁷	1.1x10 ⁶	2.95x10 ⁵	2.4x10 ⁶	4.88x10 ⁶
2	B6 (Trat. Térmico)	1.80x10 ⁵	4 x10 ²	ND	8.0x10 ³	4.3x10 ⁵
	B6	1.38x10 ⁷	9.0x10 ⁵	3.12x10 ⁵	1.5x10 ⁶	3.47x10 ⁶

El cultivo en placa realizado desde los inóculos, mostró una recuperación de células cultivables de dos órdenes logarítmicos inferior respecto a los inóculos iniciales (2.95x10⁵ ufc/mL cepa NCTC 11637 y 3.12 x10⁵ ufc/mL cepa B6). Los recuentos por cultivo de ambas cepas realizados desde las alícuotas sometidas a tratamiento térmico no presentaron crecimiento de colonias de *H. pylori*.

El recuento mediante la tinción con fluorocromos SYTO9/PI mostró una concentración de células teñidas de verde (vivas) del mismo orden que los inóculos iniciales en las alícuotas sin tratamiento térmico (1.38x10⁷ cel/mL cepa NCTC 11637 y 2.65x10⁷ cel/mL cepa B6). En las muestras tratadas térmicamente, el recuento mediante SYTO9/PI fue dos órdenes logarítmicos inferior con respecto a las muestras homólogas sin tratamiento (1.80x10⁵ cel/mL cepa NCTC 11637 y 2.05x10⁵ cel/mL cepa B6).

Todas las muestras presentaron amplificación de los fragmentos específicos de gen *vacA* de *H. pylori* tras el análisis mediante q-PCR y PMA-qPCR.

En las muestras sin tratamiento térmico, se obtuvo una cuantificación del orden de 10⁶ GU/mL en la detección de *H. pylori* con y sin pre-tratamiento con PMA. Los resultados muestran en ambos casos una pérdida de un orden logarítmico respecto a la concentración inicial del inóculo.

Para las muestras con tratamiento térmico, los resultados obtenidos mediante las técnicas q-PCR y PMA-qPCR con la cepa NCTC 11637 mostraron un descenso en la cuantificación de ADN de células viables, de hasta 4 órdenes logarítmicos (6.5x10² GU/mL), respecto a su muestra homóloga sin tratamiento térmico. Cuando se ensayó la cepa B6 se apreció una reducción de 3 órdenes logarítmicos (8.0x10³ GU/mL) respecto a la muestra sin tratamiento térmico (Tabla 18).

En las muestras sin tratamiento térmico, se observó una pérdida de 1-2 órdenes logarítmicos de células elongadas (metabolíticamente activas) respecto a la concentración inicial del inóculo, cuando se aplicaba la técnica DVC-FISH.

Con la técnica DVC-FISH, a partir de las alícuotas tratadas térmicamente de la cepa NCTC 11637 no fue posible la detección de células metabólicamente activas (células elongadas) posiblemente por estar por debajo del límite de detección de la técnica DVC-FISH ($<10^2$ cel /mL).

En la cepa B6 se detectó por SYTO9 10^5 cel/mL, que mantenían su integridad de membrana, de la cuales por DVC-FISH se determinó que mantenían su actividad metabólica 10^2 cel elongadas/mL.

La detección de células no viables (membrana dañada) mediante las técnicas PMA-qPCR y SYTO/PI fue en ambas de 10^2 cél/mL para la cepa NCTC11637 y de 10^2 - 10^3 cél/mL para la cepa B6, presentando ambas técnicas la misma eficiencia en la detección de daño celular.

Se observó también que el uso del fluoróforo CY3 para marcar las sondas EUB338, utilizadas como sondas control de la hibridación, producía mayor ruido de fondo en el proceso de hibridación y visualización de los resultados, por lo que se decidió invertir el marcaje de las sondas utilizadas: para la sonda HPYL-LNA se utilizó CY3, mientras que las sondas EUB338 se marcaron con el fluoróforo FAM. De esta forma se consiguió una mejor visualización de las células de *H. pylori* (Figura 33).

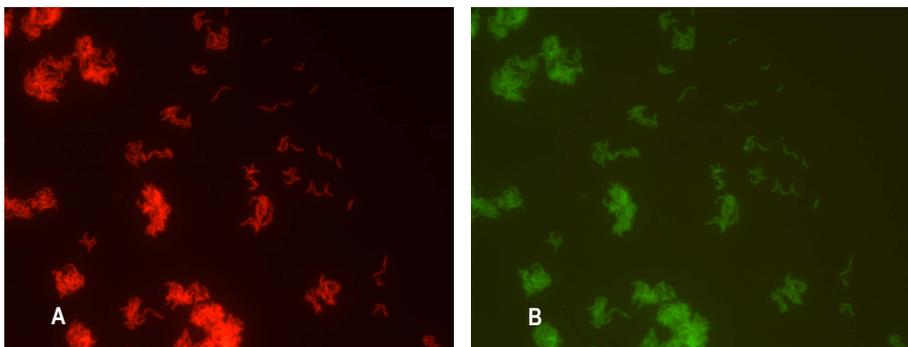


Figura 33: Hibridación de la cepa NCTC 11637 de *H. pylori* por FISH. Formamida 30 %. Sonda HPYL-LNA (CY3) (A). Sondas EUB338-I-II-II (FAM) (B)

2.3.1. Detección de ADN de células viables de *H. pylori* mediante PMA-qPCR

Cuando se realizó el análisis por PMA-qPCR de las muestras directas de agua potable, de las 32 muestras positivas por q-PCR se obtuvo producto de amplificación en 7 de ellas (7/32, 21.8 %). El análisis por PMA-qPCR únicamente fue posible de forma cualitativa, puesto que el valor del Ct estaba por encima del umbral de fiabilidad (>35 ciclos) para realizar la cuantificación.

2.3.2. Detección de células viables de *H. pylori* mediante DVC-FISH

Se identificaron células de *H. pylori* en un total de 29 de las 63 muestras analizadas, siendo el porcentaje de detección de un 46 % (29/63). Del total de muestras con presencia de *H. pylori* se detectaron células viables (elongadas) mediante DVC-FISH en 24 muestras, obteniendo valores de recuento entre 4×10^2 y 1.6×10^3 células viables de *H. pylori* /mL (Tabla 19). En las 5 restantes solo se identificaron formas cocoides del patógeno.

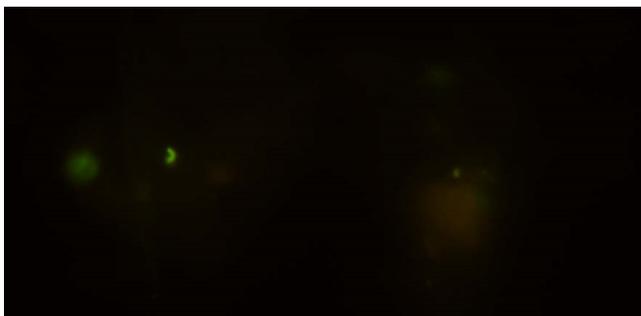


Figura 34. Célula viable de *H. pylori* hibridada con la sonda EUB 338

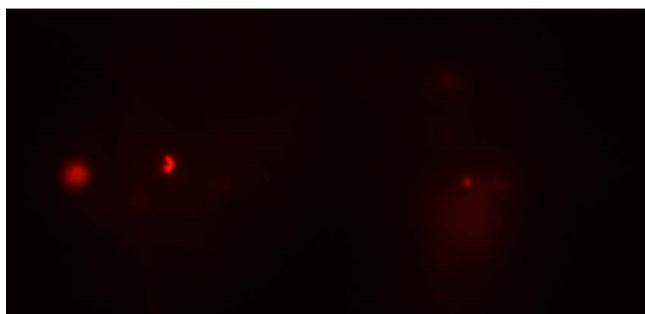


Figura 35. Célula viable de *H. pylori* hibridada con la sonda específica HPYL-LNA

2.3.3. Detección de *H. pylori* resistente a la claritromicina mediante FISH

Se realizó la hibridación *in situ* con las sondas CLAR I-II-III (claR mix) y la sonda HPYL-LNA con una concentración de formamida del 30 %. Todas las hibridaciones se realizaron a partir de muestras que previamente habían presentado resultado positivo para *H. pylori*.

En 11 de las muestras, las células de *H. pylori* presentaban la mutación específica que determina la resistencia a la claritromicina (Tabla 19). El porcentaje de detección de resistencia a la Claritromicina fue de 17.4 % (11/63) de las muestras analizadas.

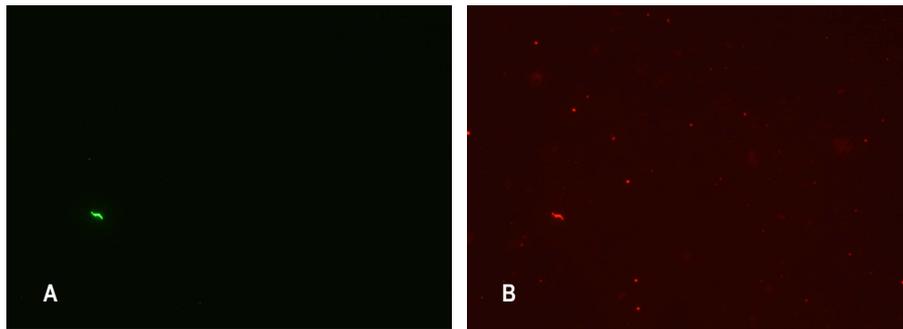


Figura 36. Detección de *H. pylori* resistente a la claritromicina por FISH. Hibridación con sondas claR mix (A). Hibridación con sonda EUB 338 (B)

TABLA RESULTADOS TOTALES EN AGUAS POTABLES

Tabla 19: Detección de *H. pylori* mediante q-PCR, PMA-qPCR, DVC-FISH y cultivo en muestras de agua potable

Muestra	Fecha	Vol. (L)	CULTIVO		q-PCR (GU/mL)		PMA- qPCR	DVC-FISH	FISH
			Directo	Enriq.	Directo	Enriq.	Directo	cel/mL	Claritromicina
M1	23/02/2012	5	-	-	-	*	-	-	-
M2	17/04/2012	5	-	-	*	-	-	-	-
M3	18/04/2012	5	-	-	-	-	-	6x10 ²	-
M4	18/04/2012	5	-	-	*	-	-	8x10 ²	-
M5	03/05/2012	5	-	-	*	*	-	-	-
M6	03/05/2012	5	-	-	*	*	*	4x10 ²	*
M7	10/05/2012	5	-	-	*	*	*	4x10 ²	*
M8	26/06/2012	5	-	-	-	-	-	-	-
M9	27/06/2012	5	-	-	*	-	-	-	-
M10	04/07/2012	5	-	-	*	*	-	-	-
M11	04/07/2012	5	-	-	*	*	-	-	-
M12	05/07/2012	5	-	-	*	*	*	6x10 ²	-
M13	05/07/2012	5	-	-	-	*	-	-	-
M14	06/11/2012	5	-	-	-	-	-	1x10 ³	-
M15		5	-	-	-	-	-	-	-
M16		5	-	-	*	-	-	-	-
M17		5	-	-	*	*	*	1.6x10 ³	*
M18	13/11/2012	5	-	-	*	*	-	-	-
M19		5	-	-	-	-	-	6x10 ²	-
M20		5	-	-	*	*	-	-	-

