

ÍNDICE

<u>ÍNDICE</u>	i
<u>RESUMENES</u>	x
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO <i>ARCOBACTER</i>	1
1.1. Antecedentes históricos	1
1.2. Situación taxonómica actual	2
1.3. Morfología y características bioquímicas	4
2. PATOGENICIDAD DEL GÉNERO <i>ARCOBACTER</i>	7
2.1. Importancia clínica en humanos	7
2.2. Mecanismo de virulencia	8
2.2.1. Mecanismo de adherencia y ataque	8
2.3. Sensibilidad y resistencia a antibióticos	9
3. EPIDEMIOLOGÍA Y RUTAS DE TRANSMISIÓN DE <i>ARCOBACTER</i>	10
3.1. Transmisión por alimentos	10
3.2. Transmisión por agua	12
4. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO <i>HELICOBACTER</i>	14
4.1. Antecedentes históricos	14
4.2. Situación taxonómica actual	15
4.3. Morfología y características bioquímicas	17
5. IMPORTANCIA CLÍNICA DEL GÉNERO <i>HELICOBACTER</i>	18
5.1. Patogenicidad de <i>H. pylori</i>	19
5.2. Patologías gástricas relacionadas con <i>H. pylori</i>	21
5.2.1. Gastritis	21
5.2.2. Úlcera péptica	21
5.2.3. Cáncer gástrico	22
5.2.4. Influencia de <i>H. pylori</i> en la aparición de enfermedades extragástricas	22

6. EPIDEMIOLOGÍA Y RUTAS TRANSMISIÓN DE <i>HELICOBACTER</i>	23
6.1. Epidemiología	23
6.2. Mecanismos de transmisión	23
6.2.1. Transmisión oral-oral	24
6.2.2. Transmisión gastro-oral	24
6.2.3. Transmisión fecal-oral	24
6.2.4. Transmisión por agua	24
6.2.5. Transmisión por alimentos	25
6.3. Otros <i>Helicobacter</i> gástricos	26
7. MÉTODOS DE DETECCIÓN POR CULTIVO	27
7.1. Detección de <i>Arcobacter</i> por cultivo	27
7.2. Detección de <i>Helicobacter</i> por cultivo	28
7.3. Identificación bioquímica de <i>Arcobacter</i> y <i>Helicobacter</i>	29
7.4. Formas viables no cultivables	29
8. MÉTODOS MOLECULARES DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	30
8.1. Detección directa	30
8.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
8.3. Detección de <i>Arcobacter</i> por PCR	30
8.4. Identificación de <i>Arcobacter</i> a nivel de especie	31
8.5. Detección de <i>Helicobacter</i> por PCR convencional	32
8.6. Detección de <i>Helicobacter</i> por PCR cuantitativa a tiempo real	33
<u>OBJETIVOS</u>	36
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	37
1. CEPAS BACTERIANAS	37
2. DETECCIÓN DE <i>ARCOBACTER</i> POR CULTIVO	37
2.1. Muestras de moluscos	37
2.2. Muestras de verduras	40
3. DETECCIÓN DE <i>ARCOBACTER</i> POR PCR	41
3.1. Aislamiento del ADN genómico bacteriano a partir de las muestras	41

3.2. Detección por PCR	42
4. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE <i>ARCOBACTER</i>	43
4.1. Identificación de <i>Arcobacter</i> spp.	43
4.2. Identificación de <i>Arcobacter</i> spp. mediante PCR-RFLP del gen 16S ARNr	43
4.2.1. Amplificación por PCR	43
4.2.2. Purificación del producto de PCR	44
4.2.3. Restricción enzimática del fragmento amplificado	45
5. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	46
5.1. Difusión en placa con disco y E-test	46
5.1.1. Preparación del inóculo y aplicación de los discos y tiras de E-test	46
5.1.2. Lectura de las placas e interpretación de los resultados	47
5.2. Determinación del mecanismo de resistencia a quinolonas	47
5.2.1. Amplificación del gen <i>gyrA</i>	47
5.2.2. Análisis de las secuencias producidas	48
6. DETECCIÓN DE <i>HELICOBACTER</i>	49
6.1. Extracción del ADN genómico	49
6.2. Detección de <i>Helicobacter</i> spp.	49
6.3. Detección de <i>Helicobacter pylori</i>	50
6.4. Detección de <i>H. pylori</i> por PCR a tiempo real	51
<u>RESULTADOS</u>	53
1. DETECCIÓN DE <i>ARCOBACTER</i> EN MUESTRAS DE MOLUSCOS	53
1.1. Aislamiento de <i>Arcobacter</i> mediante cultivo en placa	53
1.2. Detección directa de <i>Arcobacter</i> mediante PCR	54
1.3. Comparación de métodos de detección	55
2. DETECCIÓN DE <i>ARCOBACTER</i> EN MUESTRAS DE VERDURAS	56
2.1. Aislamiento de <i>Arcobacter</i> mediante cultivo en placa	56
2.2. Detección mediante PCR	57
2.3. Comparación de métodos de detección	58
3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS OBTENIDOS	59

