

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Estudio de fagos de *Helicobacter pylori* por métodos fenotípicos y genotípicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Esteban Aznar Cano

Directores

Manuel López-Brea Calvo
Teresa Alarcón Cavero
M^a Luisa Gómez-Lús Centelles

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología

**Estudio de fagos de *Helicobacter
pylori* por métodos fenotípicos y
genotípicos**

Tesis Doctoral
Esteban Aznar Cano
Madrid 2013

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Los apartados de agradecimientos tienden a ser el caldo de cultivo idóneo para las declaraciones de afecto más cursis y almibaradas. Las que vienen a continuación no pretenden ser una excepción.

En primer lugar me gustaría agradecer a los directores de esta tesis, el doctor Manuel López-Brea, y las doctoras Teresa Alarcón y María Luisa Gómez-Lus por su disposición y sus consejos. Al Dr. López-Brea debo además el haberme inculcado el interés por esta especialidad y por este microorganismo en particular. La Dra. Alarcón ha sido mi apoyo constante, animándome siempre a seguir adelante y haciéndome ver que, cuando hay sombras es porque existe un rayo de luz.

El Dr. Ernesto García ha supuesto para mí una ayuda inestimable además de un ejemplo dentro y fuera del laboratorio. Un modelo como científico y como persona y, por fortuna, también un buen amigo. Gracias a una de sus conferencias decidí el tema de esta tesis. Sin él y su equipo en el Centro de Investigaciones Biológicas, que tan amablemente me acogió, nunca habría podido desarrollar este proyecto.

Mi agradecimiento también para todo el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario de La Princesa donde me formé como especialista: facultativos, técnicos y residentes (especialmente para Elena, mi compañera de fatigas). Todos contribuyeron con su dedicación y su afecto a mi formación en los intensos años de residencia. Y por su implicación directa en este trabajo, gracias a las que han sido mis “secuaces” durante estos años, Sonia, Ángela y Marina. No podría haber pedido unas colaboradoras más eficientes y desinteresadas. Gracias no sólo por ayudarme sino también por acompañarme en este largo camino.

Y gracias a María José, sin duda más que una compañera, como demuestra cada día.

Mis padres me enseñaron que la constancia y la confianza en el amor son las claves para el éxito en cualquier aspecto de la vida. Sin ellos nunca habría llegado hasta donde estoy hoy. Donde siempre quise estar.

Quisiera agradecer también a mis hermanos, a las hermanas de mi mujer y a su madre por haberme alentado siempre. Sentirse querido ha sido el mejor de los estímulos.

AGRADECIMIENTOS

Mis hijos Samuel y Nicolás han sido, desde que nacieron, mi razón de ser. Verlos sonreír es todo lo que necesito para sobreponerme a un día de trabajo agotador. Gracias por cambiarme la vida.

Y por último, el mayor de los agradecimientos para Soledad, mi mujer. Sin su amor estaría cojo, manco y tuerto y, lo que es peor, solo. Por todos tus sacrificios, por tu apoyo inquebrantable. Mi deuda contigo va mucho más allá.

Índice de contenido

Universidad Complutense de Madrid.....	
Facultad de Medicina.....	
Departamento de Microbiología.....	
Estudio de fagos de <i>Helicobacter pylori</i> por métodos fenotípicos y genotípicos.....	
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Helicobacter pylori</i>.....	2
1.1.1 Historia.....	2
1.1.2 Descripción del género.....	4
1.1.3 Características bacteriológicas de <i>H. pylori</i>	5
1.1.3.1 Descripción y cultivo.....	5
1.1.3.2 Estructura.....	6
1.1.3.3 Metabolismo.....	7
1.1.4 Factores de virulencia.....	9
1.1.5 Genoma y diversidad genética.....	12
1.1.6 Transferencia genética horizontal.....	14
1.1.7 Epidemiología de la infección por <i>H. pylori</i>	16
1.1.8 Espectro clínico de la infección por <i>H. pylori</i>	16
1.1.9 Diagnóstico.....	20
1.1.9.1 Estrategia diagnóstica.....	23
1.1.10 Resistencias a los antibióticos.....	24
1.1.11 Tratamiento.....	26
1.2 Bacteriófagos.....	28
1.2.1 Historia.....	28
1.2.2 Biología.....	30
1.2.3 Mecanismos moleculares de la infección por fagos.....	33
1.2.4 Genoma.....	36
1.2.5 Interacción entre fagos y huéspedes.....	37
1.3 Bacteriófagos y <i>H. pylori</i>.....	40
2 OBJETIVOS.....	42
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	44
3.1 Pacientes y muestras clínicas.....	45
3.2 Cepas.....	45
3.3 Aislamiento e identificación.....	45

3.4	Sensibilidad a los antimicrobianos mediante <i>E-test</i>	46
3.5	Detección de factores de virulencia.....	46
3.6	Difusión con discos de 100 ng de mitomicina C.....	48
3.7	Preparación de placas de agar-sangre con con mitomicina C.....	48
3.8	Cultivo en medio líquido.....	49
3.9	Inducción mediante mitomicina C en medio líquido.....	49
3.10	<i>Spot test</i>	49
3.11	Precipitación de partículas fágicas.....	50
3.12	Purificación en gradiente de CsCl.....	50
3.13	Observación de posibles partículas fágicas al microscopio electrónico.....	50
3.14	Extracción de ADN fágico.....	51
3.15	Digestión de ADN fágico.....	52
3.16	Clonación del ADN fágico en <i>E. coli</i>	52
3.17	Extracción de ADN de la cepa HP146128 para secuenciación.....	54
3.18	Secuenciación del genoma completo de la cepa HP146128.....	55
3.19	Análisis del genoma de HP146128.....	55
3.19.1	Ordenación de los <i>contigs</i> obtenidos por secuenciación.....	55
3.19.2	Predicción de genes y traducción a proteínas.....	55
3.19.3	Identificación de proteínas relacionadas con fagos.....	56
3.19.4	Detección de secuencias compatibles con profagos.....	56
3.19.5	Detección de secuencias compatibles con CRISPR.....	57
3.20	Extracción de ADN de cepas de <i>H. pylori</i> para PCR.....	57
3.21	PCR del gen de la integrasa del profago de <i>H. pylori</i> B45.....	58
3.22	Análisis estadístico.....	59
4	RESULTADOS.....	60
4.1	Sensibilidad de las cepas a los antimicrobianos.....	61
4.2	Detección de factores de virulencia.....	61
4.3	Inducción de cepas lisogénicas de <i>H. pylori</i> con mitomicina C.....	63
4.3.1	Determinación de la concentración óptima de mitomicina C.....	63
4.3.2	Inducción en placas de agar-sangre con mitomicina C.....	63
4.3.3	Inducción en medio líquido con mitomicina C.....	64
4.3.4	<i>Spot test</i> con extractos de cepas lisogénicas.....	65
4.4	Aislamiento de un bacteriófago de <i>H. pylori</i> tras la inducción con mitomicina C.....	67
4.4.1	Puesta a punto de un sistema para obtener grandes cantidades de cultivo en medio líquido de <i>H. pylori</i>	67

4.4.2 Purificación de bacteriófagos y examen con microscopio electrónico.....	70
4.4.3 Aislamiento del material genético de bacteriófagos.....	71
4.4.4 Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	72
4.4.5 Clonación en vector pUC19.....	74
4.5 Análisis de la secuencia completa del genoma de una cepa lisogénica buscando genes relacionados con bacteriófagos.....	75
4.5.1 Secuenciación del genoma de HP146128.....	75
4.5.2 Ordenación del genoma.....	76
4.5.3 Predicción de genes y traducción a proteínas.....	78
4.5.4 Identificación de proteínas relacionadas con fagos.....	78
4.5.5 Detección de secuencias compatibles con profagos.....	80
4.5.6 Detección de secuencias compatibles con CRISPR.....	95
4.6 Detección mediante PCR del gen de la integrasa del profago de <i>H. pylori</i> B45 en comparación con la lisogenia.....	97
4.7 Relación entre lisogenia, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y gravedad de la infección.....	99
4.7.1 Factores de virulencia.....	99
4.7.2 Resistencia a antibióticos.....	101
4.7.3 Gravedad de la infección.....	104
5 DISCUSIÓN.....	106
5.1 Resistencia a los antibióticos y presencia de factores de virulencia.....	107
5.2 Inducción de cepas lisogénicas de <i>H. pylori</i> con mitomicina C.....	108
5.3 Aislamiento de un fago de <i>H. pylori</i> tras inducción con mitomicina C.....	111
5.4 Aislamiento del material genético e intentos de digestión y clonación.....	114
5.5 Análisis de la secuencia completa de HP146128.....	116
5.6 Detección del gen de la integrasa del profago de <i>H. pylori</i> B45.....	120
5.7 Relación entre lisogenia, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y gravedad de la infección.....	121
6 CONCLUSIONES.....	124
7 SUMMARY.....	126
8 ABREVIATURAS.....	129
9 BIBLIOGRAFÍA.....	132

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de los factores que afectan a la patología gástrica consecuencia de la infección por <i>H. pylori</i>	18
Figura 2. Esquema de los ciclos lítico y lisogénico.....	32
Figura 3. Placas de inhibición de crecimiento en agar-sangre con mitomicina C.....	64
Figura 4. Curvas de crecimiento de dos cepas de <i>H. pylori</i> con y sin mitomicina C.....	65
Figura 5. Inhibición del crecimiento observada en <i>spot test</i> con extracto de cepas lisogénicas.....	66
Figura 6. Curvas de crecimiento de la cepa HP146128 monitorizadas en el sistema <i>Bactec</i> 9050..	69
Figura 7. Imágenes compatibles con bacteriófagos observadas tras la inducción con Mitomicina C	71
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de fragmento de ADN fágico.....	72
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión.....	73
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión prolongada.....	74
Figura 11. Intento de digestión de 15 µl de ADN fágico con HaeII.....	75
Figura 12. Alineación de los <i>contigs</i> de HP146128 con el genoma completo de J99.....	77
Figura 13. Localización de secuencias CRISPR en el genoma de HP146128.....	95

Índice de tablas

Tabla 1. Recomendaciones para el tratamiento erradicador de <i>H. pylori</i>	27
Tabla 2. Clasificación y propiedades básicas de los bacteriófagos.....	31
Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR para la detección de <i>cagA</i>	47
Tabla 4. Condiciones de la reacción de PCR para la detección de <i>vacA</i>	48
Tabla 5. Condiciones de la reacción de PCR para la detección de la integrasa del profago de <i>H. pylori</i> B45.....	59
Tabla 6. Número de cepas sensibles, intermedias o resistentes para cada antibiótico.....	61
Tabla 7. Detección de factores de virulencia mediante PCR.....	62
Tabla 8. Inhibición del crecimiento lograda por los extractos de cepas lisogénicas en cultivos de cepas lisogénicas y no lisogénicas.....	67
Tabla 9. Relación de proteínas que guardan relación con proteínas fágicas según el análisis con <i>Pfam</i>	79
Tabla 10. Profago 1 detectado por <i>Prophage Finder</i>	80
Tabla 11. Profago 2 detectado por <i>Prophage Finder</i>	80
Tabla 12. Profago 3 detectado por <i>Prophage Finder</i>	81
Tabla 13. Profago 4 detectado por <i>Prophage Finder</i>	81
Tabla 14. Genes atribuidos a posible profagos por <i>Prophage Finder</i> que mostraban homólogos en J99.....	81
Tabla 15. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> de la región 5' del profago 1.....	83
Tabla 16. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> del profago 1...84	84
Tabla 17. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> de la región 3' del profago 1.....	85
Tabla 18. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> de la región 5' del profago 2.....	86
Tabla 19. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> del profago 2 ...87	87
Tabla 20. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> del extremo 3' del profago 2.....	88
Tabla 21. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> del extremo 5' del profago 3.....	89
Tabla 22. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> del profago 3...90	90
Tabla 23. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> del extremo 3' del profago 3.....	91

Tabla 24. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> del extremo 5' del profago 4.....	92
Tabla 25. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> del profago 4....	93
Tabla 26. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en <i>Pfam</i> del extremo 3' del profago 4.....	94
Tabla 27. Coincidencias con proteínas conocidas de las secuencias de los espaciadores del CRISPR 2.....	96
Tabla 28. Coincidencia con proteínas conocidas de la región espaciadora del posible CRISPR 3...	97
Tabla 29. Resultados de inducción de lisogenia con mitomicina C y PCR de integrasa del profago de <i>H. pylori</i> B45.....	98
Tabla 30. Comparación entre lisogenia y PCR de integrasa de <i>H. pylori</i> B45.....	99
Tabla 31. Resultados de la inducción mediante mitomicina C y de la detección de factores de virulencia mediante PCR.....	100
Tabla 32. Relación entre lisogenia y presencia de <i>m1</i> o <i>m2</i> de <i>vacA</i>	101
Tabla 33. Relación entre lisogenia y presencia de <i>s1</i> o <i>s2</i> de <i>vacA</i>	101
Tabla 34. Relación entre lisogenia y presencia o ausencia de <i>cagA</i>	101
Tabla 35. Resultados de lisogenia mediante inducción en mitomicina C y de sensibilidad a antimicrobianos.....	102
Tabla 36. Relación entre lisogenia y sensibilidad a amoxicilina.....	103
Tabla 37. Relación entre lisogenia y sensibilidad a tetraciclina.....	103
Tabla 38. Relación entre lisogenia y sensibilidad a metronidazol.....	103
Tabla 39. Relación entre lisogenia y sensibilidad a claritromicina.....	103
Tabla 40. Relación entre lisogenia y sensibilidad a ciprofloxacino.....	103
Tabla 41. Relación entre lisogenia y sensibilidad a rifampicina.....	104
Tabla 42. Resultados de lisogenia mediante inducción con mitomicina C y gravedad de la infección.....	105
Tabla 43. Relación entre lisogenia y gravedad de la infección.....	105

1 INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 *Helicobacter pylori*

1.1.1 Historia

El descubrimiento de *Helicobacter pylori* y de su implicación en la patología gastroduodenal ha supuesto un hito en los campos de la Microbiología y la Gastroenterología, merecedor del premio Nobel de Medicina en 2005. Se trata de una bacteria cuya historia está íntimamente ligada a la del ser humano, su único huésped conocido. Y su origen se remonta atrás en el tiempo, al menos tanto como el de los primeros hombres modernos (Linz *et al.* 2007).

Por lo que respecta a la Microbiología, las primeras observaciones relacionadas con *H. pylori* fueron publicadas a finales del siglo XIX. Los primeros indicios de la presencia de bacterias en el estómago de distintos animales los debemos a Rappin quien, en 1881, describió la presencia de bacterias espirales en el estómago de perros (Breed 1948). Este hallazgo fue confirmado por Bizzozero años después (Bizzozero 1893). En 1896 Salomon demostró que las bacterias con forma de espiroquetas encontradas en el estómago de perros y gatos podían ser transmitidas a ratones. Todavía en el siglo XIX, Jaworski estudió el sedimento de lavados gástricos en humanos y observó, entre otras bacterias, unos bacilos espiriformes a los que denominó *Vibrio rugula* sugiriendo ya entonces su posible papel patógeno (Konturek 2003). Poco tiempo después, este hallazgo fue corroborado por Kreinitz, quien observó microorganismos con morfología espiral en el estómago de pacientes con cáncer gástrico (Kreinitz 1906). El primer estudio sistemático para buscar bacterias helicoidales en la cavidad gástrica fue llevado a cabo por Doenges quien pudo encontrarlas hasta en el 43% de 243 muestras de estómago humano obtenidas mediante necropsia (Doenges 1938). Dos años después, Freedberg, obtuvo resultados similares en muestras quirúrgicas frescas (Freedberg y Barron 1940).

A pesar de estos hallazgos, la teoría que afirmaba que el pH del estómago lo convertía en un medio estéril en el que los microorganismos eran incapaces de desarrollarse era la predominante y se consideraba las observaciones citadas como meras curiosidades o debidas a posibles contaminaciones.

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, la presencia de una alta actividad de ureasa en el estómago fue descrita ya en 1924 por Luck y Seth (Luck y Seth 1925). En 1950, FitzGerald y Murphy relacionaron esta actividad con la enfermedad ulcerosa (FitzGerald y Murphy 1950). A lo largo de la década de los 50, con la expansión del uso de los antibióticos, distintos autores relacionaron el uso de antibióticos con la reducción de la actividad ureasa del estómago y con la cura de los síntomas asociados a la úlcera péptica (Kornberg 1955; Unge 2002). En 1984, año del descubrimiento de Warren y Marshall, Langenberg comunicó la relación entre la actividad ureasa y las espiroquetas gástricas (Langenberg *et al.* 1984).

Ya en la segunda mitad del siglo XX, Steer constató la relación entre la gastritis y la presencia de bacterias helicoidales en el estómago pero fue incapaz de aislar el microorganismo (Steer y Colin-Jones 1975). Hubo que esperar hasta que, gracias a una incubación prolongada ocurrida de forma casual, Warren y Marshall lograran por primera vez aislar microorganismos con una apariencia espiral similar a la del género *Campylobacter* en biopsias gástricas humanas. En primer lugar, estos autores hicieron observaciones de estas bacterias en cortes histológicos de pacientes con gastritis y úlcera péptica (Warren y Marshall 1983; Marshall y Warren 1984) y posteriormente lograron cultivarlas (Marshall, Royce, y Annear 1984) utilizando un método basado en el descrito por Skirrow para el aislamiento de *Campylobacter sp.* (Skirrow 1977). El microorganismo fue nombrado en un primer momento como *Campylobacter pyloridis*, pasando después a llamarse *Campylobacter pylori* y finalmente *H. pylori* (Goodwin *et al.* 1989). En 1985 se produce la primera comunicación describiendo el aislamiento de la bacteria en enfermos con patología gastroduodenal en nuestro país (López Brea *et al.* 1985).

El descubrimiento fue acogido con cierto escepticismo por buena parte de la comunidad científica que no veía evidencias suficientes para establecer el vínculo de causalidad entre el microorganismo y la patología gástrica lo cual llevó a Marshall y Morris a autoinocularse y comprobar mediante endoscopia la presencia de alteraciones y la posterior mejora tras la erradicación del microorganismo demostrando de este modo los postulados de Koch (Morris 1987).

INTRODUCCIÓN

Finalmente, estos y otros trabajos que demostraron los efectos de la erradicación de *H. pylori* (Valle *et al.* 1991) lograron un cambio en la corriente de pensamiento imperante de modo que, en la Conferencia Consenso de *National Institutes of Health*, quedó claramente establecido el significado clínico de *H. pylori* al que se considera desde ese momento la causa más importante de úlcera péptica y gastritis crónica y cuya erradicación se recomienda en pacientes infectados con estos síntomas (NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease 1994).

Además, en ese mismo año la *International Agency for Research of Cancer* (IARC) calificó a *H. pylori* como agente carcinógeno de grupo I en el hombre ante las evidencias que relacionaban la infección por esta bacteria con el cáncer gástrico (Møller, Heseltine, y Vainio 1995). La implicación de *H. pylori* en la patogénesis del linfoma tipo MALT es también evidente (Parsonnet *et al.* 1994) y la erradicación de la bacteria ha logrado la regresión de este tipo de tumores (Wotherspoon *et al.* 1993).

1.1.2 Descripción del género

El género *Helicobacter* está constituido por bacilos Gram negativos helicoidales, curvados o rectos, con flagelos unipolares, bipolares o laterales recubiertos por una vaina y ensanchados en el extremo distal. Son oxidasa y catalasa positivos y crecen en atmósfera microaerofílica a 37°C de manera óptima. Son sensibles a penicilina, ampicilina, amoxicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, rifampicina y tetraciclina y resistentes a ácido nalidíxico, cefalotina y polimixina. El contenido en G+C de su ADN cromosómico oscila entre 200 mol/l y 440 mol/l.

El género *Helicobacter* pertenece a la subdivisión de *Proteobacteria*, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae*. Esta familia también comprende los géneros *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurovum*, *Thiovulum* y *Wolinella*. Es un género en expansión desde que fue propuesto por primera vez (Goodwin *et al.* 1989) y comprende al menos 24 especies formalmente nombradas (Fox 2002). Muchas de ellas están implicadas en patología humana y animal. Las distintas especies descritas pueden clasificarse en gástricas o enterohepáticas. Las primeras, como *H. felis*, *H. mustelae*, *H. acynonichis* o *H. heilmannii*, producen urea y poseen flagelos que les ayudan a soportar el pH ácido del estómago y penetrar en la capa de mucus gástrico.

INTRODUCCIÓN

Además de *H. pylori*, otras especies destacan por su posible papel patógeno en humanos. *H. heilmannii* y *H. felis*, aunque son mucho más frecuentes en animales, se aíslan de manera infrecuente en humanos con gastritis y hay indicios de que también podrían estar implicados en cáncer y linfoma gástricos. *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. pullorum*, *H. canis*, *H. rappini*, *H. canadensis* y *H. winghamensis* han sido asociadas con diarrea. *H. cinaedi*, *H. fennelliae* y *H. rappini* han sido aislados de la sangre de pacientes con bacteriemia (especialmente en inmunodeprimidos). Por último, algunas especies (*H. bilis*, *H. rappini*, *H. rodentium* y *H. pullorum*) capaces de colonizar y causar patología en hígado y vías biliares de animales han sido detectadas mediante serología, cultivo o PCR en pacientes o en poblaciones con alta prevalencia de diversas patologías hepatobiliares (cáncer de vesícula biliar, colangitis esclerosante primara, cirrosis biliar primaria) sugiriendo una posible asociación.

1.1.3 Características bacteriológicas de *H. pylori*

1.1.3.1 Descripción y cultivo

H. pylori es un bacilo Gram negativo, helicoidal. Mide de 2,5 a 4,5 μm de largo y 0,5 a 1 μm de ancho y presenta de 2 a 6 flagelos unipolares de 2,5 μm de largo por 30 nm de ancho cubiertos por una vaina. Su característica forma helicoidal (en forma de “S”) observada *in vivo* y en cultivos frescos se pierde en cultivos envejecidos o tras pases sucesivos apareciendo formas cocoides que podrían indicar muerte celular (Kusters *et al.* 1997) aunque este aspecto es aún controvertido (Enroth *et al.* 1999).

H. pylori es un microorganismo exigente. Para su cultivo pueden utilizarse medios sólidos no selectivos con sangre o derivados, como agar Columbia, agar Brucella o BHI suplementados con 5- 10% de sangre de caballo o cordero, hemoglobina, suero, carbón vegetal, almidón soluble o emulsión de yema de huevo.

Los medios líquidos como caldo BHI, Mueller-Hinton o tripticasa-soja suplementados con suero (Shahamat *et al.* 1991) pueden ser útiles en el cultivo. Sin embargo suele crecer lentamente y se observa una mayor aparición de formas cocoides. Además, los microorganismos contaminantes crecen mucho más rápido en este tipo de medios impidiendo el crecimiento de *H. pylori* (Westblom *et al.* 1988). Para obtener

INTRODUCCIÓN

importantes masas bacterianas se recomienda el subcultivo en volúmenes crecientes de 5 a 500 ml (Shahamat *et al.* 1991). En este tipo de cultivos es frecuente que las bacterias formen agregados.

La adición de antibióticos como vancomicina (6-10 mg/l), trimetoprima (5 mg/l) y cefsulodina (5mg/l) y antifúngicos como anfotericina B (5-10 mg/l) da como resultado medios selectivos.

En cuanto a sus requisitos atmosféricos son características su microaerofilia y las necesidades adicionales de una elevada proporción de CO₂ y de humedad. Crece en atmósfera microaerofílica (5% de O₂, 7% de CO₂, 8% de H₂ y 80% de N₂) o en una atmósfera con un 10% de CO₂ y una humedad del 90%.

Para los aislamientos directos a partir de muestras clínicas pueden ser de ayuda (aunque no imprescindibles) los medios selectivos. Generalmente se recomienda el uso de un mortero para homogeneizar la muestra aunque, en nuestra experiencia, es igualmente efectivo desmenuzar la muestra contra la placa en el momento de la siembra. Se requiere cultivar durante dos semanas comprobando el crecimiento cada dos días. Las colonias son lisas transparentes y pequeñas.

La identificación fenotípica de las bacterias cultivadas suele hacerse mediante la demostración de sus enzimas más características (ureasa, catalasa y citocromo oxidasa) y tinción de Gram (Mégraud y Lehours 2007).

1.1.3.2 Estructura

El esquema general de la pared celular es común al de otros Gram negativos (membrana externa, periplasma y membrana interna) aunque su composición presenta particularidades destacables: la presencia de glucósidos de colesterol es única del género *Helicobacter* (Haque *et al.* 1996) , el peptidoglicano es diferente al observado en otras bacterias como *Escherichia coli* y además sufre importantes cambios en las formas cocoides (Costa *et al.* 1999), el lipopolisacárido (LPS) está compuesto por un lípido A con un bajo perfil de actividad biológica (Muotiala *et al.* 1992) y un antígeno O que mimetiza antígenos de Lewis de grupo sanguíneo (Monteiro *et al.* 1998) y sufre variaciones con el pH del medio (McGowan *et al.* 1998). Comparte con otros géneros como *Campylobacter* y *Spirillum* la presencia de una membrana polar cercana a la

INTRODUCCIÓN

inserción de los flagelos. Éstos están recubiertos por una vaina que es una capa membranosa continuación de la membrana externa con una composición parecida pero no idéntica a la de ésta (Geis *et al.* 1989). *H. pylori* tiene también la inusual capacidad de expresar en su superficie celular proteínas que son habitualmente citoplasmáticas en otras bacterias como la ureasa, la superóxido dismutasa, la catalasa y HspB lo cual podría estar relacionado con su adaptación al peculiar entorno en el que se desenvuelve este microorganismo (Bode *et al.* 1993; Spiegelhalder *et al.* 1993; Radcliff *et al.* 1997; Dunn *et al.* 1992).

En la superficie celular cabe destacar también la presencia del sistema de secreción tipo IV de CagA y la parte asociada a membrana de VacA que se comentarán más adelante como factores de virulencia, diversas porinas (Hop A-E) (Exner *et al.* 1995) y adhesinas como BabA o HopZ (Ilver *et al.* 1998; Peck *et al.* 1999).

Pueden observarse gránulos de polifosfato relacionados con el almacenamiento y la utilización de energía tanto en el citoplasma como junto a la inserción del flagelo y asociados a la membrana citoplasmática (Bode *et al.* 1993) y en medios ricos en hierro también se observan agregados citoplasmáticos de ferritina como depósitos de hierro (Bereswill *et al.* 1998).

1.1.3.3 Metabolismo

La glucosa parece ser la principal fuente energética para *H. pylori*. Se han descrito genes implicados en la vía respiratoria en distintas cepas (Alm *et al.* 1999) y esto hace pensar que posee las bases moleculares de una bacteria aerobia capaz de almacenar energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Como peculiaridad, el donante de electrones implicado la cadena respiratoria no parece ser NADH como en la mayoría de bacterias sino NADPH (Chen *et al.* 1999).

También posee enzimas como la catalasa y la superóxidodismutasa capaces de contrarrestar el estrés oxidativo ocasionado por los productos del proceso respiratorio. Colaboran en esta misma función la proteína activadora de neutrófilos y varias proteínas del metabolismo del hierro como la ferritina, Fur, FeoB y SodB. Muchas de estas son esenciales para la colonización (Kusters, van Vliet, y Kuipers 2006).

INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos pueden ser utilizados también como fuente energética mediante fermentación anaerobia en ausencia de glucosa y son una fuente esencial de nitrógeno a través de la acción de distintas deaminasas (Mendz y Hazell 1995). Se trata de un microorganismo capaz de incorporar distintos aminoácidos desde un medio rico en los mismos como es el jugo gástrico. También puede obtener nitrógeno a partir de la urea gracias a la actividad de la ureasa (Williams *et al.* 1996). Éste se incorpora en forma de amonio y es aprovechado para la síntesis de proteínas gracias a la vía de la glutamina sintetasa (la glutamato sintasa presente en otras bacterias como *E. coli* parece estar ausente). Las grandes cantidades de amonio generadas en el metabolismo del nitrógeno pueden ser neutralizadas mediante la síntesis de urea en el ciclo de la urea que probablemente es excretada antes de que vuelva a ser catabolizada por la ureasa citoplasmática (Mendz y Hazell 1996). También han sido identificadas dos amidasas que podrían funcionar como fuente de amonio en entornos pobres en urea (Skouloubris, Labigne, y De Reuse 2001).

El ciclo del ácido cítrico no parece estar completo sino que probablemente existe una sola rama (tal y como es propio del metabolismo anaerobio) destinada a la producción de succinato por vía de la fumarato reductasa (Pitson *et al.* 1999).

Por lo que respecta a la síntesis de lípidos, enzimas como la succinil-CoA acetoacetato CoA transferasa (Corthésy-Theulaz *et al.* 1997) y la acetil-CoA carboxilasa (Burns, Hazell, y Mendz 1995) parecen estar presentes formando parte de una hipotética vía disociada o de tipo II (la más habitual entre las bacterias). La baja afinidad de esta última enzima por el bicarbonato podría explicar las necesidades de altas concentraciones de CO₂ de *H. pylori*. También se han identificado los genes de algunas pero no todas las enzimas implicadas en la síntesis de fosfolípidos. Algunos ácidos grasos de *H. pylori* parecen tener actividad antiseptora de la bomba de protones y son capaces de causar daño en las células parietales.

El estudio del genoma y de algunas de las enzimas involucradas han permitido conocer bastantes características del metabolismo de los nucleótidos. *H. pylori* es capaz de sintetizar tanto nucleótidos de purinas como de pirimidinas *de novo* (Alm *et al.* 1999) (Mendz *et al.* 1994a). En el caso de las purinas, también están presentes los mecanismos

INTRODUCCIÓN

para incorporar estas bases o sus precursores desde el entorno mientras que parece que ocurre con menor intensidad en el caso de las pirimidinas (Mendz *et al.* 1994b).

Por último, existen diversos metales que, como coenzimas, resultan esenciales para *H. pylori*. El níquel, cofactor de la ureasa y la hidrogenasa es incorporado por un transportador llamado NixA (Fulkerson, Garner, y Mobley 1998) El hierro es transportado fundamentalmente en forma de ion ferroso a través de FeoB (Velayudhan *et al.* 2000) y almacenado gracias a la ferritina. También se han descrito proteínas posiblemente implicadas en el transporte de otros metales como el cobre o el cobalto.

1.1.4 Factores de virulencia

A algunas de las proteínas de *H. pylori* se les atribuye un cierto papel patogénico ya sea por que producen un daño directo al tejido del huésped, porque suponen una vía de evasión frente a los mecanismos de defensa o porque hacen posible la colonización de un medio tan hostil como la mucosa gástrica. Sólo un pequeño porcentaje de las personas infectadas por *H. pylori* desarrollan alguna sintomatología. Además existen distintos tipos de lesiones a los que puede conducir la infección y se observan diferencias geográficas en la prevalencia de las mismas. Se ha intentado explicar estas diferencias relacionándolas con los factores de virulencia presentes en la cepa infectante.

Algunos de estos factores están relacionados con la extraordinaria resistencia al ácido de *H. pylori*. Para evitar los efectos nocivos del ácido gástrico, la bacteria debe desplazarse rápidamente hasta la capa de mucus donde el pH no es tan bajo. Este movimiento se consigue gracias a los flagelos y parece estar dirigido por el gradiente de pH del mucus (Schreiber *et al.* 2004). La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la urea en dióxido de carbono y amoníaco con el consecuente aumento de pH. Se trata de una enzima muy activa y que aparece en el espacio periplásmico y en la membrana externa y en el ambiente, lo que podría ser consecuencia de la lisis bacteriana (Dunn y Phadnis 1998). Se le atribuyen diversas funciones: mantiene el pH interno y periplásmico (Scott *et al.* 1998), permite la utilización de la urea como fuente de nitrógeno, es esencial para la colonización (y según parece no sólo por contrarrestar el efecto del ácido) (Eaton y Krakowka 1994) y a través del NH₃⁺ liberado produce una

INTRODUCCIÓN

serie de daños fisiológicos en la mucosa (estasis de la microcirculación, disrupción de las células epiteliales y necrosis) (Murakami *et al.* 1990). La proteína UreI es un transportador que regula la captación de urea de manera que ésta es mayor a pH muy bajo (<4) con lo que la bacteria puede contrarrestar esa disminución de pH gracias a la actividad incrementada de la ureasa (Rektorschek *et al.* 2000).

CagA es uno de los factores de virulencia más estudiados en *H. pylori*. Las cepas de *H. pylori* pueden clasificarse en productoras y no productoras de CagA (CagA positivas y CagA negativas respectivamente). En los países occidentales se ha relacionado a las cepas CagA positivas con un mayor riesgo de úlcera duodenal (Van Doorn *et al.* 1998) y cáncer gástrico ((Yamaoka *et al.* 2002) mientras que en los orientales, donde la prevalencia de cepas CagA positivas es mayor, no parece existir tal relación (Yamaoka *et al.* 1999). El gen *cagA* forma parte de un isla de patogenicidad en la que se encuentra también codificado un sistema de secreción tipo IV capaz de inyectar la proteína CagA en el interior de la célula epitelial. El gen *cagA* forma parte de un isla de patogenicidad en la que se encuentra también codificado un sistema de secreción tipo IV capaz de inyectar la proteína CagA en el interior de la célula epitelial: en su extremo 3' existe un número variable de secuencias repetidas (conocidas como EPIYA por los aminoácidos que codifican: Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) organizadas en dos regiones, la primera con los segmentos EPIYA-A y EPIYA-B y la segunda con los segmentos EPIYA-C o EPIYA-D. El número de repeticiones del segmento C en la segunda región se relaciona con la prevalencia de carcinoma gástrico (Yamaoka *et al.* 1998) aunque dado que esta misma característica confiere una menor resistencia al ácido, es posible que sean los bajos niveles de ácido en el paciente con cáncer de estómago los que hacen que sean este tipo de cepas las más frecuentes y no al revés. Por otro lado, cada uno de estos motivos EPIYA puede ser fosforilado en la tirosina una vez CagA es inyectado en la célula epitelial y esto multiplica la capacidad de CagA de unirse a multitud de ligandos interaccionando con diferentes sistemas de señalización intracelular (Backert, Tegtmeyer, y Selbach 2010). El bloqueo de estas cascadas promueve cambios a nivel de la membrana celular, el citoesqueleto y las uniones célula a célula e induce respuestas nucleares proinflamatorias, proliferativas y antiapoptóticas.

INTRODUCCIÓN

CagA está también relacionada con la inducción del aumento de producción de interleucina 8 modulando así la respuesta inflamatoria aunque se cree que esta interacción con el sistema inmune se debe más probablemente a la acción directa del sistema de secreción tipo 4 que permite el paso de peptidoglicano al citoplasma de la célula eucariota cuando perfora la membrana (Viala *et al.* 2004).

VacA es una toxina capaz no sólo de inducir *in vitro* la formación de vacuolas en las células epiteliales. También desencadena respuestas proinflamatorias uniéndose a distintos receptores de membrana, induce la formación de canales en la membrana y lleva a la liberación de citocromo *c* desde las mitocondrias lo que a su vez induce la apoptosis (Kusters, van Vliet, y Kuipers 2006). Todas las cepas de *H. pylori* producen algún tipo de VacA. Se han encontrado diferencias en cuanto a la virulencia de la cepa según las variantes en las regiones señal (s1 o s2) y media (m1 o m2) del gen *vacA* de tal manera que las más citotóxicas son las que poseen el tipo s1m1 seguidas por las s1m2. Las cepas s2m2 no parecen ser citotóxicas y las s2m1 son muy infrecuentes (Atherton *et al.* 1995). Recientemente se han descrito otras dos regiones, la intermedia (i) y la delectiva (d) cuyas variantes podrían estar relacionadas con la virulencia (Rhead *et al.* 2007; Ogiwara *et al.* 2009)

OipA es una proteína de membrana externa. Dependiendo de si existe un correcto emparejamiento entre ambas cadenas de ADN en el gen *oipA* éste será funcionante o no funcionante (*slipped-strand mispairing*) (Yamaoka, Kwon, y Graham 2000). Esta proteína parece compartir varias de sus funciones y vías de acción con CagA. Así, parece inducir la producción de IL8, estimula la respuesta inflamatoria y la dinámica de la actina a través de la fosforilación de distintas cascadas de señalización y ataca a las uniones célula a célula mediante un mecanismo dependiente de la beta-catenina (Yamaoka 2010). Por otro lado, OipA es también una adhesina (HopH) e interviene en la colonización de la mucosa gástrica (Dossumbekova *et al.* 2006).

BabA es una adhesina (HopS) capaz de unirse a antígenos de grupo sanguíneo de Lewis fucosilados. Está codificada por el gen *babA* del que existen 2 alelos *babA1* y *babA2* aunque sólo *babA2* da lugar a una proteína completa y funcional. Experimentos en modelos animales han demostrado que BabA es importante para la colonización (Rad *et al.* 2002) y en humanos parece estar relacionado con la virulencia aunque su

INTRODUCCIÓN

frecuente asociación con CagA y VacA hace difícil valorarlo independientemente (Gerhard *et al.* 1999).

SabA es también una adhesina (HopP) capaz de unirse a los glicoconjugados con ácido siálico. Este tipo de glicoconjugados sustituyen a los sialicados a lo largo de la infección por *H. pylori* por lo que el papel de esta adhesina podría ser importante en las fases de inflamación crónica y atrofia (Mahdavi *et al.* 2002). También es capaz de unirse a los granulocitos, que presentan este tipo de ligandos, con lo que podrían regular su actividad (Unemo *et al.* 2005) y a la matriz extracelular (Walz *et al.* 2005).

DupA, es el primer factor de virulencia que se describió ligado exclusivamente a la úlcera péptica y no al cáncer gástrico (Lu *et al.* 2005) Si bien algunos estudios posteriores indican que podría estar asociado a ambas manifestaciones (Argent *et al.* 2007). Esta proteína parece estimular la respuesta inflamatoria de las células mononucleares (Hussein *et al.* 2010). El gen *dupA* está codificado en una región llamada “zona de plasticidad” que al igual que la isla de patogenicidad (Cag PAI) parece tener un origen externo dado su contenido en G+C y podría suponer el tercer sistema de secreción tipo 4 encontrado después de Cag PAI y Comb B (Kersulyte *et al.* 2009). Esta región del genoma contiene aproximadamente la mitad de los genes propios de cada cepa y varios de ellos podrían estar relacionados con la virulencia. El gen *dupA* es homólogo de *virB4* y está rodeado de varios genes *vir* que codifican un sistema de transporte tipo 4 que, junto al de ComB y CagPAI es el tercero descrito en *H. pylori* y al que se ha llamado *tfs3* (*tfs3a* en los casos en los que posee el gen *dupA* y *tfs3b* en aquellos en los que está presente su homólogo *virB4*) (Kersulyte *et al.* 2003).

El LPS de *H. pylori* posee oligosacáridos fucosilados que se asemejan a antígenos de los grupos sanguíneos humanos (antígenos de Lewis). Estos antígenos tienen un cierto papel en la adhesión aunque menor de los que se pensó en un primer momento (Mahdavi *et al.* 2003) y un papel más relevante en la evasión frente a la respuesta inmune (Monteiro *et al.* 1998).

1.1.5 Genoma y diversidad genética

Desde que se publicó el primer genoma completo de una cepa de *H. pylori* en 1997 (Tomb *et al.* 1997), las mejoras conseguidas en el campo de la secuenciación

INTRODUCCIÓN

(especialmente en el tiempo y el coste) han permitido la secuenciación de un número creciente de aislamientos. Entre estas mejoras cabe mencionar los llamados métodos de secuenciación de nueva generación disponibles ya en tres sistemas comerciales. La plataforma 454 de Roche utiliza la pirosecuenciación, una técnica basada en la detección de los pirofosfatos (PPi) liberados durante la síntesis de ADN. Otro analizador disponible actualmente es el Illumina/Solexa capaz de detectar los nucleótidos incorporados a la cadena durante la síntesis de ADN gracias a la unión reversible de un terminador marcado fluorescentemente a cada uno de los cuatro tipos de dNTPs. Por último el sistema SOLID de ABI utiliza la secuenciación por ligación en la que sondas de dinucleótidos marcadas fluorescentemente son utilizadas en distintos ciclos de ligación dando varias lecturas para cada posición lo que mejora la precisión de la secuenciación. El salto de secuencias más o menos largas a la secuenciación de genomas completos se ha logrado gracias a la secuenciación de forma paralela millones de hebras sencillas, cortas, amplificadas y unidas a cuentas separables. También han mejorado los algoritmos informáticos utilizados para analizar las secuencias así conseguidas permitiendo el solapamiento de muchas de ellas en largos *contigs* (Zhang *et al.* 2011).