Continuación Tabla 19			CULTIVO		q-PCR (GU/mL)		PMA- qPCR	DVC-FISH	FISH
Muestra	Fecha	Vol. (L)	Directo	Enriq.	Directo	Enriq.	Directo	cel/mL	Clarithromicina
M21	20/11/2012	5	-	-	-	-	-	-	-
M22		5	-	*	-	*	-	-	-
M23		5	-	-	-	-	-	-	-
M24		5	-	-	-	-	-	-	-
M25	27/11/2012	5	-	-	-	-	-	-	-
M26		5	-	-	-	-	-	FISH	-
M27		5	-	-	-	-	-	-	-
M28		5	-	-	-	-	-	-	-
M29	04/12/2012	5	-	-	-	-	-	-	-
M30		5	-	-	-	-	-	-	-
M31		5	-	-	-	-	-	-	-
M32	18/12/2012	5	-	-	-	-	-	-	-
M33		5	-	-	-	-	-	-	-
M34		5	-	-	*	*	*	1x10 ³	*
M35		5	-	-	-	-	-	-	-
M36	15/01/2013	5	-	-	-	-	-	-	-
M37		5	-	-	-	-	-	-	-
M38		5	-	-	*	-	*	8x10 ²	*
M39	23/01/2013	5	-	-	-	-	-	1.4x10 ³	-
M40		5	-	-	*	-	*	1.2x10 ³	*
M41		5	-	-	-	*	-	4x10 ²	*
M42		5	-	-	1.1x 10 ²	*	-	FISH	-
M43	29/01/2013	5	-	-	*	-	-	6x10 ²	-
M44	29/01/2013	5	-	-	-	*	-	6x10 ²	-

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *Helicobacter pylori* en Agua Potable

Continuación Tabla 19			CULTIVO		q-PCR (GU/mL)		PMA- qPCR	DVC-FISH	FISH
Muestra	Fecha	Vol. (L)	Directo	Enriq.	Directo	Enriq.	Directo	cel/mL	Clarithromicina
M45		5	-	-	*	*	-	FISH	*
M46		5	-	-	*	-	-	8x10 ²	*
M47	05/02/2013	5	-	-	-	-	-	4x10 ²	-
M48		5	-	-	-	-	-	-	-
M49		5	-	-	-	-	-	FISH	-
M50		5	-	-	-	-	-	6x10 ²	-
M51	12/02/2013	5	-	-	1.35x10 ²	*	-	8x10 ²	-
M52		5	-	-	1.59x10 ³	*	-	6x10 ²	*
M53		5	-	-	5.54x10 ²	*	-	-	-
M54		5	-	-	1.19x10 ²	*	-	6x10 ²	-
M55	19/02/2013	5	-	-	*	*	-	6x10 ²	*
M56		5	-	-	*	*	-	6x10 ²	-
M57		5	-	-	-	*	-	-	-
M58	25/02/2013	5	-	-	-	-	-	-	-
M59		5	-	-	-	-	-	-	-
M60		5	-	-	-	-	-	FISH	-
M61	05/03/2013	5	-	-	-	-	-	-	-
M62		5	-	-	-	-	-	-	-
M63		5	-	-	-	-	-	4x10 ²	-

- : Negativo (Ausencia)

* : Positivo (Presencia)

FISH: positivo en FISH (no elongadas)

3. DISCUSIÓN

Se ha sugerido que *Helicobacter pylori* es capaz de sobrevivir en biopelículas cuando crece bajo altas condiciones de C:N (Percival *et al.*, 2004), esta 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 predación por protozoos (Watson *et al.*, 2004). Se ha demostrado que *H. pylori* presenta mayor resistencia a la cloración que otros indicadores de contaminación fecal. Por tanto, aguas consideradas potables a nivel legislativo podrían contar con la presencia del patógeno. De hecho, es concebible que *H. pylori* sea capaz de persistir durante largos periodos de tiempo en sistemas de distribución de agua que contengan bajos niveles de cloro residual (Johnson *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 2007). Estudios previos indican que esta bacteria pierde su cultivabilidad en contacto con cloro durante periodos de tiempo cortos (1-5 min), aunque permanece en estado VNC (Moreno *et al.*, 2007).

Con el fin de poder establecer la presencia de *H. pylori* en los sistemas de distribución de agua, este trabajo se ha centrado en detectar *H. pylori* en diferentes fuentes de agua potable de nuestra zona geográfica. Se aplicaron técnicas capaces de determinar la viabilidad de las células, con el objetivo de establecer su potencial infectivo. La presencia de estas formas viables indicaría que el agua potable es una vía de transmisión al hombre, pudiendo representar un peligro para la salud pública.

Una de las limitaciones para aislar este patógeno debido a la baja concentración en la que se puede encontrar, es conseguir la máxima eficiencia en la recuperación de la bacteria desde las membranas de filtración en el procesado de muestra bruta. Para ello se realizó la evaluación de diferentes metodologías.

El ensayo de recuperación determinó que la metodología más eficiente para recuperar *H. pylori* tras realizar la filtración es el raspado de la membrana, una vez transferida asépticamente a un caldo de enriquecimiento. La recuperación mediante esta metodología produce una pérdida de un orden logarítmico, mientras que las otras dos técnicas evaluadas, rotación y flujo invertido, conllevan pérdidas de dos órdenes logarítmicos. El raspado con espátulas estériles facilita el desprendimiento de las células desde las fibras de la membrana hasta el caldo de enriquecimiento o diluyente, acción que se realiza en un corto periodo de tiempo, evitando al máximo el paso al estado de VNC de *H. pylori*.

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable

Dada a la dificultad en el aislamiento de *Helicobacter* en muestras ambientales, diversos autores han intentado mejorar los medios de cultivo y permitir un mejor aislamiento de la bacteria, sobre todo en muestras muy contaminadas, como es el caso de aguas o alimentos (Dent *et al.*, 1987; Eaton *et al.*, 1991; Jiang y Doyle, 2002; Degnan *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2006). A pesar de todas las modificaciones realizadas durante los últimos años en los medios de cultivo, en la actualidad no existe ningún medio óptimo para el aislamiento de *Helicobacter* en muestras ambientales, ya que la microbiota acompañante enmascara, en el caso de la presencia de *H. pylori*, su crecimiento. En este trabajo se evaluaron dos metodologías de siembra diferentes y dos medios de cultivo con distinta base.

La técnica de siembra sobre membrana de tamaño de poro de 0.65 μm , basada en la utilizada por Ceelen *et al.* (2006), que había resultado efectiva en el aislamiento a partir de aguas residuales, no resultó apropiada en el aislamiento de colonias de *H. pylori* a partir de agua potable. Aunque la tendencia es pensar que ambas matrices, agua residual y agua potable, presentan características muy similares, en la realidad difieren en composición y propiedades físicas, comportándose el agua potable como un ambiente más hostil que el agua residual que presenta mayor similitud con ambientes ricos en nutrientes.

Por el contrario, las siembras en masa presentaron crecimiento de colonias de *H. pylori*. Por tanto, tras el proceso de filtrado de muestras, una técnica de siembra rápida, que reduzca la exposición del patógeno a condiciones desfavorables por la presencia de oxígeno, puede favorecer la recuperación y aislamiento de *H. pylori* en muestras de agua potable.

Se realizaron ensayos sobre muestras inoculadas artificialmente con células de *H. pylori*, en los que se comprobó la efectividad de dos técnicas para la eliminación de microbiota acompañante, con el fin de paliar la falta de especificidad de los medios de cultivo: la separación inmunomagnética, basada en la afinidad de antígeno-anticuerpo (Lu *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2004; Brick *et al.*, 2004); y la técnica de choque ácido, basada en la capacidad de resistencia a ambientes ácidos de *H. pylori* (Rektorschek *et al.*, 2000; Shao *et al.*, 2003; Brick *et al.*, 2004).

En este estudio, la técnica de separación inmunomagnética se demostró inefectiva para concentrar específicamente las células de *H. pylori*: cuando se realizó la tinción SYTO/PI, se observó que ninguna célula de *H. pylori* se encontraba formando el complejo magnético. Se demostró que este resultado no dependía del producto comercial utilizado, ya que se realizó la IMS con dos sistemas

comerciales diferentes siguiendo el protocolo establecido por el fabricante en cada uno de los casos. Además, se sensibilizaron las perlas de *novo* en cada ensayo, al ser un paso relevante en la técnica de inmunoseparación. De cada ensayo se realizaron dos repeticiones, obteniéndose los mismos resultados negativos. La técnica IMS ha sido utilizada por varios autores para favorecer el aislamiento de *H. pylori*, pero únicamente Lu *et al.* (2002) consiguieron que funcionara en agua residual. Watson *et al.* (2004) realizaron la IMS para el aislamiento de *H. pylori* a partir de agua potable y concluyeron que la técnica no aportaba beneficio. De igual forma Brick *et al.* (2004) realizaron un estudio sobre detección de *H. pylori* en muestras de agua inoculadas artificialmente y concluyeron que la IMS no era eficaz para el aislamiento del patógeno como paso previo al cultivo, al no observar crecimiento de éste en los medios.

Al no observarse la unión entre las perlas inmunomagnéticas y las células de *H. pylori* en cultivos puros, se descartó ésta técnica para la determinación de la presencia de *H. pylori* en muestras reales de agua.

A pesar de los resultados de otros trabajos (Rektorschek *et al.*, 2000; Brick *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2008), el tratamiento con choque ácido tampoco favoreció el crecimiento de *H. pylori*. Las siembras realizadas desde la muestra sin tratamiento ácido demostraron que las células de las cepas de referencia utilizadas en el ensayo se encontraban en estado cultivable, por lo que el choque ácido es posible que ocasione daño celular, conclusión apoyada por Brick *et al.* (2004), que determinaron que distintas cepas de *H. pylori* presentan diferentes niveles de tolerancia a condiciones de acidez.

Por tanto, el tratamiento con choque ácido no es un tratamiento eficaz para favorecer el crecimiento de *H. pylori* frente a otros microorganismos intolerantes a medios ácidos, sobre todo en muestras donde se desconoce la tolerancia a la acidez de las posibles cepas presentes.

En este trabajo también se evaluaron y se emplearon diferentes medios de cultivo para el aislamiento de *H. pylori*, a partir de diferentes bases: Medio Dent-C con Agar Selectivo para *Campylobacter* y Medio Dent-B con Agar Sangre Columbia. Ambos contienen el suplemento de antibióticos Dent. Tras su evaluación en muestras artificialmente inoculadas con células de *H. pylori* se determinó que el uso de una base u otra no tiene una influencia significativa en la tasa de recuperación, por lo que se decidió utilizar Agar Selectivo para *Campylobacter*, por estar diseñado para el aislamiento específico de campylobacterias.

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable

A pesar de todos los inconvenientes descritos, se detectó presencia de colonias de *H. pylori* desde una muestra, tras su enriquecimiento. La identificación se confirmó mediante q-PCR, del gen *vacA* de *H. pylori* y posterior secuenciación del amplicón obtenido.

Este trabajo ha demostrado, por tanto, por primera vez la presencia de células cultivables de *H. pylori* en aguas potables. Dado que la cultivabilidad está intrínsecamente unida a la infectividad, con estos resultados queda patente que *H. pylori* puede estar presente en el agua potable en su forma infectiva.

La medición de cloro indicó que el cloro residual en las muestras analizadas de aguas potable oscilaba entre 0.5 y 0.9 mg/l, cantidades en las que *H. pylori* puede sobrevivir (Moreno *et al.*, 2007). Este resultado confirma las sugerencias de otros autores de que en caso de tratamientos potabilizadores inadecuados, interrumpidos o intermitentes, es posible que no se produzca una adecuada inactivación de *H. pylori* para prevenir la entrada y persistencia de la bacteria dentro de los sistemas de distribución de agua, suponiendo un riesgo de infección para los individuos que consuman estas aguas tratadas de forma deficiente (Baker *et al.*, 2002).

En este estudio la identificación fenotípica no fue posible debido a la dificultad para purificar las colonias sospechosas, lo que hizo necesario la aplicación de técnicas moleculares para confirmar la presencia de *H. pylori* en los medios de cultivo. La confirmación mediante PCR y/o FISH de las colonias características de *H. pylori* se muestra como un método alternativo, rápido y específico en estos casos en los que no es posible obtener un cultivo puro, por lo que se podría proponer como método para la identificación de colonias de *H. pylori* a la hora de establecer unos estándares de identificación.