3.1. Identificación de <i>Arcobacter</i> spp.	59
3.2. Identificación a nivel de especie mediante PCR-RFLP	60
3.2.1. PCR-RFLP del gen 16S ARNr de aislados de muestras de moluscos	61
3.2.2. PCR-RFLP del gen 16S ARNr de aislados de muestras de verduras	64
4. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS	71
4.1. Estudio de sensibilidad en placa	71
4.2. Estudio del mecanismo de resistencia a quinolonas	72
5. DETECCIÓN DE <i>HELICOBACTER</i> SPP. EN MUESTRAS DE MOLUSCOS Y VERDURAS	75
5.1. Detección de <i>Helicobacter</i> spp.	75
5.2. Detección de <i>H. pylori</i>	75
5.2.1. Detección por PCR convencional	75
5.2.2. Detección por PCR a tiempo real	76
<u>DISCUSIÓN</u>	81
<u>CONCLUSIONES</u>	88
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	90
<u>ANEXOS</u>	113

ÍNDICE DE TABLAS**INTRODUCCIÓN**

Tabla 1.	Taxonomía de <i>Arcobacter</i>	2
Tabla 2.	Especies del género <i>Arcobacter</i>	3
Tabla 3.	Características fenotípicas de las especies del género <i>Arcobacter</i>	6
Tabla 4.	Especies intestinales del género <i>Helicobacter</i>	16
Tabla 5.	Especies gástricas del género <i>Helicobacter</i>	17

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 6.	Listado de cepas de referencia utilizadas en este estudio	37
Tabla 7.	Procedencia de las diferentes muestras de moluscos	38
Tabla 8.	Procedencia de las diferentes muestras de verduras	40
Tabla 9.	Reactivos utilizados en la PCR de <i>Arcobacter</i>	42
Tabla 10.	Condiciones utilizadas en la PCR de <i>Arcobacter</i>	42
Tabla 11.	Reactivos utilizados para la mezcla de reacción en la PCR 16S ARNr	44
Tabla 12.	Condiciones de la PCR 16S ARNr	44
Tabla 13.	Secuencias de reconocimiento de las enzimas utilizadas en este estudio	45
Tabla 14.	Reactivos utilizados en la digestión	45
Tabla 15.	Criterios de interpretación de la sensibilidad de <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	47
Tabla 16.	Reactivos utilizados en la amplificación de la región QRDR del gen <i>gyrA</i>	48
Tabla 17.	Condiciones de temperatura utilizadas en la PCR <i>gyrA</i>	48
Tabla 18.	Reactivos utilizados en la PCR de <i>Helicobacter</i>	49
Tabla 19.	Condiciones utilizadas en la PCR de <i>Helicobacter</i>	50
Tabla 20.	Reactivos utilizados en la PCR de <i>H. pylori</i>	50
Tabla 21.	Condiciones de temperatura utilizadas en la PCR para <i>H. pylori</i>	51
Tabla 22.	Reactivos utilizados para la mezcla de reacción en la PCR a tiempo real	51
Tabla 23.	Condiciones utilizadas en la PCR a tiempo real para <i>H. pylori</i>	52

RESULTADOS

Tabla 24.	Detección por cultivo en muestras de moluscos	53
Tabla 25.	Procedencia y porcentajes de muestras de moluscos positivas por cultivo	54
Tabla 26.	Resumen de la detección de <i>Arcobacter</i> spp. por PCR antes y después del enriquecimiento	55
Tabla 27.	Comparación de los valores de detección obtenidos por los dos métodos en muestras de moluscos	56
Tabla 28.	Detección por cultivo en muestras de verduras	56
Tabla 29.	Procedencia de las muestras de verduras y resultados de la detección por cultivo	57
Tabla 30.	Resultados de la detección por PCR antes y después del enriquecimiento	58
Tabla 31.	Comparación de los valores de detección obtenidos por los dos métodos en muestras de vegetales	59
Tabla 32.	Especies identificadas en las muestras de moluscos	64
Tabla 33.	Especies identificadas en las muestras de verduras	66
Tabla 34.	Resultados de la detección de <i>Arcobacter</i> spp. en muestras de moluscos	67
Tabla 35.	Resultados de la detección de <i>Arcobacter</i> spp. en muestras de verduras	70
Tabla 36.	Secuenciación de la región QRDR del gen <i>gyrA</i> de los aislados resistentes y una representación de todos los aislados sensibles	73