Al menos los genomas de 9 cepas de *H. pylori* han sido ya publicados (Lara-Ramírez *et al.*). La comparación de estos genomas nos ha permitido conocer mejor muchos aspectos de la genética, microbiología y patogenicidad de este microorganismo. *H. pylori* presenta una gran diversidad genética entre distintos aislamientos (Go *et al.* 1996). El estómago es un nicho pobre en variedad bacteriana a nivel de especies pero rico en subpoblaciones de *H. pylori*. Esta diversidad permite a la bacteria enfrentarse a las diferencias individuales del huésped (Kang y Blaser 2006). Existen diversos factores que contribuyen a esta diversidad.

En primer lugar, *H. pylori* posee una gran capacidad de mutación y de recombinación y no se ha descrito ningún sistema completo de reparación de errores de emparejamiento lo que resulta en una gran frecuencia de mutación (Björkholm *et al.* 2001). Existen repeticiones no aleatorias de nucleótidos en su genoma que facilitan los fenómenos de recombinación (Aras *et al.* 2003). Presenta competencia natural y ha desarrollado un sistema de transporte tipo IV (el sistema *ComB*) capaz de importar

INTRODUCCIÓN

ADN externo e integrarlo mediante recombinación (Karnholz *et al.* 2006). Existen muchos genes sometidos a regulación “*on-off*” mediante el sistema de variación de fase por desapareamiento de nucleótidos (*slipped strand mispairing*) como los implicados en la síntesis de LPS (Salaün *et al.* 2004). Posee diferentes sistemas de restricción-modificación que varían de unas cepas a otras y que pueden suponer una defensa frente a material genético extraño o que quizá sean precisamente una consecuencia de la adquisición de material genético mediante transferencia horizontal ya que, una vez adquiridos, estos sistemas pueden protegerse a sí mismos autoprotectiéndose (Kobayashi *et al.* 1999). Es frecuente que en la replicación se produzcan inversiones que son simétricas respecto al eje de replicación (Lara-Ramírez *et al.*).

El tamaño de los genomas secuenciados está entre 1,5 y 1,7 Mpb y tiene un contenido de G+C entre el 35% y el 40%. Según un estudio reciente, el genoma central estaría compuesto por 1186 genes. Estos genes están implicados en la adaptación al nicho ecológico de la especie. Entre el 22 y el 27% del genoma estaría compuesto por genes auxiliares únicos de cada cepa o compartidos sólo por algunas de ellas (Gressmann *et al.* 2005). Entre estos se encuentran los posibles factores de virulencia descritos que podrían explicar las diferencias patogénicas observadas entre diferentes cepas. Algunos de ellos se encuentran en islas de patogenicidad como CagPAI o la zona de plasticidad que parecen tener un origen externo dado su contenido en G+C. También se incluyen en estos genes auxiliares otras proteínas de membrana y los sistemas de restricción-modificación.

Muchas cepas poseen uno o más plásmidos que no parecen codificar factores de virulencia o mecanismos de resistencia a antibióticos (Heuermann y Haas 1995).

1.1.6 Transferencia genética horizontal

La gran variabilidad genética de *H. pylori* indica una alta frecuencia de transferencia genética entre cepas (Go *et al.* 1996). Pero además, la presencia de regiones del genoma con diferente contenido en G+C, la homología de algunos genes con genes de microorganismos Gram positivos y la presencia de sistemas de restricción-modificación similares a los encontrados en otras bacterias señalan a la incorporación de material genético desde otras especies. La transferencia genética horizontal ocurre

INTRODUCCIÓN

fundamentalmente a través de tres vías clásicas: transformación, conjugación y transducción.

La transformación consiste en la capacidad para incorporar ADN del entorno e integrarlo de manera que pase a ser hereditario. La mayoría de las cepas de *H. pylori* (75% aproximadamente) es transformable de manera natural aunque la frecuencia de transformación varía mucho de unas a otras (Israel, Lou, y Blaser 2000). Los sistemas de restricción previenen la integración del ADN adquirido cuando se trata de ADN de otras especies o de ADN plasmídico pero no suponen un gran obstáculo frente a la incorporación de ADN cromosómico de otras cepas de *H. pylori* (Ando *et al.* 2000). En *H. pylori*, el sistema *comb* que codifica un sistema de secreción tipo IV juega un papel esencial en la captación de material genético (Karnholz *et al.* 2006).

En la conjugación se establece contacto físico entre dos bacterias mediante un *pilus* o un poro, el material genético se replica y pasa de una a otra. Se ha publicado una comunicación demostrando la existencia de un mecanismo similar a la conjugación conjugación *in vitro* en *H. pylori*. Como en cualquier otra bacteria se requiere contacto entre las dos bacterias implicadas aunque a diferencia de *E. coli* no es necesaria la participación de plásmidos y el intercambio es bidireccional (Kuipers *et al.* 1998). También se ha conseguido la conjugación entre una cepa donante de *E. coli* y una receptora de *H. pylori*. En este experimento además se comprobó que el material intercambiado no era afectado por los sistemas de restricción (al revés de lo que ocurre con la transformación) (Heuermann y Haas 1998). Más recientemente se publicó un estudio en el que se documentaba la conjugación entre una cepa donante de *H. pylori* y una receptora de *Campylobacter jejuni*. El intercambio en este caso era unidireccional e independiente de los sistemas de secreción tipo IV conocidos en *H. pylori* (Oyarzabal, Rad, y Backert 2007) También se ha comprobado que los genes homólogos de *traG* y *rlx* son importantes para la transferencia de plásmidos (Backert, Kwok, y König 2005).

La transducción consiste en el intercambio genético entre dos bacterias mediado por la infección de un bacteriófago. Aunque se ha descrito la existencia de bacteriófagos de *H. pylori*, las comunicaciones son muy escasas (Marshall *et al.* 1987); Schmid, von Recklinghausen, y Ansorg 1990; Heintschel von Heinegg, Nalik, y Schmid 1993) y no se ha podido demostrar la existencia de transducción en esta bacteria. Recientemente se

INTRODUCCIÓN

ha descrito de manera más completa un profago inducible en una cepa secuenciada de *H. pylori* pero no se han comunicado experimentos de transducción utilizándolo (Lehours *et al.* 2011). Durante la redacción de esta memoria se ha publicado un estudio en el que se demostraba la capacidad de un nuevo fago de *H. pylori* para lograr la transducción en esta especie (Luo *et al.* 2012).

1.1.7 Epidemiología de la infección por *H. pylori*

La prevalencia de la infección presenta importantes variaciones geográficas estando en torno al 80% en los países en desarrollo y por debajo de 40% en la mayoría de los países desarrollados. Se cree que el descenso observado en estos últimos se debe a la mejora de las condiciones higiénicas y a la eliminación de portadores mediante el uso de antibióticos (Perez-Perez, Rothenbacher, y Brenner 2004). La infección parece adquirirse fundamentalmente en la infancia manteniéndose alta en los países en desarrollo conforme aumenta la edad y aumentando muy paulatinamente en los países desarrollados. Se cree que la prevalencia en los grupos de edad más avanzada en los países desarrollados se debe a un efecto cohorte dado que la adquisición del microorganismo era más frecuente en el pasado (Brown 2000). Dentro de una misma área geográfica se relaciona inversamente con el nivel socio-económico lo que supone un argumento más a favor de la efectividad de las medidas de higiene.

Se desconoce la vía exacta de transmisión. Se han propuesto diversas hipótesis como la de la zoonosis desde reservorios animales (*H. pylori* se ha detectado ocasionalmente en gatos domésticos y con mayor frecuencia en ovejas), la transmisión a través del agua contaminada, la infección iatrogénica mediante endoscopias y, fundamentalmente la transmisión de persona a persona vía oral-oral o fecal-oral. Dada la extrema sensibilidad de *H. pylori* frente a la ausencia de nutrientes, las temperaturas fuera del rango entre los 34°C y los 40°C y la presión atmosférica de oxígeno, la vía de persona a persona, especialmente en la infancia y a través de familiares cercanos es probablemente la más importante (Brown 2000).

1.1.8 Espectro clínico de la infección por *H. pylori*

INTRODUCCIÓN

La colonización por *H. pylori* no supone una enfermedad en sí misma sino que la presencia de la bacteria parece ser un requisito necesario para el desarrollo de una serie de patologías digestivas.

La colonización por *H. pylori* conduce prácticamente siempre a la infiltración de la mucosa del antro y del corpus por neutrófilos y células mononucleares.

Las características de la fase de gastritis aguda son poco conocidas ya que la mayoría de los estudios se han realizado tras infecciones iatrogénicas o con la participación de voluntarios que ingirieron una cepa del microorganismo (Morris 1987), (Graham *et al.* 2004). Los síntomas más comúnmente observados son alteraciones dispépticas transitorias (náuseas, vómitos o sensación de plenitud). Estos síntomas se acompañan de una intensa inflamación de la mucosa y de hipoclorhidria. Se desconoce si en algunos casos la infección puede resolverse completamente después de esta fase aunque algunos estudios apoyan la colonización transitoria (Malaty *et al.* 1999).

Cuando la colonización persiste, la intensidad y la distribución de la gastritis se correlacionan con la excreción de ácido. Por un lado, la hipoclorhidria facilita la colonización de la mucosa y por el otro, la infección reduce la secreción de ácido al afectar directamente a las células parietales y de manera indirecta a través de la liberación de mediadores locales de la inflamación. En aquellos casos en los que la secreción ácida no se ve alterada, la gastritis se focaliza en la zona antral donde existen menos células parietales, se asocian con inflamación crónica activa y metaplasia gástrica en el duodeno y se produce con mayor frecuencia una úlcera péptica. Por el contrario, en los casos en los que la secreción ácida está alterada suelen mostrar una pangastritis con inflamación crónica, atrofia y metaplasia intestinal y con mayor frecuencia acaba desencadenándose un cáncer gástrico (Kusters, van Vliet, y Kuipers 2006).

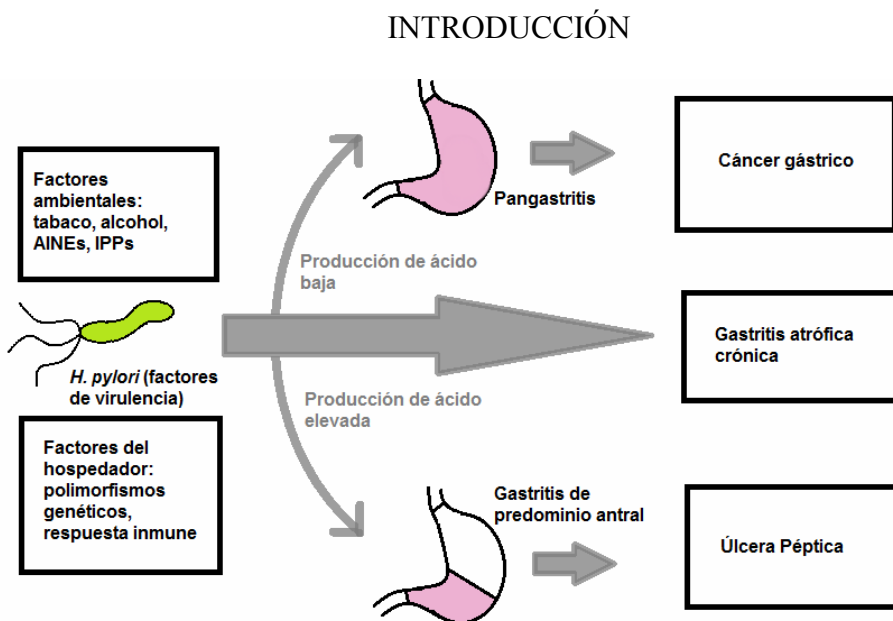


Figura 1. Representación esquemática de los factores que afectan a la patología gástrica consecuencia de la infección por *H. pylori* (Kusters, Van Vliet, y Kuipers 2006).

Las úlceras gástricas y duodenales (úlceras pépticas) se definen como defectos en la mucosa de al menos 0,5 cm. de diámetro y que penetran en la *muscularis mucosa*. Pueden conducir a graves complicaciones como el sangrado, la perforación o la obstrucción por constricción. Poco tiempo después de su descubrimiento se comprobó que la úlcera duodenal se relacionaba con la presencia de *H. pylori* en aproximadamente un 95% de casos mientras que esta asociación era de un 85% con respecto a la úlcera gástrica (Kuipers, Thijs, y Festen 1995). El riesgo relativo de los sujetos infectados frente a los no infectados está entre el 3 y el 10% (Nomura *et al.* 1994) y se estima que entre un 10 y un 15% de los individuos *H. pylori* positivos desarrollarán esta patología (Sipponen *et al.* 1990). La demostración de que el tratamiento erradicador de la bacteria conducía a la cura de la úlcera terminó de establecer la relación causal (Rauws, y Tytgat 1990) y cambió para siempre el curso natural de la enfermedad que hasta entonces era una enfermedad crónica o recurrente que requería tratamiento antiácido de mantenimiento o cirugía. En los países desarrollados, la disminución de la prevalencia de la infección por *H. pylori* está haciendo que la asociación entre la bacteria y la úlcera sea cada vez menor con un aumento porcentual de otras posibles causas de úlcera como los antiinflamatorios no esteroideos, el abuso de alcohol, la infección por

INTRODUCCIÓN

citomegalovirus, la enfermedad de Crohn o la gastritis crónica idiopática. Esto hace que cada vez sea más importante el diagnóstico de la infección en los pacientes con úlcera péptica.

La dispepsia funcional se define como la presencia de síntomas de disfunción gastrointestinal alta sin alteraciones morfológicas demostrables. Se considera dispepsia no investigada aquella en la que hay presencia de síntomas pero no se ha intentado descartar la úlcera como causa. Estos síntomas son muy comunes y la prevalencia de *H. pylori* entre quienes los padecen no es mucho mayor que la de la población general (Talley y Hunt 1997). Sin embargo sí existe evidencia de que la erradicación de *H. pylori* puede disminuir los síntomas en algunos de los pacientes (O'Morain 2006).

La inflamación crónica producida por *H. pylori* conduce, en aproximadamente la mitad de los pacientes, a cambios estructurales en la mucosa gástrica, que va siendo sustituida por tejido conectivo y mucosa intestinal. Las áreas de metaplasia intestinal se extienden de forma multifocal y aunque no producen síntomas sí se asocian con una mayor probabilidad de desarrollar un adenocarcinoma (Kuipers 1999). Se estima que la colonización por *H. pylori* incrementa en 10 veces el riesgo de padecer cáncer gástrico por lo que fue la primera bacteria considerada un carcinógeno de tipo I (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 1994). Se han estudiado distintos factores de la bacteria, como la producción de CagA, y del huésped, como la predisposición a una mayor producción de interleucina 1. También existen diversos estudios que intentan aclarar el efecto preventivo que podría tener la erradicación de la bacteria. En este sentido, parece que el mayor efecto se consigue en aquellos sujetos que no han desarrollado todavía atrofia ni metaplasia mientras que muchos de los que ya lo han hecho podrían haber pasado el punto de no retorno (Kusters, Van Vliet, y Kuipers 2006).

La mucosa gástrica no suele presentar tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) pero éste suele aparecer cuando existe colonización por *H. pylori*. El linfoma gástrico tipo MALT supone una expansión clonal de linfocitos B pertenecientes a este tejido. Aunque se trata de una patología muy poco frecuente, la relación con la colonización por *H. pylori* está claramente establecida (Parsonnet *et al.* 1994) y distintas series de casos indican que la erradicación puede llevar a la remisión del linfoma en un

INTRODUCCIÓN

elevado porcentaje de casos (60 a 80%) (Fischbach *et al.* 2004; Wündisch *et al.* 2005). El porcentaje de recurrencias es elevado (del 10 al 35%) (Raderer *et al.* 2005) y se ha relacionado la presencia de la traslocación t(11;18) (q21;q21) (que conlleva la fusión de las proteínas API2-MALT1) con una pobre respuesta a la erradicación (Liu *et al.* 2002).

Distintos datos sugieren una relación inversa entre *H. pylori* y el reflujo gastroesofágico. Por un lado, la prevalencia de *H. pylori* es menos elevada en estos pacientes. Por otro, las tendencias en la distribución geográfica y temporal de ambas variables es inversa. Y por otro existe una reducción de la secreción ácida en los pacientes *H. pylori*-positivos. Sin embargo, los efectos de la erradicación de *H. pylori* respecto al desarrollo o el empeoramiento de los síntomas no están claramente establecidos (Yaghoobi *et al.* 2010).

La lista de patologías extraintestinales en las que se ha estudiado una posible relación con la infección por *H. pylori* es larga: enfermedad coronaria, rosácea, urticaria idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), anemia ferropénica, enfermedad de Raynaud, esclerodermia, migraña y síndrome de Guillain-Barré y muchas otras. Algunas de estas asociaciones han acumulado un grado considerable de evidencia como la PTI o la anemia ferropénica idiopática. En otros casos como la enfermedad isquémica los datos son prometedores. En cuanto al resto existen ciertos indicios pero el grado de asociación, si es que existe, es todavía muy incierto (Figura *et al.* 2010).

1.1.9 Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico de la infección por *H. pylori* se basan en el estudio de los distintos aspectos anatomopatológico, microbiológico, inmunológico o enzimático (detección de la actividad de la ureasa) de la infección. Pueden agruparse en medios invasivos, que requieren de la realización de endoscopia y biopsia gástrica y los métodos no invasivos o indirectos que detectan diferentes productos de la bacteria.

Los métodos invasivos presentan la ventaja general de permitir no sólo el diagnóstico de la infección sino también de las lesiones asociadas. Sin embargo se trata de técnicas más costosas y más molestas para el paciente ya que requieren de una

INTRODUCCIÓN

endoscopia digestiva alta. Se recomienda la toma de distintas biopsias (al menos cuatro: del antro y dos del cuerpo, anterior y posterior).

El cultivo en combinación con el análisis histopatológico se considera el patrón oro (*gold standard*). Tiene la ventaja de permitir el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos de la cepa implicada. Es el método más específico (100%) pero su sensibilidad depende en gran medida de la experiencia del laboratorio y de las condiciones de transporte de la muestra (aunque se estima entre el 80 y el 95% si estas condiciones son las adecuadas: transporte en suero salino si la muestra va a ser procesada antes de 4 h, en medio de transporte específico y refrigerado en las primeras 24 h o congelada a -70°C o en nitrógeno líquido si va a ser procesada más tarde) («[Consensus development conference on *Helicobacter pylori*. Revised conclusions and recommendations of the Working group (1999)]» 1999).

El estudio bacteriológico requiere largos periodos de incubación (hasta 12 días) pero puede completarse con el examen microscópico de una extensión en fresco o con distintas tinciones como la de Gram, tinción rápida de Giemsa o naranja de acridina (Mégraud y Lehours 2007). El análisis histopatológico consiste en la identificación de la bacteria mediante tinciones simples como la de Giemsa modificada o más complejas y específicas como la de Warthin-Starry, tricrómica de Genta o de El Zimaity (el-Zimaity 2000). Su sensibilidad depende tanto de la experiencia del anatomopatólogo como del número, el tamaño y la localización de las biopsias obtenidas. Además influye en gran medida la densidad de población de *H. pylori* de manera que en situaciones como la atrofia o la metaplasia o en el control post-tratamiento, puede ser menos sensible que otras técnicas (el-Zimaity 2000).

La prueba de la ureasa rápida pone de manifiesto la actividad de la ureasa aprovechando el cambio de pH que se produce con la hidrólisis de la urea mediante un indicador de pH. La lectura se realiza a las 2 h y tiene una sensibilidad del 80% y una especificidad del 95% («[Consensus development conference on *Helicobacter pylori*. Revised conclusions and recommendations of the Working group (1999)]» 1999). De nuevo su sensibilidad depende mucho de la densidad bacteriana y su mayor ventaja, la rapidez, no suele ser determinante.

INTRODUCCIÓN

La amplificación génica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la detección del ADN de una bacteria amplificando una parte de su secuencia gracias a la ayuda de cebadores específicos. Su sensibilidad y especificidad son muy altas aunque requieren unas exigentes condiciones de manipulaciones y aunque se pueden detectar ciertas mutaciones implicadas en la resistencia a algunos antimicrobianos no aporta información respecto a la viabilidad de la bacteria (Ho y Windsor 2000). Hoy por hoy no es una técnica utilizada rutinariamente para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

Los métodos indirectos o no invasivos presentan el principal inconveniente de no permitir el diagnóstico de la lesión asociada ni el estudio de sensibilidad del microorganismo. En cambio son métodos rápidos y poco molestos.

El papel de la serología es fundamentalmente el de determinar la prevalencia en estudios epidemiológicos y resulta de poca utilidad en el diagnóstico clínico salvo quizá en pacientes con un sangrado activo en los que otras pruebas se muestran poco sensibles. También presenta la ventaja de no verse afectada por el tratamiento antisecretores previo. La técnica más empleada es el ELISA con antígenos purificados para detectar la presencia de anticuerpos específicos en el suero aunque también se han desarrollado técnicas de ELISA para la detección en muestras de saliva y de orina que no han llegado a implantarse como diagnóstico de rutina (L. Monteiro y Mégraud 1999).

La prueba respiratoria con urea marcada con C^{13} (*Urea Breath Test*, UBT) se basa en la detección del ratio $^{13}C/^{12}C$ en el CO_2 del aliento exhalado. El ^{13}C proviene del CO_2 liberado tras la hidrólisis de la urea ingerida y se detecta mediante un detector de infrarrojos o mediante espectrometría de masas. Aunque es poco invasivo, el procedimiento concreto no es sencillo por lo que su uso en niños pequeños o pacientes con dificultades de comprensión podría estar limitado (De Korwin 2003). Su elevada precisión diagnóstica (>95%), la facilidad en el transporte de las pruebas y la objetividad del resultado convierten a esta prueba en la primera opción en los casos en los que no se recomienda la endoscopia (Malfertheiner *et al.* 2007).

La detección de antígenos en las heces también presenta unas elevadas sensibilidad y especificidad y puede ser una buena alternativa al UBT especialmente en

INTRODUCCIÓN

aquellos pacientes con dificultades para realizar el procedimiento aunque presenta el inconveniente de que las heces deben ser conservadas a -20°C si la detección no se lleva a cabo con prontitud (Gisbert y Pajares 2004).

Tanto la detección de antígenos en heces como la prueba del aliento pueden ver disminuida su sensibilidad en el curso de un tratamiento antisecretor o antibiótico. Si se da esta circunstancia se recomienda no realizar la prueba hasta dos semanas después de detener el tratamiento (De Korwin 2003).

1.1.9.1 Estrategia diagnóstica

En países con baja prevalencia de la infección y de cáncer gástrico, la recomendación más habitual en pacientes jóvenes (menores de 45 años) es la estrategia conocida como *test and treat* (diagnosticar y tratar) que consiste en aplicar un método no invasivo (UBT es el preferido seguido por la detección de antígenos en heces) y comenzar el tratamiento erradicador ante un resultado positivo (Mégraud y Lehours 2007).

Para mayores de 45 años o pacientes con síntomas alarmantes siempre es recomendable la realización de una endoscopia digestiva alta con la toma de biopsias. La elección del cultivo o de la histología depende fundamentalmente de la sospecha de resistencia a claritromicina. Si la prevalencia de este tipo de resistencia es elevada (>15-20%) es recomendable practicar el cultivo con antibiograma. Por otro lado, es más frecuente que los pacientes jóvenes hayan estado expuestos a este fármaco por lo que podrían ser ellos los más beneficiados del cultivo mientras que los más mayores, en los que son más frecuentes las alteraciones histológicas graves se beneficiarían más del estudio anatomopatológico (Mégraud y Lehours 2007).

Se debe confirmar la erradicación a las 4 a 6 semanas tras el tratamiento. Con este fin se recomienda el uso de una prueba no invasiva, especialmente la UBT con la detección de antígenos en heces como segunda opción). En aquellos casos como la presencia de úlcera péptica en los que se recomienda repetir la endoscopia la confirmación debe hacerse mediante histología (Malfertheiner *et al.* 2007).

En los países menos desarrollados la prevalencia es tan elevada que probablemente lo más correcto sería ahorrar en las técnicas diagnósticas y tratar ante la

INTRODUCCIÓN

presencia de síntomas mientras que en los países emergentes es probable que no se pueda contar más que con la serología como método no invasivo y que cuando esté indicada y disponible la endoscopia se haga un diagnóstico histológico ya que los antibióticos empleados en estos países (menos costosos) no suelen presentar problemas de resistencias (Mégraud y Lehours 2007).

1.1.10 Resistencias a los antibióticos

La mayoría de los mecanismos de resistencia a los antibióticos descritos en *H. pylori* se basan en mutaciones cromosómicas puntuales. La resistencia aparece a menudo *de novo* aunque la transmisión horizontal de resistencias no puede ser excluida. La resistencia a los nitroimidazoles (como el metronidazol) se debe a diversas mutaciones en los posibles aceptores de electrones que, en condiciones normales activarían el profármaco mediante reducción (Gerrits *et al.* 2006). La resistencia frente a macrólidos (como la claritromicina) se debe en la mayoría de los casos a una mutación puntual en uno de dos nucleótidos adyacentes A₂₁₄₂ * G/C y A₂₁₄₃ * G de los genes que codifican la subunidad 23S del ribosoma (Versalovic *et al.* 1997). Las resistencias estables frente a penicilinas son muy raras en *H. pylori*. La mayoría de las cepas descritas como resistentes son sólo tolerantes a la amoxicilina y los niveles elevados de concentración mínima inhibitoria son sólo transitorios. En cualquiera de los casos y a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de otros Gram negativos, la resistencia no se debe a la presencia de betalactamasas sino a alteraciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) (Gerrits *et al.* 2006). La resistencia a tetraciclinas parece estar mediada por sustituciones simples, dobles o triples en los genes de la subunidad 16S del ribosoma y en algunos casos quizá por la reducción de la permeabilidad (Wu *et al.* 2005). El mecanismo subyacente en la resistencia a fluoroquinolonas son las mutaciones puntuales en el gen *gyrA* de la ADN girasa en las posiciones que codifican los aminoácidos 87, 88, 91 y 97 (Moore *et al.* 1995). Por último, la resistencia frente a rifampicina y rifabutina se deben a mutaciones en el gen *rpoB* de la subunidad β de la ARN polimerasa a la que se unen estos antibióticos (Gerrits *et al.* 2006).

INTRODUCCIÓN

En cuanto a la relevancia que presentan las resistencias a los distintos grupos de antibióticos, las resistencias frente a amoxicilina, tetraciclina y rifampicina se consideran en general poco frecuentes, las resistencias frente a quinolonas se han incrementado y están alrededor del 16%, las cepas resistentes a metronidazol suponen aproximadamente el 26% y las resistentes a claritromicina entorno al 17%. Las variaciones entre las distintas áreas geográficas son muy marcadas (De Francesco *et al.* 2010). Dado que el tratamiento de la infección es siempre combinado, no todas las cepas resistentes implican un fracaso terapéutico, sin embargo su influencia en el resultado definitivo del tratamiento erradicador es muy importante. Numerosos estudios han demostrado peores resultados del tratamiento en pacientes infectados con cepas resistentes (Megraud y Doermann 1998; Houben *et al.* 1999)

Se han utilizado diferentes métodos para la detección de resistencias de *H. pylori* frente a los antibióticos más utilizados, tanto fenotípicos como genotípicos. Dentro de los fenotípicos, el método de dilución en agar se considera el de referencia. La determinación mediante *E-test* tiene en general una buena correlación y es más sencilla de incorporar a la rutina diagnóstica (Glupczynski *et al.* 2002). Otros métodos como la dilución en caldo dan más problemas debido a la dificultad de cultivar *H. pylori* en medios líquidos (Coudron y Stratton 1995). La correlación de la difusión de discos sólo ha quedado claramente establecida frente a la claritromicina pero su sencillez hace que se utilice habitualmente (Grignon *et al.* 2002).

Para aquellos métodos que determinan la concentración mínima inhibitoria los puntos de corte recomendados por el Comité europeo para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos (EUCAST) son los siguientes (aunque sólo el de claritromicina tiene una correspondencia clínica claramente probada): tetraciclina, 1 µg/ml; rifampicina, 1 µg/ml; ciprofloxacino (utilizado muchas veces en lugar de levofloxacino), 1 µg/ml; amoxicilina 0,12 µg/ml; metronidazol, 8 µg/ml y claritromicina 0,25 µg/ml (las cepas entre 0,25 µg/ml y 0,5 µg/ml se consideran intermedias y las de >0,5 µg/ml, resistentes).

El caso del metronidazol es distinto ya que los resultados observados *in vitro* no se correlacionan con el éxito o el fracaso terapéuticos (el punto de corte más utilizado es 8 µg/ml) (Glupczynski *et al.* 2002).

INTRODUCCIÓN

Por otro lado dado que los mecanismos de resistencia no son muy variados y la mayoría se deben a mutaciones puntuales, se han desarrollado métodos moleculares para la detección de resistencias, especialmente frente a claritromicina. Entre los métodos utilizados destacan la PCR-RFLP y la PCR a tiempo real (esta última se ha probado con éxito incluso en muestra directa) (Mégraud y Lehours 2007).

1.1.11 Tratamiento

Las recomendaciones del III Consenso de Maastricht para el tratamiento erradicador de *H. pylori* se recogen en la tabla 1 (Malfertheiner et al. 2007):

INTRODUCCIÓN

Recomendaciones	Grado de evidencia	Nivel de recomendación
Pacientes estudiados por dispepsia (sin úlcera) infectados por <i>H. pylori</i>	1a	A
En pacientes con dispepsia no investigada es apropiada una estrategia de diagnosticar y tratar	1a	A
En poblaciones con baja prevalencia de infección, la estrategia de diagnosticar y tratar puede ser sustituida por tratamiento antiácido empírico	2a	B
La erradicación de <i>H. pylori</i> no provoca RGE	1b	A
La erradicación de <i>H. pylori</i> no afecta al resultado del tratamiento con PPI para el RGE en países occidentales	1b	A
No se recomienda descartar la infección por <i>H. pylori</i> de manera rutinaria en pacientes con RGE	1b	A
Se debe considerar descartar la infección por <i>H. pylori</i> en pacientes que reciben tratamiento de larga duración con PPIs	2b	B
Existe una relación inversa entre la prevalencia de <i>H. pylori</i> y RGE en Asia pero se desconoce la naturaleza de esa asociación	2b	B
En pacientes que reciben tratamiento de larga duración con AINEs y tienen úlcera péptica o sangrado de una úlcera, el tratamiento con PPI es superior a la erradicación para prevenir la recurrencia de la úlcera o el sangrado	1b	A
La erradicación es beneficiosa en pacientes que consumen AINEs de manera crónica pero no es suficiente para prevenir completamente la úlcera relacionada con los AINEs	1b	A
En pacientes que empiezan a utilizar AINEs, la erradicación puede prevenir la úlcera péptica o el sangrado	1b	A

Tabla 1. Recomendaciones para el tratamiento erradicador de *H. pylori*. (RGE: reflujo gastroesofágico; AINEs: antiinflamatorios no esteroideos)

El tratamiento erradicador de la infección por *H. pylori* se basa en la administración conjunta de al menos un fármaco antiácido con al menos dos antibióticos. Las combinaciones más frecuentemente utilizadas como tratamiento de primera línea son un inhibidor de la bomba de protones (PPI) junto a claritromicina y amoxicilina o metronidazol durante un tiempo no inferior a siete días. Cuando la

INTRODUCCIÓN

prevalencia de claritromicina es superior al 15-20% es preferible no utilizar este antibiótico o bien realizar previamente un estudio de sensibilidad (Malfertheiner et al. 2007). También se ha utilizado con éxito un tratamiento secuencial consistente en cinco días de un PPI junto a amoxicilina seguidos de otros cinco días del PPI junto a claritromicina y tinidazol (De Francesco et al. 2004).

Las combinaciones cuádruples que incluyen sales de bismuto, que también son una buena alternativa como primera línea, son las preferidas como tratamiento de segunda línea o de rescate. Si las sales de bismuto no están disponibles puede utilizarse una combinación de un PPI con amoxicilina o tetraciclina más metronidazol. El tratamiento de rescate debería estar guiado siempre por un estudio de sensibilidad (Malfertheiner et al. 2007).

Levofloxacino y rifabutina son dos fármacos cada vez más utilizados en diferentes combinaciones de antibióticos y antiseoretos.

1.2 Bacteriófagos

1.2.1 Historia

A principios del siglo XX, dos autores hicieron, de manera independiente, las primeras observaciones relativas a estos virus. De un lado, Twort describió en 1915 la transformación vidriosa de colonias de *Micrococcus sp.* y sugirió la posible naturaleza vírica del agente causal (Twort 1915). Del otro, d'Herelle, describió en 1917 la lisis de cultivos de *Shigella sp.* y confirmó que se debía a un agente vírico (d' Hérelle 1917). Fue él quien determinó la verdadera naturaleza de los fagos como virus que infectan a bacterias, parásitos intracelulares con un rango definido de posibles huéspedes a los que infectar. El descubrimiento llamó la atención de Bordet quien, a pesar de considerar que los efectos observados se debían más probablemente a enzimas líticas que a auténticos virus, fue el primero en acuñar el término de bacterias lisogénicas referido a aquellas que, bajo ciertas circunstancias, eran capaces de producir fagos.

D'Herelle fue también el primero en plantear la posibilidad de utilizar estos microorganismos en la lucha contra las infecciones bacterianas dando lugar al nacimiento de la fagoterapia (d' Herelle 1921). Los primeros experimentos tanto en

INTRODUCCIÓN

animales como en humanos demostraron el éxito de la administración de fagos para la prevención o el tratamiento de distintas infecciones y suscitaron gran interés. Durante la Segunda Guerra Mundial fueron utilizados tanto por el ejército ruso como por el alemán. Sin embargo, el éxito y la difusión alcanzados por los antibióticos en los países occidentales hicieron caer en el olvido los usos terapéuticos de los bacteriófagos. No sucedió lo mismo en los países de la Unión Soviética donde la investigación en este campo continuó, centrada especialmente en el Instituto fundado por Elieva y el propio d'Herelle en Georgia. No sería hasta la década de los 90 cuando, tras la caída del régimen soviético y, frente al creciente problema de las resistencias a los antibióticos, la fagoterapia volviera a despertar el interés de los investigadores.

Debido a su relativa simplicidad, los bacteriófagos han servido de modelo para estudiar diversos aspectos fundamentales de la biología molecular, especialmente en lo referente a la expresión génica. De hecho, la investigación en este campo fue crucial para demostrar el “dogma central”: la identificación del ADN como el material genético, la definición y la descripción del gen, y el descubrimiento del ARN mensajero como intermediario en la producción de proteínas. Además los fagos se utilizaron para probar la preexistencia de mutaciones aleatorias previas a la selección natural y su estudio ha permitido desentrañar la regulación de la expresión génica.

Fue Delbrück quien decidió tomar como modelo una serie de fagos a los que se denominó fagos T (del 1 al 7) y quien formó el más importante grupo de investigadores en este campo (Mullins 1972). Estos fagos fueron todos seleccionados por su clara respuesta lítica y la evidente formación de placas en los cultivos bacterianos. Más tarde, en 1950, Lwoff y Gutmann clarificaron la naturaleza de la lisogenia, monitorizaron la inducción y liberación de bacteriófagos a partir de una célula bacteriana y utilizaron el término “profago” para designar a los fagos en estado latente (Lwoff y Gutmann 1950). Poco después, los Lederberg descubrieron el fago lambda, un fago lisogénico de *E. coli* que se convirtió en el modelo de investigación de las infecciones lisogénicas (Lederberg y Lederberg 1953).

Pero los fagos no sólo han sido la clave para conocer las bases de la biología molecular sino que además han aportado muchas de las herramientas empleadas en esta disciplina. Las enzimas de restricción, los sistemas de expresión basados en promotores

INTRODUCCIÓN

fágicos, vectores para la clonación y bibliotecas genéticas o las técnicas basadas en la expresión fágica (*phage display*) son sólo las más conocidas. Actualmente, la investigación en bacteriófagos sigue abriendo prometedores caminos en la elaboración de nanomateriales y nanoestructuras, la detección e identificación de bacterias o el tratamiento de las infecciones bacterianas (Petty *et al.* 2007).

En los últimos años ha aumentado también el interés en los bacteriófagos como modelo para estudiar los sistemas ecológicos y sus complejas interacciones especialmente desde un punto de vista evolutivo (Abedon 2009).

1.2.2 Biología

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus capaces de infectar a las bacterias. Las partículas fágicas o viriones compuestos por una molécula de ácido nucleico (que puede ser ADN o ARN de cadena doble o sencilla, circular o linear) y una envoltura proteica o lipoproteica denominada cápsida. Pueden ser poliédricos, filamentosos, con cola o pleomorfos. Los fagos con cola y doble cadena de ADN (los *Caudovirales*) son, con diferencia, los más abundantes (95% de los descritos) (Ackermann *et al.* 1978).

Según sus características los fagos pueden clasificarse en familias y géneros (y un orden):

INTRODUCCIÓN

Simetría	Ácido nucleico	Orden y familia	Géneros	Miembros	Particularidades
Binarios (con cola)	ADN cd L	<i>Caudovirales</i>	15	4950	
		<i>Myoviridae</i>	6	1243	Cola contráctil
		<i>Siphoviridae</i>	6	3011	Cola larga (no contráctil)
		<i>Podoviridae</i>	3	693	Cola corta
Poliédricos	ADN cs C	<i>Microviridae</i>	4	40	
	ADN cd C T	<i>Corticoviridae</i>	1	3	Cápsida compleja (lípidos)
	ADN cd L	<i>Tectiviridae</i>	1	18	Vesícula interna lipoprotéina
	ARN cs L	<i>Leviviridae</i>	2	39	
	ARN cd L S	<i>Cystoviridae</i>	1	1	Envoltura, lípidos
Helicoidales	ADN cs C	<i>Inoviridae</i>	2	57	Filamentos o bastones
	ADN cd L	<i>Lipothrixviridae</i>	1	6?	Envoltura, lípidos
	ADN cd L	<i>Rudiviridae</i>	1	2	Similares al TMV
Pleomórficos	ADN cd C T	<i>Plasmaviridae</i>	1	6	Envoltura, lípidos. Sin cápsida
	ADN cd C T	<i>Fuselloviridae</i>	1	8?	Fusoidal, sin cápsida

Tabla 2. Clasificación y propiedades básicas de los bacteriófagos (capítulo 2, *The Bacteriophages* 2ª edición, R. Calendar (ed), Oxford University Press). C, circular; L, lineal; S, segmentado; T, superhelicoidal; cd, cadena doble; cs, cadena sencilla.

Los bacteriófagos pueden reproducirse mediante dos tipos de infecciones diferentes: líticas y lisogénicas tal y como ilustra la figura 2.