Tal como puede observarse en los resultados, la técnica de cultivo no resulta adecuada para la detección de *H. pylori* en este tipo de muestras, debido en su mayor parte, a que la forma habitual de este patógeno en muestras ambientales es el estado viable no cultivable. Por otra parte, tras enriquecimiento, debido a la falta de un medio verdaderamente específico, la presencia de microbiota acompañante capaz de crecer en las mismas condiciones enmascara el posible crecimiento de este patógeno. Por tanto, la aplicación de técnicas moleculares resulta de gran utilidad para la detección eficiente de *H. pylori*.

Tras los resultados que se obtuvieron en el capítulo 1 al aplicar métodos de PCR y q-PCR en muestras de agua residual, y tras observar que la q-PCR presentaba mayor sensibilidad en la detección de *H. pylori*, se determinó el análisis de las muestras de agua potable únicamente mediante la q-PCR con los iniciadores vacAR/vacAF, que detectan el gen *vacA* de *H. pylori* presente en todas las cepas y en una única copia en el genoma de *H. pylori* (Bernard *et al.*, 2005). La cuantificación mediante q-PCR permite una relación directa con equivalentes genómicos del patógeno.

Mediante el análisis por q-PCR se obtuvieron un total de 32 muestras directas positivas para la presencia de *H. pylori*. Cinco de ellas cuantificables, con concentraciones por encima de 1×10^2 equivalentes genómicos.

Además de su detección, es de suma importancia determinar la viabilidad y por tanto el potencial infectivo de los patógenos. En la actualidad se emplean varias técnicas para detectar la viabilidad de las células de microorganismos. El cultivo en placa, aunque actualmente es la técnica más ampliamente utilizada y establecida en los standards internacionales para determinar viabilidad desde el punto de vista microbiológico, no detecta las células VNC.

La capacidad de algunos microorganismos, como *H. pylori*, de pasar a una fase viable no cultivable, ha hecho necesario el desarrollo de técnicas moleculares para su detección en muestras ambientales. Mediante éstas técnicas se evitan los problemas que presentan los métodos tradicionales de recuento, como la elección del medio de cultivo adecuado, la generación de atmósferas controladas y los largos períodos de incubación.

Una de las técnicas más utilizadas en la detección de viabilidad, pero que no permite la identificación específica de los microorganismos, es la técnica LIVE/DEAD, basada en el recuento de células vivas y muertas, mediante tinción diferencial de las células que presentan membrana integra o dañada, respectivamente.

Los resultados del recuento con SYTO9 /PI en las muestras inoculadas artificialmente que sufrieron tratamiento térmico, se determinaron como sobreestimados por no presentar la reducción de células con fluorescencia verde (vivas) esperada. Estos resultados coinciden con los estudios de Stiefel *et al.*, (2015), quienes determinaron que factores externos como las condiciones ambientales o el estadio fisiológico de las células podían influir en los recuentos SYTO9/PI. Además, observaron que

en ocasiones el PI no sustituía la unión SYTO9-ácidos nucleicos por ser esta unión muy estable, por lo que células no viables se mostraban con fluorescencia verde, contabilizándolas en los recuentos como viables a pesar de tener daños en la membrana celular y estar metabólicamente inactivas. Resultado apoyado por el grupo de Berney *et al.*, (2007), quienes realizaron estudios de viabilidad de bacterias en muestras de agua, incluyendo *H. pylori*. Según los resultados obtenidos en este trabajo la técnica de SYTO9/PI para la determinación de viabilidad de *H. pylori* en agua potable no resulta eficiente en la identificación específica ni en el recuento de viables y los resultados obtenidos con este método deberían ser confirmados por otras técnicas con mayor fiabilidad.

La técnica q-PCR tiene una alta sensibilidad para la detección e identificación de microorganismos, pero posee la desventaja de no poder discriminar entre células viables y no viables. El uso del agente intercalante Propidio Monoazida (PMA) en un pretratamiento previo a la extracción del material genético, posibilita la amplificación del ADN perteneciente a células con la membrana intacta, consideradas células viables. Por lo que mediante la técnica PMA-qPCR y el uso de los iniciadores vacAR/vacAF se detecta, identifica y cuantifica el ADN de células viables de *H. pylori*.

Aunque esta técnica es altamente sensible puede presentar inhibidores en la propia muestra dando lugar a falsos negativos (Kabir, 2004). Además, los resultados de los ensayos con muestras inoculadas artificialmente para la puesta a punto del PMA-q-PCR, mostraron una reducción de un orden logarítmico respecto al recuento del inóculo inicial, en las muestras no tratadas con PMA. Esta disminución posiblemente este ocasionada por pérdidas de células en distintas fases del protocolo. Estas pérdidas podrían ocasionar falsos negativos en la detección de *H. pylori* si éste se encontrase en bajas cantidades en la muestra original.

La técnica FISH combina la identificación morfológica con la identificación molecular mediante sondas fluorescentes específicas a fragmentos del ARNr del microorganismo estudio. Si a su vez, se combina con la incubación previa DVC, se consigue diferenciar células viables de células no viables, mediante la visualización en el microscopio de epifluorescencia de la elongación y engrosamiento de las células viables.

Los resultados de viabilidad obtenidos en el ensayo de recuperación a partir de muestras inoculadas artificialmente mostraron que la técnica DVC-FISH es una técnica capaz de detectar células viables de *H. pylori* en muestras de agua. Si se comparan con los resultados obtenidos a partir del

cultivo, se puede observar que los recuentos se encuentran en el mismo orden logarítmico, por lo que se puede concluir que la técnica DVC-FISH es una técnica sensible y específica para detectar células viables del patógeno y que además incorpora al análisis la rapidez en la obtención de resultados, en comparación con las técnicas convencionales de cultivo. Además, la técnica DVC-FISH no presenta inhibidores y permite el recuento y visualización de células.

Nuestros resultados mostraron que la técnica PMA- qPCR es menos sensible para la detección de células viables de *H. pylori* en muestras de agua potable que la técnica DVC-FISH, que demostró ser más adecuada para la detección y diferenciación de las células viables, presentando una alta especificidad y rapidez en la obtención de resultados. A pesar de ello, algunos resultados muestran desviaciones con respecto a los resultados esperados, ya que la concentración de *H. pylori* en este tipo de matrices se encuentra en el rango del límite de detección de estas técnicas moleculares.

La cuantificación de este patógeno mediante DVC-FISH demuestra la presencia de un número considerable de células viables, y por tanto potencialmente infectivas, de *H. pylori* en muestras de agua potable. La alta tasa de detección de *H. pylori* en las muestras de aguas potables analizadas (66%) en este estudio, demuestra la capacidad de este patógeno de resistir concentraciones de cloro libre entre 0.5 y 1 mg/L, y evidencia la posibilidad de que el agua potable actúe como importante vehículo de transmisión de este patógeno emergente al hombre.

El porcentaje de muestras que contenían células viables de *H. pylori* resistentes a la claritromicina, fue de un 17.4%. En los últimos años, se ha considerado que la búsqueda de marcadores de virulencia relacionados con las resistencias a antibióticos es una de las mejores estrategias para el estudio epidemiológico del microorganismo (Agudo *et al.*, 2010). En 2014 la Food and Drug Administration de Estados Unidos (USFDA) incluyó a *H. pylori* en su lista de patógenos que suponen una amenaza grave para la Salud Pública, debido al drástico incremento en las resistencias a antibióticos que se observan a nivel global.

La misma institución estableció en su informe la frecuencia con la que se presentan resistencias a la claritromicina (10-30%), metronidazol (15-40% de resistencias), o quinolonas en cepas de *H. pylori*, y que van en aumento en todos los países del mundo (Food and Drug Administration, 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las cepas ambientales de *H. pylori* presentan tasas de resistencias similares a las obtenidas en muestras clínicas. Dada la facilidad con que se

Capítulo 2: Estudio de la presencia de *H. pylori* en Agua Potable

diseminan estas resistencias en el ambiente (Thung, *et al.*, 2015), este trabajo pone de manifiesto el riesgo que, en este sentido, podría suponer el agua como vehículo de transmisión de estas cepas resistentes a los tratamientos clínicos habituales.

DISCUSIÓN GENERAL

1. DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo se ha centrado en la detección e identificación de células viables de *Helicobacter pylori* en agua. Concretamente, se ha buscado su presencia en 2 tipos de matrices acuáticas: agua residual y agua potable. Estos estudios tienen como finalidad esclarecer la posible transmisión de *H. pylori* mediante el agua y su potencial de infección en el ser humano. El estudio de la presencia en agua residual queda justificado ya que el tipo de transmisión del patógeno es fecal-oral. En el caso de agua potable, es de suma importancia la determinación de la presencia de *H. pylori* en las misma ya que esta podría ser fuente de contaminación directa por ingestión continuada. Del mismo modo, el estudio de la supervivencia de *H. pylori* a los diferentes tratamientos de depuración realizados en las EDARs, permite evaluar la eficacia de los mismos en la eliminación del patógeno, de máxima importancia cuando el efluente es reutilizado en el riego de cultivos.

Para la detección e identificación de *H. pylori* se aplicaron diversas técnicas moleculares: PCR, PCR a Tiempo Real y la técnica FISH. Todas ellas son técnicas con una alta sensibilidad y especificidad en la detección de patógenos a nivel molecular, pero ésta puede variar dependiendo de la matriz analizada.

En este trabajo se realizó la puesta a punto de un ensayo de PCR a Tiempo Real (q-PCR) con los iniciadores *vacA* para la detección de *H. pylori*. La q-PCR como cabía esperar, presentó mayor sensibilidad en la detección del patógeno que la PCR tradicional, además de permitir la cuantificación del mismo en la muestra. Los análisis de cuantificación en muestras de agua estéril inoculadas mostraron que la técnica puede llegar a detectar, pero no cuantificar, concentraciones de un orden logarítmico. Janson *et al.* (2009) realizaron la puesta a punto de la detección de los genes *hpaA* y *glmM*, comprobando que la sensibilidad de la técnica era muy alta, siendo el límite de detección inferior de orden logarítmico. Nuestro estudio confirma que la q-PCR en matrices donde no hay presencia de inhibidores puede llegar a detectar concentraciones de un orden logarítmico de *H. pylori*.

Uno de los grandes inconvenientes que presenta la PCR es su susceptibilidad frente a inhibidores presentes en este tipo de muestras, lo que puede ocasionar la obtención de falsos negativos, por la inhibición de la acción de la Taq- polimerasa. Las aguas pueden contener sustancias inhibitorias de la PCR como ácidos fúnicos, ácidos húmicos, polifenoles, metales pesados entre otros, que provocan la inhibición de la reacción enzimática (Schrader *et al.*, 2012) y con ello la pérdida de

Discusión General

sensibilidad de la técnica. Por ello, es necesario controlar la presencia de estos inhibidores para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Por otra parte, las técnicas basadas en la detección del ADN no proporcionan información sobre la morfología o la distribución espacial de los microorganismos.

La técnica FISH permite la visualización, identificación, enumeración y localización simultánea de células microbianas (Amman *et al.*, 1995) y no presenta inhibidores conocidos que eviten la hibridación entre sonda ADN y ARNr de la bacteria diana. Moreno *et al.* (2003), concluyeron que la técnica FISH, a pesar de no presentar, por lo general, una sensibilidad alta en muestras ambientales, permitía obtener mejores resultados en muestras de agua que la detección mediante PCR. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sostienen la misma conclusión dado que, a pesar de ser teóricamente menos sensible, mediante FISH se obtuvieron tasas de detección del patógeno mayores que por las técnicas PCR y q-PCR, a pesar de no encontrarse inhibidores en las muestras analizadas.