ÍNDICE DE FIGURAS**INTRODUCCIÓN**

- Figura 1.** Mecanismos de virulencia descritos para *Arcobacter* 9
- Figura 2.** Patogénesis de *Helicobacter pylori* 21
- Figura 3.** Representación gráfica del aumento de la fluorescencia con respecto al número de ciclos de la PCR 34

MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 4.** Esquema de detección de *Arcobacter* en muestras de moluscos 39
- Figura 5.** Esquema de detección de *Arcobacter* en muestras de verduras 41

RESULTADOS

- Figura 6.** Colonias de *Arcobacter* aisladas de moluscos en medio selectivo *Arcobacter* agar 53
- Figura 7.** Morfología microscópica característica tras tinción Gram 54
- Figura 8.** Amplificación del gen 23S ARNr de *Arcobacter* utilizando los iniciadores ARCO1 y ARCO2 para la detección en muestras de moluscos. 55
- Figura 9.** Amplificación del gen 23S ARNr de *Arcobacter* utilizando los iniciadores ARCO1 y ARCO2 para la detección en muestras de verduras. 58
- Figura 10.** Amplificación del gen 23S ARNr del género *Arcobacter* utilizando los iniciadores ARCO1 y ARCO2 para la identificación de los aislados. 59
- Figura 11.** Amplificación del gen 16S ARNr de *Arcobacter* usando los iniciadores CAH1a y CAH1b en muestras de moluscos. 60
- Figura 12.** Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *Mse*I. 60
- Figura 13.** Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *Bfa*I. 61

Figura 14.	Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MnII</i> .	61
Figura 15.	Perfiles generados por restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MseI</i> en aislados procedentes moluscos.	62
Figura 16.	Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>BfaI</i> en aislados procedentes moluscos.	63
Figura 17.	Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MnII</i> en aislados procedentes moluscos.	63
Figura 18.	Perfiles generados por restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MseI</i> en aislados procedentes verduras.	65
Figura 19.	Perfiles generados por restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MnII</i> en aislados procedentes verduras.	65
Figura 20.	Prueba de difusión en disco, aislado resistente (A) y Prueba de E-test, aislado resistente (B).	71
Figura 21.	Prueba de difusión en disco, aislado sensible (A) y Prueba de E-test, aislado sensible (B).	71
Figura 22.	Amplificación de la región QRDR del gen <i>gyrA</i> .	72
Figura 23.	PCR específica para el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de moluscos.	75
Figura 24.	PCR específica para el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de verduras.	76
Figura 25.	Curva de amplificación a tiempo real para <i>H. pylori</i> en las 4 muestras de moluscos, junto con el control positivo <i>H. pylori</i> NCTC 11638.	76
Figura 26.	Curva de fusión a tiempo real para <i>H. pylori</i> en las 4 muestras de moluscos, junto con el control positivo <i>H. pylori</i> NCTC 11638	77
Figura 27.	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del gen <i>vacA</i> obtenidos por qPCR para la detección directa en muestras de moluscos.	77
Figura 28.	Curva de amplificación de PCR a tiempo real para <i>H. pylori</i> en las 5 muestras de verduras, junto con el control positivo.	78
Figura 29.	Curva de fusión de PCR a tiempo real para <i>H. pylori</i> en las 5 muestras de verduras, junto con el control positivo.	78

- Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *vacA* obtenidos por qPCR para la muestra V1. 79
- Figura 31.** Alineamiento de la secuencia del fragmento del gen de la toxina vacuolizante VacA de la cepa *H. pylori* NCTC 11638 con la secuencia obtenida por PCR a tiempo real para la muestra V1. 79
- Figura 32.** Alineamiento de la secuencia del fragmento del gen de la toxina vacuolizante VacA de la cepa de *H. pylori* CCUG 17874 con la secuencia obtenida por PCR a tiempo real para la muestra V1. 80