INTRODUCCIÓN

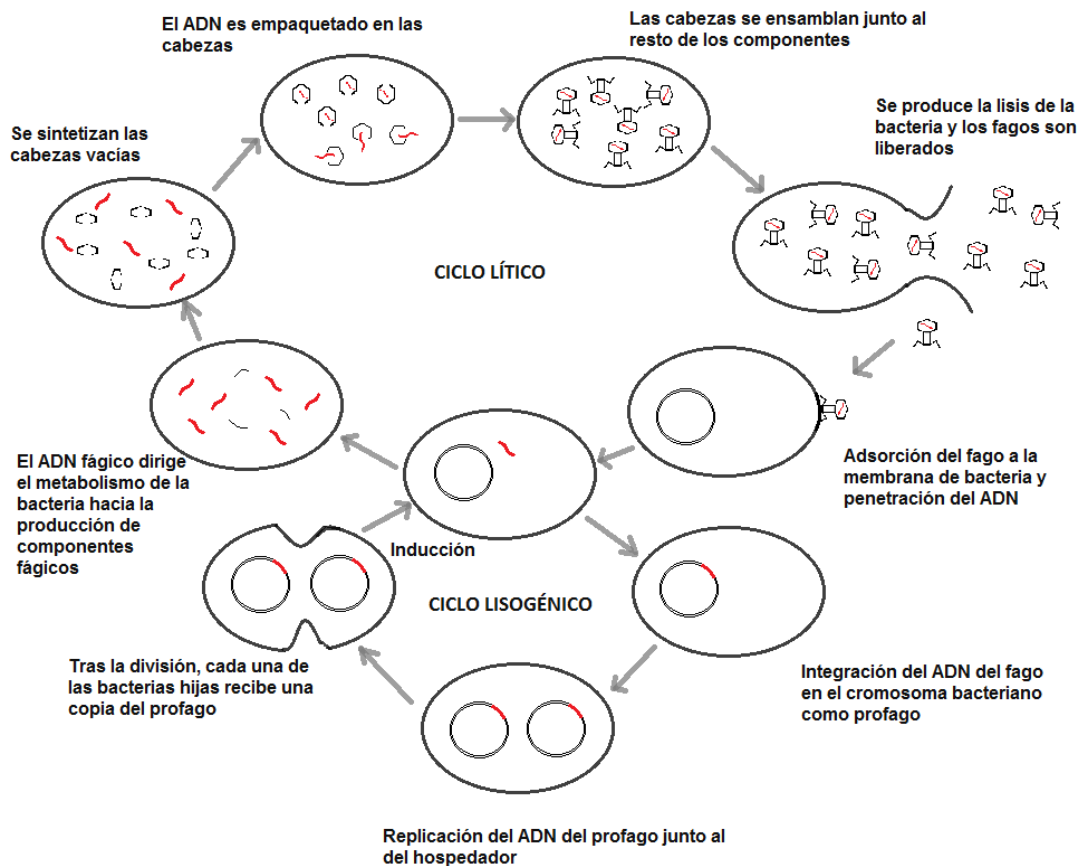


Figura 2. Esquema de los ciclos lítico y lisogénico.

En las infecciones líticas se produce en primer lugar la adsorción de uno o más bacteriófagos a la superficie de la bacteria, seguida de la penetración de su material genético en el interior de la célula bacteriana. Comienza entonces la síntesis de las proteínas precoces, cuyas funciones son proteger el genoma del fago y reestructurar los sistemas del huésped de la manera más conveniente para el virus. A continuación se transcriben los genes intermedios cuyos productos se encargan de la replicación del genoma fágico. A partir de estas copias se sintetizan las proteínas tardías que normalmente incluyen proteínas estructurales de la cubierta proteica del virus y enzimas líticas. El siguiente paso es el ensamblaje de las partes: se constituyen los capsómeros y estos se rellenan con una copia del material genético. Finalmente se produce la degradación de la pared celular y los bacteriófagos maduros son liberados. Los fagos con cola utilizan dos componentes para esta lisis: una enzima lítica capaz de romper

INTRODUCCIÓN

enlaces clave en la matriz de peptidoglicano y una holina, capaz de ensamblarse en la membrana interna formando poros a través de los cuales la enzima lítica alcanza el peptidoglicano. Los fagos sin cola producen una serie de proteínas que desestabilizan de diversas maneras las enzimas productoras de peptidoglicano del huésped. Una vez en el exterior, los viriones están listos para infectar a nuevas bacterias.

En las infecciones lisogénicas o atemperadas, lo que ocurre tras la adsorción y la penetración es que el material genético del virus se integra en el cromosoma de la bacteria de tal modo que se replicará junto a éste cada vez que la bacteria se divida (en algunos casos se perpetúan en forma de plásmidos). Esta recombinación está mediada por una enzima fágica llamada integrasa. Aunque el lugar de inserción suele ser específico, existen fagos capaces de integrarse en unos pocos sitios diferentes del cromosoma y algunos se insertan de manera aleatoria. La forma latente del bacteriófago se conoce como profago. En ocasiones, la presencia del profago confiere alguna característica fenotípica a la bacteria infectada que la diferencia de las demás, lo que se conoce como conversión. Normalmente, en este estado sólo se expresa una proteína vírica que es precisamente un represor que impide la transcripción del resto de proteínas. Este represor se produce en exceso de manera que no sólo impide la expresión del bacteriófago sino que evita que la bacteria vuelva a ser infectada por el mismo, fenómeno conocido como “inmunidad a la sobreinfección”. Si cesa la producción de este represor, se produce una enzima capaz de escindir el genoma del virus y comienza un ciclo lítico. Este fenómeno ocurre de manera espontánea con muy baja frecuencia (1 de cada 10.000 divisiones bacterianas) y es un modo de asegurar la propagación del virus. Sin embargo existen distintos factores ambientales que pueden favorecer este inicio del ciclo lítico, fenómeno conocido como inducción. De manera experimental, la inducción puede conseguirse mediante agresiones al ADN bacteriano para lo que suelen utilizarse mutágenos como la mitomicina C o los rayos ultravioletas.

1.2.3 Mecanismos moleculares de la infección por fagos

Adsorción: los fagos con cola utilizan fibras de la cola para reconocer ligandos en la superficie de la bacteria huésped. Algunos utilizan una sola fibra, otros utilizan grupos de tres, seis o doce fibras y los ligandos que reconocen pueden ser muy variados:

INTRODUCCIÓN

desde componentes del LPS y proteínas de membrana como porinas o transportadores en los Gram negativos a componentes del peptidoglicano, ácidos teicoicos y lipoteicoicos y proteínas asociadas en los Gram positivos. También hay fagos capaces de reconocer antígenos del glicocálix. Las adhesinas fágicas suelen ser complejas y variables de tal modo que pueden reconocer diferentes receptores en distintas bacterias. Además el rango de huéspedes puede cambiar gracias a la mutación o recombinación de estas moléculas (Kutter y Sulakvelidze 2004).

Penetración del ácido nucleico: una vez producida la adsorción el material genético del fago debe alcanzar el citoplasma bacteriano. En Gram negativos deberá atravesar dos barreras hidrofóbicas, las membranas interna y externa, la capa de peptidoglicano y el espacio periplásmico, que contiene endonucleasas. La velocidad a la que esto sucede es mucho mayor que la observada en la conjugación o la transformación. Generalmente se trata de un proceso activo asociado al potencial de membrana, al consumo de ATP o a la acción de alguna enzima y que difiere de unos fagos a otros. En algunos casos, como en el del podovirus T7 se basa en la acción de proteínas asociadas a la cola que forman una especie de cola extensible protegida (Molineux 2001). En otros, como en el del myovirus T4, el papel central le corresponde a la placa base, la cual sufre un cambio conformacional que hace contraerse a la vaina de la cola y empuja el tubo interno a través de la membrana externa de la bacteria. El peptidoglicano es degradado gracias a una lisozima integrada en una de las proteínas de la placa base y la membrana interna es atravesada gracias a un mecanismo desconocido dependiente del potencial de membrana (Rossmann *et al.* 2004).

Replicación del ADN fágico: la mayoría de los fagos atemperados dependen de la maquinaria del huésped para su replicación. Generalmente, circularizan su ADN tras la infección como paso previo a la recombinación con el cromosoma bacteriano. Por el contrario, la mayor parte de los fagos líticos codifican sus propias polimerasas y se replican en forma linear, formando largos concatémeros. Del mismo modo, muchos bacteriófagos utilizan la maquinaria del huésped para las funciones de recombinación y reparación del ADN pero algunos presentan sus propios mecanismos como la fotorreactivación, la escisión-reparación o la replicación basada en la recombinación (Kutter y Sulakvelidze 2004).

INTRODUCCIÓN

Transcripción: también para la transcripción, los bacteriófagos pueden aprovechar la ARN polimerasa del huésped modificándola para sus propósitos o bien pueden utilizar sus propias ARN polimerasas sin que ambos mecanismos sean excluyentes (Savalia *et al.* 2010).

Morfogénesis y empaquetado del ADN: aunque se trata de un aspecto explorado en detalle para pocos fagos, sí se sabe que muchos de ellos dedican buena parte de su genoma a codificar los componentes estructurales de la cápsida o catalizadores de su ensamblaje. Los casos más estudiados son los de algunos *Myoviridae* como T4 o P22. En el proceso de formación de la cabeza se constituye un complejo de iniciación de la proteína portal al que se unen el núcleo o andamio inicial y la o las proteínas principales de la cabeza. Este complejo portal conformará uno de los doce vértices de la estructura icosaédrica y es aquí donde se une el complejo enzimático de empaquetado del ADN. La cabeza inicial así formada suele sufrir un proceso proteolítico de maduración que dará lugar a la cabeza definitiva. Esta maduración puede ser previa o coincidir con el empaquetado del material genético que se lleva a cabo antes de unirse a las estructuras preformadas de la cola. El llenado de la cabeza suele hacerse a partir de largos concatémeros y termina bien con el reconocimiento de una secuencia concreta o bien cuando la cabeza está llena.

En los *Siphoviridae* la larga cola consiste en un tubo formado por muchas copias de la proteína principal de la cola. La longitud exacta de la cola está determinada por la proteína “cinta métrica” y la cola completada es estabilizada por una proteína “terminadora” que interacciona con la cabeza. En los *Podoviridae* el proceso se conoce peor pero parece que la placa base y la punta de la cola se unen directamente a la cabeza mientras que las demás proteínas que ayudan a la penetración son internalizadas junto al ADN. En los *Myoviridae*, los múltiples componentes de la cola contráctil se ensamblan ordenadamente comenzando por la formación de la placa base, seguida de la unión de las fibras de la cola, la polimerización del tubo, la constitución de la cubierta contráctil y, por último, el conector cabeza-cola (Kutter y Sulakvelidze 2004).

Lisis bacteriana: casi invariablemente, intervienen en este proceso una endolisina que degrada el peptidoglicano y una holina que permite a la endolisina alcanzar el espacio periplásmico. En la mayoría de los casos también participa, como

INTRODUCCIÓN

reguladora una antiholína. En los casos de fagos pequeños de ADN de cadena sencilla o ARN suelen ser unas proteínas de origen fágico las que modifican a las enzimas bacterianas para lograr la degradación del peptidoglicano (Young, Wang, y Roof 2000).

1.2.4 Genoma

Debido a su pequeño tamaño, los genomas de los bacteriófagos fueron los primeros en ser secuenciados completamente. El estudio de estos genomas ha tenido dos principales objetivos: por un lado, la utilización de los bacteriófagos y sus derivados como herramientas biotecnológicas; por el otro, conocer la adaptación de los fagos a su huésped y su evolución a nivel genómico. También se han descrito numerosos profagos en muchos de los genomas bacterianos secuenciados (Fouts 2006) aunque no se conoce cuántos de ellos mantienen el potencial de desarrollar una infección lítica. Se han desarrollado diversas herramientas informáticas para la detección de posibles profagos presentes en largas secuencias que reconocen grupos de genes relacionados con fagos y establecen la probabilidad de que se trate de un profago (Fouts 2006; Bose y Barber 2006; Lima-Mendez et al. 2008).

El rango de tamaños en el que se encuentran los genomas descritos es muy amplio abarcando desde poco más de 2000 a más de 300000 pb. También es muy amplia su diversidad en cuanto a las secuencias. Algunos fagos que comparten huésped, comparten también ciertas secuencias pero, por lo general, los fagos cuyos rangos de huésped no se solapan o que poseen diferentes tipos de viriones, no tienen secuencias en común (Hatfull 2008).

El análisis comparativo de los genomas fágicos conocidos permite establecer una serie de temas arquitectónicos comunes. Entre los fagos de la familia *Siphoviridae*, por ejemplo, existe una notable sintenia en los genes estructurales del virion y los del ensamblaje. En los genomas de mayor tamaño esta organización está menos conservada aunque todavía existe una considerable agrupación de genes estructurales del virión. Muchos contienen grupos centrales de genes interrumpidos por regiones hiperplásticas en las que se encuentran numerosas proteínas de función desconocida y algunas relacionadas con la adsorción o con la protección de la modificación del ADN por parte del huésped (Hatfull 2008).

INTRODUCCIÓN

La principal característica de los genomas fágicos es su organización en mosaico, de manera que cada genoma está constituido por una combinación de módulos intercambiables dentro de los de una misma población mediante recombinación (Hendrix *et al.* 1999).

1.2.5 Interacción entre fagos y huéspedes

Se estima que los bacteriófagos son las estructuras biológicas más abundantes sobre la Tierra (probablemente más de 10^{30} partículas fágicas) superando en 10 veces la concentración de sus huéspedes. Sin duda intervienen en la regulación de la población bacteriana de un determinado ecosistema pero semejante abundancia implica que incluso los fenómenos relativamente poco frecuentes como la transducción pueden tener una gran importancia a nivel global (Chibani-Chennoufi *et al.* 2004).

La mayor parte de los fagos muestran una gran especificidad a nivel de especie en cuanto al rango de posible huéspedes bacterianos. Experimentos *in vitro* indican que es necesaria una concentración mínima de huéspedes por debajo de la cual no existiría replicación del fago (Wiggins y Alexander 1985). Sin embargo, los datos *in vivo* para varios bacteriófagos parecen contradecir estos límites ya que se observa replicación con concentraciones mucho menores. Esto podría deberse a que algunos bacteriófagos poseen un rango considerablemente amplio de huéspedes posibles (Chibani-Chennoufi *et al.* 2004).

Algunas teorías predicen que la lisogenia es más frecuente en situaciones en las que hay escasez de huéspedes constituyendo así un mecanismo de defensa de los fagos que conseguirían perpetuarse de este modo. Si bien el beneficio podría ser recíproco para virus y bacteria ya que las bacterias lisogénicas suelen poseer ciertas ventajas adaptativas respecto a las no lisogénicas de su entorno.

Los fagos pueden aportar nuevas características (como por ejemplo factores de virulencia) a la bacteria a la que infectan, son una importante vía de transferencia genética horizontal que contribuye en gran medida a las diferencias entre cepas de una misma especie y alteran la arquitectura genómica sirviendo muchas veces de punto de anclaje para inversiones (Brüssow, Canchaya, y Hardt 2004).

INTRODUCCIÓN

En cuanto a la transferencia genética horizontal, ésta puede producirse mediante transducción o mediante conversión lisogénica. En la transducción parte del ADN bacteriano es empaquetado en el virión junto al del fago dando lugar a un bacteriófago funcional capaz de transportar genes bacterianos a las nuevas bacterias que infecte. Esta transducción puede ser especializada si los genes transmitidos son genes específicos (generalmente próximos al lugar de inserción del fago) o generalizada si el empaquetamiento de los fragmentos de ADN bacteriano se producen al azar. En la conversión lisogénica son los propios genes fágicos los que suponen una ventaja añadida para el huésped.

Los fagos atemperados pueden afectar a la capacidad de adaptación de las bacterias mediante cinco vías diferentes: como puntos de anclaje para recombinaciones bacterianas, anulando genes mediante disrupción, protegiendo a la bacteria de infecciones líticas, mediante lisis de cepas competidoras a través de la inducción y con la introducción de nuevos factores adaptativos (conversión lisogénica).

Por otro lado, desde el punto de vista evolutivo, los bacteriófagos parecen ser pasajeros transitorios en los genomas bacterianos ya que una vez incorporados al genoma sufren diversos tipos de alteraciones desde mutaciones puntuales a pérdidas masivas de ADN pasando por recombinaciones, intercambios modulares o inserciones de otros elementos móviles (Canchaya et al. 2003). Así, es frecuente encontrar tanto profagos no inducibles como remanentes de fagos en los genomas de muchas bacterias (Brüssow, Canchaya, y Hardt 2004). La frecuencia con la se encuentran genes de integrasas de tipo fágico en los cromosomas bacterianos podría indicar previas integraciones de profagos si bien en la mayoría de casos no se encuentran otros genes relacionados en las proximidades de estas integrasas (Canchaya *et al.* 2003). Del mismo modo, se cree que algunos genes transmitidos por fagos útiles para el huésped podrían acabar disociándose del resto de componentes del bacteriófago para pasar a formar parte del cromosoma bacteriano como en el caso de las islas de patogenicidad (Hacker y Kaper 2000).

Pero a pesar de la importante contribución de los fagos atemperados a la capacidad adaptativa de las bacterias, es posible que estos no sean siempre necesarios: algunas especies podrían haber eliminado los profagos de sus genomas o quizá los

INTRODUCCIÓN

nichos que ocupan no sean favorables para las infecciones fágicas. Existen varias especies cuyos genomas no parecen tener secuencias de profagos como *S. pneumoniae*, *M. leprae*, *Mycoplasma sp.* o, hasta hace poco, *H. pylori*. Sin embargo esto podría ser simplemente fruto del azar al escoger la cepa en cuestión para ser secuenciada. De hecho, se sabe por ejemplo que el 76% de los aislamientos clínicos de *S. pneumoniae* poseen fagos (Ramirez, Severina, y Tomasz 1999) y, como ya hemos mencionado, una de las últimas secuencias de *H. pylori* ha revelado la presencia de un profago (Lehours *et al.* 2011).

También existen ciertos mecanismos de defensa desarrollados por las bacterias frente a las infecciones por bacteriófagos (Hyman y Abedon 2010). En algunos casos estos sistemas han sido seleccionados gracias a la presión artificial ejercida por el hombre como en las bacterias implicadas en la industria láctea. Entre estos mecanismos podemos encontrar el bloqueo de la adsorción mediante la hiperproducción de la cápsula o la pérdida o alteración de los receptores. También es posible que se produzca la adsorción pero que la bacteria impida de algún modo que el bacteriófago tome posesión de su sistema metabólico como por ejemplo bloqueando la entrada del material genético del fago, mediante enzimas de restricción que degradan el ADN fágico, gracias a la inmunidad conferida por un profago ya presente en el cromosoma bacteriano o mediante la presencia de CRISPR (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Este último mecanismo todavía no se conoce completamente pero parece que algunas bacterias podrían incorporar a su genoma pequeñas secuencias de fagos con los que hayan tenido encuentros previos (“espaciadores”) separadas por repeticiones palindrómicas y que esto conferiría algún tipo de protección mediada probablemente por el bloqueo de la transcripción del ARN de origen fágico (Deveau, Garneau, y Moineau 2010). En otros casos se produce una infección abortiva que lleva a la muerte de la bacteria sin una replicación efectiva del bacteriófago limitando así su diseminación.

A su vez los bacteriófagos han desarrollado estrategias para evitar algunos de estos sistemas, especialmente la destrucción mediante los sistemas de modificación-restricción. Estos sistemas se basan en la modificación del ADN bacteriano de tal manera que no sea afectado por las enzimas de restricción que, de este modo, destruyen

INTRODUCCIÓN

el ADN extraño preservando el del huésped. Las estrategias de evasión desarrolladas por los fagos incluyen mutaciones puntuales que alteran la secuencia de reconocimiento utilizada por la enzima de restricción, la producción de moléculas capaces de bloquear a las enzimas de restricción o la utilización en su ADN de bases modificadas.

1.3 Bacteriófagos y *H. pylori*

Se conoce muy poco respecto a los bacteriófagos de *H. pylori* a pesar de que las primeras observaciones de partículas intracelulares similares a fagos en preparaciones de la bacteria se hicieron poco tiempo después de su descubrimiento (Marshall *et al.* 1987; Goodwin, Amstrong, y Peters 1989).

A principios de los años 90, Schmid, von Reckilghausen y Ansorg describieron una cepa lisogénica de *H. pylori* que producía partículas fágicas de manera espontánea (Schmid, Von Recklinghausen, y Ansorg 1990) y tres años después Heintschel von Heinegg, Nalik y Schmid reprodujeron el ciclo lítico con este mismo fago, describieron su morfología mediante microscopía electrónica e incluso aislaron su material genético: las cabezas maduras del fago medían aproximadamente 50 nm., las colas estriadas medían 170 nm. y su material genético era una molécula de ADN circular bicatenario de 22,000 pb (Heintschel von Heinegg, Nalik, y Schmid 1993).

En 2007, nuestro grupo comunicó en el *XXth International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation* la observación de partículas semejantes a bacteriófagos tras la inducción con mitomicina C (Aznar *et al.* 2007) y poco después, en 2008, se publicó la producción de partículas fágicas a partir de una cepa lisogénica de *H. pylori* tras la inducción con rayos ultravioletas (Vale *et al.* 2008). En 2011 se publicó el aislamiento de un fago lítico de *H. pylori* (Wan *et al.* 2011) y muy recientemente se ha publicado el descubrimiento de un profago inducible en el genoma secuenciado de una cepa de *H. pylori* (Lehours *et al.* 2011).

En cuanto a otras especies de *Helicobacter*, se han descrito dos profagos, uno en el genoma de una cepa de *H. acynonichis* (Eppinger *et al.* 2006) y otro en una cepa de *H. felis* (Arnold *et al.* 2011).

También cabe destacar otras publicaciones relacionadas de manera más indirecta como la descripción de una enzima lítica similar a la lisozima del bacteriófago T4

INTRODUCCIÓN

(Marsich *et al.* 2002) o el uso de un bacteriófago M13 recombinante que expresaba fragmentos de un anticuerpo capaz de unirse a *H. pylori* para inhibir el crecimiento de la bacteria (Cao *et al.* 2000).

Durante la redacción de esta memoria, Luo *et al* comunicaron el aislamiento de un nuevo bacteriófago de *H. pylori*. Además, comparando su secuencia encontraron otros profagos similares integrados en el genoma de diferentes cepas de *H. pylori* ya secuenciadas y llevaron a cabo, con éxito, experimentos de transducción (Luo *et al.* 2012). Por otro lado, se han publicado las secuencias de dos nuevos bacteriófagos obtenidas tras el aislamiento de las partículas víricas liberadas por dos cepas de *H. pylori* de manera espontánea (Uchiyama *et al.* 2012). Uno de ellos ha sido purificado y caracterizado; se trata de un virus esférico, con envuelta lipídica y que está presente en las bacterias a las que infecta como un episoma (no integrado en el ADN bacteriano). Se trata posiblemente de una nueva familia de bacteriófagos (Uchiyama *et al.* 2013).

2 OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.-Inducir cepas lisogénicas de *H. pylori* con mitomicina C para determinar la presencia de profagos y conocer el porcentaje de cepas lisogénicas.

2.-Aislar un bacteriófago de *H. pylori* tras inducción con mitomicina C con el fin de conocer su estructura y las características más relevantes de su genoma.

3.-Analizar la secuencia completa del genoma de una cepa lisogénica buscando genes relacionados con bacteriófagos.

4.-Detectar mediante PCR del gen de la integrasa del profago de *H. pylori* B45 y comparar con la existencia de lisogenia tras la inducción con mitomicina C.

5.-Estudiar la posible relación entre lisogenia, factores de virulencia conocidos, resistencias a antibióticos y manifestaciones clínicas de la infección.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y muestras clínicas

Los pacientes fueron tanto adultos como niños con sintomatología digestiva alta atendidos en los hospitales universitarios de La Princesa, El Niño Jesús y Doce de Octubre de Madrid y Severo Ochoa de Leganés entre 2008 y 2010. En todos ellos se consideró indicada la realización de una endoscopia. En función de los hallazgos endoscópicos e histológicos se agrupó a los pacientes en aquellos que presentaban infección grave (gastritis atrófica, linfoma tipo MALT, cáncer de estómago), moderada (úlceras gástricas, bulboadenitis erosiva, lesión aftosa prepilórica) o leve (gastritis crónica superficial, observación endoscópica de nodularidad antral o endoscopia sin hallazgos).

Las muestras fueron obtenidas mediante endoscopia digestiva alta y biopsia de la mucosa del antro gástrico y fueron enviadas al laboratorio del Hospital de La Princesa en un recipiente estéril con un mililitro de suero salino. En aquellos casos en los que el procesamiento de la muestra iba a retrasarse más de 3 h, las muestras se congelaron a -80°C .

3.2 Cepas

En los distintos experimentos se utilizaron 76 aislamientos de *H. pylori* que fueron obtenidos a partir de muestras clínicas (biopsias gástricas) y congeladas a -70°C en medio con glicerol siguiendo la metodología microbiológica habitual.

Posteriormente fueron subcultivadas en placas de agar Columbia con sangre de cordero (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) e incubadas a 37°C en una atmósfera con 5 a 10% de CO_2 durante 5- 7 días.

La cepa TIGR 26695, cuyo genoma ha sido completamente secuenciado sin que se haya descrito la presencia de profagos en el mismo, fue utilizada como control.

3.3 Aislamiento e identificación

Los aislamientos se obtuvieron mediante cultivo en agar-sangre (Columbia Agar con 5% de sangre de oveja; BioMérieux) y Agar *Pylori* (*Pylori* Agar; BioMérieux).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ambos tipos de placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) durante 15 días a lo largo de los cuales fueron revisadas periódicamente para detectar la presencia de colonias pequeñas y translúcidas compatibles con el aspecto y morfología de *H. pylori*.

La identificación de las cepas como *H. pylori* se hizo sobre la base de la tinción de Gram y las pruebas de la ureasa, la catalasa y la oxidasa.

3.4 Sensibilidad a los antimicrobianos mediante E-test

A partir de cultivos de 48 h de *H. pylori* se prepararon suspensiones en suero salino con una turbidez de 3 unidades McFarland. Las suspensiones se extendieron en placas de agar Mueller Hinton sangre (BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, E.E.U.U.) con hisopos de algodón estériles. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante la prueba de epsilómetro (E-test; BioMérieux). Sobre las placas se colocaron tiras con amoxicilina, claritromicina, metronidazol, tetraciclina, ciprofloxacino y rifampicina y se incubaron 72 h en condiciones microaerofílicas. Se consideró que la CMI era la concentración más baja a la que se inhibía el crecimiento visible de la cepa leída como el punto de intersección entre la zona elíptica de inhibición y la graduación marcada en la tira de E-test.

Los puntos de corte utilizados fueron los recomendados por el Comité europeo para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos (EUCAST):

- Tetraciclina, 1 µg/ml
- Rifampicina, 1 µg/ml
- Ciprofloxacino, 1 µg/ml
- Amoxicilina, 0,12 µg/ml
- Metronidazol, 8 µg/ml
- Claritromicina, 0,25 µg/ml (las cepas entre 0,25 µg/ml y 0,5 µg/ml se consideraron intermedias y las de >0,5 µg/ml, resistentes).

3.5 Detección de factores de virulencia

MATERIAL Y MÉTODOS

Mediante PCR se estudió la presencia en las cepas del gen que codifica el factor de virulencia CagA (*cagA*) y se determinó la variante (*s1* o *s2* y *m1* o *m2*) del gen *vacA* (correspondiente al factor de virulencia VacA).

La detección del gen *cagA* se realizó del siguiente modo:

Los cebadores utilizados en la PCR fueron:

Forward-5' ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A 3'

Reverse-5' TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATC ACG CCA T 3'

Los dos tenían una temperatura de fusión (T_m) de 63 °C.

Para la *mastermix* se utilizó el preparado comercial *illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare companies) que contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 unidades de pureTaq polimerasa y tampón de reacción que deben reconstituirse para conseguir un volumen final de 25 μ l. A éste se añadieron 1 μ l del ADN, 0,375 μ l de cada uno de los cebadores (0,3 μ M) y 23,25 μ l de agua destilada.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador PCR Express GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) y las condiciones para los ciclos de la PCR se resumen en la tabla 3.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2	1
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	60	1	38
Extensión	72	1	
Extensión final	72	5	1
Temperatura final de mantenimiento: 4°C			

Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR para la detección de *cagA*

El fragmento ampliado, de 297 pb, se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

En el caso del gen *vacA*, la detección se hizo tal y como se expone a continuación:

Se utilizó una pareja de cebadores para detectar *vacA* s:

MATERIAL Y MÉTODOS

vacA s Forward-5' ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC 3' (Tm 54)

vacA s Reverse-5' CCT GAG ACC GTT CCT ACA GC 3' (Tm 63°C)

Y otra pareja para amplificar *vacA m*:

vacA m Forward-5' CAATCTGTCCAATCAAGCGAG 3' (Tm 55°C)

vacA m Reverse-5' TGAGGTTGTTTGATATTGAC 3' (Tm 64°C)

Para preparar la *mastermix* se utilizó de nuevo el preparado comercial *illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare companies) al que se añadieron en este caso 1 ml del ADN, 0,625 ml de cada uno de los dos cebadores (0,5 mM) y 22,75 ml de agua destilada.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador PCR Express GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) con los siguientes tiempos y temperaturas para cada ciclo:

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	45 segundos	
Hibridación	52	45 segundos	30
Extensión	72	45 segundos	
Extensión final	72	7 min	1
Temperatura final de mantenimiento 4 °C.			

Tabla 4. Condiciones de la reacción de PCR para la detección de *vacA*

Los fragmentos resultantes de la amplificación (de 176 pb para *vacA s1*, 200 pb para *vacA s2*, 290 pb para *vacA m1* y 350 pb para *vacA m2*) fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

3.6 Difusión con discos de 100 ng de mitomicina C

Como una primera aproximación, se dispensaron 10 µl de una dilución de 10 mg/ml de mitomicina C (Roche) (100 ng) en discos de papel de filtro que se colocaron sobre placas recién cultivadas con un inóculo de 2 unidades Mc Farland de 24 cepas de *H. pylori*.

3.7 Preparación de placas de agar-sangre con con mitomicina C

MATERIAL Y MÉTODOS

Se prepararon placas de 20 ml de agar Columbia (Oxoid) con sangre de carnero(8%) (Pronadisa), vancomicina (10 mg/l), anfotericina B (5 mg/l) y concentraciones de mitomicina C de: 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml. El medio fue esterilizado en autoclave previamente a la adición de la sangre, los antibióticos y la mitomicina C (Roche).

Las placas fueron sembradas con 1-2 μ l de un inóculo de 10^6 ufc/ml de 77 cepas (incluyendo TIGR 26695) con hisopos de algodón estériles mediante el método de estría en placa para obtener distintas densidades de cultivo que facilitaran la observación de las placas de inhibición del crecimiento.

3.8 Cultivo en medio líquido

El cultivo en medio líquido se realizó mediante dos procedimientos:

Por un lado se preparó medio infusión de cerebro y corazón (BHI, BBL, Becton Dickinson, BD) y se suplementó con un 10% de SFB (Lonza) y 5% de extracto de levadura (Sigma).

Por otro, se probaron diversos medios comerciales: *Bactec Ped Plus*, *Bactec Standard Aerobic* y *Bactec Standard Anaerobic* (Becton Dickinson, BD) con y sin SFB (10%).

Para lograr grandes cantidades de cultivo en medio líquido se utilizó el medio Bactec Ped Plus suplementado con SFB (10%), vancomicina (10 mg/l) y anfotericina B (5 mg/l).

3.9 Inducción mediante mitomicina C en medio líquido

A los medios mencionados previamente se les añadió desde el momento de su inoculación, mitomicina C a la concentración de 5 ng/ml.

3.10 Spot test

A partir de placas de agar-sangre con mitomicina C en las que se observaban placas de inhibición se obtuvieron extractos añadiendo 3 ml de BHI y mezclando las colonias de la placa con varilla. A continuación, se recogieron con jeringa los 3 ml de medio BHI. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm, 10 min (4°C) para separar los

MATERIAL Y MÉTODOS

desechos celulares y el sobrenadante fue filtrado utilizando jeringas y filtros con un tamaño de poro de 45 μm .

Partiendo de cultivos densamente crecidos de *H. pylori* se tomaron con una torunda las colonias correspondientes a 1 cm^2 y se hizo subcultivo en placas de agar-sangre reaislando en 3 cuadrantes para obtener concentraciones sucesivamente menores de colonias. En cada uno de los tres cuadrantes se depositó una gota (10 μl) de extracto obtenido a partir de cepas lisogénicas tras inducción.

3.11 Precipitación de partículas fágicas

Tras lograr el crecimiento de *H. pylori* en grandes cantidades de medio líquido y en presencia de mitomicina C, se añadió NaCl a una concentración final de 0,5 M (1 h a 4°C) y se centrifugó diez min a 1.500 rpm para eliminar los restos celulares.

Se recuperó el sobrenadante, se añadió polietilenglicol (PEG) 6000 (Fluka) al 10% mezclando continuamente y se dejó reposar 24 h a 4 °C para lograr que precipitaran las partículas fágicas presentes en el medio.

A continuación se centrifugó (10000 \times g, 15 min) y se resuspendió el precipitado en un volumen del 2% de TBT (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5-8; 0.1 M NaCl; 10 mM MgCl₂).

3.12 Purificación en gradiente de CsCl

Con ayuda de un refractómetro se prepararon tres soluciones de CsCl con densidades de 1,5, 1,7 y 1,3 g/cm^3 . Se crearon gradientes en tubos de propileno (SW 28) añadiendo 10 ml de la solución menos densa seguidos de otros 10 ml de la solución intermedia y, finalmente, 3ml de la más densa. Sobre este gradiente se depositó la muestra y se centrifugó a 100000 \times g, 150 min (rotor SW55) a 18°C.

La región entorno a 1,5 g/ml fue aspirada con jeringa y se volvió a centrifugar a 100000 \times g, 12 h y 18°C. De nuevo se volvió a aspirar la misma región y se dializó en exhaustivamente contra TBT a 4°C.

3.13 Observación de posibles partículas fágicas al microscopio electrónico

MATERIAL Y MÉTODOS

Las posibles partículas fágicas precipitadas con PEG a partir de cultivo en medio líquido BHI suplementado fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo al 1% en rejillas de cobre reforzadas con carbón y cubiertas de Formvar (300 mesh).

Las partículas fágicas precipitadas con PEG a partir de cultivo en medio Bactec fueron teñidas negativamente con la tinción basada en vanadio Nanovan © (Nanoprobes) al 2% en rejillas de cobre reforzadas con carbón y cubiertas de Formvar (300 mesh).

Se tomaron micrografías en un microscopio de electrónico de transmisión LEO 910 funcionando a 80 kV.

3.14 Extracción de ADN fágico

Tras precipitar en PEG y resuspender en TBT se trató con DNasa y RNasa (a concentración final de 10 µg/ml) 90 min a 37 °C. A continuación, se añadió EDTA (50 mM) y SDS (0,5%).

Posteriormente se trató con proteinasa K (100 µg/ml) durante 90 min a 50 °C.

Se añadió fenol/cloroformo-isoamílico (24:1) en proporción 1:1. Se mezcló vigorosamente y se centrifugó (20 min a 12000 rpm), (centrífuga Sorvall RC-5B; rotor SS34), se recuperó la fase acuosa y se trató del mismo modo con cloroformo-isoamílico (24:1).

Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con dos partes de etanol absoluto a -20°C.

Tras pasar 12 h a esta temperatura, se centrifugó de nuevo (10000 × g, 10 min) y se desechó el sobrenadante. El ADN así extraído se lavó con etanol al 70% y tras dejar secar los tubos al vacío, el precipitado se resuspendió en 200 µl de TE (10 mM Tris a pH 8 y 1 mM EDTA).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para corroborar la presencia de ADN y conseguir una estimación de su tamaño se realizó electroforesis en gel de agarosa al 7% junto al marcador de peso molecular λ /HindIII.

3.15 Digestión de ADN fágico

El ADN fágico fue sometido en primer lugar a digestión con DNasa I para comprobar si se trataba de ADN bicatenario. Para ello se incubó 1 ml del ADN con 1 ml de DNasa y 5 a 10 nM de MgCl₂, durante 12 h.

También se probó la digestión con enzimas de restricción para lo cual se incubó 1 μ l de ADN con 1 μ l de enzima, 3 μ l del tampón recomendado por la casa comercial para cada una de las enzimas y 5 μ l de agua destilada estéril durante 2 h a la temperatura óptima para cada una de las enzimas. Se repitió también el experimento prolongando el tiempo de incubación a 24 h.

Las enzimas utilizadas fueron: EcoRI, HindIII, Sau3AI y ScaI, AccI, ClaI, HincII y SspI de laboratorios Takara; BfaI, DdeI, HaeIII, HinPI y MspI de laboratorios New England Biolabs; AluI, AsnI, DraI y TaqI de Boehringer-Ingelheim y Hae II de Amersham.

Con HindIII se intentó además digerir una mayor cantidad de ADN para lo cual se incubaron 15 μ l del ADN con 5 μ l de enzima, 5 μ l de tampón y 25 μ l de agua destilada estéril durante 24 h a 37 °C. Toda la mezcla se sometió a continuación a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %.

3.16 Clonación del ADN fágico en *E. coli*

La extracción del ADN a partir de un gel de agarosa utilizado previamente para la electroforesis se hizo utilizando el sistema comercial *GENECLEAN* © *Turbo kit* (Qbiogene), siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se resume a continuación:

Por cada 100 mg de gel de agarosa se añadió un volumen de 100 μ l de la solución *GENECLEAN Turbo Salt Solution*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incubó a 55°C en un baño maría durante 5 min hasta observar la disolución de la agarosa (agitando cada minuto durante la incubación).

La mezcla se transfirió a un tubo *GENECLEAN Turbo Cartridge* unido a un tubo de 2 ml y se centrifugó a 14000 × g durante 5 segundos.

Se agregó 500 µl de la solución *GENECLEAN Turbo Wash* y se centrifugó a 14000 × g durante 5 segundos; este paso se repitió dos veces más.

Después se centrifugó a 14000 × g durante 4 min y se agregó 30 µl de la solución *GENECLEAN Turbo Elution Solution* y se centrifugó a 14 000 × g durante 1 min y se recuperó la solución eluída que contenía el ADN.

Para los experimentos de ligación, se utilizó como vector el plásmido pUC19 digerido con *SmaI* y fosforilado.

Se preparó la reacción añadiendo los 30 µl del ADN purificado a partir del gel de agarosa, 1 µl de ligasa, 1 µl de tampón y 8 de agua destilada estéril.

La mezcla se incubó a 16 °C durante 12 h.

Tras la ligación del plásmido pUC 19 con los posibles fragmentos de ADN fágico se acometió la transformación de la cepa competente de *E. coli* DH10B.

400 ml de la cepa se incubaron en hielo junto a los 30 µl de ADN plasmídico durante 30 min.

Se llevó a cabo un choque térmico calentando 1.5 min a 42 °C .

Se añadieron 1,6 ml de LB (extracto de levadura 5 mg/l, triptona 10 mg/l y Na Cl 5 mg/l) y se dejó 45 min a 37 °C con agitación fuerte.

Se prepararon placas de LB con agar (1,6 %), ampicilina (100 µg/ml), IPTG (500mM) y X-Gal (40 µg/ml).

Varias de estas placas se sembraron con 200 µl cada una de la reacción de ligación y se incubaron 12 h a 37°C.

Para la purificación del ADN plasmídico de *E. coli* se utilizó el sistema comercial *High Pure Plasmid isolation Kit* (Roche).

Cada una de las cepas sospechosas de haber incorporado el plásmido con injerto se sembró en 8 ml de LB e incubadas 24 h a 37°C y a partir de estos cultivos se siguieron las instrucciones del fabricante siguiendo los siguientes pasos:

MATERIAL Y MÉTODOS

Se concentraron las células por centrifugación (cada 4 ml de cultivo se centrifugaron 30 segundos a 9000 r.p.m).

Se resuspendió el pellet en 250 μ l de tampón de suspensión con RNasa y se añadieron 250 μ l de tampón de lisis.

Tras mezclar suavemente se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente.

Se añadieron 350 μ l de tampón de unión muy frío y de nuevo se dejó reposar (esta vez a 0°C) durante 5 min.

Se centrifugó a 14000 \times g durante 10 min.

El sobrenadante se transfirió a un tubo con filtro *High Pure* y se centrifugó a 14000 \times g 1 min desechando el caudal sobrante.