Para eliminar el inconveniente de la pérdida de fluorescencia y aumentar la intensidad de la misma, en este trabajo se emplearon sondas LNA, más estables, sensibles y específicas que las convencionales (Kubota *et al.*, 2006)

Una importante ventaja de la técnica FISH frente a otros métodos moleculares es su capacidad de discernir entre diferentes morfologías de la misma bacteria, lo que posibilita la distinción entre formas cocoides y formas helicoidales de *H. pylori*. Dicha diferenciación aporta importante información frente al resto de técnicas empleadas en la detección de *H. pylori*

En este trabajo las formas cocoides de *H. pylori*, que son formas Viables No Cultivables, presentaban una señal fluorescente intensa al hibridar con la sonda LNA-HPYL, con lo que se aprecia que su contenido en ARNr no se ve afectado por las condiciones de estrés. Estos resultados están en línea con los que obtuvieron Trebesius *et al.* (2000), quienes concluyeron que las formas cocoides de *H. pylori* presentan una concentración importante de ARNr al que puede unirse la sonda específica.

En los últimos años se ha estudiado las formas VNC y su potencial infectivo. Li *et al.* (2014) señalaron que son células que sufren una reducción del tamaño celular, posiblemente para minimizar los requerimientos energéticos, pero que no presentan daños en la membrana celular, manteniendo una actividad metabólica baja, y destacaron que muchas de las especies con la capacidad de pasar al

estado de VNC como respuesta a unas condiciones desfavorables, son capaces de revertir éste estado y recuperar su poder infectivo. Saito *et al.* (2012), por su parte, demostraron que las formas cocoides de *H. pylori* no son “entidades” pasivas sino que pueden infectar activamente las células epiteliales gástricas del hombre.

De acuerdo con lo anterior, que la técnica FISH permita detectar las formas Viables No Cultivables de *H. pylori* y determinar su morfología cocoide representa un importante adelanto para esclarecer el posible papel del agua como vía de transmisión del patógeno.

Tanto la técnica q-PCR como FISH son técnicas moleculares que no detectan viabilidad celular. Para determinar si la presencia de *H. pylori* en el agua puede representar un riesgo para el hombre es necesario comprobar que éste es viable y por tanto potencialmente infectivo. La incorporación de pre-tratamientos combinados con las técnicas moleculares posibilita la detección de ADN de células viables en el caso de la q-PCR, y la detección de células metabólicamente activas en el de FISH. En el presente trabajo se pusieron a punto las técnicas PMA-qPCR y DVC-FISH con esta finalidad. Los resultados mostraron que, para este tipo de muestras, la técnica con mayor sensibilidad y eficacia en la detección de células viables resulta ser DVC-FISH.

El conocimiento de la incapacidad de cultivar microorganismos que se encuentran en estado viable no cultivable, entre los que se encuentra *H. pylori*, ha hecho que en los últimos años cada vez se considere más la aplicación de las técnicas moleculares como métodos estandarizados. Aún así, para verificar un método de detección nuevo se debe comparar con el método de detección estándar, que es el cultivo (Nocker *et al.*, 2009). Por otra parte, la demostración indiscutible de que un microorganismo es infectivo consiste en demostrar su capacidad para crecer en cultivo a partir de la muestra en que se halla (EPA, 2015). Por ello, en esta tesis, junto con las técnicas moleculares se ha utilizado simultáneamente el método de cultivo en placa para la detección y posible aislamiento del patógeno.

En la actualidad no existe un medio de cultivo óptimo para el aislamiento de *H. pylori* de muestras ambientales, lo que disminuye significativamente el potencial uso de esta técnica, tanto para el diagnóstico como para los estudios epidemiológicos. Varios autores han tratado de mejorar la capacidad de los medios de cultivo para favorecer el crecimiento y aislamiento de *H. pylori*, mediante la incorporación de nutrientes, acidificación del medio y adición de antibióticos para la eliminación de

Discusión General

microbiota acompañante (Dent *et al.*, 1987; Eaton *et al.*, 1991; Stevenson *et al.*, 2000; Jiang y Doyle, 2002; Degnan *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2006).

En nuestro caso, se realizó el estudio de la eficacia del medio Agar Dent con diferentes bases de Agar nutritivo, y se concluyó que el uso de Agar Columbia Blood o Agar selectivo para *Campylobacter* no es un factor determinante para el aislamiento de *H. pylori*, puesto que los dos mostraron la misma tasa de recuperación. Además se estudió el efecto de la adición de suero fetal bovino al medio de cultivo, observando que el SFB no mejora el crecimiento del patógeno estudio.

Dado que las modificaciones de los medios no favorecieron el aislamiento de *H. pylori* a partir de las muestras de agua, se estudiaron diferentes metodologías de siembra y recuperación del patógeno para eliminar microbiota acompañante y aumentar la selectividad.

Con el método modificado de Ceelen *et al.* (2006) se consiguió observar colonias de *H. pylori*. A pesar de que no se consiguió purificar totalmente el cultivo, si que se pudo identificar en él la presencia del patógeno mediante FISH, PCR y posterior secuenciación del fragmento VacA.

La técnica FISH resultó ser muy eficaz para la identificación de *H. pylori* en las colonias, puesto que no se necesita de una resiembra en ASC y posterior identificación bioquímica para confirmar su presencia. Esta técnica podría reducir mucho el tiempo empleado para la posterior purificación e identificación de colonias y generar resultados incluso cuando hay presencia de microbiota acompañante y la purificación no es posible, como en el caso de las muestras ambientales. El hecho de haber optimizado un protocolo para cultivar e identificar *H. pylori* a partir de muestras ambientales es un resultado de gran relevancia, debido a la dificultad que presenta su aislamiento. Anteriormente sólo se había conseguido una única vez a partir de este tipo de muestras (Lu *et al.*, 2001).

Las políticas medioambientales están avanzando hacia una reutilización de los recursos hídricos, sobre todo en zonas donde la escasez de agua es cada vez más evidente. El aprovechamiento de aguas depuradas para el riego se muestra como una alternativa muy eficaz, siempre que se mejoren los tratamientos en las depuradoras con un posterior paso de desinfección, ya que ésta se convertiría en un potencial vehículo de transmisión de los patógenos presentes en la misma a través del riego. En el caso de *H. pylori* está demostrado que sobrevive en las hortalizas que

han sido irrigadas con aguas contaminadas con éste patógeno durante largos periodos de tiempo (Atapoor *et al.*, 2014), entrañando un importante riesgo para la salud.

Un resultado a destacar en este trabajo, es que se detectó *H. pylori* en los diferentes puntos de muestreo a lo largo del tratamiento de depuración de agua residual, incluyendo el efluente reutilizado para el riego. Este trabajo muestra que los procesos de depuración reducen la presencia de *H. pylori* en las aguas depuradas y desinfectadas pero que no se alcanza la eliminación completa. Benami *et al.* (2014) sugirieron que la desinfección de aguas residuales mediante tratamiento biológico y posterior desinfección con cloro o UV es efectiva para el tratamiento de los patógenos, pero remarcaron que la eficiencia de inactivación no se puede estimar por la técnica q-PCR, ya que la presencia de ADN por sí misma no determina la viabilidad celular. Este trabajo doctoral manifiesta que la detección e identificación mediante la técnica DVC-FISH posibilitaría estimar la eficiencia de inactivación de los distintos tratamientos. Del mismo modo nos permitiría la diferenciación de las distintas morfologías del patógeno, incluyendo la cocoide, y por tanto estado fisiológico del mismo.

Una de las grandes limitaciones de la detección de *H. pylori* en aguas potables es aumentar la sensibilidad de las técnicas. Para detectar pequeñas concentraciones del patógeno, usualmente es necesario concentrar grandes volúmenes de agua, lo que puede ocasionar la concentración simultánea de inhibidores de PCR (Jiang *et al.*, 2005; Schrader *et al.*, 2012). La optimización del protocolo de recuperación de *H. pylori* desde membranas de filtración puesto a punto en este trabajo, permitió detectar su presencia a partir de un volumen de 5 L de agua.

Además de demostrar la presencia de este patógeno en aguas potables, se ha podido determinar simultáneamente, por primera vez, su viabilidad. Este resultado es de suma importancia, ya que evidencia la transmisión del patógeno a través del agua de consumo y su potencial infectivo.

La cuantificación de este patógeno mediante DVC-FISH demuestra la presencia de un número considerable de células viables, con actividad metabólica y por tanto potencialmente infectivas, de *H. pylori* en muestras de agua potable.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), ha incluido a *H. pylori* dentro de la Lista 3 de candidatos para incorporar su control a la legislación que rige la normativa de control ambiental de patógenos. *H. pylori* permanece como candidato a la espera de obtener un método

Discusión General

estandarizado para su detección e identificación en muestras ambientales. Este trabajo doctoral plantea la posibilidad de utilizar el método DVC-FISH como óptimo para la detección e identificación de *H. pylori* viable en matrices ambientales. Del mismo modo, y mientras no exista un medio de cultivo óptimo para la detección del patógeno, nos permite proponer una metodología de identificación en aguas consistente en el cultivo de la muestra concentrada, seguido de la identificación mediante FISH y/o qPCR de las presuntas colonias de *H. pylori*, incluso aunque se hallen cubiertas por microbiota acompañante. Este protocolo mejora enormemente la eficacia del proceso y reduce los tiempos de identificación.

Nuestro estudio ha demostrado también la presencia de células de *H. pylori* resistentes a la claritromicina en el 41.6 % de aguas residuales y en el 17.4 % de las muestras de agua potable y positivas, estas últimas además viables.

El porcentaje de detección de cepas resistentes a la claritromicina en aguas residuales puede deberse al alto contenido de residuos fecales en la composición de las mismas, ya que a ellas llegan las excretas del hombre. Por otro lado, el porcentaje de detección de cepas resistentes al antibiótico en agua potable es prácticamente el mismo que se detecta en muestras clínicas a nivel mundial (Ghotaslou, *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos, por tanto, evidencian la necesidad de monitorizar la presencia de estas cepas resistentes en el ambiente, ya que el agua puede suponer un riesgo para la expansión de las resistencias, y los consiguientes fallos terapéuticos en la práctica clínica.

Los datos de esta tesis doctoral reafirman el papel del agua como vía de transmisión de *H. pylori*, demostrando que este patógeno es capaz de sobrevivir a los diferentes tratamientos del agua. Y llegar al hombre indirectamente a través del riego con aguas reutilizadas y directamente mediante la ingestión de agua potable. Nuestros resultados resaltan la importancia de realizar controles habituales para la detección de *H. pylori*, y ponen de manifiesto la infravaloración del potencial infeccioso de este tipo de muestras ambientales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Tanto la técnica FISH como la q-PCR han demostrado ser métodos rápidos y específicos para la detección e identificación de *H. pylori* en aguas residuales y aguas depuradas.
2. Los iniciadores vacAR/vacAF presentan una alta especificidad para la detección de *H. pylori*, posibilitando la cuantificación del número de equivalentes genómicos presentes en las muestras.
3. El método q-PCR para la detección de *H. pylori* en aguas residuales necesita de un paso previo de enriquecimiento para aumentar su eficacia, mientras que la técnica FISH no necesita de este enriquecimiento para ser más eficaz.
4. Las técnicas FISH y q-PCR han demostrado ser métodos rápidos y específicos para la detección directa e identificación de *H. pylori* en agua potable.
5. La técnica DVC-FISH es un método más eficiente que la técnica PMA-qPCR para la identificación de células viables de *H.pylori* en aguas potables.
6. El método de cultivo no es adecuado para el aislamiento e identificación de *H. pylori* en aguas residuales, depuradas y potables, por su falta de especificidad. La técnica de “siembra sobre membrana” permite eliminar la microbiota acompañante y mejorar la detección del patógeno.
7. Además de para la detección de *H. pylori*, las técnicas FISH y q-PCR han demostrado ser métodos rápidos y específicos para la identificación de las presuntas colonias de *H. pylori* obtenidas en un medio de cultivo, sin necesidad de su posterior resiembra y purificación.

Conclusiones

8. *H. pylori* es capaz de sobrevivir al tratamiento de depuración del agua residual en una EDAR, lo que debería ser considerado al evaluar el riesgo potencial de su reutilización para el riego. Del mismo modo, se demuestra que el agua depurada podría actuar como vehículo de transmisión al hombre de este patógeno emergente.