Se pasaron por el tubo 500 ml de tampón de lavado I (13000 \times g, 1 min) y a continuación 700 ml de tampón de lavado II (13000 \times g, 1 min, dos veces).

Finalmente, se añadieron 100 ml de solución de elución, se centrifugó a 13000 \times g, 1 min y se recogió la solución eluída que contenía el ADN.

5 μ l correspondientes a cada una de las cepas sospechosas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para comprobar el tamaño de los plásmidos.

3.17 Extracción de ADN de la cepa HP146128 para secuenciación

Se resuspendieron las colonias de una placa de Petri de cultivo de *H. pylori*, tras 48 h de incubación en 200 μ l de solución tampón con pH 8.

Se añadieron 20 μ l de dodecil sulfato sódico (SDS) al 20% agitando suavemente, tras lo cual se calentó durante 5 min a 65°C.

Se añadieron 500 μ l de fenol/cloroformo-isoamílico (24:1), agitando fuertemente y se centrifugó a 12000 rpm, 15 min.

Se recuperó la fase acuosa y se añadieron 500 μ l de cloroformo-isoamílico (24:1). De nuevo, se agitó fuertemente y se centrifugó 15 min a 12000 rpm.

Se recuperó la fase acuosa, se añadieron 700 μ l de etanol frío al 95% (a -20°C) y se mezcló suavemente hasta que precipitó el ADN .

Se dejó reposar a -20°C durante 30 min.

MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se centrifugó 5 min a 13000 rpm y se desechó el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol al 70% mezclando suavemente y se centrifugó otros 5 min a 13000 rpm.

Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar 15 min.

Finalmente se resuspendió el ADN en 50 µl de agua estéril y se conservó a -20 °C .

3.18 Secuenciación del genoma completo de la cepa HP146128

La secuenciación se obtuvo comercialmente a través de la empresa *Lifesequencing* S. L. que utiliza la tecnología 454 de pirosecuenciación en el sistema GS FLX de Roche.

Para ello se envió una muestra del ADN extraído de la cepa HP146128 que reunía los requisitos exigidos para la secuenciación de genomas completos (ratio A260/A280 \geq 1,8; concentración \geq 300 ng/µl y cantidad total $>$ 5 µg).

3.19 Análisis del genoma de HP146128

3.19.1 Ordenación de los *contigs* obtenidos por secuenciación

Para ordenar los distintos *contigs* obtenidos por secuenciación se alinearon todos ellos con la secuencia ya publicada de la cepa de *H. pylori* J99 utilizando el programa *Genome Workbench* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) que puede obtenerse desde la página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/gbench/>.

Este programa es una herramienta que permite visualizar y analizar tanto datos privados como los datos publicados en las bases de datos de NCBI.

El genoma de la cepa J99 se enfrentó a los *contigs* de HP146128 utilizando la herramienta *Genomic Aligner*.

3.19.2 Predicción de genes y traducción a proteínas

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó la aplicación *GeneMark* (desarrollada por el *Georgia Institute of Technology*) capaz de determinar el potencial de codificación de proteínas de una secuencia sobre la base de los parámetros específicos de especie de los modelos de Markov de regiones codificantes y no codificantes (Lukashin y Borodovsky 1998). *GeneMark* está disponible para su uso en línea en la dirección: <http://exon.gatech.edu>.

3.19.3 Identificación de proteínas relacionadas con fagos

Las proteínas obtenidas mediante *GeneMark* fueron comparadas con la base de datos *Pfam*. Esta base de datos contiene más de 13000 familias de proteínas y está disponible a través de la dirección: <http://pfam.sanger.ac.uk/> (Punta *et al.* 2011). Se identificaron todas aquellas posibles correspondencias con proteínas característicamente fágicas.

3.19.4 Detección de secuencias compatibles con profagos

La secuencia completa y ordenada del genoma de HP146128, se analizó mediante la aplicación *Prophage Finder*, disponible en la dirección: <http://bioinformatics.uwp.edu/~phage/ProphageFinder.php>.

Prophage Finder es una herramienta gratuita en línea que posibilita la predicción de *loci* de profagos en secuencias de entre 5 kb y 10 Mb en formato FASTA. Esta herramienta utiliza BLASTX (NCBI) con un valor umbral definido por el usuario (valor *E*) para identificar secuencias coincidentes con una base de datos de secuencias de aminoácidos de todos los genomas de fagos disponibles en la dirección: www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/phg.html. A continuación analiza los resultados en busca de agrupaciones de estas coincidencias que se encuentren a una distancia máxima determinada por el usuario (desde 3,5 a 6 kb) y con un número mínimo de coincidencias determinadas también por el usuario (entre 5 y 10).

Como resultados se obtienen las coincidencias del BLASTX (*BlastOut*), las secuencias de ADN de los posibles profagos identificados (*ProphageFinderDNASeqs*), las secuencias de los genes de estos posibles profagos (*ProphageFinderGeneSeqs*) y su traducción a proteínas (*ProphageFinderProtSeqs*) así como un resumen breve con diferentes coincidencias agrupadas y su correlación (*ProphageFinderSummary*) y un

MATERIAL Y MÉTODOS

resumen completo con todos los demás resultados e información adicional como el contenido en GC o el uso de codones de las secuencias detectadas en comparación con la secuencia completa analizada (*ProphageFinderCompleteSummary*) (Bose y Barber 2006).

Además se comprobó si los genes detectados por Prophage Finder se encontraban presentes en el genoma de la cepa J99, completamente secuenciada y en la que no se ha descrito la presencia de fagos. Para ello se utilizó de nuevo la herramienta *Genomic Aligner* del programa *Genome Workbench*.

Por último, se analizaron las secuencias próximas a los posibles fagos (10 kpb en posiciones 3' y 5' o más si se encontraba próxima alguna de las proteínas característicamente fágicas según el análisis con *Pfam*). Para ello se hizo una búsqueda mediante la herramienta BLASTP (NCBI) de las proteínas en cuestión en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI limitando la búsqueda a aquellas entradas en las que apareciera la palabra “*phage*”.

3.19.5 Detección de secuencias compatibles con CRISPR

La secuencia completa del genoma de HP146128 fue analizada con *CRISPR Finder*. *CRISPR Finder* es una aplicación en línea y gratuita diseñada para identificar secuencias tipo CRISPR, incluyendo las más cortas. Permite la detección precisa de las secuencias repetidas así como de las secuencias próximas a éstas y de los espaciadores.

Como resultados, *CRISPR Finder* ofrece además de la localización de los posibles CRISPR, las secuencias de las repeticiones y los espaciadores, una comparación mediante BLAST de las secuencias espaciadoras con la base de datos de *GenBank* y la comprobación de si las repeticiones se encuentran presentes también en otros CRISPR conocidos de genomas ya secuenciados.

El servicio se encuentra disponible a través de la dirección: <http://crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php>

3.20 Extracción de ADN de cepas de *H. pylori* para PCR

Para la extracción del ADN de las distintas cepas de *H. pylori* que serían sometidas a PCR se utilizó el sistema automatizado NucliSENS® EasyMAG™ de BioMérieux.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este sistema se basa en la denominada tecnología BOOM® en la que la separación del ADN es posible gracias a la adición de moléculas de sílice a las que se unirá el ácido nucleico una vez lisadas las células (el sistema incluye un primer paso de lisis celular previo a la separación del ADN).

El procedimiento consiste en los siguientes pasos:

Se transfieren 400 µl de muestra a la cubeta del NucliSENS® EasyMAG™.

Se prepara la mezcla de sílice-calibrador (550 µl de tampón + 550 µl de sílice).

Se añade la mezcla de sílice-calibrador a la cubeta donde está la muestra.

Comienza la extracción automática del ADN: unión del sílice al ADN, eliminación de los restos celulares y separación del sílice y el ADN que queda eluído en un volumen final de 25 µl.

El eluído se transfirió a un tubo de microcentrifugapara conservarlo a -20°C o para realizar las técnicas de PCR a continuación.

3.21 PCR del gen de la integrasa del profago de *H. pylori* B45

Para esta PCR se diseñaron dos cebadores a partir de la secuencia publicada del gen de la integrasa del profago (C21B450018).

Los cebadores se obtuvieron comercialmente de Grupo Taper y sus secuencias fueron las siguientes:

Forward-5'AAGYTTTTTGTAGMGTTTTGYG3'-

Reverse-5'CGCCCTGGCTTAGCATC3'-

Sus respectivas T_m son 51 °C y 57 °C.

Para preparar la *Master mix* Se utilizó el kit comercial *illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare companies). Dicho kit contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 unidades de *pureTaq* polimerasa y tampón de reacción que deben reconstituirse para conseguir un volumen final de 25 µl.

Para ello se añadió a la reacción 1µl del ADN, 0,375 ml de cada uno de los cebadores (0,3 mM) y 23,25 ml de agua destilada.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador PCR Express GeneAmp PCR

MATERIAL Y MÉTODOS

System 2400 (Perkin Elmer) y las condiciones para la reacción de PCR en el termociclador fueron las descritas en la tabla 5.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	95	45 s	
Hibridación	52	45 s	35
Extensión	72	45 s	
Extensión final	72	5 min	1
Temperatura final de mantenimiento 4 °C.			

Tabla 5. Condiciones de la reacción de PCR para la detección de la integrasa del profago de *H. pylori* B45

3.22 Análisis estadístico

Para comparar la PCR del gen de la integrasa del fago de *H. pylori* B45 con la inducción mediante mitomicina C para detectar cepas portadoras de profagos se utilizó el índice Kappa.

Para analizar la relación entre los resultados de la inducción por un lado y la sensibilidad a cada uno de los antibióticos, la presencia de alguno de los factores de virulencia o la gravedad del cuadro por otro, se hicieron tablas de 2×2 y se calculó el valor de P mediante la prueba exacta de Fisher.

Todos los cálculos se realizaron a través de la aplicación en línea gratuita *GraphPad* (www.graphpad.com).

4 RESULTADOS

RESULTADOS

4.1 Sensibilidad de las cepas a los antimicrobianos

El número de cepas consideradas sensibles, resistentes e intermedias para los antimicrobianos utilizados de manera más habitual estimado mediante *E-test* se refleja en la tabla 6.

Antibiótico	Sensibles	Intermedias	Resistentes (%)
Amoxicilina	74	-	2 (2,6%)
Clarithromicina	42	0	34 (44,7%)
Tetraciclina	76	-	0
Metronidazol	55	-	21 (27,6%)
Levofloxacino	73	-	2 (2,7%)
Rifampicina	70	-	6 (7,9%)

Tabla 6. Número de cepas sensibles, intermedias o resistentes para cada antibiótico

4.2 Detección de factores de virulencia

Mediante PCR se determinó las variantes de *m* y *s* del gen *vacA* y la presencia o ausencia de *cagA*. Los resultados para las cepas en las que se llevó a cabo la PCR se resumen en la tabla 7.

RESULTADOS

CEPA	<i>vacA m</i>	<i>vacA s</i>	<i>cag A</i>
146128		s2	Negativo
184184	m 2	s 2	Negativo
185922	m 2	s 2	Negativo
186589	m 1	s 1	Positivo
186695	m 2	s 1	Positivo
186788	m 2	s 2	Negativo
186985		s2	Negativo
187510	m 1	s 1	Positivo
190657	m 2	s 1	Positivo
190804	m 2	s 1	Positivo
191033	m 1	s 1	Positivo
191830	m 2	s 1	Positivo
200836	m 2	s 2	Negativo
200837	m 2	s 2	Negativo
3066797		s2	Negativo
3066798		s2	Negativo
3067479		s2	Negativo
3069577		s2	Negativo
3069578		s2	Negativo
3069579		s2	Negativo
3070564		s1	Positivo
3073879		s2	Negativo
3073884		s2	Negativo
3074082		s1	Positivo
3074297		s2	Negativo
165034-50	m 2	s 2	Negativo
180901-44	m 2	s 2	Negativo
182167-26	m 1	s 1	Positivo
182764-51	m 2	s 2	Negativo
185662-18		s1	Positivo
186695-22	m 2	s 1	Positivo
186867-38	m 2	s 2	Negativo

Tabla 7. Detección de factores de virulencia mediante PCR

RESULTADOS

4.3 Inducción de cepas lisogénicas de *H. pylori* con mitomicina C

4.3.1 Determinación de la concentración óptima de mitomicina C

Utilizando el método de difusión en disco, se comprobó que concentraciones relativamente bajas de mitomicina C (discos con 100 ng en placas de 20 ml de agar-sangre) eran tóxicas para *H. pylori* ya que se observó que la cepa TIGR 26695, considerada el control negativo, mostraba inhibición del crecimiento. Se seleccionó también la cepa HP146128 como una de las cepas más sensibles (con mayor halo de inhibición) para determinar la concentración óptima para los experimentos de inducción.

Utilizando placas de agar-sangre con concentraciones de 0,5, 1, 5, 10 y 20 ng/ml de mitomicina C se comprobó que TIGR 26695 mostraba inhibición de crecimiento en las placas con 20 ng/ml mientras que la cepa HP-46128 era incapaz de crecer en placas con 10ng/ml por lo que se decidió utilizar la concentración de 5 ng/ml para los experimentos de inducción.

4.3.2 Inducción en placas de agar-sangre con mitomicina C

La inducción mediante el cultivo en placas de agar-sangre con 5 ng/ml de mitomicina C, reveló la aparición de placas de inhibición del crecimiento en 27 de 76 cepas (35,5%). En la figura 3 pueden verse algunas de estas placas (destacadas por las flechas) observadas en una de las cepas.

RESULTADOS

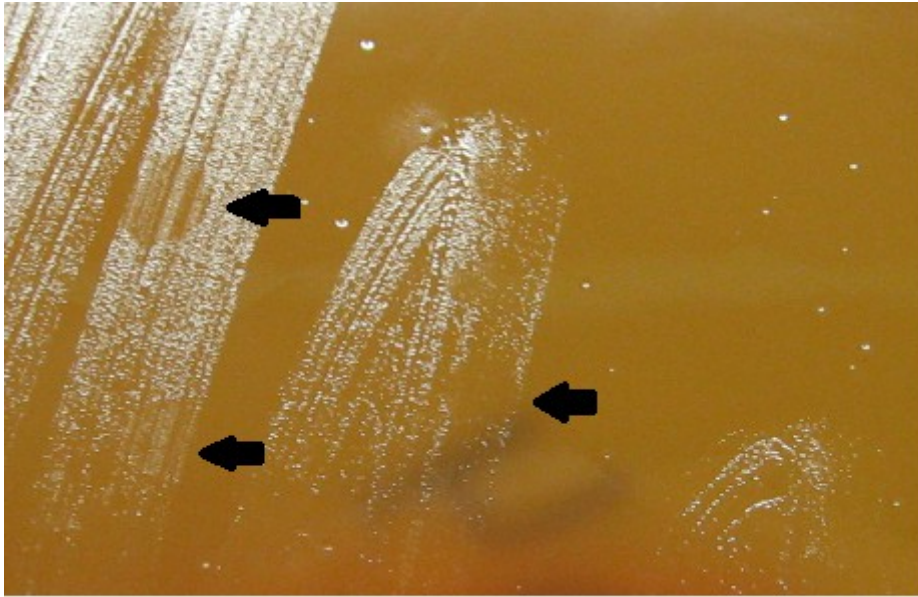


Figura 3. Placas de inhibición de crecimiento en agar-sangre con mitomicina C

4.3.3 Inducción en medio líquido con mitomicina C

HP146128 y 190804, dos de las cepas que mostraron inducción en placas de agar-sangre fueron sometidas a inducción con 5ng/ml de mitomicina en 100 μ l de medio líquido (BHI suplementado con SFB) en placas de *microtiter*. La densidad óptica a 600 λ fue medida cada hora y se utilizó un inóculo de la misma cepa sin mitomicina C como control negativo.

En ambos casos se comprobó una disminución de la densidad óptica en los pocillos que contenían mitomicina C tal y como se aprecia en la figura 4:

RESULTADOS

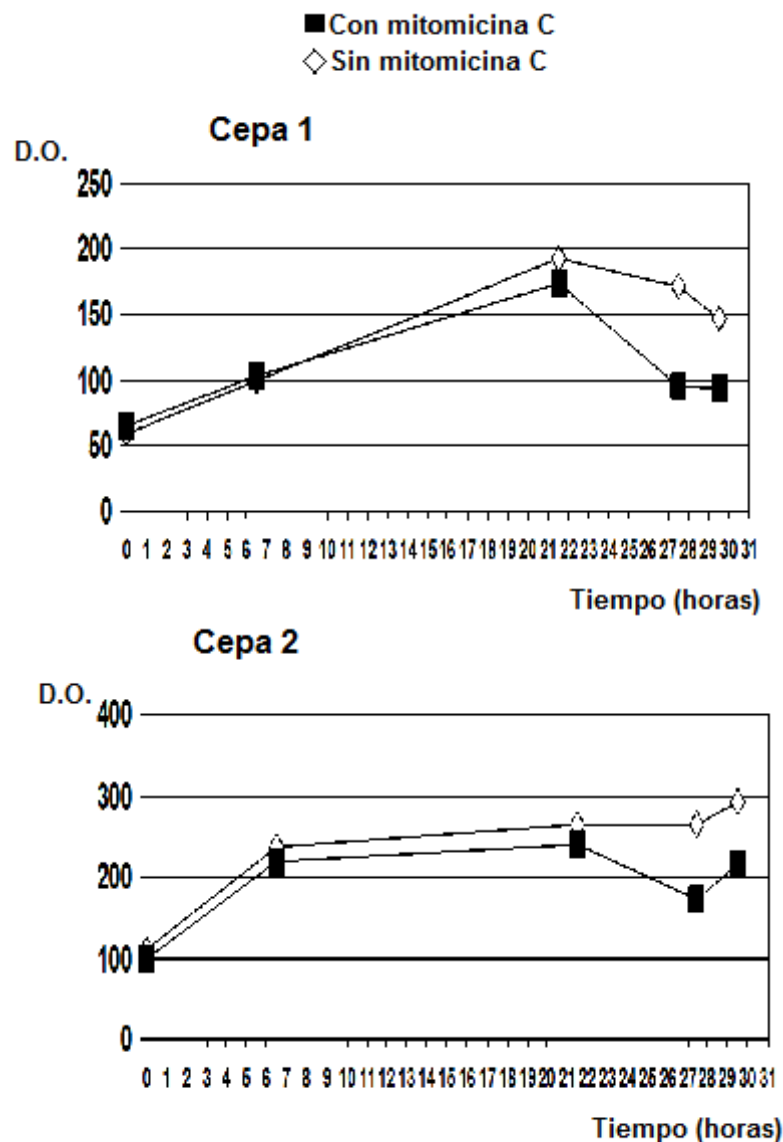


Figura 4. Curvas de crecimiento de dos cepas de *H. pylori* con y sin mitomicina C (densidad óptica medida a 600 nm). Cepa 1, HP146128; Cepa 2, 190804.

4.3.4 *Spot test* con extractos de cepas lisogénicas

Con el fin de comprobar que las placas de inhibición de crecimiento se debían a la acción de fagos, se probó un extracto de seis de las cepas que parecían mostrar lisogenia sobre cultivos de las mismas y de otras 11 cepas que no mostraban placas de inhibición. El extracto fue centrifugado y filtrado. Los resultados de este experimento se

RESULTADOS

recogen en la tabla 8. La inhibición de crecimiento en alguna cepas fue evidente y puede observarse en la figura 5.



Figura 5. Inhibición del crecimiento observada en *spot test* con extracto de cepas lisogénicas.

CEPA	EXTRACTO (CEPA DE ORIGEN)					
	1(146128)	2(200837)	3(200836)	4(191033)	5(190804)	6(186589)
185922	+	-	-	-	+	-
187309	+	-	-	+	-	-
187510	+	-	-	+	-	-
190804	+	-	-	+	-	-
186788	+	-	-	+	-	-
200836	+	-	-	+	-	-
200356	+	-	-	-	-	+
190657	+	-	-	+	-	-
200837	+	-	-	+	-	+
186985	+	-	-	+	+	-
191830	+	-	-	+	+	-
146128	-	-	-	+	-	+
191033	-	-	+	-	-	-
186589	+	-	-	+	+	-
184184	+	+	-	-	-	-
186695	-	-	-	-	-	-
200810	+	-	-	-	+	-
TIGR26695	+	-	-	+	-	-

RESULTADOS

Tabla 8. Inhibición del crecimiento lograda por los extractos de cepas lisogénicas en cultivos de cepas lisogénicas y no lisogénicas (+, inhibición del crecimiento observada; -, no se aprecia inhibición del crecimiento)

4.4 Aislamiento de un bacteriófago de *H. pylori* tras la inducción con mitomicina C.

4.4.1 Puesta a punto de un sistema para obtener grandes cantidades de cultivo en medio líquido de *H. pylori*

Se cultivó la cepa HP146128 en 10 ml de BHI suplementado con SFB y extracto de levadura y se hicieron sucesivos subcultivos a cantidades mayores de medio para tratar de alcanzar una cantidad cercana a los dos litros. A intervalos regulares se tomaban alícuotas de 100 µl para medir la DO a 600 nm y para comprobar la viabilidad de la cepa mediante observación de preparación en fresco y tinción de Gram. Los tiempos de incubación fueron de 48 a 72 h. Sin embargo, siguiendo este procedimiento, se produjeron frecuentes contaminaciones y se observó que las bacterias tendían a formar agregados o a sufrir una transformación hacia la forma cocoide no cultivable de *H. pylori*. La mayor cantidad obtenida mediante este sistema fue de 600 ml.

Para minimizar las manipulaciones y las contaminaciones así como disminuir el número de subcultivos y el tiempo total de incubación se intentó cultivar *H. pylori* en distintos medios del sistema automatizado *Bactec* (Becton Dickinson, BD) que presentaba las ventajas de ser un sistema cerrado en el que se evitaban las manipulaciones una vez inoculado y de permitir el uso de un incubador automático que agita los cultivos (disminuyendo la agregación) y mide de manera continua el crecimiento.

Se inocularon 3 ml de una suspensión 2 de Mac Farland de las cepas TIGR 26695 y HP146128 en los medios *Bactec Ped Plus*, *Bactec Standard Aerobic* y *Bactec Standard Anaerobic* (Becton Dickinson, BD) con y sin SFB y se incubaron a 37 °C practicándose subcultivos a los tres y cinco días. El único medio en el que se observó crecimiento fue *Bactec Ped Plus* suplementado con SFB.

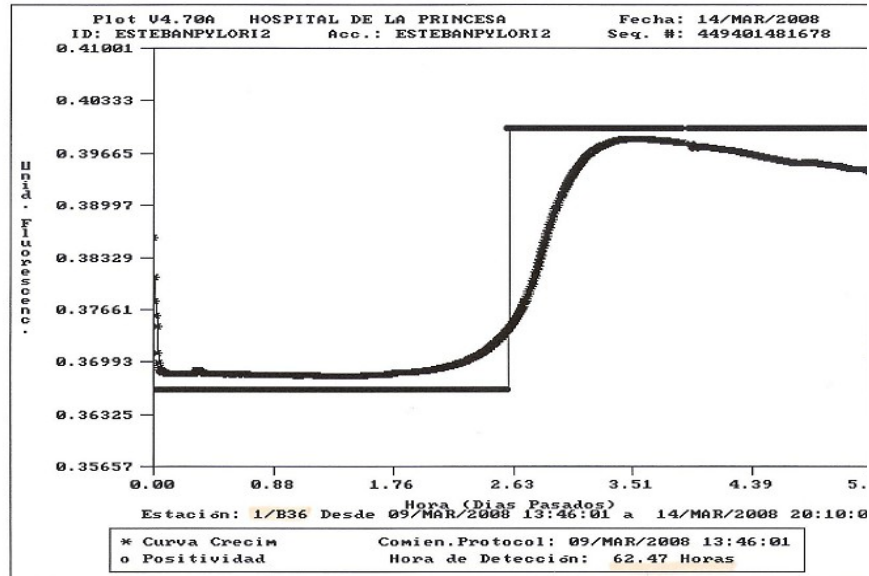
RESULTADOS

Se comprobó también la viabilidad de ambas cepas en este medio siendo incubadas en el instrumento Bactec 9050 y la capacidad de éste para trazar las curvas de crecimiento.

Por último se compararon las curvas en ausencia y en presencia de mitomicina C. En el caso del control negativo, TIGR 26695, no se apreciaron diferencias en las curvas con y sin mitomicina C. En cambio, el tiempo para alcanzar la fase exponencial fue notablemente superior al incubar HP146128 en presencia de mitomicina C:

RESULTADOS

A)



B)

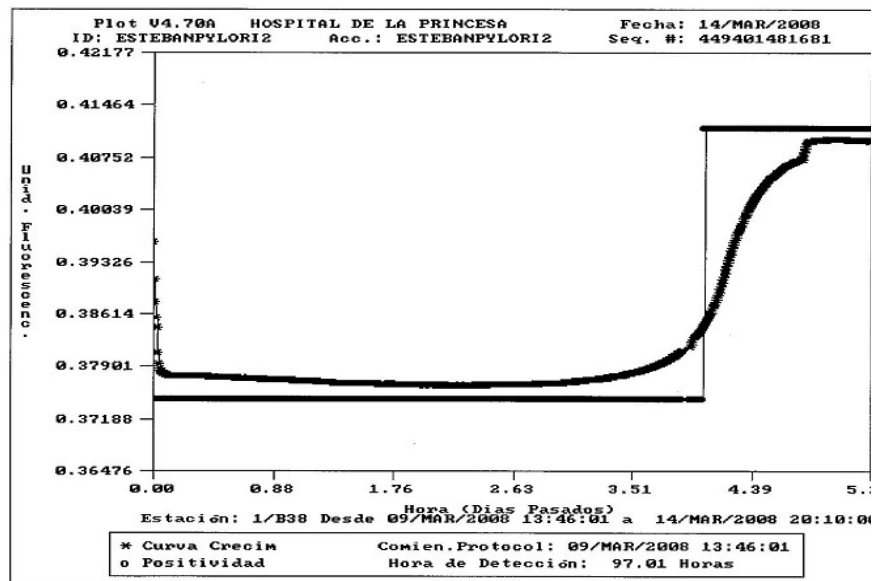


Figura 6. Curvas de crecimiento de la cepa HP146128 monitorizadas en el sistema Bactec 9050: A) En ausencia de mitomicina C, B) En presencia de 5 ng/ml de mitomicina C.

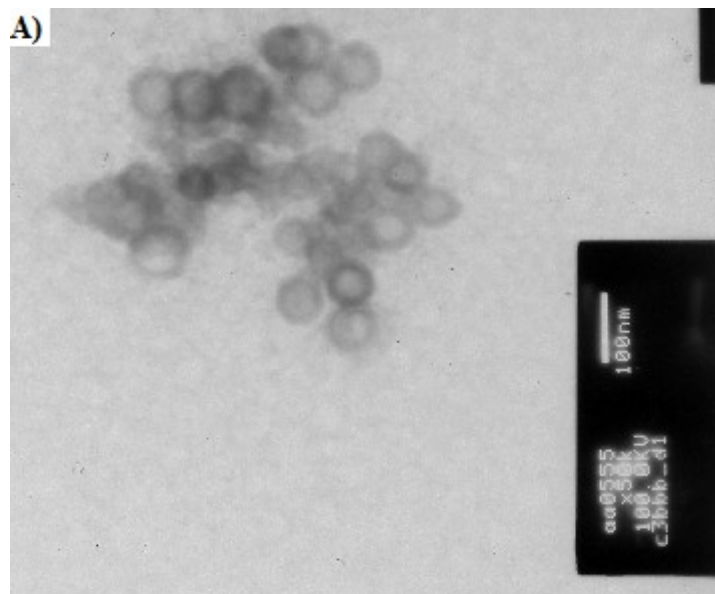
RESULTADOS

Para confirmar que la inducción había tenido lugar, se filtraron 3 ml de cultivo líquido de la cepa HP146128 y se realizó un *spot test* sobre la cepa HP 187510 que demostró la inhibición de crecimiento.

4.4.2 Purificación de bacteriófagos y examen con microscopio electrónico

La purificación se intentó a partir de 600 ml de medio líquido obtenido por subcultivos sucesivos en BHI suplementado con SFB y con antibióticos y a partir de 2 litros obtenidos en 40 frascos de Bactec Ped Plus igualmente suplementados con SFB y con antibióticos.

Tras lisar las bacterias con NaCl y centrifugar para eliminar los restos celulares, se precipitaron los posibles fagos con PEG. El precipitado se resuspendió en un 2% de TBT y distintas muestras de estos concentrados se observaron al microscopio electrónico. En ambos casos se observaron escasas estructuras que, por su tamaño y morfología, podrían ser compatibles con partículas fágicas:



RESULTADOS

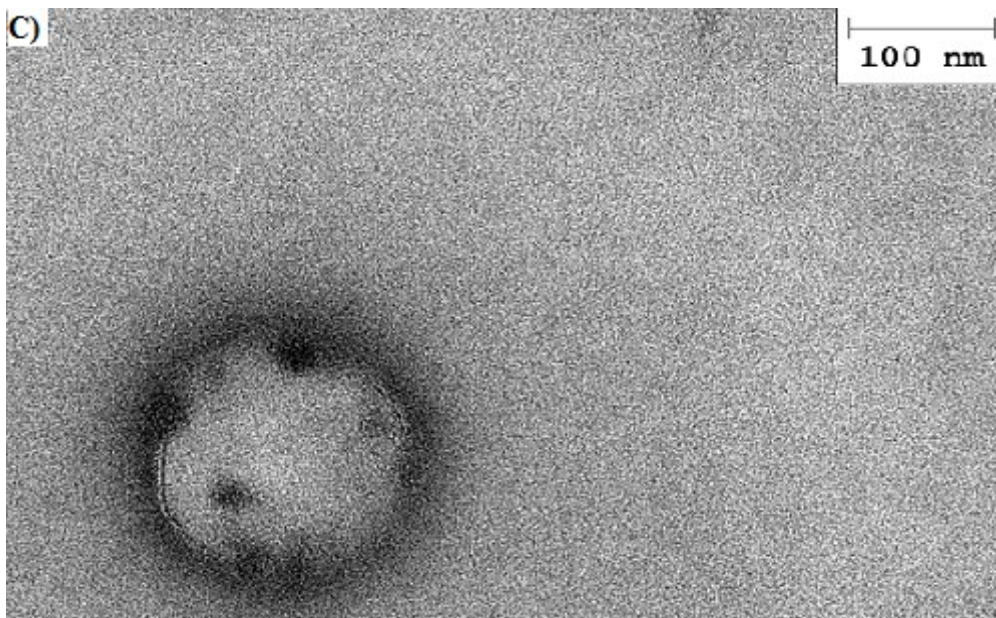
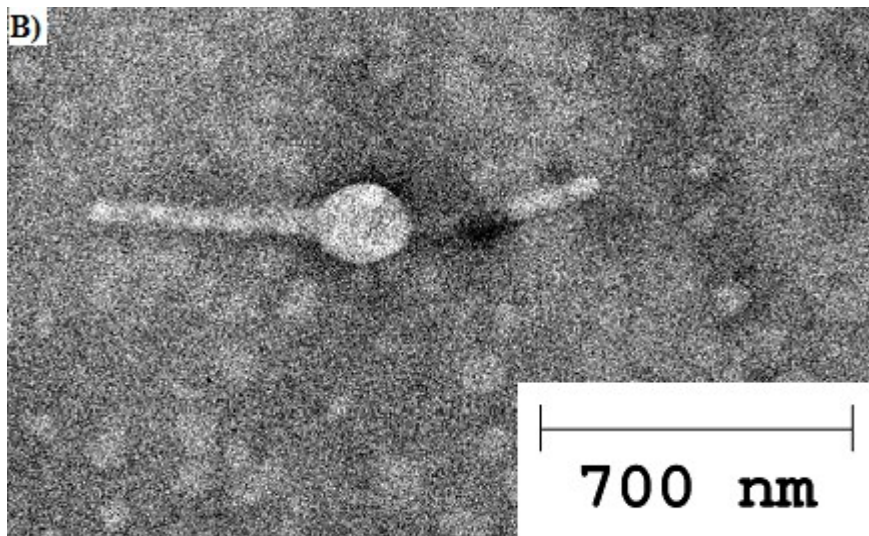


Figura 7. Imágenes compatibles con bacteriófagos observadas tras la inducción con Mitomicina C. A) A partir de cultivo en BHI; B y C) A partir de cultivo en *Bactec Ped Plus*.

Se intentó también purificar los posibles bacteriófagos mediante gradiente en CsCl pero no se observó ninguna banda de densidad compatible. A pesar de todo se extrajo la zona del gradiente de densidades entorno a $1,5 \text{ g/cm}^3$ y se examinó al microscopio electrónico sin encontrar estructuras compatibles con partículas fágicas.

4.4.3 Aislamiento del material genético de bacteriófagos

RESULTADOS

Partiendo también de dos litros de cultivo en medio líquido de *H. pylori* (cepa HP146128) en presencia de mitomicina C (en *Bactec Ped Plus*) se trató de aislar el material genético de los posibles bacteriófagos presentes tras la inducción.

Tras concentrar los posibles fagos siguiendo los mismos pasos que en el apartado previo, se sometió a la suspensión con DNasa y RNasa para eliminar posibles restos de ácidos nucleicos bacterianos. A continuación se trató con proteinasa K para liberar el material genético del interior de la cápsida. El ácido nucleico se purificó tratando con fenol/cloroformo-isoamílico (24:1) y precipitando con etanol.

En la electroforesis pudo observarse que se había obtenido un fragmento de ADN de unas 20 kb.

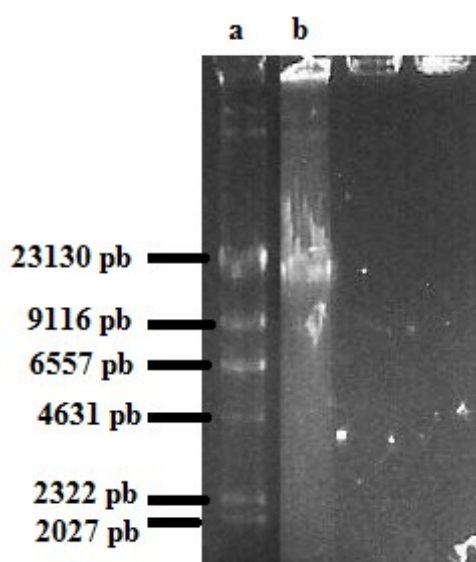


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de fragmento de ADN fágico: a) marcador de peso molecular (I/HindIII), b) ADN de origen fágico.

Se comprobó también que se trataba de ADN bicatenario ya que se degradó completamente al ser sometido a digestión mediante DNasa I.

4.4.4 Digestión del ADN con enzimas de restricción

A pesar de que se trató de digerir el fragmento de ADN con diversas enzimas de restricción (EcoRI, HindIII, Sau3AI y ScaI) no se observó ningún efecto.

Tras volver a purificar el ADN se sometió de nuevo a digestión y el resultado fue el mismo:

RESULTADOS

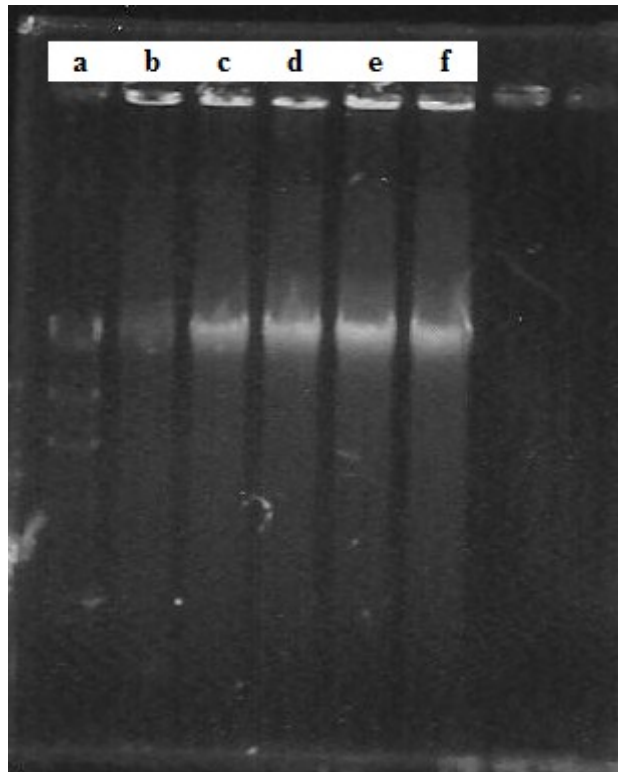


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión: a) marcador de peso molecular (1/HindIII), b) ADN fágico, c-f) digestión con enzimas de restricción: c) EcoRI, d) HindIII, e) Sau3AI, f) Scal

Se repitió el experimento con mayor número de enzimas y prolongando el tiempo de incubación (24 h) (AccI, AluI, AsnI, BfaI, ClaI, Dde, DraI, HaeII, HaeIII, HincII, HinPI, MspI, SspI, TaqI) (figura 10). Con AccI y AluI, el ADN fue digerido por completo. También ocurrió lo mismo con HaeIII si bien con ésta quedó un rastro de fragmentos digeridos. Con el resto de enzimas no se observó digestión (figura 10).

RESULTADOS

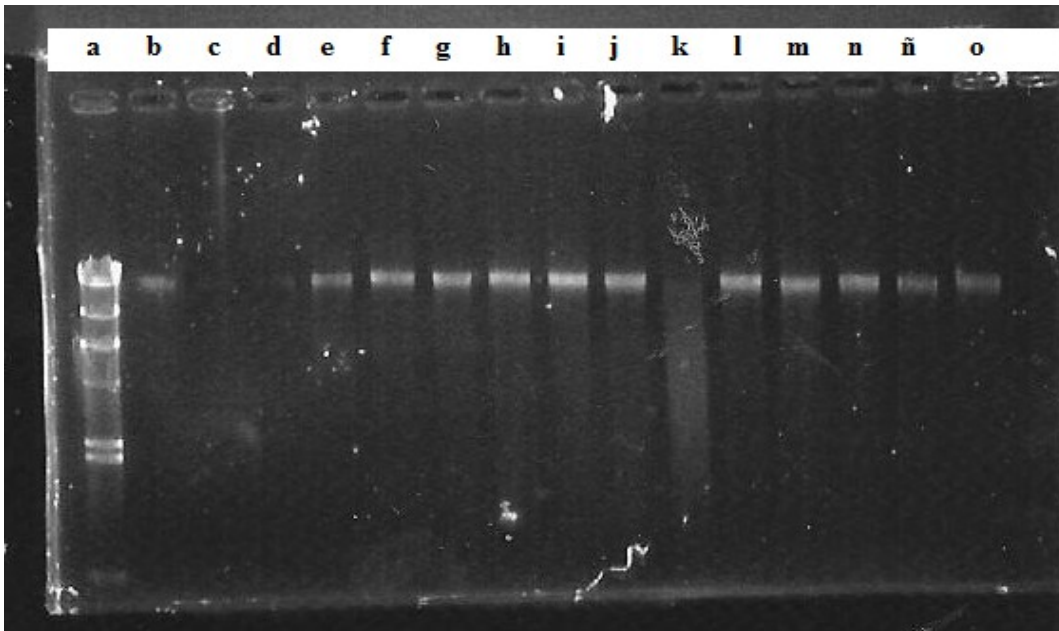


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión prolongada: a) marcador de peso molecular (ADN del fago I digerido con HindIII), b) ADN fágico, c-o) digestión con enzimas de restricción: c) Accl, d) Alul, e) Asnl, f) Bfal, g) Clal, h) Dde, i) Dral, j) HaeII, k) HaeIII, l) HincII, m) HinpI, n) MspI, ñ) SspI, o) TaqI

4.4.5 Clonación en vector pUC19

Se trató de lograr una digestión parcial de 15µl de ADN fágico con HaeIII para clonar los posibles fragmentos con el plásmido pUC19 de *E. coli*.