9. En este trabajo se ha conseguido detectar, por primera vez, la presencia de células viables de *H. pylori* en agua potable para consumo, lo que evidencia que el agua potable podría actuar como vehículo de transmisión a los humanos.

10. *H. pylori* es capaz de sobrevivir a las concentraciones de cloro libre residual que se encuentran en los puntos finales de la red de distribución, lo que debería ser considerado al evaluar el riesgo potencial del consumo de agua potable de fuentes públicas.

11. En el 17.4 % de las muestras de agua potable y en el 41.6 % de aguas residuales positivas para *H. pylori* se han detectado cepas resistentes a la claritromicina. Estos resultados ponen de manifiesto el riesgo adicional que el agua puede suponer para la expansión de las resistencias, y los consiguientes fallos terapéuticos en la práctica clínica.

12. En vista a los resultados obtenidos, se proponen los protocolos puestos a punto en esta tesis, principalmente el DVC-FISH, como validables para el control ambiental eficaz de *H. pylori*.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Agudo, S., Pérez-Pérez, G., Alarcón, T., and López-Brea, M. 2010. High Prevalence of Clarithromycin-Resistant *H. pylori* Strains and Risk Factors Associated with Resistance in Madrid, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 48, p. 3703–3707.
- Akcam, Y., Ersan S., Alper M., Bicik Z., and Aytug, N. 2000. The transmission of *Helicobacter pylori* via exposure to common sources outweighs the person- to- person contact among spouses in developing countries. *The American Journal of Gastroenterology*. 95: 317-319.
- Amman, R. I., Ludwig W., and Schleifer K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59: 143-169.
- Atapoor, S., Dehkordi, F. S., and Rahimi, D., 2014. Detection of *Helicobacter pylori* in various types of vegetables and salads. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 7 (5): e10013.
- Axon, A. 2014. *Helicobacter pylori* and Public Health. *Helicobacter*. 19 (S1): 68–73.
- Azevedo, N. F., Pacheco, A. P., Keevil, C. W., and Vieira, M. J. 2004. Nutrient shock and incubation atmosphere influence recovery of culturable *Helicobacter pylori* from water. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 490-493.

B

- Baker, K .H, Hegarty, J. P, Redmond, B, Reed, N. A, and Herson, D. S. 2002. Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine and ozone) on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 981.
- Barcina, I., Arana, I., Santorum, P., Iriberrri, J. and Egea, I. 1995. Direct viable count of Gram-positive and Gram-negative bacteria using ciprofloxacin as inhibitor of cellular division. *Journal of Microbiological Methods*. 22: 139-150.
- Bassily, S., Frenck, R. W., Mohareb, E. W., Wierzba, T., Savarino, S., Hall, E., Kotkat, E., Naficy, A., Hyams, K. C., and Clemens J. 1999. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* among Egyptian newborns and their mothers: a preliminary report. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61: 37-40.

Bibliografía

- Bates, T. C., and Oliver, J. D. 2004. The viable but non-culturable state of kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Microbiology*. 42, 74-79.
- Bernard, M., Cappon, A., Pancotto, L., Ruggiero, P., Rivera Giuseppe Del Giudice, J., and Montecucco, C. 2005. The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. *Cellular Microbiology*. 7 (2), 191-198.
- Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann H. U., and Egli, T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (10): 3283-3290.
- Blum, A. L. 1997. An historical overview of *Helicobacter*-associated disorders. The Immunobiology of *H. pylori*. New York. XIV-XIX.
- Bode, G., Mauch F., and Malfertheiner P. 1993. The coccoids forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiology and Infection*. 111: 483-490.
- Bopp, B. A.; Sonders, R. C. and Kesterson, J. W. 1986. Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine. *Critical Reviews in Toxicology*. 16:213-306.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., and Valdezate, S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29 (8):601-608.
- Brick, G., Chisholm, S., Lai, S., Said, B., Owen, R. Nichols, G. and Lee, J. V. 2004. Further studies on the incidence of *Helicobacter* organisms in water supplies. *The Health Protection Agency to the Drinking Water Inspectorate for Variation*. 70 (2):146.
- Brissaud, F., 2008. Criteria for water recycling and reuse in the Mediterranean countries. *Desalination*. 218; 24-33.
- Bunn, J., MacKay, W. G., Thomas, J. E., Reid, D. C., and Weaver, L. T. 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Letters in Applied Microbiology*. 34: 450-454.

C

- Calduch, J. V., Segarra, M. M., Colomina, J., Llorca, C., and Pascual, R. 2003. *Vibrio cholerae* no-01 en paciente inmunodeprimida. *Anales de Medicina Interna*. 20: 630-632.

- Ceelen, M. L., Decostere, A., Van den Bulck K., On L. W., Baele M., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. 2006. *Helicobacter pullorum* in chickens, Belgium. *Emerging Infectious Diseases journal*. 12: 263-267.
- Choi, Y. K., Han, J. H., and Joo, H. S. 2001. Identification of novel *Helicobacter* species in pig stomachs by PCR and partial sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 3311-2215.
- Cohn, P. D., Cox, M., and Beger, N. J. 2002. Aspectos de la calidad del agua. Salud y estética. En calidad y tratamiento del agua. Manual de suministros de agua comunitaria. *RD Letterman (Ed. España)*. Editorial: McGraw Hill, pp. 5.98-5.118.
- Colwell, R. R and Grimes, D. J. 2000. Nonculturable Microorganisms in the Environment. In R. R. Colwell and D. J. Grimes (eds.), Nonculturable Microorganisms in the Environment. *American Society for Microbiology Press*. Ed: Washington, D.C.
- Colwell R. R. 2000. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 6:121–125.
- Cotticelli, L, Borrelli, M, D'Alessio, A. C., Menzione, M., Villani, A., and Piccolo, G. 2006. Central serous chorioretinopathy and *Helicobacter pylori*. *European Journal of Ophthalmology* . 16: 274- 278.
- Coullier, J., Prevots, M. and Rompre, A. 1994. The optimization and application of two direct viable count methods for bacteria in distributed drinking water. *Canadian Journal of Microbiology*. 40: 830-836.
- Cover, T. L., and Blaser, M. J. 1995. *Helicobacter pylori* a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. *American Society for Microbiology Features*. 61: 21-26.

D

- Day, A. P., and Oliver, J. D. 2004. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but non-culturable state. *Journal of Microbiology*. 42, 69-73.
- Degnan, A. J., Sonzogni, W. C., Standrige, J. H. 2003. Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 2914-2918.
- Dent, J. C., McNulty, C. A. M., Uff, J. C., Wilkinson, S. P., and Gear, M. W. L. 1987. Spiral organisms in the gastric antrum. *The Lancet*. 2:96-98.

Bibliografía

- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases journal*. 8 (9), pp: 881-890.
- Dorer, M. S., Talarico, S., and Salama, N. R. 2009. *Helicobacter pylori's* Unconventional Role in Health and Disease. *PLoS Pathogens*. 5(10): e1000544. doi:10.1371.
- Du, Y. Q., Su, T., Fan, J. G. Lu, Y. X., Zheng, P., Li, X. H., Guo, C. Y., Xu, P., Gong, Y. F., and Li, Z. S. 2012. Adjuvant probiotics improve the eradication effect of triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*. 21; 18 (43): 6302-6307.
- Dunn, B. E., Cohen, H., and Blaser, M. 1997. *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology Reviews*.10: 720-741.

E

- Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., and Krakowka, S. 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity*. 59: 2470-2475.
- El-Sharouny, E., El-Shazli, H., and Olama, K. 2015. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Some Egyptian Water Systems and Its Incidence of Transmission to Individuals. *Iranian Journal of Public Health*. 44 (2) 203-210
- Engberg, J., On S. L., Harrington C. S., and Gerner-Smidt P. 2000. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 286-291.
- Enroth, H. and Engstrand, L. 1995. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 2162-2165.
- Essawi, T., Hammoudeh, W., Sabri, I., Sweidan, W., and Farraj, M. A. 2013. Determination of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Gastric Biopsies by PCR. *International Scholarly Research Notices: Gastroenterology*. (ID 606258).
- Espigares M. and Pérez J. A. 1985. Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. Capitulo 1. Aguas Residuales, su composición. Universidad de Granada. Servicio de Publicaciones. Granada.
- EPA, United States Environmental Protection Agency. www.epa.gov, Water Research On-line 2015.

Eusebi, L. H. 2014. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 19 (S1): 1–5.

F

Fabian, K., Kirchner, A., Williams, W., Heider, F., Leibl, T., and Huber, S. 1996. Three-dimensional micromagnetic calculations for magnetite using FFT. *Geophysical Journal International*. 124: 89-104.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., and Bray, F. 2014. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* doi:10.1002/ijc.29210. Published online 9 Oct 2014.

Fernández, M., Contreras M., Suárez P., Gueneau P., García-Amado M. A. 2007. Use of HP selective medium to detect *Helicobacter pylori* associated with other enteric bacteria in seawater and marine molluscs. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 213-218.

Food and Drug Administration (FDA). 2014. Establishing a List of Qualifying Pathogens Under the Food and Drug. Act Federal Register: 79(108). <https://federalregister.gov/a/2014-13023>.

Fu, Z., Rogelj, S., and Kieft, T. L. 2004. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 99:47-57.

Fuchs, B. M., Syutsubo, K., Ludwig, W., and Amann, R. 2001. *In situ* accesibility of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 961-968.

Fujimura, S., Kato, S., and Kawamura, T. 2004. *Helicobacter pylori* in Japanese river water and its prevalence in Japanese children. *Letters in Applied Microbiology*. 38: 517–521

G

Ghotaslou, R., Ebrahimzadeh, H., and Mohammadzadeh, Y. 2015. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. *World Journal of Methodology*. 5 (3): 164-174.

Bibliografia

- Giáo, M. S., Azevedo, N. F., Wilks, S. A., Vieira, M. J. and Keevil, C. W. 2008. Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking-water Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (19): 5898.
- Ginny, C., Parkes, S., and Parkes, H .1999. Analytical Molecular Biology. Quality and Validation. Published for *Laboratory of the Government Chemist by The Royal Society of Chemistry*, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK. ISBN 0-85404-472-8.
- Giovannoni, S. J, Delong, E. F, Olsen, G. J, and Pace, N. R. 1988. Phylogenetic group-specific oligo deoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*. 170: 720-726.
- Goodwing, C., and Armstrong A. J. 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) from the human gastric mucosa. *Journal of Medical Microbiology*. 9: 1-13.
- Graham, D. Y., Malaty, H. D., Evans, D. G., Evans, D. J., Klein, P. D., and Adam, E. 1991. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. *Gastroenterology*. 100: 1495-1501.

H

- Hong, W., Sano, K., Morimatsu, S., Scott, D. R., Weeks, D. L., Sachs, G., Goto, T., Mohan, S., Harada, F., Nakajima, N. and Nakano, T. 2003. Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 52, 211–216.
- Horiuchi, T., Ohkusa, T., Watanabe, M., Kobayashi, D., Miwa, H., Eishi, Y. 2001. *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiology and Immunology*. 45: 515-519.
- Hulten, K., Han, S. W., Enroth, H., Klein, P. D., Opekun, A. R., Gilman, R. H., Evans, D. G., Engstrand, L., Graham, D. Y., and Elzaatari, F. A. K. 1996. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 11: 1031-1035.
- Hulten, K., Enroth, H., Nystrom, T., and Engstrand, L. 1998. Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 282-286.

I

- IARC, *Helicobacter pylori* Working Group. 2014. *Helicobacter pylori* eradication as a strategy for Preventing gastric cancer. *ARC Working Group Reports*, No. 8. (<http://www.iarc.fr/en/publications/>)

pdfs-online/wrk/wrk8/index.php).