RESULTADOS

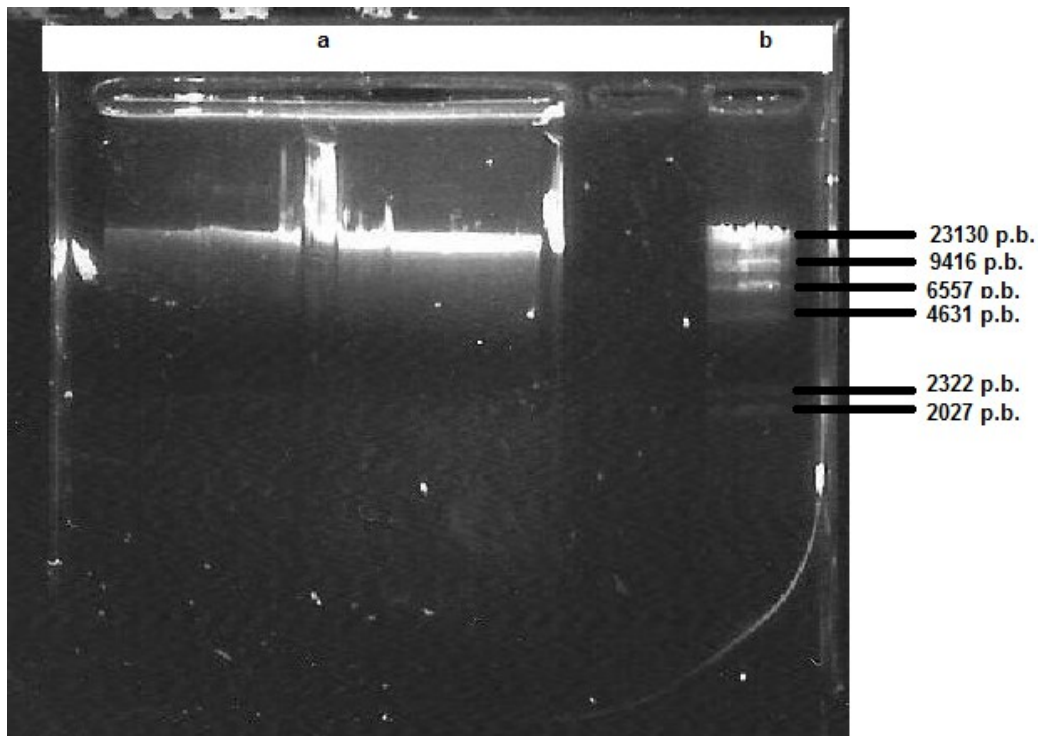


Figura 11. Intento de digestión de 15 μ l de ADN fágico con HaeII (a) y marcador de peso molecular (λ HindIII)

Al no observarse digestión aparente, se extrajo todo el ADN del gel.

Sin embargo, tras la ligación y la transformación sólo se obtuvieron 7 colonias y se comprobó que todas ellas habían incorporado el plásmido pUC19 sin inserto.

4.5 Análisis de la secuencia completa del genoma de una cepa lisogénica buscando genes relacionados con bacteriófagos

4.5.1 Secuenciación del genoma de HP146128

La secuencia completa del genoma de la cepa HP146128 contiene un total de 1,6 Mb.

La secuenciación llevada a cabo obtuvo un total de 88.557 lecturas, con una media de 360,88 nucleótidos por secuencia que se ensamblaron en 57 *contigs*.

RESULTADOS

4.5.2 Ordenación del genoma

Utilizando la herramienta *Genomic Aligner* del programa *Genome Workbench* se pudieron comparar los *contigs* obtenidos por secuenciación con el genoma de la cepa J99 de *H. pylori* (AE001439.1) para poder ordenarlos.

La figura 12 representa el emparejamiento de los distintos *contigs* con el genoma completo de J99.

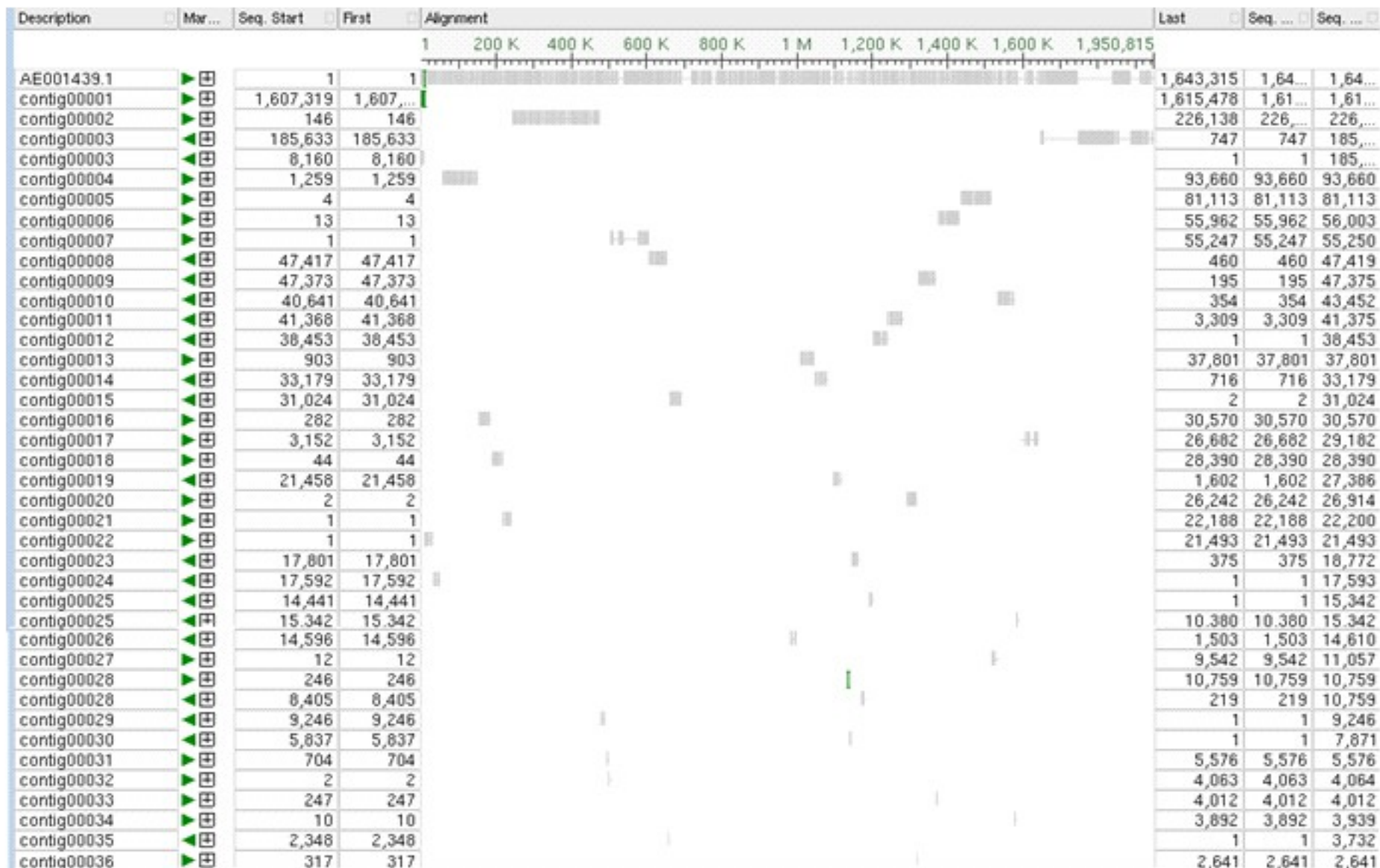


Figura 12. Alineación de los contigs de HP146128 con el genoma completo de J99 (AE1439.1)

RESULTADOS

El orden y sentido definitivos de los *contigs* en correlación con el genoma de J99 fue el siguiente: 3 (inv), 22 (dir), 24 (inv), 4 (dir), 16 (dir), 18 (dir), 21 (dir), 2 (dir), 29 (inv), 31 (dir), 32 (dir), 7 (dir), 8 (inv), 35 (inv), 15 (inv), 1 (dir), 26 (rev), 13 (dir), 14 (inv), 19 (inv), 28 (dir), 30 (inv), 23 (inv), 28 (inv), 25 (inv), 12 (inv), 11 (inv), 20 (dir), 9 (inv), 33 (dir), 6 (dir), 5 (dir), 27 (dir), 10 (inv), 34 (dir), 25 (inv), 17 (dir), 3 (inv).

4.5.3 Predicción de genes y traducción a proteínas

Utilizando la aplicación en línea *GeneMark* se identificaron 1740 posibles genes que fueron traducidos a proteínas. Del total de ORFs detectadas, 583 no observaban relación con ninguna proteína de la base de datos de proteínas *Pfam* y de entre aquellas que sí la tuvieron hubo 108 coincidencias con proteínas o dominios de función desconocida.

4.5.4 Identificación de proteínas relacionadas con fagos

De entre todos los posibles genes traducidos a proteínas se identificaron 24 que, en mayor o menor grado, presentaban cierta relación con proteínas fágicas o potencialmente relacionadas con fagos.

La tabla 9 muestra las proteínas fágicas codificadas por genes homólogos a los de HP146128, la localización de estos genes y el grado de similitud (*E value*).

ORF	INICIO	FIN	aa	Familia (Pfam)	Familia (descripción)	E value
1	68871	70892 (rev)	674	Phage GPO	Serina peptidasa de la proteína de andamiaje fágica	1,80E-002
2	91275	92972 (rev)	566	Phage GPO	Serina peptidasa de la proteína de andamiaje fágica	4,60E-002
3	316047	92972 (rev)	291	Phage endonuclease I	Endonucleasa fágica I	7,30E-001
4	386998	387669 (dir)	224	NTPase P4	ATPasa P4 del bacteriófago phi 12	4,90E-002
5	474952	475356 (rev)	135	Minor tail Z	Proteína menor de la cola Z	1,50E-002
6	606958	607845(rev)	296	T4 Baseplate	Proteína de la base de T4	3,40E-002
7	628427	629851 (dir)	475	TMP 2	Proteína de cinta métrica de la cola del profago	8,10E-002
8	647722	648813 (dir)	364	Phage integrase	Familia de integrasas fágicas	7,00E-035
9	696582	697034 (dir)	151	Phage protein Gp 14	Proteína fágica Gp 14	8,10E-004
10	885390	886946 (dir)	519	Phage 1 1	Proteína de bacteriófago 1.1	5,10E-001
11	987064	987273 (dir)	70	PspB	Proteína fágica de choque B	1,30E-001
12	993959	995011 (dir)	351	CRISPR Cas 2	Proteína asociada a CRISPR Cas2	1,80E-001
13	1004482	1005393 (rev)	304	Phage integrase	Familia de integrasas fágicas	7,10E-017
14	1014913	1015986 (rev)	358	Phage integrase	Familia de integrasas fágicas	2,60E-019
15	1063519	1063746 (rev)	76	Phage GP20	Proteína estructural menor de fago GP20	1,80E-001
16	1082515	1083159 (dir)	215	CRISPR Cas 2	Proteína asociada a CRISPR Cas2	3,60E-001
17	1138615	1139400 (rev)	262	Phage holin T	Holina de bacteriófago T	1,40E-001
18	1154606	1155139 (dir)	178	Fic	Familia Fic/Doc	1,40E-010
19	1311165	1311542 (dir)	126	P22 Coat protein	Gen-proteína 5 de la envuelta de P22	4,20E-003
20	1417439	1417558 (dir)	40	Phage DNA bind	Proteína desestabilizadora de la hélice	1,20E-001
21	1440879	1441160 (rev)	94	Phage GP20	Proteína estructural menor de fago GP20	6,60E-002
22	1442247	1442873 (rev)	209	Phage term sma	Subunidad pequeña de terminasa putativa de bacteriófago	7,20E-003
23	1494525	1495514 (dir)	330	Phage 30 3	Proteína fágica 30.3	1,90E-002
24	1565074	1565586 (rev)	171	Phage connect 1	Proteína de conexión cabeza-cola parecida a gp 6	3,00E-001

Tabla 9. Relación de proteínas que guardan relación con proteínas fágicas según el análisis con *Pfam*

RESULTADOS

4.5.5 Detección de secuencias compatibles con profagos

Tras analizar la secuencia completa y ordenada del genoma de HP146128 con *Prophage Finder* se identificaron 4 posibles profagos.

El contenido en GC de la secuencia completa fue 38,97%.

Las coincidencias con la base de datos de proteínas fágicas del primero de los posibles profagos, cuyo contenido en GC es de 38,1% están reflejadas en la tabla 10.

ORF	INICIO	FIN	Mejor concordancia (BLASTX)	valor E
1	242081	243058 (dir)	ref NP_818300.1 gp250	1,00E-019
2	246932	247159 (rev)	ref NP_817550.1 gp101	3,10E-001
3	247621	247908 (rev)	ref NP_543076.1 putativa metilasa de ADN	1,40E-001
4	249424	250116 (dir)	ref YP_077259.1 Citosina metilasa similar a N4	2,00E-017
5	250795	251088 (dir)	ref NP_817947.1 gp96	1,80E-001
6	251332	251910 (dir)	ref YP_024504.1 putativa exonucleasa	6,00E-003

Tabla 10. Profago 1 detectado por *Prophage Finder*

El segundo, con un contenido en GC de 37,12% presentaba coincidencias descritas en la tabla 11.

ORF	INICIO	FIN	Mejor concordancia (BLASTX)	Valor E
1	638177	638659 (dir)	ref YP_195267.1 putativa helicasa	1,40E-001
2	639281	639586 (dir)	ref NP_445687.1 putativa helicasa	2,00E-006
3	642583	643569 (dir)	ref NP_852546.1 proteína hipotética	9,00E-006
4	648094	648798 (dir)	ref NP_536628.1 Integrasa	8,00E-008
5	651296	653641 (rev)	ref YP_195185.1 Subunidad A de ribonucleótido-reductasa	4,00E-083

Tabla 11. Profago 2 detectado por *Prophage Finder*

En cuanto al tercero, su contenido en GC era del 39,75% y las coincidencias encontradas fueron las expuestas en la tabla 12.

RESULTADOS

ORF	INICIO	FIN	Mejor concordancia (BLASTX)	valor E
1	1350166	1351566 (rev)	ref NP_795382.1 putativa subunidad delta de ADN polimerasa III	4,00E-062
2	1356185	1356580 (rev)	ref NP_046948.1 gp52	6,00E-005
3	1356720	1356908 (rev)	ref NP_599080.1 desconocida	1,30E-002
4	1356943	1357776 (rev)	ref YP_077259.1 Citosina metilasa similar a N4	7,00E-020
5	1360136	1360324 (dir)	ref NP_046948.1 gp52	4,00E-004

Tabla 12. Profago 3 detectado por *Prophage Finder*

Por último, se identificó un cuarto posible profago con un contenido en GC del 36,09%. Los genes concordantes con proteínas fágicas se detallan en la tabla 13.

ORF	INICIO	FIN	Mejor concordancia (BLASTX)	valor E
1	1451404	1452306 (dir)	ref YP_164394.1 RNA helicasa DEAD-box	2,00E-003
2	1454537	1456330 (dir)	ref YP_006476.1 Enzima de restricción	2,00E-065
3	1457089	1457418 (dir)	ref YP_006476.1 Enzima de restricción	3,00E-013
4	1460124	1461350 (dir)	ref NP_542568.1 putativa endonucleasa/metiltransferasa	3,00E-015
5	1462553	1462765 (dir)	ref NP_438164.1 proteína hipotética	2,00E-008

Tabla 13. Profago 4 detectado por *Prophage Finder*

De entre estos genes de posible origen fágico se comprobó cuáles tenían algún homólogo en el genoma de la cepa J99 (tabla 14).

Gen	Proteína fágica similar	Homólogo en J99	Proteína codificada	Identidad	Valor E
ORF1/Profago1	gp250	purA	AAD05829.1/ Adenilosuccinato sintetasa	96,11	<0,000001
ORF4/Profago2	Int	jhp_0617	AAD06197.1/Integrasa-recombinasa (familia XERCD)	96,74	<0,000001
ORF5/Profago2	Subunidad A de ribonucleotido reductasa	nrdA	AAD06201.1/Cadena alfa de ribonucleosido-difosfato reductasa I	97,44	<0,000001
ORF2/Profago4	Res	res_2	AAD069881.1/Enzima de restricción tipo III	92,88	<0,000001

Tabla 14. Genes atribuidos a posible profagos por *Prophage Finder* que mostraban homólogos en J99

RESULTADOS

El análisis de las secuencias de los posibles profagos y de las secuencias que las flanquean en sus extremos 5' y 3' para identificar proteínas similares a otras presentes en genomas conocidos (buscando la mayor homología en la base de datos *Pfam* y haciendo una búsqueda acotada por el término *phage* en BLASTP) se resume en las tablas 15 a 26.

ORF (posición, sentido y Nº de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
231809..232837 (rev), 343 aa	Flgl	Proteína flagelar anillo-P	Familia	7,00E-108	gp41 [Fago BigNuz de <i>Mycobacterium</i>]	3,80E-002
233026..234504 (dir), 493 aa	DEAD	Helicasa DEAD/DEAH box	Dominio	9.8e-46	Putativa helicasa [Fago de <i>Vibrio</i> VP16C]	2,00E-008
	Helicase C	Dominio C terminal conservado de helicasa	Familia	3.2e-27		
234525..235613 (dir), 363 aa	Band 7	SPFH Dominio / Band 7 Familia	Familia	4.1e-31	Proteína hipotética 2204_scaffold14_00033 [Fago no identificado]	7,00E-015
235620..236159 (dir), 180 aa	DUF2393	Proteína de función desconocida (DUF2393)	Familia	1.2e-24	gp149 [Fago Dandelion de <i>Mycobacterium</i>]	2,00E-003
	ABC2 membrane 2	Familia de proteínas transportadoras ABC-2	Dominio	19		
236209..237759 (rev), 517 aa	ABC tran	Transportador ABC	Dominio	2,00E-020	Profago CP4-6: prophage; subunidad predicha de transportador férrico [<i>Escherichia coli</i> cepa. K-12 subcepa MG1655] >ref YP_006127651.1	2,00E-027
	oligo HPY	Región C terminal de transportador de oligopéptidos/dipéptidos	Familia	0.0062		
	ABC tran	Transportador ABC	Dominio	1.9e-16		
	oligo HPY	Región C terminal de transportador de oligopéptidos/dipéptidos	Familia	0.00017		
237769..238791 (rev), 341 aa	OppC N	Dominio TM N terminal de transportador de oligopéptidos permeasa C	Dominio	1.4e-07	Putativa proteína relacionada con fagos [<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512]	2,00E-003
	BPD transp 1	Componente de membrana interna de sistema de transporte dependiente de unión a proteínas	Familia	1.2e-26		
239118..240560 (dir), 481 aa	HP OMP	Proteína de membrana externa de <i>Helicobacter</i>	Familia	Dominio	Dominio de ribonucleotido reductasa [Fago de <i>Prochlorococcus</i> P-SSP7] >gb AAX44199.1	6,00E-004
240612..241979 (dir), 456 aa	HP OMP	Proteína de membrana externa de <i>Helicobacter</i>	Familia	9.9e-50	Proteína hipotética [Fago no cultivado MedDCM-OCT-S05-C532]	8,00E-003

Tabla 15. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* de la región 5' del profago 1

ORF (posición, sentido y N° de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
243731..244390 (dir), 220 aa	MgtE N	Dominio N intracelular de MgtE (transp. Mg)	Dominio	2.2e-06	Integrasa/recombinasa, familia de integrasas fágicas [<i>Streptococcus</i> sp. M143] >gb EFA24462.1	9,90E-002
244390..245403 (dir), 338 aa	Peptidase M5	Familia de peptidasas M50	Familia	2.9e-50	Proteína de cinta métrica de la cola [<i>Clostridiales</i> bacterium 1_7_47_FAA] >gb EEQ60005.1	2,00E-003
	PDZ	Dominio PDZ (también conocido como DHR o GLGF)	Dominio	0.0045		
245448..246491 (dir), 348 aa	tRNA anti 2	Dominio de unión a ácido nucleico en pliegue OB	Dominio	2.1e-27	Putative proteína de la cola [<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a] >emb CAQ43904.1	2,00E-003
	Exonuc VII L	Exonucleasa VII, subunidad grande	Familia	1.9e-71		
246566..246709 (dir), 48 aa	CusF Ec	Proteína periplásmica de unión al cobre CusF	Familia	0.14	Proteína estructural del virión [Fago de <i>Pseudomonas</i> phi15] >emb CBZ42011.1	6,00E-003
246728..247339 (rev), 204 aa	N6 N4 Mtase	ADN metilasa	Familia	4,00E-019	Proteína fágica [<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906] >gb EEI47842.1	1,00E-003
247354..247899 (rev), 182 aa	N6 N4 Mtase	ADN metilasa	Familia	7.1e-30	Mod [Fago P7 de <i>Enterobacteria</i>]	4,00E-015
247892..248506 (rev), 205 aa					ADN polimerasa [Fago JSE de <i>Enterobacteria</i>] >gb ACL77977.1	1,00E-003
248696..249385 (dir), 230 aa	EcoRII C	Dominio C terminal de EcoRII	Dominio	0.21	Recombinasa sitio-específica, familia de integrasas fágicas [<i>Prevotella amnii</i> CRIS 21A-A] >gb EFN90698.1	5,00E-004
249382..250140 (dir), 253 aa	N6 N4 Mtase	ADN metilasa	Familia	1.6e-40	gp77 [Fago de <i>Mycobacterium</i> SG4]	4,00E-026
250213..252783 (dir), 857 aa	Clp N	Dominio aminoterminal de Clp	Familia	9,00E-010	Proteína hipotética RaK2_00069 [Fago de <i>Enterobacteria</i> vB_KleM-RaK2]	5,00E-073
	Clp N	Dominio aminoterminal de Clp	Familia	24		
	AAA	Familia de ATPasas relacionadas con varias funciones celulares (AAA)	Familia	1,00E-015		
	AAA 2	Dominio AAA (subfamilia Cdc48)	Dominio	4.8e-53		
	ClpB D2 small	Dominio D2 pequeño, C terminal de ClpB	Dominio	6.4e-21		

Tabla 16. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* del profago 1

ORF (posición, sentido y N° de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
253568..254704 (dir), 379 aa	Amydohydro 4	Amidohidrolasa	Dominio	4.7e-06	Proteína XkdM [Fago de <i>Clostridium</i> phi CD119] >gb YP_529566	2,00E-003
254689..255918 (dir), 410 aa	Amydohydro 1	Familia de amidohidrolasas	Dominio	1.3e-35	Dominio N terminal de proteína estructural menor fágica [<i>Streptococcus parauberis</i> NCFD 2020] >gb EGE53774.1	6,00E-003
255980..256222 (dir), 81 aa					Subunidad cuña de la base y alfiler de la cola [Fago de <i>Shigella</i> SP18] >gb ADO19511.1	3,00E-004
256232..257545 (dir), 438 aa	UPF0004	Familia de proteínas no caracterizadas UPF0004	Familia	1,00E-028	Recombinasa sitio-específica, familia de integrasas fágicas [<i>Veillonella atypica</i> ACS-049-V-Sch6] >gb EFL55706.1	4,00E-004
	Radical SAM	Superfamilia de radicales SAM	Dominio	1,00E-031		
257584..258237 (dir), 218 aa	DUF374	Dominio de función desconocida (DUF374)	Familia	1.6e-27	Producto protéico sin nombre [Fago de <i>Bacillus</i>] >gb ADH03260.1	4,00E-004
258230..259213 (dir), 328 aa					Proteína hipotética LaPh949_gp026 [Fago de <i>Lactococcus</i> 949] >gb ADM73584.1	3,00E-003
259203..259736 (dir), 178 aa	Nucleoporin C	Extremo C terminal de nucleoporina no repetitiva/WGA negativo	Dominio	34	Proteína fágica hipotética [<i>Escherichia coli</i> SE11]	2,00E-004
259733..260272 (dir), 180 aa	Rubis-subst-bin	Unión a sustrato de RuBisCo	Dominio	18	Hidrolasa fágica de la pared celular [<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg] >gb ABX41177.1	2,00E-003
260289..260687 (dir), 133 aa	FliB	Flagelina N-metilasa	Familia	7.9e-17	Proteína fágica hipotética conservada [<i>Arsenophonus nasoniae</i>]	2,00E-003
260724..262019 (dir), 432 aa	PPR	Repetición PPR	Familia	0.00097	Subunidad pequeña de terminasa fágica [<i>Pasteurella bettyae</i> CCUG 2042] >gb EIJ69495.1	8,00E-004

Tabla 17. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* de la región 3' del profago 1

ORF (posición, sentido y N° de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
627126..628427 (dir), 434 aa	Peptidase M16	Insulinasa (familia de peptidasas M16)	Familia	7.8e-10	gp2 [Fago G de <i>Bacillus</i>]	2,00E-009
	Peptidase M16 C	Dominio inactivo de peptidasa M16	Dominio	2.4e-19		
628427..629851 (dir), 475 aa	GatB N	Dominio catalítico GatB/GatE	Dominio	2.2e-120	Proteína de cinta métrica de la cola, profago P2W3 [<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Drosophila melanogaster</i>] >gb AAK85310.1	1,80E-002
	GatB Yqey	Dominio GatB	Dominio	2.2e-44		
	TMP 2	Proteína de cinta métrica de la cola	Familia	81		
629851..631080 (dir), 410 aa	SurA N	Dominio N terminal SurA	Dominio	2.8e-11	Proteína hipotética LPPPVgp38 [Fago de <i>Listonella phiHSIC</i>] >gb AAW67538.1	2,70E-002
631091..632098 (dir), 336 aa	zf P11	Dedo de zinc P-11	Familia	14	PfWMP4_02 [Cianofago Pf-WMP4] >gb ABI33146.1	1,00E-003
	DUF35 N	Dominio cinta de zinc tipo rubredoxina (DUF35_N)	Dominio	0.82		
632100..632531 (dir), 144 aa	RNase H	RNAsa H	Dominio	6.8e-32	Putativa ribonucleasa HI [Fago de <i>Pseudomonas</i> EL] >emb CAG27218.1	3,00E-027
632543..633262 (dir), 240 aa	Ribonuclease 3	Ribonucleasa III	Familia	8.3e-20	Proteína semejante a ADN polimerasa [Fago de <i>Ralstonia</i> RSB2]	5,00E-003
	dsm	Motivo de unión a ARN de doble cadena	Dominio	2.1e-15		
633259..634356 (dir), 366 aa	Chorismate synt	Corismato sintasa	Familia	2.7e-127	Proteína hipotética EcP1_gp18 [Fago de <i>Enterobacter</i> EcP1]	1,20E-002
634393..634908 (dir), 172 aa	DUF2603	Proteína de función desconocida (DUF2603)	Familia	1.6e-44	Proteína antirepresora de fago [<i>Bacillus cereus</i> Rock3-29] >gb EEL37228.1	5,00E-004
634908..636281 (dir), 458 aa	Radical SAM	Superfamilia de radicales SAM	Dominio	2.4e-18	Proteína hipotética ORF032 [Fago de <i>Pseudomonas</i> 73] >gb AFB83322.1	7,00E-003
	HemN C	Dominio C terminal de HemN	Dominio	7.6e-09		
636278..637579 (dir), 434 aa		Dominio digrupa 4Fe-4S	Dominio	1.7e-08	Producto proteico sin nombre [Fago de <i>Synechococcus</i> S-SM1] >gb ADO97165.1	7,00E-003
		Cysteine-rich Dominio rico en cisteína	Familia	1.6e-16		
		Dominio rico en cisteína	Familia	6.2e-12		

Tabla 18. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* de la región 5' del profago 2

ORF (posición, sentido y Nº de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
637655..642484 (dir), 1610 aa	Mir cat	Endonucleasa de restricción	Familia	5,00E-013	helicasa [Fago de <i>Synechococcus</i> syn9] >gb ABA47044.1	4,00E-010
	Res III	Enzima de restricción tipo III, subunidad res	Familia	2,00E-030		
	Helicasa C	Helicase conserved C-terminal Dominio	Familia	7.4e-11		
	Methyltransf 26	Dominio metiltransferasa	Dominio	2.3e-09		
642481..644967 (dir), 829 aa	SIR2 2	Dominio tipo SIR2	Familia	6.2e-28	Proteína fágica [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato Max13] >ref ZP_07253793.1	3,00E-014
645188..646000 (dir), 271 aa	HP CMP	Proteína de membrana externa de <i>Helicobacter</i>	Familia	1.4e-54	proteína hipotética Mup48 [Enterobacteria phage Mu] >ref YP_006162605.1	1,00E-003
646159..647331 (dir), 391 aa	Aminotran 1 2	Aminotransferasa clase I y II	Dominio	3.3e-71	Putativo componente de la cola, dominio N terminal [<i>Peptoniphilus</i> sp. oral taxon 836 str. F0141] >gb EFK39530.1	1,00E-043
647722..648813 (dir), 364 aa	Phage integrase	Familia de integrasas fágicas	Familia	7,00E-035		
648912..649388 (rev), 159 aa	Methyltransf 1N	6-O-metilguanina ADN metiltransferasa, dominio tipo ribonucleasa	Dominio	1.9e-14	Producto protéico sin nombre [Fago de <i>Pseudomonas</i> OBP] >gb AEV89737.1	1,00E-003
	DNA binding	6-O-metilguanina ADN metiltransferasa, dominio de unión a ADN	Dominio	2.9e-32		
649754..649936 (rev), 61 aa	Tau E	Exportador de sulfito TauE/SafE	Familia	0.00039	gp263 [Fago de <i>Sphingomonas</i> PAU]	1,00E-004
	BT1	Familia BT1	Familia	0.0022		
649942..650157 (rev), 72 aa	Res III	Exportador de sulfito TauE/SafE	Familia	1.4e-10	Putativa subunidad grande de terminasa [Fago de <i>Streptococcus</i> 5093] >gb ACR45911.1	5,20E-002
650269..651216 (rev), 316 aa	GFO IDH MocA	Familia oxidoreductasa, pliegue Rossmann de unión a NAD	Familia	2.7e-24	Proteína hipotética EpJS98_gp130 [Fago de <i>Enterobacteria</i> JS98] >gb ABX11114.1	7,00E-003
	GFO IDH MocA	Familia oxidoreductasa, dominio alfa/beta C terminal	Dominio	1,00E-010		
651278..653644 (rev), 789 aa	ATP cone	Dominio cono ATP	Dominio	3,00E-013	Recombinasa sitio-específica, familia de integrasas fágicas [<i>Paraprevotella xylaniphila</i> YIT 11841] >gb EGG51924.1	4,00E-003
	Ribonuc red IgN	Ribonucleotido reductasa, dominio all alfa	Dominio	3.1e-24		
	Ribonuc red IgC	Ribonucleotide reductase, barrel Dominio	Familia	6.4e-191		

Tabla 19. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* del profago 2

ORF (posición, sentido y Nº de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
654361..654681 (rev), 107 aa	TraT	Proteína de resistencia a complemento de enterobacterias TraT	Familia	0.41	Proteína de la cola relacionada con fagos [<i>Leuconostoc citreum</i> KM20] >gb ACA82873.1]	1,00E-004
	Rick 17kDa Anti	Dominio cremallera de glicina 2TM	Familia	24		
654857..656185 (rev), 443 aa	NTP transf 3	Dominio NTP transferasa tipo MobA	Dominio	9.1e-15	gp187 [Fago de <i>Sphingomonas</i> PAU]	1,00E-007
	Hexapep	Hexapéptido de transferasa bacteriana (seis repeticiones)	Repetición	4.7e-09		
656266..657012 (dir), 249 aa	FliP	Familia FliP	Familia	7.8e-81	Proteína fágica [Fago de <i>Streptococcus</i> 9429.1] >ref YP_598166.1	1,00E-003
657051..659354 (rev), 768 aa	Plug	Dominio enchufe de receptor dependiente de TonB	Dominio	2.9e-21	putative phage head-tail adaptor [<i>Selenomonas artemidis</i> F0399] >gb EFW29842.1]	2,00E-011
659607..661535 (rev), 643 aa	FeoB N	Proteína transportadora de hierro B	Familia	8.4e-63	Profago CP4-57; proteína de unión a GTP predicha [<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655] >gb AAT48146.1]	2,00E-005
	Gate	Reconocimiento de nucleósidos	Dominio	6.7e-16		
	FeoB C	Proteína transportadora de hierro B, C terminal	Familia	6.3e-18		
	Gate	Reconocimiento de nucleósidos	Dominio	9.6e-34		
661678..662490 (dir), 271 aa	NA pol B exo2	Exonucleasa 3'-5' relacionada con dominio exonucleasa de PolB predicha	Familia	5.5e-72	Putativa Exonucleasa asociada a ADN-PolB [Fago de <i>Brucella</i> Tb] >gb AEY69778.1]	3,00E-007
662487..662672 (rev), 62 aa	RPT	Dominio repetido A en proteína UCH	Dominio	0.16	gp13 [Fago de <i>Salmonella</i> phiSG-JL2] >gb ACD75704.1]	9,00E-004
662773..663648 (dir), 292 aa	Thiolase N	Tiolasa, dominio N termnal	Dominio	2.1e-98	Putativa proteína estructural [Fago de <i>Pseudomonas</i> JG024]	3,00E-003
663632..663949 (dir), 106 aa	Thiolase C	Tiolasa, dominio C terminal	Dominio	4.8e-41	gp32 [Fago de <i>Mycobacterium</i> Send513]	1,10E-002

Tabla 20. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* del extremo 3' del profago 2

ORF (posición, sentido y Nº de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
1340473..1340574 (rev), 34 aa					Putativa metilasa [Fago de <i>Pectobacterium</i> ZF40]	5,00E-003
1341020..1341106 (rev), 29 aa					Proteína fágica [<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> LGA251]	1,00E-003
1341192..1341641 (rev), 150 aa	DUF 2264	Proteína no caracterizada conservada en bacterias (DUF2264)	Familia	0.04	Putativo anti-represor fágico [<i>Paenibacillus sp. Aloe-11</i>] >gb EHS59409.1	1,00E-003
1341832..1344228 (rev), 799 aa	N6 Mtase	Proteína de función desconocida (DUF2869)	Familia	3.4e-10	Putativa metiltransferasa-endonucleasa [Fago de <i>Halorubrum</i> HF2] >gb AAL54988.1	6,00E-006
1344253..1345074 (rev), 274 aa	QRPTase N	Quinolinato fosfo-ribosil transferasa, dominio N terminal	Dominio	1.1e-19	proteína fágica [<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> LGA251]	
	QRPTase C	Quinolinato fosfo-ribosil transferasa, dominio C terminal	Dominio	7,00E-063	Proteína fágica tipo Mu de familia gp29 [<i>Pantoea stewartii subsp. stewartii</i> DC283] >gb EHU01936.1	3,00E-003
1345074..1346084 (rev), 337 aa	NadA	Quinolinato sintetasa A	Familia	5.7e-97	Proteína fágica hipotética [<i>Lactobacillus vaginalis</i> ATCC 49540] >gb EEJ41018.1	7,00E-004
1346074..1346877 (rev), 268 aa	PS Dcarbxy	Fosfatidilserina decarboxilasa	Familia	1.5e-57	Proteína fágica [<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> LGA251]	7,00E-004
1346871..1347377 (rev), 169 aa	DUF2869	Proteína de función desconocida (DUF2869)	Familia	0.00052	Resolvasa [Fago de <i>Sodalis phiSG1</i>] >dbj BAE80502.1 Resolvasa [Fago de <i>Sodalis phiSG1</i>] >gb ABN42242.1 gp36 [Fago de <i>Sodalis phiSG1</i>]	1,60E-002
1347390..1347884 (rev), 165 aa					Integrasa de bacteriófago [<i>Oenococcus kitaharae</i> DSM 17330]	1,00E-003
1347877..1348761 (rev), 295 aa	UbiA	Familia preniltransferasa UbiA	Familia	3.2e-32	Putativaproteína transmembrana de la cola relacionada con fagos [<i>Burkholderia ambifaria</i> MEX-5] >gb EDT43157.1	2,00E-004
1348790..1350103 (rev), 438 aa	Competence	Proteína de competencia	Familia	6.6e-26	Holina secreción de toxina/lisis fágica [<i>Fusobacterium sp. 2_1_31</i>] >gb EEO39218.2	8,20E-002

Tabla 21. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* del extremo 5' del profago 3

ORF (posición, sentido y N° de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
1363633..1364379 (reverse), 249 aa	MreC	Proteína determinante de la forma bacilar MreC	Familia	2.1e-21	Proteína estructural principal del núcleo P1 [Fago de <i>Pseudomonas phi12</i>] >gb AAL01109.1	6,00E-03
1364383..1365426 (reverse), 348 aa	MreB Mb1	Proteína MreB/Mbl	Familia	6.2e-143	Proteína hipotética KP-KP15_gp215 [Fago de <i>Klebsiella KP15</i>] >gb ADE35032.1	7,00E-03
1365469..1366809 (reverse), 447 aa	Zf-C4 ClpX	Dedo de zinc tipo ClpX C4	Dominio	1.6e-05	gp258 [Fago de <i>Bacillus G</i>]	2,00E-138
	AAA 2	Dominio AAA (subfamilia Cdc48)	Dominio	5.7e-47		
	ClpB D2-small	Dominio D2 pequeño de la proteína ClpB, C terminal	Dominio	1,00E-12		
1366811..1367623 (reverse), 271 aa	Hexapep	Hexapeptido de transferasa bacteriana(seis repeticiones)	Repetición	6.7e-05	O-acetiltransferasa de cápsula K1 [Fago de <i>Enterobacteria CUS-3</i>] >emb CAZ00810.1	1,00E-06
	Hexapep	Hexapeptido de transferasa bacteriana(seis repeticiones)	Repetición	0.0018		
	Hexapep	Bacterial transferase hexapeptide (six repeats)	Repetición	6,00E-11		
	Hexapep	Hexapeptido de transferasa bacteriana(seis repeticiones)	Repetición	0.0015		
	Acetyltransferase 11	Udp N-acetylglucosamina O-aciltransferasa; dominio 2	Dominio	1.3e-16		
1367626..1368105 (reverse), 160 aa	FabA	Dominio tipo FabA	Dominio	1.9e-41	Proteína hipotética PSSM2_264 [Fago de <i>Prochlorococcus P-SSM2</i>] >gb AAX44641.1]	7,00E-04
1368287..1368688 (reverse), 134 aa	FliW	Proteína FliW	Familia	2.5e-31	Putativa dUTPasa [Fago de <i>Bacillus SPBc2</i>] >ref NP_389883.1 Deoxiuridine 5'-trifosfato nucleotidohidrolasa [<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168</i>] >emb CAB13893.1	2,00E-04
1368892..1369002 (direct), 37 aa					Putativa lipoproteína fágica [Fago de <i>Enterobacteria RTP</i>] >emb CAJ42249.1	2,00E-03
1369140..1369736 (direct), 199 aa	YfiO	Lipoproteína de membrana externa	Dominio	2.3e-18	gp569 [Fago de <i>Bacillus G</i>]	8,00E-03
1369778..1371643 (direct), 622 aa	LON	Dominio proteasa ATP-dependiente La (LON)	Familia	2.6e-25	Producto proteico sin nombre [Fago de <i>Aeromonas phiAS5</i>] >gb ADM79990.1 subunidad abrazadera [Fago de <i>Aeromonas phiAS5</i>]	2,00E-06
	AAA	ATPase Familia de ATPasas relacionadas con varias funciones celulares (AAA)	Familia	5.1e-22		

Tabla 22. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* del profago 3

ORF (posición, sentido y Nº de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
1351577..1352977 (rev), 467 aa	DnaB	Dominio N terminal de helicasa tipo DnaB	Dominio	1.2e-17	Proteína hipotética PHI105_00085 [Fago de <i>Bacillus phi105</i>]	2,00E-004
	DnaB C	Dominio C terminal de helicasa tipo DnaB	Dominio	1.4e-101		
1352980..1354113 (rev), 378 aa	HisKA	Dominio His Kinasa A (fosfoaceptor)	Dominio	3.2e-05	Holina fágica, Familia LL-H [<i>Lactobacillus crispatus</i> 214-1] >gb EFD98729.1]	4,00E-005
	HATPase	Histidina kinasa-, ADN girasa B-, y ATPasa tipo HSP90	Dominio	2.5e-10		
1354148..1354789 (rev), 214 aa	Response reg	Dominio receptor de regulador de respuesta	Dominio	1.3e-23		
	Trans reg C	Proteína reguladora transcripcional, C terminal	Dominio	8.9e-16		
1354872..1355327 (rev), 152 aa	Response reg	Dominio receptor de regulador de respuesta	Dominio	1.3e-23	Putativa endonucleasa homing HNH [Fago de <i>Vibrio ICP1</i>] >gb ADX87844.1]	2,00E-003
	Trans reg C	Proteína reguladora transcripcional, C terminal	Dominio	8.9e-16		
1355473..1355967 (rev), 165 aa	TFIIE alpha	Subunidad alfa de TFIIE	Familia	13	Proteína hipotética SXFG_00223 [Fago de <i>Synechococcus S-CAM8</i>]	5,00E-003
1356044..1356142 (rev), 33 aa					Cje0219 [Fago de <i>Campylobacter CGC-2007</i>]	1,00E-002
1356158..1356574 (rev), 139 aa	N6 N4 Mtase	ADN metilasa	Familia	5.4e-30	DNA adenine methylase [Prochlorococcus phage P-SSM4] >gb AAX46849.1]	4,00E-016
1356642..1356935 (rev), 98 aa	N6 N4 Mtase	ADN metilasa	Familia	7.6e-10	Putativa N6A metiltransferasa [Fago de <i>Prochlorococcus P-SSM2</i>] >gb AAX44446.1] Putativa N6A metiltransferasa [Fago de <i>Prochlorococcus P-SSM2</i>] >gb ACY75944.1] Proteína hipotética conservada [Fago de <i>Prochlorococcus P-SSM2</i>]	1,00E-10
1356922..1357785 (rev), 288 aa	N6 N4 Mtase	ADN metilasa	Familia	1.8e-50	Proteína hipotética 2204_scaffold812_00021 [Fago no identificado]	4,00E-20
1358032..1359447 (direct), 472 aa	N6 N4 Mtase	ADN metilasa	Familia	4.8e-16	Putativa adenina metiltransferasa [Fago de <i>Enterobacteria vB_EcoM-FV3</i>]	1,00E-22
1359431..1360666 (direct), 412 aa	N6 N4 Mtase	ADN metilasa	Familia	3.8e-24	Putativa adenina metiltransferasa [Fago de <i>Escherichia rv5</i>] >gb ABI79300.1] Putativa adenina metiltransferasa [Fago de <i>Escherichia rv5</i>]	2,00E-30

Tabla 23. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* del extremo 3' del profago 3

ORF (posición, sentido y N° de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
1440879..1441160 (rev), 94 aa	T4SS	Tproteínas de sistema de secreción tipo IV	Familia	0.0056	gp30 [Fago de <i>Mycobacterium</i> Predator] >gb ACF05127.1 gp30	7,00E-03
	Mob C	Proteína de movilización bacteriana	Familia	1.7e-06	gp16 [Fago de <i>Enterobacteria</i> BA14] >gb ACF15769.1 gp16	6,00E-03
1441648..1441935 (dir), 96 aa	CagY M	Repetición DC-EC	Repetición	2,00E-13	Proteína hipotética 201phi2-1p369 [Fago de <i>Pseudomonas</i> 201phi2-1] >gb ABY63194.1	2,00E-03
1441968..1442081 (rev), 38 aa					Proteína hipotética RSM3_gp13 [Fago de <i>Ralstonia</i> phage RSM3] >dbj BAG75145.1	2,00E-04
1442247..1442873 (rev), 209 aa	THY1	Proteína complemento de timidilato sintetasa	Familia	4.3e-42	Putativa subunidad pequeña de terminasa	7,00E-03
					Timidilato sintetasa [Fago de <i>Campylobacter</i> NCTC12673] >gb AEA86402.1 Thymidylate synthetase [Campylobacter phage NCTC12673]	5,00E-54
1442895..1444688 (rev), 598 aa	GATase 6	Dominio glutamina amidotransferasa	Dominio	4.2e-24	Proteína hipotética ORF004 [Fago de <i>Pseudomonas</i> PA11]	5,00E-11
	SIS	Dominio SIS	Familia	7,00E-24		
	SIS	Dominio SIS	Familia	2,00E-08		
1444689..1444928 (rev), 80 aa	DUF2443	Proteína de función desconocida (DUF2443)	Familia	3,00E-43	Protector de lisis precoz inducida por profago rIIA [Fago de <i>Enterobacteria</i> RB16] >gb ADJ55306.1	5,00E-03
1444971..1445513 (rev), 181 aa	PNP UDP	Superfamilia de fosforilasas	Dominio	1.8e-06	Terminasa fágica, subunidad grande, familia pbsx [<i>Listeria seeligeri</i> FSL N1-067]	4,00E-04
1445666..1447033 (dir), 456 aa	Bac DnaA	Proteína DnaA bacteriana	Familia	5.7e-79	Proteína de replicación [Fago Gifsy-2] >ref YP_001700631.1 Proteína de replicación de ADN fágica homóloga de DnaC [Fago Gifsy-1] >ref YP_001700656.1 Proteína de replicación de ADN fágica [Fago Gifsy-2] >gb AAL19949.1 ATPasa del profago Gifsy-2 implicada en la iniciación de la replicación de ADN [Fago Gifsy-2] >emb CBW17049.1	1,00E-09
	Bac DnaA	Proteína DnaA bacteriana hélice-giro-hélice	Dominio	5.9e-08		
1447186..1447263 (rev), 26 aa					producto proteico sin nombre [Fago de <i>Bacillus</i> W.Ph.] >gb ADH03240.1	2,00E-03
1447262..1448692 (dir), 477 aa					gp26 [Fago de <i>Roseobacter</i> SIO1] >gb AAG02609.1 AF189021_29 gp26 [Fago de <i>Roseobacter</i> SIO1]	6,50E-02
1448873..1449625 (dir), 251 aa	Exo endo	Familia endonucleasa/exonucleasa/fosforilasa	Dominio	6.9e-26	Putativa integrasa fágica [<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> str. ATCC 27774] >gb ACL48183.1	2,00E-03
1449622..1450257 (rev), 212 aa	HP OMP	Proteína de membrana externa de <i>Helicobacter</i>	Familia	2.5e-27	Putativa proteína de ensamblaje de fibra de la cola [Fago de <i>Enterobacteria</i> phiP27] >emb CAC83573.1	1,00E-04
1450261..1450617 (rev), 119 aa					gp57 [Fago de <i>Bacillus</i> G]	3,30E-02

Tabla 24. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* del extremo 5' del profago 4

ORF (posición, sentido y Nº de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
1452628..1453941 (direct), 438 aa	N6N4 Mtase	ADN metilasa	Familia	1.6e-48	Mod [Fago de <i>Enterobacteria</i> P7]	9,00E-58
1453938..1454519 (direct), 194 aa					Proteína de cinta métrica de la cola TP901 [Clostridium perfringens ATCC 13124] >gb ABG84381.1	8,00E-05
1454522..1456864 (direct), 781 aa	ResIII	Subunidad res de enzima de restricción tipo III	Familia	6.6e-16	Res [Fago de <i>Enterobacteria</i> P7]	6,00E-70
1456885..1457433 (direct), 183 aa					Res [Fago de <i>Enterobacteria</i> P7]	1,00E-18
1457492..1457572 (reverse), 27 aa					ADN primasa [Fago de <i>Lactobacillus</i> Sal4] >gb ABE00010.1 ADN primasa [Fago de <i>Lactobacillus</i> Sal4] >gb ADJ79267.1	1,00E-03
1457553..1461512 (direct), 1320 aa	Eco57I	Eco57I metilasa de restricción-modificación	Dominio	1.2e-23	Proteína hipotética NCTC12673_gp055 [Fago de <i>Campylobacter</i> NCTC12673] >gb AEA86401.1	7,00E-21
	TaqI C	Dominio de especificidad C terminal tipo TaqI	Dominio	6.4e-15		
1461513..1462052 (direct), 180 aa					Proteína semejante a ARN polimerasa [Fago de <i>Ralstonia</i> RSB2]	4,00E-03
1462087..1462200 (reverse), 38 aa					Producto proteico sin nombre [Fago de <i>Synechococcus</i> Syn19] >gb ADO99469.1	3,00E-03
1462550..1462987 (direct), 146 aa	DUF 4065	Proteína de función desconocida (DUF4065)	Familia	2.9e-22	Proteína asociada a fagos [<i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 = CCUG 17874]	8,00E-102
					Proteína hipotética NCTC12673_gp055 [Fago de <i>Campylobacter</i> NCTC12673] >gb AEA86401.1	4,00E-20

Tabla 25. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* del profago 4

ORF (posición, sentido y Nº de aa)	Familia	Descripción	Familia/ Dominio	valor E	RELACIÓN CON FAGOS	valor E
1463735..1463902 (rev), 56 aa					Helicasa de la familia SNF2 [Fago de <i>Bacillus</i> phage SP10]	2,00E-03
1463966..1465153 (rev), 396 aa	NusA N	Dominio N terminal de NusA	Dominio	9.1e-16	Proteína hipotética RB32ORF194c [Fago de <i>Enterobacteria</i> RB32] >gb ABI95018.1	5,00E-03
	KH 5	Dominio KH semejante a NusA	Dominio	7.3e-23		
1465255..1466427 (rev), 391 aa	SelA	Seleniotransferasa L-seril-ARNt	Familia	1.6e-119	gp29 [Fago de <i>Mycobacterium</i> George]	1,00E-03
TonB dependent receptor	Plug	Dominio enchufe receptor dependiente de TonB	Dominio	4.3e-18	Producto del gen gp41 [Fago de <i>Synechococcus</i> S-SM1] >gb ADO97167.1 ADN primasa-helicasa [Fago de <i>Synechococcus</i> S-SM1]	4,00E-03
	TonB dep	Receptor dependiente de TonB	Familia	3.4e-15		
1469439..1469789 (rev), 117 aa					Subunidad grande de terminasa [Fago de <i>Enterobacteria</i> phiEco32] >gb ABY52808.1	5,00E-04
1469773..1470126 (rev), 118 aa	FolB	Dihidroneopterina aldolasa	Dominio	1.3e-19	Proteína cinta métrica de la cola [<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>natto</i>] >dbj BAJ77091.1]	2,00E-003
1470123..1470911 (rev), 263 aa	G3P acyltransf	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa	Familia	6.3e-48	Proteína hipotética lb338_fago_32 [Fago de <i>Lactobacillus</i> Lb338-1] >gb ACO36953.1	3,00E-003
1470891..1472267 (dir), 459 aa	Fer4 5	Dominio de unión 4Fe-4S	Dominio	4.1e-14	Proteína hipotética SaPh711_gp054 [Fago de <i>Salmonella</i> 7-11] >gb AEK81969.1	3,00E-004
	Fer4 18	Dominio digrupo 4Fe-4S	Dominio	2.4e-11		
	Bre5	Proteína asociada a Ubp3 Bre5	Dominio	7.2e-19		

Tabla 26. Análisis de proteínas relacionadas con fagos y sus homólogos en *Pfam* del extremo 3' del profago 4

RESULTADOS

4.5.6 Detección de secuencias compatibles con CRISPR

El análisis de la secuencia completa del genoma de HP146128 con *CRISPR Finder* ofreció los siguientes resultados:

Se identificaron 2 CRISPR confirmados y uno posible.

Su localización en el genoma puede verse en la figura 13.

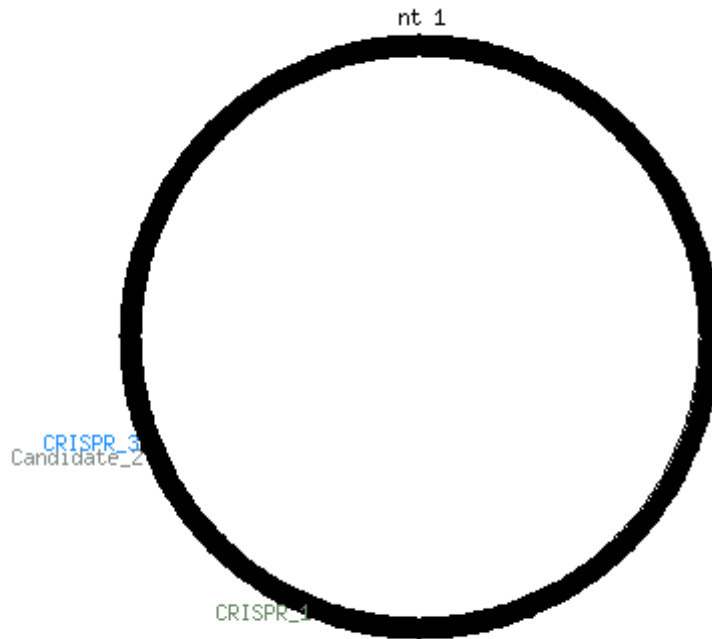


Figura 13. Localización de secuencias CRISPR en el genoma de HP146128

El primero de los CRISPR está situado entre las posiciones 900385 y 900580. Consiste en 4 repeticiones de la secuencia palindrómica: TTCAATCAAGGGACTTATCACTTTA

y tres espaciadores:

GTAACAGCGCAAGTTCAAGCTTTGATAATAGTAGT,
ATAGTGCTCAATCTGCTTTTAATAACAGCAAT y
ATAATAACGCTAGCTTTAATAACAACACC.

La secuencia repetida no está presente en otros CRISPR ya identificados en otros genomas. La comparación mediante BLASTX de los espaciadores indicó una gran semejanza una proteína descrita en varias cepas de *H. pylori* como “proteína de

RESULTADOS

membrana semejante a la toxina vacuolizante” (CAX29430.1, *Putative toxin-like outer membrane protein/vacuolating cytotoxin (VacA) paralogue [H. pylori B38]*, valor E: 3 e-77).

La segunda de las secuencias CRISPR, situada entre las posiciones 1111244 y 1111452 está compuesta por 4 repeticiones de la secuencia:

TAATTTGATTTGTAGCGTTTTCT

y tres espaciadores con las siguientes secuencias:

TTAGCTTGGTTTAGGGCTTCAAAGCTTTCGGTTTTGTTGGTGT,

TTCGCTTGTGTGATCGCTTCAAAGGCTTTGCGTTTTGTTTTCGG y

CTGGCTTGGTTTAAAAGATTTGATAGCTCG.

De nuevo, no se encontró esta misma secuencia repetida en otros CRISPR identificados con anterioridad. En cuanto a la comparación con la base de datos de proteínas no redundantes, la mayor similitud encontrada correspondió a una hipotética proteína presente en distintas cepas de *H. pylori* aunque, con menor relevancia, se encontró también alguna similitud con proteínas de origen fágico (tabla 27).

Proteína	Valor E
gb/ADU81936.1/ proteína hipotética HPGAM_05745 [<i>Helicobacter pylori</i> Gambia94/24]	2,00E-027
gb/EGC81052.1/ proteía menor estructural fágica, dominio N terminal [<i>Lactobacillus iners</i> UPII 60-B]	4,00E-006
gb/ACN74629.1/ putativa tail proteína de la punta de la cola [Fago de <i>Enterobacteria</i> SSL-2009a]	2,00E-005
gb/AEC18425.1/Phage-related protein, tail component [<i>Gallibacterium anatis</i> UMN179]	6,00E-005

Tabla 27. Coincidencias con proteínas conocidas de las secuencias de los espaciadores del CRISPR 2

Por último el posible tercer CRISPR está situado entre las posiciones 1099943 y 1100028 y está compuesto por dos repeticiones de la secuencia:

CATGCGAGAAGTAGTGGTTCAAGAAC,

y un espaciador con la secuencia:

GCTTCAAGGGAGTTTTCTTTGATCTCTGTATGGG

RESULTADOS

La secuencia palindrómica repetida tampoco coincide con la de ningún CRISPR descrito previamente y en la comparación con la base de datos de proteínas no redundantes, se encontró un relativo parecido con una proteína presuntamente implicada en la síntesis de LPS de *H. pylori* y sólo una coincidencia remota con una proteína de origen fágico (tabla 28).

Proteína	Valor E
gb/ADI35167.1/proteína de biosíntesis de LPS [<i>Helicobacter pylori</i> v225d]	6,00E-011
emb/CAG27129.1/proteína hipotética [Fago de <i>Pseudomonas</i> EL]	1,00E-004

Tabla 28. Coincidencia con proteínas conocidas de la región espaciadora del posible CRISPR 3

4.6 Detección mediante PCR del gen de la integrasa del profago de *H. pylori* B45 en comparación con la lisogenia.

La PCR para la integrasa del profago de *H. pylori* B45 se llevó a cabo en 68 cepas: 43 no lisogénicas y 25 lisogénicas de acuerdo a la presencia de placas de inhibición tras la inducción con mitomicina C.

En 12 de ellas se detectó el gen de la integrasa.

El resultado para cada una de las cepas se refleja en la tabla 29.

RESULTADOS

CEPA	PCR DE INTEGRASA	LISOGENIA
146128	N	SÍ
184184	N	NO
185922	P	NO
186788	P	NO
187309	N	NO
187510	N	NO
190657	N	SÍ
190804	P	SÍ
191033	P	SÍ
191830	P	NO
200356	P	NO
200810	N	NO
200836	P	SÍ
3070564	N	SI
3094490	N	SI
165034-50	N	NO
180901-44	N	NO
182167-26	N	NO
182764-51	P	NO
185662-18	P	NO
186695-22	N	NO
186867-38	N	NO
187112-9	N	NO
187505-11	N	NO
187510-12	P	NO
190806-59	N	NO
191033-55	P	NO
201387-41	N	NO
202810-54	P	NO
3066797	N	SI
3066798	N	SI
3067006	N	NO
3067007	N	NO
3067479	N	SI
3069376	N	NO
3069578	N	SI
3069579	P	SI
3069977	N	NO
3070184	N	NO
3070188	N	NO
3071585	N	NO
3071586	N	NO
3072440	N	NO
3072905	N	NO
3072909	N	NO
3073879	N	SI
3073884	N	SI
3073885	N	NO
3074082	N	SI
3074297	N	SI
3075489	N	SI
3075508	N	NO
3076962	N	SI
3078407	N	NO
3091353	P	NO
3092253	N	SI
3092261	N	SI
3092691	N	NO
3092692	P	NO
3095302	N	SI
3095305	N	NO
3095308	N	NO
3096261	N	SI
3097814	N	SI
3097815	N	SI
3099770	N	SI
3099771	N	NO
TIGR 26695	N	NO

Tabla 29. Resultados de inducción de lisogenia con mitomicina C y PCR de integrasa del profago de *H. pylori* B45 (P, positivo; N, negativo)

RESULTADOS

El índice Kappa se calculó a partir de estas observaciones resumidas en la tabla 30. Su valor fue 0,105.

	PCR DE INTEGRASA		
		Positivo	Negativo
LISOGENIA	Sí	4	21
	No	11	32

$$\kappa = 0,105$$

Tabla 30. Comparación entre lisogenia y PCR de integrasa de *H. pylori* B45

4.7 Relación entre lisogenia, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y gravedad de la infección.

4.7.1 Factores de virulencia

La tabla 31 recoge los resultados para la lisogenia y los factores de virulencia de todas aquellas cepas para las que éstos fueron determinados mediante PCR.

RESULTADOS

CEPA	LISOGENIA <i>vacA m</i>		<i>vacA s</i>	<i>cag A</i>
146128	SÍ		s2	Negativo
184184	NO	m2	s2	Negativo
185922	NO	m2	s2	Negativo
186589	SÍ	m1	s1	Positivo
186695	NO	m2	s1	Positivo
186788	NO	m2	s2	Negativo
186985	NO		s2	Negativo
187510	NO	m1	s1	Positivo
190657	SÍ	m2	s1	Positivo
190804	SÍ	m2	s1	Positivo
191033	SÍ	m1	s1	Positivo
191830	NO	m2	s1	Positivo
200836	SÍ	m2	s2	Negativo
200837	SÍ	m2	s2	Negativo
3070564	SÍ		s1	Positivo
165034-50	NO	m2	s2	Negativo
180901-44	NO	m2	s2	Negativo
182167-26	NO	m1	s1	Positivo
182764-51	NO	m2	s2	Negativo
185662-18	NO		s1	Positivo
186695-22	NO	m2	s1	Positivo
186867-38	NO	m2	s2	Negativo
187112-9	NO		s2	Negativo
187505-11	NO		s2	Negativo
190806-59	NO	m2	s2	Negativo
191033-55	NO	m1	s1	Positivo
201387-41	NO	m1 m2	s2	Negativo
202810-54	NO	m2	s2	Negativo
3066797	SÍ		s2	Negativo
3066798	SÍ		s2	Negativo
3067479	SÍ		s2	Negativo
3069577	NO		s2	Negativo
3069578	SÍ		s2	Negativo
3069579	SÍ		s2	Negativo
3073879	SÍ		s2	Negativo
3073884	SÍ		s2	Negativo
3074082	SÍ		s1	Positivo
3074297	SÍ		s2	Negativo
TIGR 26695	NO		s1	Positivo

Tabla 31. Resultados de la inducción mediante mitomicina C y de la detección de factores de virulencia mediante PCR

RESULTADOS

Estos resultados fueron analizados en tablas de 2x2 para tratar de establecer las posibles relaciones entre la lisogenia y cada uno de los determinantes de virulencia estudiados (Tablas 32 a 34)

	<i>vacA m</i>		
		m1	m2
LISOGENIA	No	4	13
	Sí	2	4

$$p=0,63$$

Tabla 32. Relación entre lisogenia y presencia de m1 o m2 de *vacA*

	<i>vacA s</i>		
		s1	s2
LISOGENIA	No	8	14
	Sí	6	11

$$p=1$$

Tabla 33. Relación entre lisogenia y presencia de s1 o s2 de *vacA*

	<i>cagA</i>		
		Positivo	Negativo
LISOGENIA	No	8	14
	Sí	6	11

$$p=1$$

Tabla 34. Relación entre lisogenia y presencia o ausencia de *cagA*

4.7.2 Resistencia a antibióticos

Los datos de resistencia a los principales antibióticos y de lisogenia (establecida por la presencia de placas de inhibición tras cultivar en presencia de mitomicina C) de cada una de las cepas se muestran en la tabla 35.

RESULTADOS

CEPA	LISOGENIA	Amoxicilina	Tetraciclina	Metronidazol	Clarithromicina	Ciprofloxacino	Rifampicina
146128	SI	S	S	R	S	S	S
184184	NO	S	S	R	S	S	S
185922	NO	S	S	R	R	R	S
186589	SI	S	S	R	S	S	I
186695	NO	S	S	R	R	S	S
186788	NO	S	S	S	S	S	I
186985	NO	S	S	S	S	S	S
187309	NO	S	S	R	S	S	S
187510	NO	S	S	S	S	S	S
190657	SI	S	S	S	S	S	S
190804	SI	S	S	S	S	S	S
191033	SI	R	S	S	R	S	S
191830	NO	S	S	S	S	S	S
200356	NO	S	S	R	S	S	S
200836	SI	S	S	S	S	S	S
200837	SI	S	S	S	R	S	S
3066797	SI	S	S	S	R	S	S
3066798	SI	S	S	S	S	S	S
3067006	NO	S	S	S	R	S	S
3067007	NO	S	S	S	S	S	S
3067479	SI	S	S	S	R	S	S
3069376	NO	S	S	S	S	S	S
3069577	NO	S	S	S	R	S	S
3069578	SI	S	S	R	S	S	S
3069579	SI	S	S	R	R	S	S
3069580	NO	S	I	R	S	S	S
3069977	NO	S	S	S	R	S	S
3070184	NO	S	S	S	S	S	I
3070188	NO	S	S	S	R	S	S
3070560	NO	S	S	S	S	S	R
3070564	SI	S	S	R	R	S	S
3071585	NO	S	S	S	R	S	S
3071586	NO	S	S	S	R	S	S
3072440	NO	S	S	S	R	S	S
3072905	NO	S	S	S	S	S	S
3072909	NO	S	S	R	S	S	I
3073879	SI	S	S	S	R	S	S
3073880	NO	S	S	S	R	S	S
3073884	SI	S	S	S	S	S	S
3073885	NO	R	S	R	R	S	S
3074082	SI	S	S	R	R	R	S
3074297	SI	S	S	S	R	S	S
3075489	SI	S	S	S	S	S	S
3075508	NO	S	S	S	S	S	S
3076962	SI	S	S	S	S	S	S
3078407	NO	S	S	S	R	S	S
3091353	NO	S	S	S	S	S	S
3092253	SI	S	S	S	R	S	S
3092261	SI	S	S	S	R	S	S
3092691	NO	S	S	R	S	S	S
3092692	NO	S	S	R	R	S	S
3094490	SI	S	S	S	R	S	S
3095087	NO	S	S	S	S	S	S
3095302	SI	S	S	S	S	S	S
3095305	NO	S	S	S	S	S	S
3095307	NO	S	S	S	S	S	S
3095308	NO	S	S	S	S	S	S
3096261	SI	S	S	S	R	S	S
3097814	SI	S	S	R	S	S	R
3097815	SI	S	S	S	R	S	S
3099770	SI	S	S	S	R	S	S
3099771	NO	S	S	S	R	S	S
165034-50	NO	S	S	S	R	S	S
180901-44	NO	S	S	S	S	S	S
182167-26	NO	S	S	R	S	S	S
182764-51	NO	S	S	R	S	S	S
185662-18	NO	S	S	S	S	S	S
186695-22	NO	S	S	R	R	S	S
186867-38	NO	S	S	S	R	S	S
187112-9	NO	S	S	R	S	S	S
187505-11	NO	S	S	R	R	S	S
187510-12	NO	S	S	S	S	S	S
190806-59	NO	S	S	S	S	S	S
191033-55	NO	R	S	S	R	S	S
201387-41	NO	S	S	S	S	S	S
202810-54	NO	S	S	S	S	S	S
TIGR 26695	NO	S	S	S	S	S	S

Tabla 35. Resultados de lisogenia mediante inducción en mitomicina C y de sensibilidad a antimicrobianos (S, sensible; R, resistente; I, intermedio)

RESULTADOS

Para cada uno de los antibióticos se construyó una tabla 2x2 y se calculó la p de la posible relación (tablas 36 a 41).

	Amoxicilina		
		S	R
Lisogenia	Sí	26	1
	No	48	2

$$p=1$$

Tabla 36. Relación entre lisogenia y sensibilidad a amoxicilina

	Tetraciclina		
		S	I
Lisogenia	Sí	27	0
	No	49	1

$$p=1$$

Tabla 37. Relación entre lisogenia y sensibilidad a tetraciclina

	Metronidazol		
		S	R
Lisogenia	Sí	21	6
	No	35	15

$$p=0,59$$

Tabla 38. Relación entre lisogenia y sensibilidad a metronidazol

	Claritromicina		
		S	R
Lisogenia	Sí	12	15
	No	31	19

$$p=0,16$$

Tabla 39. Relación entre lisogenia y sensibilidad a claritromicina

	Ciprofloxacino		
		S	R
Lisogenia	Sí	25	1
	No	49	1

$$p=1$$

Tabla 40. Relación entre lisogenia y sensibilidad a ciprofloxacino

RESULTADOS

	Rifampicina		
		S	I+R
Lisogenia	Sí	25	2
	No	46	4

p=1

Tabla 41. Relación entre lisogenia y sensibilidad a rifampicina

4.7.3 Gravedad de la infección

En cuanto a la gravedad clínicopatológica y su relación con la lisogenia de la cepa causante de la infección, los datos se muestran en la tabla 42.

RESULTADOS

CEPA	LISOGENIA	Gravedad Clínica
146128	SÍ	Leve
184184	NO	Leve
186589	SÍ	Elevada
186695	NO	Leve
186788	NO	Leve
186985	NO	Elevada
187309	NO	Leve
187510	NO	Leve
190657	SÍ	Leve
191033	SÍ	Leve
191830	NO	Leve
200837	SÍ	Leve
3095087	NO	Leve
3095307	NO	Leve
165034-50	NO	Leve
180901-44	NO	Leve
182167-26	NO	Leve
182764-51	NO	Leve
185662-18	NO	Leve
186695-22	NO	Leve
186867-38	NO	Leve
187112-9	NO	Leve
187510-12	NO	Leve
190806-59	NO	Leve
191033-55	NO	Leve
3066797	SI	Leve
3066798	SI	Leve
3070184	NO	Leve
3070188	NO	Leve
3072440	NO	Leve
3073880	NO	Leve
3073885	NO	Leve
3092261	SI	Leve
3095302	SI	Leve
3095305	NO	Leve
TIGR	NO	Leve

Tabla 42. Resultados de lisogenia mediante inducción con mitomicina C y gravedad de la infección

	Gravedad		
	Leve	Elevada	
Lisogenia	Sí	8	1
	No	26	1

p=0,44

Tabla 43. Relación entre lisogenia y gravedad de la infección

5 DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

5.1 Resistencia a los antibióticos y presencia de factores de virulencia

La frecuencia con la que se administran tratamientos antibióticos frente a la infección por *H. pylori* junto al escaso número de opciones de las que se dispone ha hecho que la prevalencia de las resistencias (especialmente frente a macrólidos y nitroimidazoles) haya aumentado considerablemente en las últimas décadas (Gerrits *et al.* 2006). Los antibióticos más utilizados son amoxicilina, claritromicina y metronidazol mientras que las quinolonas, la tetraciclina y la rifampicina se emplean más en regímenes de rescate.

Las resistencias frente a metronidazol entre nuestras cepas alcanzaron una prevalencia del 27,6% (tabla 6). Existe una relación entre el nivel de desarrollo de la población estudiada y la prevalencia de resistencias frente a este antibiótico debida, probablemente, a que en los países tropicales se utiliza con mayor frecuencia como antiparasitario. Así, algunos estudios comunican una prevalencia en torno al 35% en países desarrollados y casi del 100% en países en vías de desarrollo (Gerrits *et al.* 2006). En cualquier caso, hay importantes diferencias de unos estudios a otros y algunos cifran la prevalencia total en torno al 27% (De Francesco *et al.* 2010). En nuestro país, los datos publicados recientemente oscilan entre un 37,5% y un 45% (Agudo *et al.* 2009; Cuadrado-Lavín *et al.* 2012). El estudio de Agudo y colaboradores se desarrolló en el mismo laboratorio y empleando los mismos métodos que en nuestro caso aunque la población incluida era solamente pediátrica. Aunque, *a priori*, sería esperable que el porcentaje de resistencias fuera menor en pacientes pediátricos, las diferencias observadas podrían deberse a la escasa reproducibilidad de los métodos utilizados para detectar la resistencia (Glupczynski *et al.* 2002).

Las resistencias frente a claritromicina parecen estar ligadas al consumo de macrólidos por lo que se aprecian diferencias geográficas y una mayor prevalencia en pacientes pediátricos (Koletzko *et al.* 2006). Datos recientes estiman la resistencia a nivel global en el 17,2% (De Francesco *et al.* 2010) La prevalencia observada en este estudio (44,7%) está en consonancia con la observada en otros realizados en nuestro país: 35,6% (Agudo *et al.* 2009) en población general y 54,6% en población pediátrica.

En cuanto a los demás antibióticos, todos los porcentajes fueron bajos: 2,6%

DISCUSIÓN

para amoxicilina, 2,7% para levofloxacino y 7,9% para rifampicina (no se encontraron cepas resistentes a tetraciclina); estos niveles son similares a los publicados en otros estudios de nuestro entorno salvo quizá porque no se refleja el reciente aumento en la resistencia a quinolonas comunicado por algunos autores (Cuadrado-Lavín et al. 2012; Raymond *et al.* 2010).

CagA y VacA son dos de los factores de virulencia mejor conocidos de *H. pylori*. Las cepas CagA positivas (en países donde la prevalencia de CagA es moderada) y aquellas con la variante s1 (y en menor medida con m1) de VacA se relacionan con una frecuencia mayor de manifestaciones gástricas graves (Yamaoka 2010; van Doorn *et al.* 1998; Ogiwara *et al.* 2009). El porcentaje de cepas *cagA* positivo fue del 45,9% (tabla 7), menor que el observado en otros estudios llevados a cabo en países europeos como Países Bajos (67%) (Van Doorn *et al.* 1998) o Italia (51,8%) (Chiarini *et al.* 2009) pero algo mayor que el encontrado recientemente por Somodevilla o Agudo (26,2% y 37,3% respectivamente) en pacientes de hospitales españoles (Somodevilla 2012; Agudo *et al.* 2010). El factor más relevante que influye en la presencia de este factor de virulencia es el origen geográfico de los pacientes, un dato no analizado en este estudio.

El genotipo más frecuente en cuanto a *vacA* fue *m2 s2* (tabla 7), tal y como ya se había comunicado en España en estudios previos (Alarcón *et al.* 1999). El 64,1% de las cepas mostraba *s2*, en una correlación absoluta con las cepas *cagA* negativo; una asociación ya detectada anteriormente (Agudo *et al.* 2010). El número de cepas para las que se pudo realizar la detección de la variante *m* fue considerablemente menor (22) pero cabe destacar que, entre éstas, todas las que presentaron *s2* fueron también positivas para *m2*. Además, se dio la circunstancia de que una de las cepas presentaba ambas variantes de la región *m*. Este fenómeno ya era conocido con anterioridad y parece que, en cuanto a su virulencia, podrían comportarse del mismo modo que las cepas *m1* (Ji *et al.* 2000).

5.2 Inducción de cepas lisogénicas de *H. pylori* con mitomicina C

Dentro de los posibles agentes físicos o químicos que provocan la inducción de cepas lisogénicas, la luz ultravioleta y algunos compuestos mutágenos que alteran el

DISCUSIÓN

ADN bacteriano son los más utilizados *in vitro*. La mitomicina C es uno de estos compuestos. Se trata de un compuesto natural que contiene aziridina y produce entrecruzamientos en las moléculas de ADN. Dado que la inducción supone una alteración en el equilibrio de los ácidos nucleicos bacterianos con un bloqueo selectivo de la síntesis de ADN, se cree que la capacidad de muchos mutágenos para unirse específicamente a estas moléculas podría ser la causa de la inducción (Thomson y Woods 1975).

Aunque generalmente se emplea en cultivos bacterianos en medio líquido, las dificultades para trabajar con este tipo de cultivos con *H. pylori* hicieron que, en un primer momento nos decantáramos por probar la inducción en medio sólido. Otros investigadores han empleado la concentración capaz de matar al 50% de las bacterias en un cultivo líquido como la concentración idónea para los experimentos de inducción (Muschel y Schmoker 1966). Sin embargo, al trabajar con cultivos en medio sólido, decidimos emplear una concentración tal que no tuviera ningún efecto visible sobre el control negativo (TIGR 26695) y que fuera la dilución inmediatamente inferior a la que producía inhibición del crecimiento sobre el control positivo (la cepa HP146182, una de las más sensibles según la prueba con el disco de 100 ng). El hecho de que una cepa que posteriormente demostró ser lisogénica presente una mayor sensibilidad al efecto antibiótico de la mitomicina C en comparación con una cepa no lisogénica ya había sido descrito y se cree que se debe precisamente a la acción aditiva del antibiótico y la lisis por bacteriófagos (Muschel y Schmoker 1966).

La concentración utilizada finalmente (5 ng/ml) es mucho menor que la empleada previamente en otros microorganismos como los 0,5 mg/ml utilizados en *E. coli*, o *Clostridium sordellii* (Muschel y Schmoker 1966; Shimamura et al. 1974), los 2 mg/ml utilizados en bacterias productoras de ácido glutámico (Shapiro 1976) o los 0,1 mg/ml para *S. pneumoniae* (Ramirez, Severina, y Tomasz 1999; Romero, García, y Mitchell 2009). Esta extremada sensibilidad de *H. pylori* frente a un agente mutágeno como la mitomicina C podría estar relacionada con la aparente ausencia de sistemas de reparación del ADN (Björkholm *et al.* 2001). También es posible que esta característica haya frustrado intentos previos de inducir cepas lisogénicas de *H. pylori*.

DISCUSIÓN

Una vez determinada la concentración de mitomicina C se prepararon placas de agar-sangre con 5 ng/ml de mitomicina C y se observó que, tras una incubación de 48 a 72 h, aparecían, en distintas cepas, las características placas de lisis producidas por la liberación de fagos. La identificación de las placas no fue sencilla en todos los casos ya que las colonias de *H. pylori* son transparentes y poco densas y además, se observó que las bacterias sobrecrecían en las placas si se prolongaba la incubación. El porcentaje de cepas lisogénicas observado mediante este método de inducción fue del 35,5%. Es un dato comparable al observado en otras especies (Langley et al. 2003; Kiliç *et al.* 2001) aunque la prevalencia es muy variable dependiendo de la especie y de la sensibilidad del método empleado. Generalmente, los métodos moleculares son capaces de demostrar una frecuencia mayor de profagos (Ramirez, Severina, y Tomasz 1999; Gutiérrez *et al.* 2012) ya que hay que tener en cuenta que estos sistemas podrían detectar también restos no inducibles de fagos. En este caso, sin embargo, el porcentaje detectado fue mayor que el 21,4% obtenido por Lehours y colaboradores buscando mediante PCR el gen de la integrasa del fago B45 de *H. pylori* (Lehours *et al.* 2011). Este resultado confirmaría que hasta ahora la lisogenia en esta especie ha sido subestimada. Entre las implicaciones que este hallazgo podría tener cabe destacar la contribución de la transducción a la notable diversidad genética de *H. pylori* y la posible participación de los genes de profagos en la virulencia y la adaptación de la bacteria a su particular nicho ecológico.

Las placas de agar-sangre con mitomicina C (5 ng/ml) resultaron ser un sistema rápido y sencillo para comprobar la lisogenia de los distintos aislamientos de *H. pylori*. Todas las comunicaciones relativas a fagos atemperados de *H. pylori* hasta la fecha han partido de aislamientos que liberaban virus de forma espontánea (Heintschel von Heinegg, Nalik, y Schmid 1993; Luo *et al.* 2012; Uchiyama *et al.* 2012) o han encontrado serias dificultades para la inducción de los profagos (Lehours *et al.* 2011). Un sistema tan sencillo como el descrito y con el que se ha observado un porcentaje tan elevado de cepas lisogénicas podría suponer una herramienta muy útil en el descubrimiento y la caracterización de nuevos fagos de *H. pylori*.

Las curvas de crecimiento de dos de las cepas lisogénicas en pequeñas cantidades de medio líquido (100 µl en una placa de *microtiter*) demostraron una caída de la densidad óptica que podría atribuirse a la liberación de bacteriófagos cuando las

DISCUSIÓN

cepas crecían en presencia de mitomicina C (figura 4). En el caso de la cepa 190804 se observa una recuperación del crecimiento al final de la curva que podría deberse a la proliferación de bacterias resistentes.

Con el fin de comprobar si los fagos obtenidos mediante inducción podrían propagarse en otras cepas, se llevó a cabo el experimento de *spot test* en el que los extractos de 6 de las cepas lisogénicas (tras haber sido filtrados) se enfrentaban a cultivos en medio sólido de esas mismas cepas y otras doce cepas no lisogénicas.