- Ingerson-Mahar, M. and Reid, A. 2012. The microbiology of water distribution systems a report on an American Academy of microbiology colloquium. Boulder, Colorado. April 2012.
- Islam, M. S., Hasan, M. K., Miah, M. A., Sur, G. C., Felsenstein, A., Venkatesan, M., Sack, R. B. and Albert, M. J. 1993. Use of the polymerase chain reaction and fluorescence-antibody methods for detecting viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type I in laboratory microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 53-540.
- Iwanczak, B. and Francavailla R. 2014. *Helicobacter pylori* Infection in Pediatrics. *Helicobacter* 19 (S1): 46-51.

J

- Janzon, A., Sjöling, A., Lothigius, A., Ahmed, D., Qadri, F. and Svennerholm, A-M. 2009. Failure to detect *Helicobacter pylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive Real-Time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (10): 3039-3044.
- Jhonson, C. H., Rice, E. W., and Reasoner, D. J. 1997. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4969-4970.
- Jiang, X., and Doyle, M. P. 2002. Optimizing enrichment conditions for detecting *Helicobacter pylori* in foods. *Journal of Food Protection*. 65: 1949-1954.

K

- Kabir, S. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in faeces and saliva by Polimerase Chain Reaction: a Review. *Helicobacter* 9: 115-123.
- Karner, M., and Fuhrman, J. A. 1997. Detemination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography and nucleoid staining. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1208-1213.
- Kelly, S. M., Geraghty, J. M., and Neale, G. 1994. *Helicobacter pylori*, gastric carcinoma and MALT lymphoma. *The Lancet*. 343:418.

Bibliografía

- Khan, A., Farroqui, A., and Kazmi, S. U. 2012. Presence of *Helicobacter pylori* in drinking water of Karachi, Pakistan *The Journal of Infection in Developing Countries*. 6(3):251-255.
- Kogure, K., Simidu, U., and Taga, H. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 25: 415-420.
- Kreder, C. A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1102-1106.
- Kreiss, C., Blum, A. L., and Malfertheiner, P. 1995. Peptic ulcer pathogenesis. *Current Opinion in Gastroenterology*. 11: 25-31.
- Krumbiegel, P., Lehmann, I., Alfreider, A., Fritz, G. J., Boeckler, D., Rolle-Kampzyk, U., Richter, M., Jorks, S., Muller, L., Richter, M. W., and Herbarth, O. 2004. *Helicobacter pylori* determination in non-municipal drinking water and epidemiological findings. *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 40: 75-80.
- Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H., and Harada, H. 2006. Improved *in situ* hybridization efficiency with Locked-Nucleic-Acid-Incorporated DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (8): 5311-5317.

L

- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Wiley: London; 115-175.
- Lejona, S., Benetti, M. S., Fay, F. and Fay O. 2006. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Fundación Dr. J.R. Villavicencio*. XIV. 033-037.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., and Faucher, S. P. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 5 (258).
- Lin, D. and Koskella, B. 2015. Friend and foe: factors influencing the movement of the bacterium *Helicobacter pylori* along the parasitism–mutualism continuum. *Evolutionary Applications*, 8: 9-22.
- Lu, Y., Redlinger T. E., Avitia R., Galindo A., and Goodman K. 2002. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1436-1439.

M

- Malaty H. M., and Niren O. 2003. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 8: 8-12.
- Maldonado-Contreras, A., Goldfard, K. C; Godoy-Vitoriono, F., Karaoz, U., Contreras, M., Blaser, M. J., Brondie, E. L., and Dominguez- Bello, MG. 2011. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *The ISME Journal*. (5) 574-579.
- Marshall, B. J., and Warren, R. J. 1983. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* I: 1273-1275.
- Mauget-Faysse, M., Kodjikian, L., Quaranta, M., Ben, D., Trepsat, C., Mion, F. 2002. *Helicobacter pylori* in central serous chorioretinopathy and diffuse retinal epitheliopathy. Results of the first prospective pilot study. *J Fr Ophtalmol*. 25: 1021-1025.
- Megraud F. 1997. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 11 (1):43-53.
- Mercanoglu, B., and Griffiths, M. W., 2005. Combination of immunomagnetic separation with real-time pcr for rapid detection of Salmonella in milk, ground beef and alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection*. 68: 557-561.
- Metcalf and Eddy. 2003. Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización. 30 edición: McGraw-Hill Inc., Interamerica de España S.A.
- Moreno, Y., Ferrús, M. A., Medina, E., Jiménez, A., Martínez, M., and Hernández, J. 2001. Direct detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples by *in situ* hybridization. *Clinical Microbiology and Infection*. 7 (1): 1537.
- Moreno, Y., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Jiménez, A., and Hernández, J. 2003. Use of fluorescent *in situ* hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Research*. 37: 2251-2256.
- Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J. L., Jiménez, A., González, A., and Ferrús, M. A. 2007. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Research*. 41: 3490-3496.
- Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J. L., and Ferrús, M. A. 2015. DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii*. *Research in Microbiology*. XX 1-6.

Bibliografia

- Moter, A., and Göbel, U. B. 2000. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiology Methods*. 41: 85-112.
- Murakami, K., Fujioka, T., Okimoto, T., Sato, R., Kodama, M., and Nasu M. 2001. Drug combinations with amoxicillin reduce selection of clarithromycin resistance during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 19: 67–70.
- Murray, R. G., and Stackebrand, E. 1995. Taxonomic note: Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 45: 186-187.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262: 56-65.

N

- Nabwera, H. M., and Logan, R. P. 1999. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: transmission, translocation and extragenic reservoirs. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 50: 711-722.
- Nayak, A. K. and Rose, J. B. 2007. Detection of *Helicobacter pylori* in sewage and water using a new quantitative PCR method with SYBR_ green. *Journal of Applied Microbiology*. ISSN 1364-5072.
- Nilius, M., Ströhle, A., Bode, G., and Malfertheiner, P. 1993. Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. *International Journal of Medical Microbiology. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 280:259–272.
- Nilsson, H., Blom, J., Al-Soud, W., Ljungh, A., Andersen, L., and Eadström, T. 2002. Effect of cold starvation, acid stress and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 11-19.
- Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M. D., and Camper, A. K. 2007. Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (16): 5111-5117.
- Nocker, A., Burr, M., and Camper, A. K. 2009. Syntesis document on molecular techniques for the drinking water industry. *Water Research Foundation*. ISBN 978-1-60573-057-8.

O

- O'Connor, A. 2014. Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2014. *Helicobacter*. 19 (S1): 38-45.
- Oliver, J. D. 2000b. The public health significance of viable but nonculturable bacteria, p. 277-299. In R.R. Colwell and D.J. Grimes (eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- Oliver, J. D., 2005. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology*. (43) 93-100.
- Oliver, J. D. 2010. Recent findings on the viable but non-culturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 34: 415-425.
- Opel, K. L., Chung, D., and Bruce, R. 2009. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences*.. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x
- Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K. S., Hornes, E., Ugelstad, J. and Uhlen, M. 1994. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 7:43-54.
- Osaki, T., Taguchi, H., Yamaguchi, H. and Kamiya, S. 1997. Detection of *Helicobacter pylori* in fecal samples of gnotobiotic mice infected with *H. pylori* by an immunomagnetic-bead separation technique. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 321-323.
- Owen R.J. 1993. *Helicobacter*-species classification and identification. *British Medical Bulletin*. 54:17-30.

P

- Pakodi, F., Abdel-Salam, O. M., Debreceni, A., and Mózsik, G. 2000. *Helicobacter pylori*, one bacterium and a broad spectrum of human disease. *Journal of Physiology-Paris*. 94:139-152.
- Papagiannakis, P. 2013. The role of *Helicobacter pylori* infection in hematological disorders. *European Journal of Internal Medicine*. 24: 685-690.
- Pardue, M. L., and Gall, J. G. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 64: 600-604.
- Percival, S. L., Chalmers, R. M., Embrey, M., Hunter, P. R., Sellwood, J., and Wyn-Jones, P. 2004. *Microbiology of Waterborne Pathogens*. Ed: Elsevier Academic Press. London.

Bibliografía

- Pereira, M. I., and Medeiros, J. A. 2014. Role of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World Gastroenterol*, 20(3): 684-98.
- Pernthaler, A., and Amann, R. 2004. Simultaneous fluorescent *in situ* hybridization of mRNA in environmental bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:5426-5433.
- Philips, C. A. 2001. *Arcobacter* as emerging human foodborne pathogens. *Food Control* 12: 1-6.
- Pinto, D., Santos, M. A., and Chambel, L. 2013. Thirty years of viable but non-culturable state research: unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*. Doi: 10.3109/1040841X.2013.794127.
- Piqueres, P., Moreno, Y., González, A., Hernández, J., Ferrús, M. A. 2006. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in vegetables irrigated with contaminated water. *Helicobacter*. 9(5): 511.

R

- Rahimi, E., and Kheirabadi, E. K. 2012. Detection of *Helicobacter pylori* in bovine, buffalo, camel, ovine, and caprine milk in Iran. *Foodborne Pathog Diseases*. 9(5):453-6.
- Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. «BOE» núm. 294, de 8 de diciembre de 2007, pág. 50639 a 50661. BOE-A-2007-21092.
- Real Decreto 1120/2012, de 20 de julio, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. «BOE» núm. 207, de 29 de Agosto de 2012, pág. 61012 a 61013. BOE-A-2012-11191.
- Reynolds, D. T., and Fricker, C. R. 1999. Application of laser scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples. *Journal of Applied Microbiology*. 86:785-795.
- Rodríguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgwaty, H. F. 1992. Use of fluorescent redox probe for direct visualization of a actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 1801-1808.
- Rodríguez, R., 2011. Use of fluorescence *in situ* hybridization technique to visualize microorganisms. *Salud UIS*. 43 (3):307-316.

Rune, T., Nielsen, P. S., Jensen, T. H. 2006. Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes. *RNA Journal*. 11: 1745-1748.

S

Salgot, M., Huertas, E., Webe, S., Dott, W., and Hollender, J., 2006. Wastewater reuse and risk: definition of key objectives. *Desalination* 187: 29-40.

Santiago, P., Moreno, Y., and Ferrús, M. A. 2015. Identification of viable *Helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques. *Helicobacter*. (4): 252-259.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 113: 1014-1026.

Seguí, L. A. 2004. Sistemas de regeneración y reutilización de aguas residuales. Metodología para el análisis técnico económico y casos. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología. Universidad Politécnica de Cataluña.

Shahamat, M. C., Paszko-Kolva, C., Kessel, M., and Colwell, R. R. 1993. Use of autoradiography to assess the viability of *Helicobacter pylori* in water. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 1231-1235.

Shao, C., Zhang, Q., Tang, W., Qu, W., Zhou, Y., Sun, Y., Yu, H. and Jia J. 2008. The Changes of Proteomes Components of *Helicobacter pylori* in Response to Acid Stress without Urea. *Journal of Microbiology*. 46 (3): 331-337.

Shirai, H., Nishibuchi, M., Ramamurthy, T., Bhattaleftya, S. K, Pal, S. C., and Takeda Y. (1991). Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 29:2517–2521.

Shleeva, M., Mukamolova, G. V., Young, M., Williams, H. D. and Kaprelyants, A. S. 2004. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology*. 150: 1687-1697.

Signoretto, C., Lleo, M., Tafi, M. C., Canepari, P. 2000. Cell wall chemicals composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (5): 1953-1959.

Bibliografia

- Signoretto, C., Burlacchini, G., Lleò, M. M., Pruzzo, C., Zampini, M., and Pane, L. 2004. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the non-culturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 6892-6896.
- Smith, C., and Ashbolt, N. 2012. The fate of *Helicobacter pylori* phagocytized by *Acanthamoeba polyphaga* demonstrated by fluorescent in situ hybridization and quantitative polymerization chain reaction tests. *Current Microbiology*. 65(6):805-812.
- Stephen, F., Altschul, T., Madden, L., Alejandro, A., Schäffer¹, Zhang, J., Zhang, Z., Miller W., and Lipman, D.J.. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17): 3389–3402.
- Stevenson, T. H., Castillo, A., Lucia, L. M., and Acuff, G. R. 2000. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Letters in Applied Microbiology*. 30: 192-196.
- Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., and Ren, Q. 2015. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*. 15:36.
- Somma, M., and Querci, M. 1996. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. *JRC European Commission. WHO. Sesión 6*.
- Song, Q., Lange, T., Spahr, A., Adler, G., and Bode, G. 2000. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 49: 349-353.
- Suerbaum, S., and Michetti, P. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine*. 347: 1175-86.