En muchos de los cultivos el extracto inhibió el crecimiento bacteriano demostrando la presencia de un agente filtrable (tabla 8). La escasísima concentración en que se encontraba y el efecto desigual del extracto dependiendo de la cepa de procedencia hacen improbable que la inhibición se debiera a la presencia de la mitomicina C. En todos los casos en los que se produjo la inhibición, ésta fue completa y no se observaron placas de lisis. Repetir el experimento con diluciones seriadas de los extractos hasta observar placas aisladas de lisis podría haber sido de ayuda para confirmar que dicho agente filtrable era un bacteriófago y no una bacteriocina y para cuantificar la concentración de bacteriófagos presentes en los extractos (Kutter y Sulakvelidze 2004). Aunque el *spot test* no es el método idóneo para determinar el rango de huésped de un fago, sí puede emplearse como un método de cribado rápido para conocer qué cepas están fuera del rango bactericida del fago (Hyman y Abedon 2010). En este caso, los diferentes rangos observados para cada uno de los extractos parecen indicar la presencia de al menos 6 fagos diferentes aunque no puede asegurarse con total certeza ya que las diferencias podrían deberse en parte a la concentración de fagos de cada uno de los extractos y este es un dato que desconocemos. Por otro lado, las cepas lisogénicas de las cuales se obtuvieron los extractos demostraron ser inmunes a la sobreinfección, lo que es un argumento más en favor de la presencia de fagos en estos extractos. El fenómeno de la inmunidad a la sobreinfección de las bacterias portadoras de un profago por ese mismo virus es bien conocido (especialmente en *Siphoviridae*) y se debe habitualmente a la expresión de la proteína represora que mantiene el estado de latencia del fago atemperado (Kutter y Sulakvelidze 2004).

5.3 Aislamiento de un fago de *H. pylori* tras inducción con mitomicina C

DISCUSIÓN

Con el fin de purificar los fagos inducidos en una de las cepas lisogénicas se decidió cultivar dicha cepa en grandes cantidades de medio líquido en presencia de mitomicina C para después precipitar las partículas víricas utilizando una técnica de separación en dos fases mediante un polímero (PEG) (Kutter y Sulakvelidze 2004) y analizar el precipitado al microscopio electrónico en busca de los posibles fagos.

Las dificultades para conseguir cultivar *H. pylori* en abundante medio líquido se deben a la necesidad de hacer una sucesión de subcultivos en volúmenes cada vez mayores. Dada la riqueza en nutrientes de los medios empleados, la manipulación continua aumenta notablemente las posibilidades de contaminación del medio pero, además, lo prolongado del proceso favorece la agregación de las bacterias y su transformación desde su forma viable a su forma cocoide (Shahamat *et al.* 1991; Westblom *et al.* 1988).

La máxima cantidad que se obtuvo a partir de un aislamiento de HP146128 mediante el procedimiento de subcultivos sucesivos fueron 600 ml por lo que se intentó poner a punto un nuevo sistema para cultivar mayores cantidades con una mínima manipulación y con una monitorización constante. Experimentos anteriores habían fracasado en el intento de cultivar *H. pylori* en medios comercializados para hemocultivos (Westblom *et al.* 1988). Sin embargo, en esta ocasión, la adición de antibióticos (vancomicina y anfotericina B) y suero fetal bovino a un medio ya muy rico en nutrientes como *Bactec Ped Plus* fue determinante para conseguir el éxito del cultivo. Fue mediante este procedimiento como se consiguió alcanzar los 2 litros de cultivo.

La monitorización continua del crecimiento en los frascos permitió observar que en aquellos en los que el microorganismo se cultivó en presencia de 5 ng/ml de mitomicina C se produjo un considerable retraso en alcanzar la fase exponencial del crecimiento lo cual se debió probablemente a la liberación de fagos y la consecuente lisis bacteriana aunque es evidente que algunas bacterias lograron proliferar finalmente debido probablemente a la inmunidad a la sobreinfección (figura 6).

La inoculación de alguna de las cepas sensibles con los extractos fágicos (Kutter y Sulakvelidze 2004) habría logrado probablemente una mayor proliferación de los

DISCUSIÓN

fagos facilitando su posterior observación al microscopio electrónico y la purificación y será una estrategia a explorar en el futuro.

La precipitación de partículas víricas con PEG se realizó tanto a partir de los 600 ml conseguidos mediante subcultivos sucesivos como a partir de los dos litros obtenidos en *Bactec Ped Plus*. En ambos casos, las imágenes de partículas compatibles con bacteriófagos que pudieron observarse al microscopio electrónico fueron muy escasas y ninguna de ellas presentaba una nitidez ni unas características tales que pueda asegurarse que se tratara de viriones o de alguno de sus componentes (figura 7).

Dada la escasez de publicaciones en cuanto a bacteriófagos de *H. pylori*, se dispone de pocas imágenes con las que comparar las observadas en este estudio. Las más claras sin lugar a dudas siguen siendo las del fago HP1 aislado por Heinstchel von Heinegg y colaboradores (Heintschel von Heinegg, Nalik, y Schmid 1993). Se trataba de un fago de la familia *Siphoviridae*, con cabeza poliédrica de 50 a 60 nm de diámetro cola de 170 nm de longitud y con una molécula de ADN bicatenario lineal de 22000 pb como material genético. Marshall y colaboradores describieron en una cepa de *H. pylori* la presencia de fagos icosaédricos sin cola con un diámetro de 40 nm (Marshall *et al.* 1987) y también Goodwin comunicó el hallazgo de una cepa productora de fagos icosaédricos sin cola de 80 a 90 nm de diámetro (Goodwin *et al.* 1989). En un artículo muy reciente, Luo y colaboradores describen un nuevo bacteriófago de *H. pylori* también como miembro de la familia *Siphoviridae*, con cabeza de unos 60 nm y cola de, aproximadamente, 150 nm (Luo *et al.* 2012). El que más se aleja de esta descripción es un virus esférico de unos 68 nm de diámetro y que ha sido el último en ser caracterizado (Uchiyama *et al.* 2013).

En cuanto a las imágenes encontradas tras la inducción con mitomicina C de la cepa HP146128, la primera de ellas (obtenida a partir de los 600 ml de medio líquido BHI suplementado) muestra un conjunto de estructuras que podría corresponder a cabezas esféricas de unos 55 a 65 nm (figura 7, A). Estas imágenes muestran similitudes con las descritas por Uchiyama y colaboradores (Uchiyama *et al.* 2013). Dado que la tinción es negativa, se trataría de cabezas llenas de material genético. Por la disposición en la que se encuentra parecen formar un agregado de partículas. La capacidad de algunos fagos como MS2 o 0305φ8-36 para formar agregados es bien conocida (Dika

DISCUSIÓN

et al. 2011; Serwer, Hayes, y Lieman 2007). También podría tratarse de un agregado de nucleoproteínas similares a las observadas en otros bacteriófagos (Gill, Hull, y Curtiss 1981). De ser así, su densidad en el gradiente de CsCl sería mayor de 1,5 lo que podría en parte explicar su ausencia tras la purificación. Del mismo modo, la presencia de lípidos en su estructura (tal y como describen Uchiyama y colaboradores) también afectaría a la densidad del virion.

Las otras dos imágenes fueron obtenidas a partir del cultivo en *Bactec Ped Plus* suplementado (Figura 7, B y C). La primera podría corresponder a un fago del orden de los *Caudovirales* con cabeza y cola. Su gran tamaño lo situaría fuera del rango de la mayoría de fagos conocidos (menores de 200 nm). El diámetro mayor de su cabeza estaría en torno a los 200 nm y el menor entorno a 170 nm, mayor incluso que el del mayor myovirus descrito hasta la fecha, el fago G con un diámetro de su cápsida de unos 150 nm (Etten 2008). Este tamaño, excepcionalmente grande, podría hacer pensar en que se tratara de un artefacto. Por otro lado, este tipo de fagos de gran tamaño, conocidos como fagos *jumbo*, suelen tener también grandes genomas, lo que no se correspondería con el ADN aislado en este caso. La segunda de las imágenes podría recordar a un fago de la familia *Podoviridae* debido a su corta cola de unos 35 nm aunque posee una cápsida de 170 nm por 135 nm que de nuevo lo sitúa en el límite de los fagos conocidos y por encima los que pertenecen a dicha familia (55 nm en el caso de T7 o 60 nm en el de P22 o Cp1).

La fallida purificación en gradientes de CsCl pudo deberse a la escasez de partículas víricas presentes en el precipitado de PEG. Como ya se ha comentado, a pesar de que la inducción pareció efectiva es posible que la propagación en una cepa que presenta inmunidad a la sobreinfección no haya sido la precisa como para obtener una concentración suficiente de bacteriófagos. La inoculación de una cepa sensible con extractos filtrados de la cepa lisogénica podría, tal vez, suponer una mejora en este sentido.

5.4 Aislamiento del material genético e intentos de digestión y clonación

El tamaño del genoma es una de las características más relevantes de los fagos. Cuanto mayor es el tamaño, mayor el número de genes, mayor la complejidad de los

DISCUSIÓN

viriones y del ciclo infeccioso, más probable la adquisición de genes mediante transferencia horizontal y más frecuente la redundancia genética.

Los genomas de tamaño más pequeño son de 3,5 kpb y corresponden a fagos con ARN de cadena sencilla de la familia *Leviridae*. Los genomas de mayor tamaño, a partir de las 16 kb, corresponden a los fagos con cola. El mayor de todos los conocidos, el del fago G, mide aproximadamente 500 kpb. En cuanto a los genomas de los fagos aislados hasta la fecha en *H. pylori*, el aislado por Heintschel von Heinegg (Heintschel von Heinegg, Nalik, y Schmid 1993) tenía un tamaño de 22 kpb; el profago recientemente detectado por Lehours medía 24,6 kpb (Lehours *et al.* 2011) y el nuevo fago aislado por Luo posee un genoma de 27 kpb (Luo *et al.* 2012). En todos los casos se trató de ADN de doble cadena.

El material genético aislado tras la inducción de profagos en la cepa HP146128 fue una molécula de ADN de doble cadena de una longitud aproximada de 20 kpb lo cual concuerda con las características estimadas para los genomas de los otros fagos de *H. pylori* (Figura 8). No pudo realizarse una medición más exacta ya que pese a los repetidos intentos de digestión con distintas enzimas de restricción, no fue posible obtener fragmentos de menor tamaño. La imposibilidad de procesar el fragmento de ADN con enzimas de restricción resultó determinante también para que no se pudiera lograr la clonación en *E. coli*. Es conocido que *H. pylori* posee gran variedad de sistemas de restricción-modificación, pero en cualquier caso, no parece probable que el material genético del fago sea resistente a tantas enzimas de restricción diferentes por este mecanismo. El motivo por el cual no se consiguió degradar el ADN pudo ser la impureza del mismo pese a repetir en varias ocasiones la purificación con fenol/cloroformo-isoamílico (24:1). Esto, a su vez, pudo estar relacionado con el medio empleado para el cultivo de *H. pylori*. Los medios de Bactec suplementados con resinas capaces de inactivar gran variedad de antibióticos poseen tanto resinas intercambiadoras de cationes que se unen a las moléculas cargadas positivamente como resinas poliméricas de absorción que son capaces de unirse a las regiones hidrofóbicas de casi cualquier antibiótico. Si estas resinas estaban presentes en el momento de la liberación del ADN del virión, podrían haberse unido al ADN. En futuros experimentos sería

DISCUSIÓN

recomendable utilizar medios desprovistos de este tipo de resinas (Spaargaren, Van Boven, y Voorn 1998).

5.5 Análisis de la secuencia completa de HP146128

El tamaño de los distintos genomas de cepas de *H. pylori* publicados en la base de datos del NCBI oscila entre 1,5 y 1,8 Mb estando la mayoría en torno a 1,6 Mb tal y como sucede con el de la cepa HP146128. Dado que hasta hace muy poco tiempo no se había caracterizado completamente el origen de replicación en *H. pylori* (Donczew *et al.* 2012), el primer gen en el genoma fue establecido de manera arbitraria en la mayoría de casos. Muchos de ellos consideraron al gen *nusB* el primero tal y como se había hecho en el caso de la cepa J99. En nuestro caso se decidió alinear todos los *contigs* obtenidos en la secuenciación con el genoma completo de J99 con lo que se obtuvo un orden similar al de esta cepa (figura 12).

A simple vista, llaman la atención dos zonas desapareadas. La primera es una región presente en el genoma de la cepa J99 (desde la posición 500.061 a la 547.691 en la secuencia de J99) y ausente en la cepa HP146128 y corresponde a la isla de patogenicidad Cag. La segunda es una inversión (desde la posición 1.475.137 a la 1.563.951 en el genoma de J99) que ya había sido descrita en el genoma de otra cepa de *H. pylori* HPAG1, (Oh *et al.* 2006).

Después de detectar los posibles genes y traducirlos a proteínas se seleccionaron aquellas que tenían similitud con proteínas fágicas conocidas (tabla 9). No se encontró ningún conjunto de proteínas cuyos genes estuvieran lo suficientemente próximos como para pensar en que formaran parte de la secuencia de un profago. Además, el grado de similitud con proteínas fágicas fue bajo para casi todas las proteínas detectadas. Las únicas con un valor *E* destacable fueron 3 integrasas y un gen Fic/Doc. Las integrasas, pese a su posible origen fágico, forman parte de distintos elementos móviles y se han descrito con anterioridad en *H. pylori* en regiones como la isla de patogenicidad Cag o la zona de plasticidad. De hecho, las tres integrasas encontradas en el genoma de HP146128 parecen estar presentes también en el genoma de J99. En cuanto a las proteínas Fic/Doc se trata de una familia que comprende proteínas tipo Fic (*Filamentous Induced by cAMP*), relacionadas con la división celular y proteínas Doc

DISCUSIÓN

(*Death On Cure*). Éstas últimas inducen la muerte de aquellas bacterias hijas de una bacteria lisogénica que hayan perdido el profago de su progenitora (Lehnherr *et al.* 1993). De cualquier modo hay que tener en cuenta que, hasta la fecha, eran muy escasas las secuencias presentes en las bases de datos correspondientes a bacteriófagos de *H. pylori* y que, entre los muchos genes que no mostraron similitud con proteínas conocidas y aquellos que eran similares a proteínas de función desconocida, podría haber alguno perteneciente a un nuevo fago de *H. pylori*.

En los últimos años, impulsadas por el extraordinario desarrollo de las técnicas de secuenciación, se han desarrollado diferentes herramientas informáticas para la búsqueda de secuencias compatibles con profagos en genomas completos. Algunas de éstas, como *PhageFinder*, *Prophinder* o *Prophage Finder* se basan en la comparación con sus propias bases de datos de genes fágicos (Bose y Barber 2006; Fouts 2006; Lima-Mendez *et al.* 2008). Existen otras basadas en el análisis de la abundancia relativa de dinucleótidos (Srividhya *et al.* 2007) y, por último, las hay también que combinan ambas metodologías (Akhter, Aziz, y Edwards 2012). Sin embargo, ninguna de ellas es perfecta en cuanto a su sensibilidad y especificidad. En este caso se decidió utilizar *Prophage Finder* por cuestiones de accesibilidad. Empleando esta herramienta *online* se detectaron cuatro posibles profagos en el genoma completo de la cepa HP146128. Según las indicaciones de los creadores de *Prophage Finder*, un posible profago empieza a ser valorable a partir de 5 coincidencias con la base de datos. 7 u 8 coincidencias sugieren una alta probabilidad de que se trate de un auténtico profago y a partir de 10 es prácticamente seguro que se trata de la secuencia de un profago. Según estos criterios, aunque el programa detectó 4 posibles profagos (tablas 10 a 13), sólo uno de ellos presenta 6 coincidencias mientras que los otros 3 presentan 5. Además, en el caso de los tres últimos, todos parecen presentar un gen duplicado por lo que había que rebajar el número de coincidencias a 4. Por último, los profagos 1, 2 y 4 poseían homólogos de uno (en los casos de los profagos 1 y 4) o dos (en el caso del profago 2) de sus genes en el genoma de J99, una cepa en la que no se han descrito profagos. Estos resultados parecen, pues, poco concluyentes.

Analizando las coincidencias más destacadas (por su valor *E*) tampoco encontramos una evidencia sólida (tabla 14). gp250, en el profago 1, es una proteína

DISCUSIÓN

presente en distintos fagos de micobacterias aunque parece ser homóloga de la adenilsuccinato sintetasa presente también en diversas bacterias (entre ellas *H. pylori*). También en el profago 1, podemos encontrar la citosina-metilasa del virus de *Sulfolobus* STSV1, con homólogos también en sistemas de restricción-modificación de distintos virus y bacterias. De hecho, *H. pylori* es una de las especies conocidas con mayor número de homólogos de sistemas de restricción-modificación (46 en 26695 y 47 en J99). Estos genes poseen muy probablemente un origen exógeno y se cree que podrían comportarse como auténticos parásitos, pasando de unas bacterias a otras mediante distintos sistemas de transferencia horizontal (incluida la transducción por bacteriófagos) y perpetuándose en su progenie (Kobayashi *et al.* 1999). En el profago 2, además de una de las integrasas con homólogos en el genoma de J99 ya comentadas, aparece una ribonucleótido-reductasa, de nuevo con homólogos en numerosas bacterias. En el profago 3 destacan una metilasa y una subunidad de la ADN polimerasa, dos enzimas comunes en fagos y bacterias. En cuanto al profago 4, las mejores concordancias se obtuvieron para un sistema de restricción-modificación y una proteína de función desconocida que sí parece tener un claro origen fágico.

Cuando se examinaron las regiones 5' y 3' colindantes con los posibles profagos se encontraron nuevas coincidencias con proteínas fágicas (tablas 15 a 26). Por lo que respecta al profago 1, en su región 5' (tabla 15) destacan una proteína hipotética de un fago no identificado obtenido de muestras fecales humanas (Minot *et al.* 2012) y un sistema de transporte de hierro presente en algunos fagos pero también en distintos géneros bacterianos. En la secuencia del propio fago (tabla 16), además de la metilasa ya comentada, encontramos una subunidad de unión a ATP con homólogos en virus y bacterias. En la región 3' (tabla 17), no hay ninguna coincidencia destacable. En cuanto al profago 2, en su extremo 5' (tabla 18) hay una ribonucleasa, en absoluto exclusiva de bacteriófagos. En la secuencia del propio profago (tabla 19), encontramos una sirtuina (proteínas de respuesta al estrés muy conservadas) y un posible componente de la cola de un fago que es, más probablemente, una aminotransferasa. Tampoco aparece ninguna coincidencia destacable en el extremo 3' (tabla 20). En la región 5' del posible profago 3 (tabla 21) y en la región correspondiente al propio profago (tabla 22), encontramos, de nuevo, metilasas mientras que en la 3' destaca una subunidad de unión a ATP (gp258)

DISCUSIÓN

(tabla 23). Por último, en cuanto al posible profago 4, además del sistema de modificación-restricción ya comentado, encontramos dos proteínas relacionadas con un profago de *Campylobacter* (una de ellas homóloga también de una proteína relacionada con fagos descrita en *H. pylori*). La primera se encuentra en la región 5' (tabla 24) y su función parece ser la de una metilasa (timidilato sintasa), la segunda se encuentra en la región del profago (tabla 25) y su función es desconocida (Kropinski *et al.* 2011). Otro dato a tener en cuenta respecto a este posible profago es su situación en el genoma de HP146128 ya que su posición coincide con la gran inversión observada en esta cepa respecto a J99. La inversión comienza en el nucleótido 1.439.743 y el posible profago 4 en 1.440.579. Como ya se ha comentado, los profagos pueden servir de punto de anclaje para inversiones y otros tipos de reordenaciones genómicas (Brüssow, Canchaya, y Hardt 2004).

Cabe la posibilidad de que a pesar de tratarse de una cepa lisogénica, el ADN del virus no se encontrara integrado en la molécula de ADN bacteriano porque su material genético se encontrase en forma de episoma (Uchiyama *et al.* 2013).

Los CRISPRs y las proteínas asociadas a CRISPRs (Cas) son sistemas muy extendidos entre bacterias y arqueas que los defienden de la acción de ácidos nucleicos de origen exógeno. La estructura de los CRISPRs consiste en repeticiones de secuencias palindrómicas separadas por espaciadores cuyas secuencias, no repetidas, se corresponden con fragmentos de las secuencias de bacteriófagos o plásmidos con los que han tenido contacto en algún momento. Estos sistemas actúan en dos fases; una primera de adaptación en la que la bacteria adquiere nuevas secuencias de espaciadores y una segunda en la que los CRISPRs así generados bloquean la expresión del ADN exógeno mediante un mecanismo similar al de interferencia del RNA (Deveau, Garneau, y Moineau 2010). En ocasiones, la expresión no es bloqueada por completo ya que se conocen casos, en arqueas, en los que las secuencias de los espaciadores coinciden con las de los propios profagos presentes en la cepa (Shah, Hansen, y Garrett 2009). En estos casos se cree que podrían tener un papel de regulación de la expresión de los genes fágicos

Mediante el uso de una herramienta informática (CRISPR *Finder*) desarrollada para localizar este tipo de estructuras en un genoma pretendíamos demostrar que el

DISCUSIÓN

genoma de la cepa HP146128 se ha visto modificado tras entrar en contacto con ADN de origen exógeno, posiblemente fágico. De este modo, se detectaron dos CRISPRs confirmados y uno posible en la cepa HP146128 (figura 13). El primero de los CRISPRs encontrados poseía un espaciador que presentaba una coincidencia con una proteína presente en distintas cepas de *H. pylori* y descrito como “proteína de membrana semejante a la toxina vacuolizante”. La expresión de un gen homólogo al que codifica esta proteína (*imaA*) ha demostrado de manera experimental estar regulada por la concentración de ácido y tener un papel modulador de la respuesta inflamatoria del huésped. La presencia de una secuencia similar a la de este gen en un espaciador de un CRISPR apoya el probable origen exógeno de este factor de virulencia (Sause, Castillo, y Ottemann 2012). En el segundo de ellos, se encontraron coincidencias con distintas proteínas fágicas estructurales (tabla 27). La similitud relativamente baja (dados los valores de *E*) podría indicar que los supuestos fagos a partir de los que se adquirió la secuencia sólo están lejanamente emparentados con fagos conocidos, lo cual no es extraño dado el escaso número de fagos descritos en *Helicobacter sp.* En cuanto al tercero de los CRISPR, la presencia de un solo espaciador y la coincidencia de esta secuencia con una proteína bien caracterizada de *H. pylori* hacen poco probable que se trate de un hallazgo significativo (tabla 28).

5.6 Detección del gen de la integrasa del profago de *H. pylori* B45

La detección de un profago inducible en la secuencia de la cepa B45, supuso la primera ocasión en que se comunicaba la secuencia de un bacteriófago de *H. pylori*. Los autores de esta comunicación trataron de determinar la prevalencia del profago en otros aislamientos mediante una PCR en la que se utilizaron dos fragmentos de la secuencia del gen de la integrasa como cebadores. Obtuvieron así una prevalencia del 21,4% (Lehours *et al.* 2011). La búsqueda del gen de la integrasa mediante PCR en las cepas de nuestro estudio, ofreció un porcentaje de cepas portadoras del gen del 18% (tabla 29), no muy distinto del obtenido por Lehours *et al.* en su estudio. Sin embargo, resultó sorprendente la escasa coincidencia entre las cepas portadoras del gen de la integrasa y las cepas que mostraron ser lisogénicas mediante la inducción con mitomicina C con un índice Kappa del 0,1 que indica una correlación muy pobre (tabla 30). Es más, la cepa

DISCUSIÓN

lisogénica HP146128, utilizada para la secuenciación y análisis de su genoma, dio un resultado negativo. Existen varias explicaciones posibles para esta aparente contradicción. Por un lado, desconocemos la diversidad genética de los bacteriófagos de *H. pylori*. Desde este punto de vista, la inducción con mitomicina C podría ser capaz de detectar no sólo aquellos profagos con una integrasa similar a la de B45 sino también otros, no relacionados filogenéticamente con éste, cuya integrasa presentara una secuencia distinta. Además, la estrategia seguida en el estudio de Lehours *et al.* para determinar la prevalencia de profagos en aislamientos de *H. pylori* podría no ser la más adecuada. De hecho, la búsqueda de un único gen como marcador de la presencia de bacteriófagos podría ser un sistema poco sensible y específico. El gen de la integrasa es un gen relativamente conservado entre distintos fagos pero existen fagos que carecen de él (como los que se comportan como plásmidos en el interior de la bacteria huésped) y, por otro lado, existen elementos móviles como plásmidos, integrones o islas de patogenicidad que también presentan genes de integrasas. Así que, aunque la mayoría de fagos atemperados poseen en su secuencia un gen de la integrasa, su presencia no es ni necesaria ni suficiente para demostrar la existencia de un profago (Casjens 2003).

5.7 Relación entre lisogenia, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y gravedad de la infección

Tal y como se comentó en la introducción, los fagos atemperados son capaces de modificar el genoma de las bacterias en las que se integran mediante diversos mecanismos. Como consecuencia de estas alteraciones, la bacteria huésped puede sufrir una conversión lisogénica y expresar así nuevos factores de virulencia o nuevos mecanismos de resistencia frente a antibióticos. Por supuesto, estos dos elementos, virulencia y resistencia son cruciales en la patogenia y la gravedad de una infección. Son muchos los genes y proteínas que se han postulado como posibles factores de virulencia de *H. pylori*. Algunos tienen una implicación más evidente en el cuadro clínico observado, otros han ofrecido resultados contradictorios en distintos estudios. Por desgracia, ninguno de ellos parece explicar por sí mismo las grandes diferencias existentes entre los distintos cuadros comprendidos dentro del espectro clínico originado por la infección por *H. pylori*. Dos de los factores más estudiados y con una mayor

DISCUSIÓN

evidencia demostrada son CagA y VacA. En este estudio se comparó la existencia de lisogenia con la presencia o ausencia de *cagA* y con el tipo de segmentos *s* y *m* de *vacA* expresada por las cepas (tabla 31). La lisogenia mostró una total independencia tanto de *cagA* (tabla 34) como de *vacA* *s* (tabla 33) mientras que la ligera tendencia a la asociación entre cepas lisogénicas y presencia de la variante *m2* de *vacA* (tabla 32), no fue significativa. En cualquier caso, el número de cepas en las que se analizó la variante *m* de *vacA* fue demasiado pequeño como para extraer cualquier tipo de conclusión definitiva.

Se conocen con detalle los genes que codifican tanto CagA como VacA y ninguno de ellos parece estar integrado en un profago. Sin embargo, dada la dificultad para explicar la virulencia de *H. pylori* basándose en los factores descritos en la actualidad, cabe pensar que podría existir relación entre los distintos factores (descritos y por describir) de manera que fuera una determinada combinación de los mismos la que se relacionara con una determinada patogenicidad (Zambon *et al.* 2003). Por este motivo, podría sospecharse la asociación entre VacA o CagA y la presencia de fagos atemperados.

Del mismo modo se estudiaron las resistencias a distintos antibióticos en cepas lisogénicas y no lisogénicas (tabla 35). La baja prevalencia de resistencias para varios de estos antibióticos limitó considerablemente el estudio al disminuir drásticamente las posibilidades de encontrar una asociación. Este fue el caso respecto a los antibióticos amoxicilina, tetraciclina, levofloxacino y rifampicina. La mayor prevalencia de resistencias a metronidazol y claritromicina permitieron al menos observar ciertas tendencias de asociación (tablas 38 y 39 respectivamente). En el caso de metronidazol se observó un mayor porcentaje de cepas resistentes entre las no lisogénicas aunque la relación no fue significativa. Con claritromicina se observó una mayor proporción de aislamientos resistentes entre las cepas lisogénicas. En este caso, aunque la asociación no fue estadísticamente significativa, se obtuvo un valor de *p* de 0,16 y quizá una muestra algo mayor habría conseguido demostrar la asociación.

Hasta el momento, a pesar de que se han demostrado mecanismos de transformación (Israel, Lou, y Blaser 2000), conjugación (Kuipers *et al.* 1998) y, muy recientemente, transducción (Luo *et al.* 2012) en experimentos *in vitro*, se cree que *H.*

DISCUSIÓN

pylori adquiere la mayor parte de sus mecanismos de resistencia en forma de mutaciones puntuales *de novo*. Y ciertamente es notoria la facilidad de la bacteria para desarrollar este tipo de mutaciones; se han descrito cepas hipermutadoras (Woodford y Ellington 2007) y se sabe que la propia ADN polimerasa I de *H. pylori* contribuye de algún modo a la alta tasa de mutaciones observadas (García-Ortiz *et al.* 2011) así como la ausencia de determinados mecanismos de reparación del ADN (Björkholm *et al.* 2001) debido probablemente a la ausencia de distintos sistemas de corrección de errores en la replicación. Es poco probable por tanto, que un profago presente en una cepa de *H. pylori* confiera resistencia a un antibiótico concreto. Sin embargo, existe la posibilidad de que la presencia de un profago actúe como marcador de un determinado fenotipo de resistencia tal y como se ha descrito en otras especies (Inglis *et al.* 1990). En ese caso, el profago podría estar indicando el origen común de un clon de aislamientos resistentes o quizá de un clon de aislamientos hipermutadores capaces de desarrollar resistencias con mayor facilidad.

Lisogenia y gravedad de la infección pueden tener una relación clara y evidente cuando media la conversión por la expresión de nuevos factores de virulencia. Así ocurre en casos tan notorios como los del cólera causado por cepas de *Vibrio cholerae* infectadas por el fago CTX ϕ o en la difteria ocasionada por cepas de *Corynebacterium diphtheriae* infectadas por el fago β . En la actualidad, en nuestro entorno, la mayor parte de las infecciones por *H. pylori* se diagnostican precozmente por lo que es poco habitual obtener biopsias en pacientes graves. Éste ha sido el principal factor limitante en nuestro estudio y habría sido necesario un número mayor de muestras para poder demostrar o descartar la relación con la lisogenia de una manera significativa.

6 CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La influencia de los bacteriófagos en la diversidad genética, la capacidad de adaptación o la virulencia de *H. pylori* podría haber sido infravalorada hasta ahora ya que un 35% de las cepas estudiadas resultaron ser lisogénicas mediante métodos fenotípicos.

2. La inducción en placas de agar sangre suplementadas con 5 ng/l de mitomicina C parece un método sencillo y efectivo de detectar cepas lisogénicas. Este método unido a las técnicas para aislar y caracterizar un bacteriófago de *H. pylori* descritas recientemente por Luo y colaboradores podría suponer una herramienta clave para describir nuevos fagos de esta especie.

3. El aislamiento de ADN de origen fágico a partir de una cepa lisogénica deja una línea abierta de estudio que permita el estudio de este material genético y el aislamiento y la caracterización del bacteriófago completo.

4. El estudio de la secuencia de una cepa lisogénica reveló un genoma aparentemente marcado por la presencia de fagos atemperados o el contacto con ellos. Se encontraron genes relacionados con otros de origen fágico y se detectaron posibles profagos mediante el uso de programas informáticos capaces de analizar la secuencia completa.

5. Se detectaron secuencias de tipo CRISPR, implicadas en la resistencia de las bacterias a la incorporación de material genético exógeno como el de origen fágico, mediante análisis informatizado de la secuencia.

6. La detección del gen de la integrasa del profago de B45 como marcador de cepas portadoras de profagos indicó una prevalencia menor que la observada mediante la inducción con mitomicina C además de una correlación muy pobre con este método.

7. En cuanto a la relación entre lisogenia, resistencia a antibióticos, factores de virulencia y gravedad de la infección, se obtuvieron datos no concluyentes. Sería necesario un número mayor de cepas para poder demostrar las posibles diferencias entre cepas lisogénicas y no lisogénicas.

7 SUMMARY

SUMMARY

Helicobacter pylori is a Gram negative spiral bacterium that colonizes the human stomach and is involved in the development of a wide range of pathological manifestations such as chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer or MALT lymphoma.

H. pylori pathogenicity is not fully understood and it may be determined by the huge genetic diversity found in this species.

Phages have an important role in genetic diversity, in the mechanism of adaptation to the ecological niche and in the transmission of genetic material as they contribute to dissemination of virulence factors and mechanisms of resistance.

We have studied the presence of phages in *H. pylori* clinical isolates by phenotypic and genotypic methods.

Induction of prophages in solid and liquid media was achieved by very low concentration of Mitomycin C in a high percentage of strains. Phage extracts were able to inhibit growth of several *H. pylori* strains. Despite the failure of the attempt at purifying phage particles, some phage compatible images were obtained by electron microscopy and phage DNA was successfully isolated from one *H. pylori* strain after induction.

The presence of a phage integrase gene of a recently isolated *H. pylori* phage was investigated by PCR showing a high percentage of strains with phage integrase. One *H. pylori* strain, HP146128, was completely sequenced and it is 1,6 Mb, similar to other already sequenced *H. pylori* strains (1,5 to 1,8 Mb). The sequence was aligned with J99 whole sequence founding two unpaired regions. One of them, present in J99, corresponds to the Cag Pathogenicity island. The second one is an inversion (position 1.475.137 to 1.563.951 in J99 genome) also described in *H. pylori* HPAG1. Genes were detected and translated into proteins and those similar to phage proteins were selected: three integrases and a Fic/Doc gene (Fic, *Filamentous Induced by cAMP*, related to cellular division and Doc, *Death On Cure*, involved in killing daughter bacteria without prophage after division).

SUMMARY

Prophage Finder was used to detect four possible prophages in HP146128 genome. Some proteins found were: gp250, an adenylsuccinate synthetase homologous present in Micobacteriaceae and other bacteria phages, the cytosine-methylase of *Sulfolobus* STSV1, homologous of restriction-modification systems, a ribonucleotide-reductase, a methylase, a DNA polymerase subunit, and an unknown function protein of phagic origin.

The 5' and 3' prophage flanking regions were studied and some phage proteins were also found: a hypothetical protein of an unidentified phage obtained from fecal specimens, an iron transport system present in some phages, ATP binding subunits (gp258 among others), a ribonuclease, a sirtuine (stress responding protein), a component of phage tail, a suitable aminotransferase, methylases, and two proteins related to a *Campylobacter* phage (a probable methylase, thymidylate synthetase and an unknown function protein).

CRISPRs and CRISPRs associated proteins (Cas) are palindromic repeated sequences separated by spacers which correspond to fragments of phages or plasmids. The mechanism of action occurs in two phases: in the first one the bacteria acquire spacer sequences and in the second one CRISPRs blocks the expression of exogenous DNA by a mechanism similar to RNA interference. They could also have a role in regulating phage expression. CRISPR *Finder* was used and two confirmed and one possible CRISPR were found in HP146128.

No significant association was established between lysogeny, resistance to antibiotics, the main virulence factors or clinical-pathological severity although there was a tendency to find a higher percentage of lysogenic strains among clarithromycin resistant isolates.

All these findings suggest that bacteriophage may represent a great source of diversity for *H. pylori* contributing to its adaptation and pathogenicity. An easy and rapid method to induce the lytic cycle of lysogenic strains was described and several phage related genes were found in the whole genome sequence of a lysogenic strain.

8 ABREVIATURAS

Además de las abreviaturas y unidades aceptadas por el Sistema Internacional y por la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), se utilizaron las siguientes:

aa, aminoácidos

ADN, ácido desoxirribonucleico

AINEs, antiinflamatorios no esteroideos

ARN, ácido ribonucleico

ATCC, *American Type Culture Collection*

ATP, adenosín trifosfato

BHI, infusión cerebro-corazón o *Brain Heart Infusion*

CRISPR, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente separadas o *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

DO, densidad óptica

E-test, Epsilon Test (prueba de difusión en gradiente)

ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EUCAST, Comité Europeo para la Evaluación de la Sensibilidad a los Antimicrobianos o *European Comitee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

G+C, guanina y citosina

h, horas

Mb, mega pares de bases

min, minutos

pb, pares de bases

PBPs, proteínas de unión a penicilina o *Penicillin Binding Proteins*

PCR, reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*

PEG, polietilenglicol

RFLP, polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RGE, reflujo gastroesofágico

S, Svedberg

SFB, suero fetal bovino

UBT, prueba del aliento o *Urea Breath Test*

9 BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. T. 2009. «Chapter 1 Phage Evolution and Ecology». En *Advances in Applied Microbiology*, Volume 67:1-45. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216408010010>.
- Ackermann, H. W., A. Audurier, L. Berthiaume, L. A. Jones, J. A. Mayo, y A. K. Vidaver. 1978. «Guidelines for bacteriophage characterization». *Advances in Virus Research* 23: 1-24.
- Agudo, S., T. Alarcón, L. Cibrelus, P. Urruzuno, M. J. Martínez, y M. López-Brea. 2009. «[High percentage of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates obtained from Spanish children]». *Revista Española de Quimioterapia* 22 (2) (junio): 88-92.
- Agudo, S., G. Pérez-Pérez, T. Alarcón, y M. López-Brea. 2010. «High Prevalence of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Strains and Risk Factors Associated with Resistance in Madrid, Spain». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (10) (octubre): 3703-3707.
- Akhter, S., R. K. Aziz, y R. A. Edwards. 2012. «PhiSpy: a Novel Algorithm for Finding Prophages in Bacterial Genomes That Combines Similarity- and Composition-based Strategies». *Nucleic Acids Research* (mayo 14). <http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2012/05/14/nar.gks406>.
- Alarcón, T., D. Domingo, M. J. Martínez, y M. López-Brea. 1999. «*cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages». *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24 (2) (junio): 215-219.
- Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, et al. 1999. «Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*». *Nature* 397 (6715) (enero 14): 176-180.
- Ando, T., Q. Xu, M. Torres, K. Kusugami, D. A. Israel, y M. J. Blaser. 2000. «Restriction-modification system differences in *Helicobacter pylori* are a barrier to interstrain plasmid transfer». *Molecular Microbiology* 37 (5) (septiembre): 1052-1065.
- Aras, R. A., J. Kang, A. I. Tschumi, Y. Harasaki, y M. J. Blaser. 2003. «Extensive repetitive DNA facilitates prokaryotic genome plasticity». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (23) (noviembre 11): 13579-13584.
- Argent, R. H., A. Burette, V. Y. Miendje Deyi, y J. C. Atherton. 2007. «The presence of *dupA* in *Helicobacter pylori* is not significantly associated with duodenal ulceration in Belgium, South Africa, China, or North America». *Clinical Infectious Diseases* 45 (9) (noviembre 1): 1204-1206.
- Arnold, I. C., Z. Zigo, M. Holden, T. D. Lawley, R. Rad, G. Dougan, S. Falkow, S. D. Bentley, y A. Müller. 2011. «Comparative whole genome sequence analysis of the carcinogenic bacterial model pathogen *Helicobacter felis*». *Genome Biology and Evolution* 3: 302-308.
- Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, y T. L. Cover. 1995. «Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic

BIBLIOGRAFÍA

- ulceration». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (30) (julio 28): 17771-17777.
- Aznar, E., T. Alarcón, E. García, y M. López-Brea. 2007. «Bacteriophage-like particles after mitomycin C induction in *Helicobacter pylori* clinical isolates». *Helicobacter* 12: 379.
- Backert, S., T. Kwok, y W. König. 2005. «Conjugative plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori* mediated by chromosomally encoded relaxase and TraG-like proteins». *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 11) (noviembre): 3493-3503.
- Backert, S., N. Tegtmeyer, y M. Selbach. 2010. «The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis». *Helicobacter* 15 (3) (junio): 163-176.
- Bereswill, S., U. Waidner, S. Odenbreit, F. Lichte, F. Fassbinder, G. Bode, y M. Kist. 1998. «Structural, functional and mutational analysis of the pfr gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*». *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 9) (septiembre): 2505-2516.
- Bizzozero, G. 1893. «Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut». *Archiv für mikroskopische Anatomie* 42: 82-152.
- Björkholm, B., M. Sjölund, P. G. Falk, O. G. Berg, L. Engstrand, y D. I. Andersson. 2001. «Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (25) (diciembre 4): 14607-14612.
- Bode, G., P. Malfertheiner, G. Lehnhardt, M. Nilius, y H. Ditschuneit. 1993. «Ultrastructural localization of urease of *Helicobacter pylori*». *Medical Microbiology and Immunology* 182 (5) (noviembre): 233-242.
- Bode, G., F. Mauch, H. Ditschuneit, y P. Malfertheiner. 1993. «Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*». *Journal of General Microbiology* 139 (12) (diciembre): 3029-3033.
- Bose, M., y R. D. Barber. 2006. «Prophage Finder: a prophage loci prediction tool for prokaryotic genome sequences». *In Silico Biology* 6 (3): 223-227.
- Breed, R. S. and E. G. D. Murray and A. P. Hitchens. 1948. «Rappin J. Contribution a L'étude Des Bactéries De La Bouche a L'état Normal». En *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 6th Edition*. Baltimore: Williams & Wilkins Company.
- Brown, L. M. 2000. «*Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission». *Epidemiologic Reviews* 22 (2): 283-297.
- Brüssow, H., C. Canchaya, y W. Hardt. 2004. «Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68 (3) (septiembre): 560-602.
- Burns, B. P., S. L. Hazell, y G. L. Mendz. 1995. «Acetyl-CoA carboxylase activity in *Helicobacter pylori* and the requirement of increased CO₂ for growth». *Microbiology (Reading, England)* 141 (Pt 12) (diciembre): 3113-3118.
- Canchaya, C., C. Proux, G. Fournous, A. Bruttin, y H. Brüssow. 2003. «Prophage genomics». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 67 (2) (junio): 238-276.