T

- Thomas, J. E., Gibson, G. R., Darboe, M. K., Dale, A., and Weaver, L.T. 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *The Lancet*. 340: 1194-1195.
- Thung, L., Aramin, H., Vavinskaya, V., Gupta, S., Park, J. Y. Crowe, S. E. and Valasek, M. A. 2015. Review article: The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 43: 514-533.

- Trebesius, K., Panthel, K., Strobel, S., Vogt, K., Faller, G., Kirchner, T., Kist, M., Heesemann, J. and Haas, R. 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridisation. *Gut*. 46:608-614.
- Trust, T. J., Logan, S. M., Gustafson, C. E., Rmaniuk, P. J., Kim, N. W., Chan, V. L., Ragan, M. A., Guerry, P., and Gutell, R. R. 1994. Phylogenetic and molecular characterization of a 23S rRNA gene positions the genus *Campylobacter* in the epsilon subdivision of the Proteobacteria and shows that the presence of transcribed spacers is common in *Campylobacter* spp. *Journal of Bacteriology*. 176: 4597-4609.
- Tuan, V., Thuy, N., Tonner, L., Dac, P., and Dalsgaard, A. 2005. Faecal and protozoan parasite contamination of water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated in urban wastewater in Phnom Penh, Cambodia. *Tropical Medicine & International Health*. 12: 73-81.

U

- UK, Standards for Microbiology Investigations. 2015. Investigation of gastric biopsies for *Helicobacter pylori*. *The Standards Unit, Microbiology Services, PHE Bacteriology*. 55 (6) 1-25.

V

- Vallejo, C., Garrido, L., Cáceres, D., Madrid, A. M., Defilip, C., Defilippi, C., and Toledo, H. 2007. Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la Región Metropolitana. *Revista Médica Chile*. 135:287-293.
- Vandamme, P. 2000. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In: Nachamkin, I. and Blaser, M. J. (eds.). *Campylobacter*, 2nd Edition. ASM Press, Washinton, DC. pp. 3-26.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., and de Ley, J. 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 41: 88-103.
- Villarino, A., Bouvet, O. M. M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., and Grimont, A. D. 2000. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat-or UV-killed cells. *Research. Microbiology*. 151: 755-760.

Bibliografia

Virta, M., Lineri, S., Kankaanpää, P., Karp, M., Peltonen, K., Nuutila, J., and Lilius, E. M. 1998. Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 515-519.

W

Wang, F. 2014. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Letters*. 345: 196–202.

Wang, X. F., and Wang, K. X. 2004. Cloning and expression of *vacA* gene fragment of *Helicobacter pylori* with coccoid form. *Journal of the Chinese Medical Association*. 67:549-556.

Watson, C. L., Owen, R. J., Lai, S., Lee, J. V., Surman-Lee, S., and Nichols, G. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 690-698.

Wilson, I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3741-3751.

Y

Yakub, G. P. and Stadterman-Knauer, K. L. 2004. Separation of Pathogenic Organisms From the Environment. *Methods in Molecular Biology*, vol. 268: Public Health Microbiology: Methods and Protocols. Edited by: J. F. T. Spencer and A. L. Ragout Spencer © Humana Press Inc., Totowa, NJ. USA.

Z

Zhang, M. 2015. High antibiotic resistance rate: A difficult issue for *Helicobacter pylori* eradication treatment. *World Journal of Gastroenterology*. 21 (48): 13432-13437.

Páginas Web consultadas:

- www.helico.com
- www.who.int
- www.jpsn.com
- www.globocan.iarc.fr
- www.boe.es

ANEJOS

ANEJO A. MEDIOS DE CULTIVO**ANEJO A.1. MEDIOS SÓLIDOS****Agar Sangre de Caballo (ASC)**

- Base de Agar Sangre Columbia (Difco, ref. 279240)

Composición (g/L):

Digerido pancreático de caseína	10
Peptona de proteasa No.3	5
Extracto de levadura	5
Digerido de corazón de res	3
Almidón	1
Cloruro sódico	5
Agar	15

- 10% de Sangre Desfibrinada de Caballo (Oxoid, ref. SR0050C)

Agar Dent (Medio Dent-C)

- Base de Agar Base Selectivo para Campylobacter (Merk, ref. 2248)

Composición (g/L):

Peptona de proteasa No.3	21
Almidón	1
Agar	13

- 5% de sangre desfibrinada de caballo (Oxoid, ref. SR0050C)
- *Helicobacter pylori* Suplemento Selectivo "Dent" (Oxoid, ref. SR0147E)

Cada vial suplementa 500 ml de medio.

Anejos

Composición por vial (mg/ 0.5 L):

Vancomicina	5
Lactato de trimetoprin	2.5
Cefsulodín	2.5
Anfotericina	2.5

Agar Dent (Medio Dent-B)

- Base de Agar Sangre Columbia (Difco, ref, 279240)

Composición (g/L):

Digerido pancreático de caseína	10
Peptona de proteasa No.3	5
Extracto de levadura	5
Digerido de corazón de res	3
Almidón	1
Cloruro sódico	5
Agar	15

- 5% de sangre desfibrinada de caballo (Oxoid, ref. SR0050C)
- *Helicobacter pylori* Suplemento Selectivo "Dent" (Oxoid, ref. SR0147E)

Cada vial suplementa 500 ml de medio.

Composición por vial (mg/ 0,5 L):

Vancomicina	5
Lactato de trimetoprin	2.5
Cefsulodín	2.5
Anfotericina	2.5

Agar Pylori

- Agar Pylori® (Biomérieux, Francia, ref. 4443 263)

Composición (g/L):

Peptona de caseína	16
Peptona de soja	7
Extracto de carne	0.15
NaCl	6
Agar	15
Plasma de caballo	100 mL
PolyVitex	10 mL
Mezcla de antibióticos	20 mL

Agar Urea

- Base de Agar Urea Christensen (Microkit, ref. DMT132)

Composición g/L:

Peptona de carne	1
Glucosa	1
Cloruro sódico	5
Fosfato disódico	1.2
Fosfato monopotásico	0.8
Rojo fenol	0.012
Agar	15

- Urea (Panreac, ref. 131754)

ANEJO A.2. CALDOS DE CULTIVO

Caldo Dent

- Base de BBL™ Brucella Broth (Difco, ref. 211088)

Composición (g/L):

Digerido pancreático de caseína	10
Peptamina	10
Dextrosa	1
Extracto de levadura	2
Cloruro de sodio	5
Bisulfito de sodio	0.1

- *Helicobacter pylori* Suplemento Selectivo "Dent" (Oxoid, ref. SR0147E)

Caldo nutritivo de conservación de cepas

- Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, ref. CM0067)

Composición (g/L):

Polvo "Lav-Lemco"	10
Peptona	10
Cloruro sódico	5

- 10% de Glicerol

ANEJO B. REACTIVOS Y SOLUCIONES

ANEJO B.1. GENERACIÓN DE MICROAEROFILIA

Sobre con mezcla generadora de microaerofilia (CampyGen™, Oxoid ref. CN35)

Cuando se coloca un sobre en una jarra de 3.5L y se cierra ésta, el oxígeno contenido en la misma es absorbido con rapidez mientras que simultáneamente se genera dióxido de carbono produciendo las condiciones microaerófilas apropiadas. El componente activo de cada sobre es ácido ascórbico.

ANEJO B.2. AISLAMIENTO

PBS 3X

Composición (g/L):

NaCl	22.8
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	4.1
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	5.3
Agua destilada	1000mL
pH 7.2	

Primero disolver los fosfatos y luego el cloruro sódico. Esterilizar por filtración 0.45 µm o 0.2 µm. Posteriormente esterilizar a 115°C, 20 min. Conservar a 4°C, uso en frío.

PBS 1X: Diluir 3 veces el tampón PBS 3X en agua destilada. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Ácido Bopp

El tampón de ácido descrito por Bopp *et al.* (1981) se compone de un tampón HCl-KCl (1:1) con un pH de 2.2.

ANEJO B.3. HIBRIDACIÓN IN SITU (FISH)

Fijación de las muestras

- PBS 1X
- Paraformaldehído (PFA) (Panreac, ref. 141451)

Calentar 65 mL de agua destilada hasta 60°C. Añadir 4 g de paraformaldehído (Panreac, ref. 141451). Adicionar unas gotas de NaOH (5M) para ayudar a la disolución del polvo. Quitar de la fuente de calor y añadir 33 mL de PBS 3X. Ajustar el pH a 7.2 con CIH. Eliminar los posibles cristales mediante filtración y conservar a 4°C durante un 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-Aldrich, ref. C-5926)	0.01%

Calentar previamente el agua destilada hasta 60°C. Añadir la gelatina y la sal de cromato y mantener calentando en agitación hasta la completa disolución. Atemperar la solución a unos 45°C y sumergir en ella los portaobjetos cubiertos con teflón (Marienfeld, ref. 9782100). Escurrir los portaobjetos y dejar secar al aire.

Deshidratación de las muestras

- **Etanol 50%:** 100 mL Etanol absoluto + 100 mL agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- **Etanol 80%:** 160 mL Etanol absoluto + 40 mL agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

- **Etanol 100 %:** Reactivo etanol absoluto grado PRS. Guardar a temperatura ambiente y a 4°C para fijación.

Sondas (50 ng/μL)

- ❖ Sonda para *Eubacterias*: **EUB338-I, EUB338-II, EUB338-III** (Tib Molbiol ®, Alemania)
- ❖ Sonda para *Helicobacter pylori*: **HPY** (Tib Molbiol ®, Alemania)
- ❖ Sonda para *Helicobacter pylori*: **HPY-LNA** (Exiqon, USA)

Tampón de hibridación

NaCl 5M	360 μL (0.9M)
HCl-Tris 1M	40 μL (20 mM)
SDS 10%	2 μL (0.01%)
Formamida (SIGMA F-7503)	X μL (0-50%)
Agua milliQ	completar hasta 2 mL

Mezclar todos los componentes y añadir en último lugar el SDS 10%. Completar hasta 2 mL y agitar.

Solución de lavado

NaCl 5M*	(9000-100 μL)
HCl-Tris 1M	1000 μL
EDTA 0.5M**50 μL	500 μL
SDS 10%	
Agua milliQ	completar hasta 50 mL

%Formamida (Tampón de hibridación)	µL de NaCl 0.5M (Tampón de lavado)
0	9000
10	4500
20	2150
30	1020
35	700
40	460

* La concentración de NaCl depende de la concentración de formamida en el tampón de hibridación.

** Solo se añade en caso de que el tampón de hibridación contenga un 20% de formamida o más.

1- NaCl 5M

Cloruro de sodico	292.2g
Agua destilada	1000 mL

Disolver el NaCl en 800 mL de agua destilada y ajustar el volumen hasta 1 litro. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración.

2- Tris-HCl 1M (pH 8.0)

Tris Base	121.1g
HCl	42 mL
Agua destilada	hasta 1000 mL

Pesar el Tris Base y añadir a 800 mL de agua destilada. Añadir 42 mL de HCl concentrado y completar hasta 1000 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración.

3- SDS 10%

SDS	10 g
Agua destilada	Hasta 1000 mL

Esterilizar por filtración.

4- EDTA 0.5M

EDTA	186.1 g
Agua destilada	hasta 1000 mL

Pesar el EDTA y añadir a 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH. Completar hasta 1000 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos y por filtración.

Visualización al microscopio

- Antirrefractante (FluoroGuard™ Antifade Reagent, Bio-Rad)

ANEJO B.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Extracción de DNA

- Aguas Residuales: “Realpure Spind Food Stool Bacteria Kit” (Durviz, España, ref. RBMEGS03)
- Aguas Potables: “GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit” (Fermentas, Alemania, ref. #K0721)

Tampón TE

Tris- HCl	M10 mM
EDTA	1 mM
(pH 8)	

Reacción de amplificación

- **dNTPs** (PCR Nucleotide Mix, Bionline ref. BIO-39028)
- **Taq DNA polymerase, 5U/μl** (Bioron ref. 1011005)
- **Tampón de reacción 10X** (Bioron, ref 1011005)

(NH ₄) ₂ SO ₄	160 mM
Tris-HCl (pH = 8.8)	670 mM
Teewn-20	0.1%

- **MgCl₂** (50mM) (Bioron, ref.1011005)
- **Iniciadores *Helicobacter pylori***:

HP1/ HP2 (Tib Molbiol®, Alemania)

VacAR/ VacAF (Tib Molbiol®, Alemania)

Electroforesis de DNA en gel de agarosa

- **Agarosa** (Agarose D-1 Medium EEO, Pronadisa ref. 8067)
- **Tampón TAE 1X:**

Tris-HCl	0.02M
Ácido acético glacial	0.02M
EDTA	0.002M

Pesar la cantidad deseada de agarosa (15mg/mL) y disolver con el tampón TAE 1X. Llevar a ebullición, agitar y atemperar a 50° C. Verter en el tanque electroforético.

- **Tampón de carga** (6X Loading Dye Solution, Fermentas, España, ref. R0611)

Composición 10mL:

Azul de bromofenol 1%	2.5 mL
Ficoll	2.5 mL
EDTA (0.5M)	1mL
Agua Ultrapura	4mL

pH = 8

- **Marcador de pesos moleculares** (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, España, ref. SM0323)
- **Bromuro de etidio** (1µg/mL) (AppliChem)
- **GelRed** (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X in water) (0.5 µl/10mL) (Biotium)

ANEJO C: INICIADORES Y CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DEL 16S rDNA

Para la amplificación del fragmento del 16S rDNA se utilizaron los iniciadores universales y las condiciones de amplificación según Maldonado-Contreras *et al.* (2011) para PCR tradicional y posterior secuenciación.

Tabla 20. Secuencias de los iniciadores 16S rDNA (Lane, 1991)

Nomenclatura iniciadores	T _m	Secuencia de nucleótidos
27F*	56 °C	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'
1492R	49 °C	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

*M= A o C

Reactivos de amplificación por muestra: 5 µL de tampon 10X; 2.5 µL de DMSO (al 5 % vol/vol), 2 µL de MgCl₂ (25mM), 2 µL de cada iniciador (25 pmol), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de Taq-polimerasa (5U /µL), en un volumen final de 50 µL.

Tabla 21. Condiciones de amplificación de los iniciadores 27F/ 1492R

Nombre Programa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (h:mm:ss)
Desnaturalización.	1	95	0:03:00
Desnaturalización	25	95	0:00:30
Unión de iniciadores		52	0:00:25
Extensión del producto		72	0:00:25
Extensión Final		72	0:02:00
Enfriamiento	1	4	Continuo

ANEJO D: ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDAR)

Las estaciones depuradoras de aguas residuales son instalaciones donde el agua residual se somete a un proceso en el que, por combinación de diversos tratamientos físicos, químicos y/o biológicos, se consigue la reducción de la carga contaminante del vertido, eliminando materias en suspensión, sustancias coloidales, sustancias disueltas y patógenos, con el fin de obtener un efluente inocuo para el medio ambiente y adecuado para su posterior reutilización.

ANEJO D.1. FASES DEL PROCESO DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

Según la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Generalitat Valenciana (EPSAR), es necesario tratar y depurar las aguas para evitar enfermedades y ayudar a la naturaleza en su proceso de depuración, que no es más que un conjunto de sistemas que nos permiten acelerar los procesos naturales para que podamos devolver al medio el agua en las debidas condiciones. Este proceso de depuración se divide en cuatro fases: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario. A continuación se destacan sus principales características.

Pretratamiento. Consiste en una sucesión de etapas físicas y mecánicas destinadas a separar las materias voluminosas en suspensión que de entrar en el proceso, podrían comprometer gravemente el buen funcionamiento de las instalaciones. Además consta de instalaciones para contener las avalanchas de excesos de caudal de agua que se producen en las poblaciones que no cuentan con red separada de aguas pluviales.

Tratamiento primario. Durante este proceso se lleva a cabo la sedimentación de los materiales suspendidos, mediante la utilización de tratamientos físicos o fisico-químicos (decantación primaria), que no se han conseguido retirar durante el pretratamiento. En ocasiones dejando simplemente las aguas residuales un tiempo en grandes tanques o, en el caso de los tratamientos primarios mejorados, añadiendo al agua contenida en estos grandes tanques, sustancias químicas quelantes que permitan la unión de pequeñas partículas, formando unas mayores y que, de esta forma, puedan sedimentar con mayor facilidad.

Tratamiento secundario. El efluente proveniente del tratamiento anterior es sometido a un tratamiento secundario, también llamado tratamiento biológico. En este proceso se eliminan las partículas coloidales y disueltas; así como la retención de sólidos en suspensión. El proceso secundario más habitual es de carácter biológico y se lleva a cabo mediante la oxidación de la materia orgánica por vía aerobia a través del uso de lodos activos. Consta básicamente de dos unidades: el reactor y el decantador. Los reactores están diseñados especialmente para mantener los microorganismos bajo condiciones controladas, acelerando el proceso natural de descomposición y neutralización de los residuos. En los decantadores se produce la separación de los lodos mediante sedimentación, que pasarán a la línea de tratamiento de fangos.

Tratamiento terciario. Constituye un complemento a la depuración del agua residual para eliminar compuestos no biodegradables o microorganismos patógenos que hayan sobrevivido a los anteriores procesos. Los componentes de este tratamiento son todos de carácter opcional y van en función del tipo de contaminante que se desee eliminar para los cuales tenemos: filtración, coagulación, nitrificación-desnitrificación, absorción por carbón, intercambio iónico, irradiación con luz ultravioleta, ósmosis inversa y desinfección por cloración u ozonización.

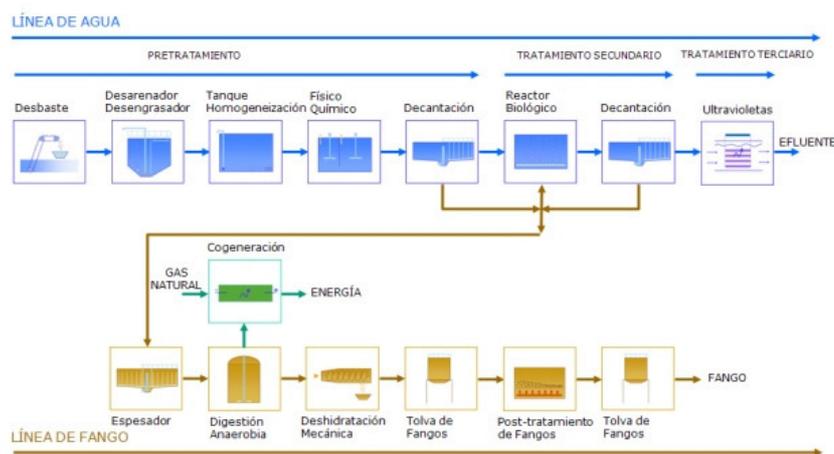


Figura 37. Diagrama de bloques del proceso de depuración de agua residual. (EPSAR)

ANEJO E. ESTACIONES DE TRATAMIENTO DE AGUA POTABLE (ETAP)

Se denomina potabilización al proceso por el cual se convierte un agua en mayor o menor medida contaminada, en un agua apta para el consumo humano. El agua potable debe pues estar ausente de microorganismos patógenos y sustancias tóxicas.

Las potabilizadoras o Estaciones de tratamiento de agua potable (ETAP), son las instalaciones donde se trata el agua para hacerla potable. El proceso de potabilización de agua cruda, consiste en la eliminación de turbidez y de impurezas de distinto tipo, para obtener agua potable, apta para el consumo humano. Este proceso tiene distintas fases, desde la misma toma de captación de agua cruda hasta antes de la salida del agua potable de la ETAP, mediante el sistema de bombeo, a la red de distribución.

Los diferentes tipos de estaciones de tratamiento de agua potable (ETAP) para potabilizar el agua pueden clasificarse en:

- 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.

ANEJO E.1. FASES DEL PROCESO DE POTABILIZACIÓN DE AGUA

Fases del proceso de potabilización del agua en la ETAP: Procesos Físico-Químicos de purificación del agua.

Coagulación: Proceso en que se emplean coagulantes que se utilizan para desestabilizar la carga exterior de las partículas coloidales, evitando la repulsión entre ellas, y favoreciendo las reacciones entre ellas, formándose coágulos de mayor densidad, lo que acelera su precipitación. Esta

fase está influida por la calidad del agua bruta, agitación de la mezcla, dosis y tipo de coagulantes empleados (sales de hierro y aluminio).

Floculación: Proceso en que se emplean floculantes para la eliminación de sustancias que se encuentran presentes en las aguas en forma coloidal, por si solas no sedimentan de forma rápida, puesto que se agrupan formando flóculos. La adición de reactivos floculantes, hacen que los flóculos formados sean más voluminosos y pesados, aumentando la velocidad de sedimentación de éstos y favoreciendo su precipitación.

Decantación: Proceso por el que se produce la eliminación de sólidos presentes en el agua, por la acción de la gravedad.

Filtración: Proceso de finalización de la clarificación del agua. El agua se hace pasar a través de un lecho filtrante, de arena, grava de distinta granulometría o carbón activado. Mediante la filtración se retiene la materia que aún queda en suspensión en el agua, después de los procesos de decantación. Además en el lecho se adsorben partículas que podrían producir olores y sabores en el agua. Par evitar atascamientos, la retención de partículas debe producirse en la superficie del lecho.

Cloración o Desinfección: El objetivo de la desinfección, es la eliminación de los organismos patógenos que pueda llevar el agua, garantizando así sanitariamente su consumo. Así se establece en la reglamentación técnica sanitaria, en el apartado de suministro y distribución de las aguas potables, donde se articula 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 (Valores de concentración de cloro libre residual entre 0,2 y 0,6 ppm en la red de distribución).

La elección de los agentes desinfectantes depende de diversos factores como el tiempo de contacto, calidad del agua, instalaciones y recursos disponibles. El desinfectante más generalizado para potabilizar el agua, es el cloro y sus derivados (dióxido de cloro, hipocloritos). También se utiliza como desinfectando el ozono, aunque se producción y aplicación requiere una tecnología más costosa de instalar, explotar y mantener que la de dosificación de cloro, por ello su aplicación como agente desinfectante en menor en las estaciones de potabilización de agua.

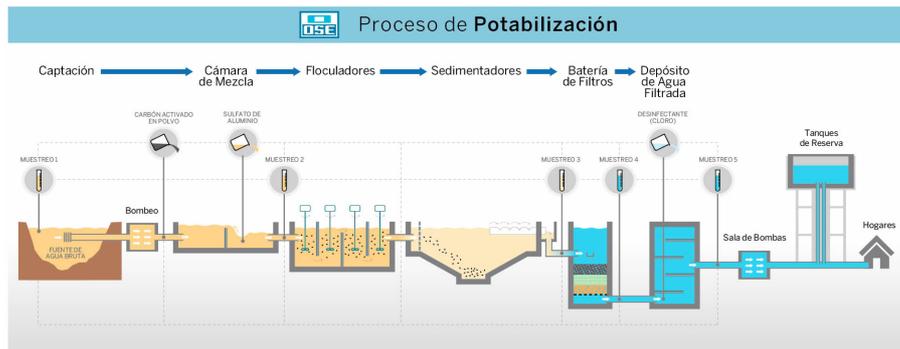


Figura 38. Diagrama de bloques del proceso de potabilización de agua (Aysa)