BIBLIOGRAFÍA

- Cao, J., Y. Sun, T. Berglinth, B. Mellgård, Z. Li, B. Mårdh, y S. Mårdh. 2000. «*Helicobacter pylori*-antigen-binding fragments expressed on the filamentous M13 phage prevent bacterial growth». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1474 (1) (marzo 6): 107-113.
- Casjens, S. 2003. «Prophages and Bacterial Genomics: What Have We Learned so Far?» *Molecular Microbiology* 49 (2): 277-300.
- Chen, M., L. P. Andersen, L. Zhai, y A. Kharazmi. 1999. «Characterization of the respiratory chain of *Helicobacter pylori*». *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24 (2) (junio): 169-174.
- Chiarini, A., C. Calà, C. Bonura, A. Gullo, G. Giuliana, S. Peralta, F. D'Arpa, y A. Giammanco. 2009. «Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 28 (5) (mayo): 437-446.
- Chibani-Chennoufi, S., A. Bruttin, M. Dillmann, y H. Brüssow. 2004. «Phage-host interaction: an ecological perspective». *Journal of Bacteriology* 186 (12) (junio): 3677-3686.
- «[Consensus development conference on *Helicobacter pylori*. Revised conclusions and recommendations of the Working group (1999)]». 1999. *Gastroentérologie Clinique Et Biologique* 23 (10 Pt 2) (octubre): C95-104.
- Corthésy-Theulaz, I. E., G. E. Bergonzelli, H. Henry, D. Bachmann, D. F. Schorderet, A. L. Blum, y L. N. Ornston. 1997. «Cloning and characterization of *Helicobacter pylori* succinyl CoA:acetoacetate CoA-transferase, a novel prokaryotic member of the CoA-transferase family». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (41) (octubre 10): 25659-25667.
- Costa, K., G. Bacher, G. Allmaier, M. G. Dominguez-Bello, L. Engstrand, P. Falk, M. A. de Pedro, y F. García-del Portillo. 1999. «The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall». *Journal of Bacteriology* 181 (12) (junio): 3710-3715.
- Coudron, P. E, y C. W. Stratton. 1995. «Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media.» *Journal of Clinical Microbiology* 33 (4) (abril): 1028-1030.
- Cuadrado-Lavín, A., J. R. Salcines-Caviedes, M. F. Carrascosa, P. Mellado, I. Monteagudo, J. Llorca, M. Cobo, *et al.* 2012. «Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* to six antibiotics currently used in Spain». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (1) (enero): 170-173.
- Deveau, H., J. E. Garneau, y S. Moineau. 2010. «CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions». *Annual Review of Microbiology* 64: 475-493.
- Dika, C., J. F. L. Duval, H. M. Ly-Chatain, C. Merlin, y C. Gantzer. 2011. «Impact of Internal RNA on Aggregation and Electrokinetics of Viruses: Comparison between MS2 Phage and Corresponding Virus-Like Particles». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (14) (julio): 4939-4948.
- Doenges, J. L. 1938. «Spirochetes in Gastric Glands of Macacus rhesus and Humans without Definite History of Related Disease». *Proceedings of the Society for*

BIBLIOGRAFÍA

- Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 38 (4) (mayo 1): 536-538.
- Donczew, R., C. Weigel, R. Lurz, J. Zakrzewska-Czerwińska, y A. Zawilak-Pawlik. 2012. «*Helicobacter Pylori* oriC—the First Bipartite Origin of Chromosome Replication in Gram-negative Bacteria». *Nucleic Acids Research* (agosto 16). <http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2012/08/14/nar.gks742>.
- Van Doorn, L. J., C. Figueiredo, R. Sanna, A. Plaisier, P. Schneeberger, W. de Boer, y W. Quint. 1998. «Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*». *Gastroenterology* 115 (1) (julio): 58-66.
- Dossumbekova, A., C. Prinz, J. Mages, R. Lang, J. G Kusters, Arnoud H M Van Vliet, Wolfgang Reindl, *et al.* 2006. «*Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms». *The Journal of Infectious Diseases* 194 (10) (noviembre 15): 1346-1355.
- Dunn, B. E., y S. H. Phadnis. 1998. «Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 71 (2) (abril): 63-73.
- Dunn, B. E., R. M. Roop 2nd, C. C. Sung, S. A. Sharma, G. I. Perez-Perez, y M. J. Blaser. 1992. «Identification and purification of a cpn60 heat shock protein homolog from *Helicobacter pylori*». *Infection and Immunity* 60 (5) (mayo): 1946-1951.
- Eaton, K. A., y S. Krakowka. 1994. «Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*». *Infection and Immunity* 62 (9) (septiembre): 3604-3607.
- el-Zimaity, H. M. 2000. «Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori* with biopsy». *Gastroenterology Clinics of North America* 29 (4) (diciembre): 863-869.
- Enroth, H., K. Wreiber, R. Rigo, D. Risberg, A. Uribe, y L. Engstrand. 1999. «In vitro aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties». *Helicobacter* 4 (1) (marzo): 7-16.
- Eppinger, M., C. Baar, B. Linz, G. Raddatz, C. Lanz, H. Keller, G. Morelli, H. Gressmann, M. Achtman, y S. C. Schuster. 2006. «Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines». *PLoS Genetics* 2 (7) (julio): e120.
- Van Etten, J. L. 2008. *Lesser Known Large dsDNA Viruses*. Springer.
- Exner, M. M., P. Doig, T. J. Trust, y R. E. Hancock. 1995. «Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*». *Infection and Immunity* 63 (4) (abril): 1567-1572.
- Figura, N., F. Franceschi, A. Santucci, G. Bernardini, G. Gasbarrini, y A. Gasbarrini. 2010. «Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection». *Helicobacter* 15 Suppl 1 (septiembre): 60-68.
- Fischbach, W., M-E. Goebeler-Kolve, B. Dragosics, A. Greiner, y M. Stolte. 2004. «Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series». *Gut* 53 (1) (enero): 34-37.

BIBLIOGRAFÍA

- FitzGerald, O, y Murphy, P. 1950. «Studies on the physiological chemistry and clinical significance of urease and urea with special reference to the stomach». *Irish Journal of Medical Science* 25 (3): 97-159.
- Fouts, Derrick E. 2006. «Phage_Finder: automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences». *Nucleic Acids Research* 34 (20): 5839-5851.
- Fox, J G. 2002. «The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases». *Gut* 50 (2) (febrero): 273-283.
- De Francesco, V., F. Giorgio, C. Hassan, G. Manes, L. Vannella, C. Panella, E. Ierardi, y A. Zullo. 2010. «Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review». *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 19 (4) (diciembre): 409-414.
- De Francesco, V., A. Zullo, M. Margiotta, S. Marangi, O. Burattini, P. Berloco, F. Russo, et al. 2004. «Sequential treatment for *Helicobacter pylori* does not share the risk factors of triple therapy failure». *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 19 (4) (febrero 15): 407-414.
- Freedberg, A. S., y L. E. Barron. 1940. «The presence of spirochetes in human gastric mucosa». *American Journal of Digestive Diseases* 7 (octubre): 443-445.
- Fulkerson, J. F., Jr., R. M. Garner, y H. L. Mobley. 1998. «Conserved residues and motifs in the NixA protein of *Helicobacter pylori* are critical for the high affinity transport of nickel ions». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1) (enero 2): 235-241.
- García-Ortíz, M., S. Marsin, M. E. Arana, D. Gasparutto, R. Guérois, T. A. Kunkel, y J. P. Radicella. 2011. «Unexpected role for *Helicobacter pylori* DNA polymerase I as a source of genetic variability». *PLoS genetics* 7 (6) (junio): e1002152.
- Geis, G., H. Leying, S. Suerbaum, U. E. Mai, y W. Opferkuch. 1989. «Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella». *Journal of Clinical Microbiology* 27 (3) (marzo): 436-441.
- Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Borén, R. Rad, W. Schepp, S. Miehke, M. Classen, y C. Prinz. 1999. «Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (22) (octubre 26): 12778-12783.
- Gerrits, M., A. H. M. van Vliet, E. J. Kuipers, y J. G. Kusters. 2006. «*Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications». *The Lancet Infectious Diseases* 6 (11) (noviembre): 699-709.
- Gill, G. S., R. C. Hull, y R. Curtiss. 1981. «Mutator Bacteriophage D108 and Its DNA: An Electron Microscopic Characterization.» *Journal of Virology* 37 (1) (enero 1): 420-430.
- Gisbert, J. P., y J. M. Pajares. 2004. «Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review». *Helicobacter* 9 (4) (agosto): 347-368.
- Glupczynski, Y., N. Broutet, A. Cantagrel, L. P. Andersen, T. Alarcón, M. López-Brea, y F. Mégraud. 2002. «Comparison of the E test and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 21 (7) (julio): 549-552.

BIBLIOGRAFÍA

- Go, M. F., V. Kapur, D. Y. Graham, y J. M. Musser. 1996. «Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure». *Journal of Bacteriology* 178 (13) (julio): 3934-3938.
- Goodwin C, Armstrong J, y Peters M. 1989. «*Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease». En *Microbiology of C. pylori*, 25-49. Igaku Shoin, New York, NY: Blaser MJ, editor.
- Goodwin, C.S., J.A. Armstrong, T. Chilvers *et al.* 1989. «Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively.» *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 397-405.
- Graham, D. Y., A. R. Opekun, M. S. Osato, H. M. T. El-Zimaity, C. K. Lee, Y. Yamaoka, W. A. Qureshi, M. Cadoz, y T. P. Monath. 2004. «Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers». *Gut* 53 (9) (septiembre): 1235-1243.
- Gressmann, H., B. Linz, R. Ghai, K. P. Pleissner, R. Schlapbach, Y. Yamaoka, C. Kraft, S. Suerbaum, T. F. Meyer, y M. Achtman. 2005. «Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*». *PLoS Genetics* 1 (4) (octubre): e43.
- Grignon, B., J. Tankovic, F. Mégraud, Y. Glupczynski, M. O. Husson, M. C. Conroy, J. P. Emond, J. Loulergue, J. Raymond, y J. L. Fauchère. 2002. «Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of *Helicobacter pylori*». *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 8 (1): 61-66.
- Gutiérrez, D., B. Martínez, A. Rodríguez, y P. García. 2012. «Genomic Characterization of Two *Staphylococcus epidermidis* Bacteriophages with Anti-biofilm Potential». *BMC Genomics* 13 (1) (junio 8): 228.
- Hacker, J., y J. B. Kaper. 2000. «Pathogenicity islands and the evolution of microbes». *Annual Review of Microbiology* 54: 641-679.
- Haque, M., Y. Hirai, K. Yokota, N. Mori, I. Jahan, H. Ito, H. Hotta, I. Yano, Y. Kanemasa, y K. Oguma. 1996. «Lipid profile of *Helicobacter* spp.: presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature». *Journal of Bacteriology* 178 (7) (abril): 2065-2070.
- Hatfull, Graham F. 2008. «Bacteriophage Genomics». *Current Opinion in Microbiology* 11 (5) (octubre): 447-453.
- Heintschel von Heinegg, E., H. P. Nalik, y E. N. Schmid. 1993. «Characterisation of a *Helicobacter pylori* phage (HP1)». *Journal of Medical Microbiology* 38 (4) (abril): 245-249.
- Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford, y G. F. Hatfull. 1999. «Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5) (marzo 2): 2192-2197.
- D' Hérelle, F. 1917. «Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques». *Comptes rendus Acad Sci Paris.* 165: 373-5.
- D' Herelle, F. 1921. «Le bactériophage. Son rôle dans l'immunité.» *La Presse méd.* 29: 463-4.

BIBLIOGRAFÍA

- Heuermann, D., y R. Haas. 1995. «Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*». *Gene* 165 (1) (noviembre 7): 17-24.
- Heuermann, D., y R. Haas. 1998. «A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation». *Molecular & General Genetics: MGG* 257 (5) (marzo): 519-528.
- Ho, G. Y., y H. M. Windsor. 2000. «Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Polymerase chain reaction tests». *Gastroenterology Clinics of North America* 29 (4) (diciembre): 903-915.
- Houben, M. H. M. G., D. Van De Beek, E. F. Hensen, A. J. M. De Craen, E. A. J. Rauws, y G. N. J. Tytgat. 1999. «A Systematic Review of *Helicobacter Pylori* Eradication Therapy—the Impact of Antimicrobial Resistance on Eradication Rates». *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 13 (8) (agosto 1): 1047-1055.
- Hussein, N. R., R. H. Argent, C.K. Marx, S. R. Patel, K. Robinson, y J. C. Atherton. 2010. «*Helicobacter pylori* dupA is polymorphic, and its active form induces proinflammatory cytokine secretion by mononuclear cells». *The Journal of Infectious Diseases* 202 (2) (julio 15): 261-269.
- Hyman, P., y S. T. Abedon. 2010. «Bacteriophage host range and bacterial resistance». *Advances in Applied Microbiology* 70: 217-248.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1994. «Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994». *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* 61: 1-241.
- Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, y T. Borén. 1998. «*Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging». *Science (New York, N.Y.)* 279 (5349) (enero 16): 373-377.
- Inglis, B., I. Heding, M. Merrylees, y P. R. Stewart. 1990. «Bacteriophage 604: a marker phage for multi-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia.» *Epidemiology and Infection* 104 (2) (abril): 211-218.
- Israel, D. A., A. S. Lou, y M. J. Blaser. 2000. «Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation». *FEMS Microbiology Letters* 186 (2) (mayo 15): 275-280.
- Ji, X., T. Fernandez, D. Burroni, C. Pagliaccia, J. C. Atherton, J M Reyrat, R. Rappuoli, y J. L. Telford. 2000. «Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion». *Infection and Immunity* 68 (6) (junio): 3754-3757.
- Kang, J., y M. J. Blaser. 2006. «Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*». *Nature Reviews. Microbiology* 4 (11) (noviembre): 826-836.
- Karnholz, A., C. Hoefler, S. Odenbreit, W. Fischer, D. Hofreuter, y R. Haas. 2006. «Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*». *Journal of Bacteriology* 188 (3) (febrero): 882-893.

BIBLIOGRAFÍA

- Kersulyte, D., W. Lee, D. Subramaniam, S. Anant, P. Herrera, L. Cabrera, J. Balqui, *et al.* 2009. «*Helicobacter pylori*'s plasticity zones are novel transposable elements». *PloS One* 4 (9): e6859.
- Kersulyte, D., B. Velapatiño, A. K Mukhopadhyay, L. Cahuayme, Alejandro Bussalleu, Juan Combe, Robert H. Gilman, y Douglas E. Berg. 2003. «Cluster of type IV secretion genes in *Helicobacter pylori*'s plasticity zone». *Journal of Bacteriology* 185 (13) (julio): 3764-3772.
- Kiliç, A. O., S. I. Pavlova, S. Alpay, S. S.Kiliç, y L. Tao. 2001. «Comparative Study of Vaginal *Lactobacillus* Phages Isolated from Women in the United States and Turkey: Prevalence, Morphology, Host Range, and DNA Homology». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8 (1) (enero 1): 31-39.
- Kobayashi, I., A. Nobusato, N. Kobayashi-Takahashi, y I. Uchiyama. 1999. «Shaping the genome--restriction-modification systems as mobile genetic elements». *Current Opinion in Genetics & Development* 9 (6) (diciembre): 649-656.
- Koletzko, S., F. Richy, P. Bontems, J. Crone, N. Kalach, M. L. Monteiro, F Gottrand, *et al.* 2006. «Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe». *Gut* 55 (12) (diciembre): 1711-1716.
- Konturek, J W. 2003. «Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer». *Journal of Physiology and Pharmacology* 54 Suppl 3 (diciembre): 23-41.
- Kornberg, H. L. 1955. «Gastric Urease». *Physiology Review* 35 (1): 169-177.
- De Korwin, J. 2003. «Advantages and limitations of diagnostic methods for *H. pylori* infection». *Gastroentérologie Clinique Et Biologique* 27 (3 Pt 2) (marzo): 380-390.
- Kreinitz, W. 1906. «Ueber das auftreten von spirochaeten verschiedener form im magenihalt bei carcinoma ventriculi.» *Dtsch. Med. Wochenschr.* 32: 872.
- Kropinski, A. M., D. Arutyunov, M. Foss, A. Cunningham, W. Ding, A. Singh, A. R. Pavlov, *et al.* 2011. «Genome and Proteome of *Campylobacter jejuni* Bacteriophage NCTC 12673». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (23) (enero 12): 8265-8271.
- Kuipers, E. J. 1999. «Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer». *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 13 Suppl 1 (marzo): 3-11.
- Kuipers, E. J., D. A. Israel, J. G. Kusters, y M. J. Blaser. 1998. «Evidence for a conjugation-like mechanism of DNA transfer in *Helicobacter pylori*». *Journal of Bacteriology* 180 (11) (junio): 2901-2905.
- Kuipers, E. J., J. C. Thijs, y H. P. Festen. 1995. «The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease». *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 9 Suppl 2: 59-69.
- Kusters, J. G., M. M. Gerrits, J. A. Van Strijp, y C. M. Vandenbroucke-Grauls. 1997. «Cocoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death.» *Infection and Immunity* 65 (9) (septiembre): 3672-3679.
- Kusters, J. G., A. H. M. van Vliet, y E. J. Kuipers. 2006. «Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection». *Clinical Microbiology Reviews* 19 (3) (julio): 449-490.

BIBLIOGRAFÍA

- Kutter, E., y A. Sulakvelidze. 2004. *Bacteriophages: Biology and Applications*. 1.^a ed. CRC Press.
- Langenberg, M.L., G. N. J. Tytgat, M. E. I. Schipper, y H. C. Zanen. 1984. «*Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals.» *Lancet* i: 1348-1349.
- Langley, R., D. T. Kenna, P. Vandamme, R. Ure, y J. R. W. Govan. 2003. «Lysogeny and Bacteriophage Host Range Within the *Burkholderia cepacia* complex». *Journal of Medical Microbiology* 52 (6) (enero 6): 483-490.
- Lara-Ramírez, E. E., A. Segura-Cabrera, X. Guo, G. Yu, C. A. García-Pérez, y M. A. Rodríguez-Pérez. «New Implications on Genomic Adaptation Derived from the *Helicobacter pylori* Genome Comparison» 6 (2).
- Lederberg, E. M., y J. Lederberg. 1953. «Genetic Studies of Lysogenicity in *Escherichia Coli*». *Genetics* 38 (1) (enero): 51-64.
- Lehnerr, H., E. Maguin, S. Jafri, y M. B. Yarmolinsky. 1993. «Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained». *Journal of molecular biology* 233 (3) (octubre 5): 414-428.
- Lehours, P., F. F. Vale, M. K. Bjursell, O. Melefors, R. Advani, S. Glavas, J. Guegueniat, et al. 2011. «Genome Sequencing Reveals a Phage in *Helicobacter pylori*». *mBio* 2 (6) (noviembre 15). doi:10.1128/mBio.00239-11.
- Lima-Mendez, G., J. Van Helden, A. Toussaint, y R. Leplae. 2008. «Prophinder: a computational tool for prophage prediction in prokaryotic genomes». *Bioinformatics (Oxford, England)* 24 (6) (marzo 15): 863-865.
- Linz, B., F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H. Liu, P. Roumagnac, D. Falush, et al. 2007. «An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*». *Nature* 445 (7130) (febrero 22): 915-918.
- Liu, H., H. Ye, A. Ruskone-Fourmesttraux, D. De Jong, S. Pileri, C. Thiede, A. Lavergne, et al. 2002. «T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication». *Gastroenterology* 122 (5) (mayo): 1286-1294.
- López Brea, M., M.L. Jiménez, M. Blanco, y J.M. Pajares. 1985. «*Campylobacter* en patología gástrica.» *Microbiología* 1: 97-99.
- Lu, H., P. Hsu, D. Y. Graham, y Y. Yamaoka. 2005. «Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*». *Gastroenterology* 128 (4) (abril): 833-848.
- Luck, J. M., y T. N. Seth. 1925. «The Physiology of Gastric Urease». *The Biochemical Journal* 19 (3): 357-365.
- Lukashin, A. V., y M. Borodovsky. 1998. «GeneMark.hmm: New Solutions for Gene Finding». *Nucleic Acids Research* 26 (4) (enero 2): 1107-1115.
- Luo, C., P. Chiou, C. Yang, y N. Lin. 2012. «Genome, Integration, and Transduction of a Novel Temperate Phage of *Helicobacter pylori*». *Journal of virology* 86 (16) (agosto): 8781-8792.
- Lwoff, A., y A. Gutmann. 1950. «[Research on the lysogenic *Bacillus megatherium*]». *Annales De l'Institut Pasteur* 78 (6) (junio): 711-739.
- Mahdavi, J., T. Borén, C. Vandembroucke-Graults, y B. J. Appelmelk. 2003. «Limited role of lipopolysaccharide Lewis antigens in adherence of *Helicobacter pylori* to

BIBLIOGRAFÍA

- the human gastric epithelium». *Infection and Immunity* 71 (5) (mayo): 2876-2880.
- Mahdavi, J., B. Sondén, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, *et al.* 2002. «*Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5581) (julio 26): 573-578.
- Malaty, H. M., D. Y. Graham, W. A. Wattigney, S. R. Srinivasan, M. Osato, y G. S. Berenson. 1999. «Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: 12-year follow-up cohort study in a biracial community». *Clinical Infectious Diseases* 28 (2) (febrero): 279-282.
- Malfertheiner, P., F. Megraud, C. O'Morain, F. Bazzoli, E. El-Omar, D. Graham, R. Hunt, T. Rokkas, N. Vakil, y E. J. Kuipers. 2007. «Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report». *Gut* 56 (6) (junio): 772-781.
- Marshall, B. J., J. A. Armstrong, G. J. Francis, N. T. Nokes, y S. H. Wee. 1987. «Antibacterial action of bismuth in relation to *Campylobacter pyloridis* colonization and gastritis». *Digestion* 37 Suppl 2: 16-30.
- Marshall, B. J., y J. R. Warren. 1984. «Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration». *Lancet* 1 (8390) (junio 16): 1311-1315.
- Marshall, B.J., H. Royce, y D.I. Annear. 1984. «Original isolation of *Campylobacter pyloris* from human gastric mucosa». *Microbios Letters* 25: 83-88.
- Marsich, E., P. Zuccato, S. Rizzi, A. Vetere, E. Tonin, y S. Paoletti. 2002. «*Helicobacter pylori* expresses an autolytic enzyme: gene identification, cloning, and theoretical protein structure». *Journal of Bacteriology* 184 (22) (noviembre): 6270-6279.
- McGowan, C. C., A. Necheva, S. A. Thompson, T. L. Cover, y M. J. Blaser. 1998. «Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*». *Molecular Microbiology* 30 (1) (octubre): 19-31.
- Megraud, F., y H. P. Doermann. 1998. «Clinical Relevance of resistant strains of *Helicobacter pylori*: a review of current data». *Gut* 43 (suppl 1) (julio 1): S61-S65.
- Mégraud, F., y P. Lehours. 2007. «*Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing». *Clinical Microbiology Reviews* 20 (2) (abril): 280-322.
- Mendz, G. L., y S. L. Hazell. 1995. «Aminoacid utilization by *Helicobacter pylori*». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 27 (10) (octubre): 1085-1093.
- Mendz, G. L., y S. L. Hazell. 1996. «The urea cycle of *Helicobacter pylori*». *Microbiology (Reading, England)* 142 (Pt 10) (octubre): 2959-2967.
- Mendz, G. L., B. M. Jimenez, S. L. Hazell, A. M. Gero, y W. J. O'Sullivan. 1994a. «De novo synthesis of pyrimidine nucleotides by *Helicobacter pylori*». *The Journal of Applied Bacteriology* 77 (1) (julio): 1-8.
- Mendz, G. L., B. M. Jimenez, S. L. Hazell, A. M. Gero, y W. J. O'Sullivan. 1994b. «Salvage synthesis of purine nucleotides by *Helicobacter pylori*». *The Journal of Applied Bacteriology* 77 (6) (diciembre): 674-681.

BIBLIOGRAFÍA

- Minot, S., S. Grunberg, G. D. Wu, J. D. Lewis, y F. D. Bushman. 2012. «Hypervariable loci in the human gut virome». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (10) (marzo 6): 3962-3966.
- Molineux, I. J. 2001. «No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven». *Molecular Microbiology* 40 (1) (abril): 1-8.
- Møller, H., E. Heseltine, y H. Vainio. 1995. «Working Group Report on Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter Pylori*. Meeting Held at IARC, LYON, 7-14 June 1994». *International Journal of Cancer* 60 (5) (marzo 3): 587-589.
- Monteiro, L., y F. Mégraud. 1999. «How to detect *Helicobacter pylori* before and after eradication treatment?». *Gastroentérologie Clinique Et Biologique* 23 (10 Pt 2) (octubre): C3-19.
- Monteiro, M. A., K. H. Chan, D. A. Rasko, D. E. Taylor, P. Y. Zheng, B. J. Appelmelk, H. P. Wirth, *et al.* 1998. «Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (19) (mayo 8): 11533-11543.
- Moore, R. A., B. Beckthold, S. Wong, A. Kureishi, y L. E. Bryan. 1995. «Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (1) (enero): 107-111.
- Morris, A. 1987. «Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH». *American Journal of Gastroenterology* 82 (3): 192-9.
- Mullins, N. C. 1972. «The development of a scientific specialty: The phage group and the origins of molecular biology». *Minerva* 10 (1) (enero): 51-82.
- Muotiala, A., I. M. Helander, L. Pyhälä, T. U. Kosunen, y A. P. Moran. 1992. «Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide». *Infection and Immunity* 60 (4) (abril): 1714-1716.
- Murakami, M., J. K. Yoo, S. Teramura, K. Yamamoto, H. Saita, K. Matuo, T. Asada, y T. Kita. 1990. «Generation of ammonia and mucosal lesion formation following hydrolysis of urea by urease in the rat stomach». *Journal of Clinical Gastroenterology* 12 Suppl 1: S104-109.
- Muschel, L. H., y K. Schmoker. 1966. «Activity of Mitomycin C, Other Antibiotics, and Serum Against Lysogenic Bacteria». *Journal of Bacteriology* 92 (4) (octubre): 967-971.
- NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. 1994. «NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease». *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 272 (1) (julio 6): 65-69.
- Nomura, A., G. N. Stemmermann, P. H. Chyou, G. I. Perez-Perez, y M. J. Blaser. 1994. «*Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration». *Annals of Internal Medicine* 120 (12) (junio 15): 977-981.
- O'Morain, Colm. 2006. «Role of *Helicobacter pylori* in functional dyspepsia». *World Journal of Gastroenterology: WJG* 12 (17) (mayo 7): 2677-2680.

BIBLIOGRAFÍA

- Ogiwara, H., M. Sugimoto, T. Ohno, R. Vilaichone, V. Mahachai, D. Y. Graham, y Y. Yamaoka. 2009. «Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the *Helicobacter pylori vacA* gene in cases of gastroduodenal diseases». *Journal of Clinical Microbiology* 47 (11) (noviembre): 3493-3500.
- Oh, J. D., H. Kling-Bäckhed, M. Giannakis, J. Xu, R. S. Fulton, L. A. Fulton, Holland S. Cordum, *et al.* 2006. «The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: Evolution during disease progression». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (26) (junio 27): 9999-10004.
- Oyarzabal, O. A., R. Rad, y S. Backert. 2007. «Conjugative transfer of chromosomally encoded antibiotic resistance from *Helicobacter pylori* to *Campylobacter jejuni*». *Journal of Clinical Microbiology* 45 (2) (febrero): 402-408.
- Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelman, y G. D. Friedman. 1994. «*Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma». *New England Journal of Medicine* 330 (18): 1267-71.
- Peck, B., M. Ortkamp, K. D. Diehl, E. Hundt, y B. Knapp. 1999. «Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*». *Nucleic Acids Research* 27 (16) (agosto 15): 3325-3333.
- Perez-Perez, G. I., D. Rothenbacher, y H. Brenner. 2004. «Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection». *Helicobacter* 9 Suppl 1: 1-6.
- Petty, N. K., T. J. Evans, P. C. Fineran, y G. P. C. Salmond. 2007. «Biotechnological exploitation of bacteriophage research». *Trends in Biotechnology* 25 (1) (enero): 7-15.
- Pitson, S. M., G. L. Mendz, S. Srinivasan, y S. L. Hazell. 1999. «The tricarboxylic acid cycle of *Helicobacter pylori*». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 260 (1) (febrero): 258-267.
- Punta, M., P. C. Coghill, R. Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Boursnell, N. Pang, *et al.* 2011. «The Pfam protein families database». *Nucleic Acids Research* 40 (D1) (noviembre 29): D290-D301.
- Rad, R., M. Gerhard, R. Lang, M. Schöniger, T. Rösch, W. Schepp, I. Becker, H. Wagner, y C. Prinz. 2002. «The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (6) (marzo 15): 3033-3041.
- Radcliff, F. J., S. L. Hazell, T. Kolesnikow, C. Doidge, y A. Lee. 1997. «Catalase, a novel antigen for *Helicobacter pylori* vaccination». *Infection and Immunity* 65 (11) (noviembre): 4668-4674.
- Raderer, M., B. Streubel, S. Woehrer, A. Poespoek, U. Jaeger, M. Formanek, y A. Chott. 2005. «High relapse rate in patients with MALT lymphoma warrants lifelong follow-up». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (9) (mayo 1): 3349-3352.
- Ramirez, M., E. Severina, y A. Tomasz. 1999. «A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*». *Journal of Bacteriology* 181 (12) (junio): 3618-3625.

BIBLIOGRAFÍA

- Rauws,, E., y G. Tytgat. 1990. «Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*». *Lancet* 335 (8700): 1233–5.
- Raymond, J., D. Lamarque, N. Kalach, S. Chaussade, y C. Burucoa. 2010. «High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates». *Helicobacter* 15 (1) (febrero): 21-27.
- Rektorschek, M., A. Buhmann, D. Weeks, D. Schwan, K. W. Bensch, S. Eskandari, D. Scott, G. Sachs, y K. Melchers. 2000. «Acid resistance of *Helicobacter pylori* depends on the UreI membrane protein and an inner membrane proton barrier». *Molecular Microbiology* 36 (1) (abril): 141-152.
- Rhead, J. L., Darren P. Letley, M. Mohammadi, N. Hussein, M. A. Mohagheghi, Mahmoud Eshagh Hosseini, y John C. Atherton. 2007. «A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer». *Gastroenterology* 133 (3) (septiembre): 926-936.
- Romero, P., E. García, y T. J. Mitchell. 2009. «Development of a Prophage Typing System and Analysis of Prophage Carriage in *Streptococcus pneumoniae*». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (6) (marzo 15): 1642-1649.
- Rossmann, M. G., V. V. Mesyanzhinov, F. Arisaka, y P. G. Leiman. 2004. «The bacteriophage T4 DNA injection machine». *Current Opinion in Structural Biology* 14 (2) (abril): 171-180.
- Salaün, L., B. Linz, S. Suerbaum, y N. J. Saunders. 2004. «The diversity within an expanded and redefined repertoire of phase-variable genes in *Helicobacter pylori*». *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 4) (abril): 817-830.
- Sause, W. E., A. R. Castillo, y K. M. Ottemann. 2012. «The *Helicobacter pylori* autotransporter ImaA (HP0289) modulates the immune response and contributes to host colonization». *Infection and Immunity* 80 (7) (julio): 2286-2296.
- Savalia, D., W. Robins, S. Nechaev, I. Molineux, y K. Severinov. 2010. «The role of the T7 Gp2 inhibitor of host RNA polymerase in phage development». *Journal of Molecular Biology* 402 (1) (septiembre 10): 118-126.
- Schmid, E. N., G. von Recklinghausen, y R. Ansorg. 1990. «Bacteriophages in *Helicobacter (Campylobacter) pylori*». *Journal of Medical Microbiology* 32 (2) (junio): 101-104.
- Schreiber, S., M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H. Werling, C. Josenhans, y S. Suerbaum. 2004. «The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (14) (abril 6): 5024-5029.
- Scott, D. R., D. Weeks, C. Hong, S. Postius, K. Melchers, y G. Sachs. 1998. «The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*». *Gastroenterology* 114 (1) (enero): 58-70.
- Serwer, P., S. Hayes, y K. Lieman. 2007. «Aggregates of Bacteriophage 0305φ8-36 Seed Future Growth». *Virology Journal* 4 (1) (diciembre 4): 131.
- Shah, S. A., N. R. Hansen, y R. A. Garrett. 2009. «Distribution of CRISPR spacer matches in viruses and plasmids of crenarchaeal acidothermophiles and implications for their inhibitory mechanism». *Biochemical Society transactions* 37 (Pt 1) (febrero): 23-28.

BIBLIOGRAFÍA

- Shahamat, M., U. E. Mai, C. Paszko-Kolva, H. Yamamoto, y R. R. Colwell. 1991. «Evaluation of liquid media for growth of *Helicobacter pylori*.» *Journal of Clinical Microbiology* 29 (12) (diciembre): 2835-2837.
- Shapiro, J. A. 1976. «Observations on lysogeny in glutamic acid bacteria.» *Applied and Environmental Microbiology* 32 (1) (julio): 179-182.
- Shimamura, T., S. Nakamura, M. Hayase, y S. Nishida. 1974. «Mitomycin-Induced Lysis of *Clostridium sordellii*.» *Journal of Medical Microbiology* 7 (2) (enero 5): 277-283.
- Sipponen, P., K. Varis, O. Fräki, U. M. Korri, K. Seppälä, y M. Siurala. 1990. «Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis. A clinical follow-up study of 454 outpatients.» *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 25 (10) (octubre): 966-973.
- Skirrow, M. B. 1977. «*Campylobacter enteritis*: a “new” disease.» *British Medical Journal* 2 (6078) (julio 2): 9-11.
- Skouloubris, S., A. Labigne, y H. De Reuse. 2001. «The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues.» *Molecular Microbiology* 40 (3) (mayo): 596-609.
- Somodevilla, A. 2012. «Factores de virulencia, aspectos inmunológicos y patrones de sensibilidad en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*.» Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Spaargaren, J., C. P. van Boven, y G. P. Voorn. 1998. «Effectiveness of resins in neutralizing antibiotic activities in bactec plus Aerobic/F culture medium.» *Journal of clinical microbiology* 36 (12) (diciembre): 3731-3733.
- Spiegelhalter, C., B. Gerstenecker, A. Kersten, E. Schiltz, y M. Kist. 1993. «Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene.» *Infection and Immunity* 61 (12) (diciembre): 5315-5325.
- Srividhya, K. V., V. Alaguraj, G. Poornima, D. Kumar, G. P. Singh, L. Raghavenderan, A. V. S. K. Mohan Katta, P. Mehta, y S. Krishnaswamy. 2007. «Identification of prophages in bacterial genomes by dinucleotide relative abundance difference.» *PloS one* 2 (11): e1193.
- Steer, H. W., y D. G. Colin-Jones. 1975. «Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium.» *Gut* 16 (8) (agosto): 590-597.
- Talley, N. J., y R. H. Hunt. 1997. «What role does *Helicobacter pylori* play in dyspepsia and nonulcer dyspepsia? Arguments for and against H. pylori being associated with dyspeptic symptoms.» *Gastroenterology* 113 (6 Suppl) (diciembre): S67-77.
- Thomson, J. A., y D. R. Woods. 1975. «Prophage Induction in *Escherichia coli* (Lambda) by N-Nitrosamines.» *Applied Microbiology* 29 (3) (marzo): 430-431.
- Tomb, O. W., A. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, y S. Gill. 1997. «The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.» *Nature* 388 (6642): 539-47.
- Twort, F.W. 1915. «An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses.» *Lancet* 2: 1241-1243.
- Uchiyama, J., H. Takeuchi, S. Kato, I. Takemura-Uchiyama, T. Ujihara, M. Daibata, y S. Matsuzaki. 2012. «Complete Genome Sequences of Two *Helicobacter pylori*

BIBLIOGRAFÍA

- Bacteriophages Isolated from Japanese Patients». *Journal of Virology* 86 (20) (octubre 15): 11400-11401.
- Uchiyama, J., H. Takeuchi, S. Kato, K. Gamoh, I. Takemura-Uchiyama, T. Ujihara, M. Daibata, y S. Matsuzaki. 2013. «Characterization of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30». *Applied and Environmental Microbiology* 79 (10): 3176.
- Unemo, M., M. Aspholm-Hurtig, D. Ilver, J. Bergström, T. Borén, D. Danielsson, y S. Teneberg. 2005. «The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (15) (abril 15): 15390-15397.
- Unge, P. 2002. «*Helicobacter* Pioneers: Firsthand Accounts from the Scientists Who Discovered *Helicobacters*». En *Helicobacter pylori treatment in the past and in the 21st century*, CABI;203–213. Victoria, Australia: Blackwell Science Asia.
- Vale, F. F., A. P.A. Matos, P. Carvalho, y J. M.B. Vitor. 2008. «*Helicobacter pylori* Phage Screening». *Microscopy and Microanalysis* 14 (Supplement S3): 150-151.
- Valle, J., K. Seppälä, P. Sipponen, y T. Kosunen. 1991. «Disappearance of Gastritis after Eradication of *Helicobacter pylori*: A Morphometric Study». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 26 (enero): 1057-1065.
- Velayudhan, J., N. J. Hughes, A. A. McColm, J. Bagshaw, C. L. Clayton, S. C. Andrews, y D. J. Kelly. 2000. «Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter». *Molecular Microbiology* 37 (2) (julio): 274-286.
- Versalovic, J., M. S. Osato, K. Spakovsky, M. P. Dore, R. Reddy, G. G. Stone, D. Shortridge, R. K. Flamm, S. K. Tanaka, y D. Y. Graham. 1997. «Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40 (2) (agosto): 283-286.
- Viala, J., C. Chaput, I. G. Boneca, A. Cardona, S. E. Girardin, A. P. Moran, R. Athman, et al. 2004. «Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island». *Nature Immunology* 5 (11) (noviembre): 1166-1174.
- Walz, A., S. Odenbreit, J. Mahdavi, T. Borén, y S. Ruhl. 2005. «Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays». *Glycobiology* 15 (7) (julio): 700-708.
- Wan, X., D. Tang, A. Liu, S. Tan, W. Li, J. Kuang, y H. Li. 2011. «Isolation of a wild-type virulent phage of *Helicobacter pylori* and its simulated treatments of gastrointestinal Hp in vitro». *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of Southern Medical University* 31 (2) (febrero): 304-307.
- Warren, J.R., y B.J. Marshall. 1983. «Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis». *The Lancet* 321 (8336) (junio): 1273-1275.
- Westblom, T. U., E. Madan, B. R. Midkiff, V. W. Adkins, y M. A. Subik. 1988. «Failure of *Campylobacter pylori* to grow in commercial blood culture systems». *Journal of Clinical Microbiology* 26 (5) (mayo): 1029-1030.

BIBLIOGRAFÍA

- Wiggins, B. A., y M. Alexander. 1985. «Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems». *Applied and Environmental Microbiology* 49 (1) (enero): 19-23.
- Williams, C. L., T. Preston, M. Hossack, C. Slater, y K. E. McColl. 1996. «*Helicobacter pylori* utilises urea for amino acid synthesis». *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 13 (1) (enero): 87-94.
- Woodford, N., y M. J. Ellington. 2007. «The Emergence of Antibiotic Resistance by Mutation». *Clinical Microbiology and Infection* 13 (1): 5-18.
- Wotherspoon, A. C., C. Doglioni, T. C. Diss, L. Pan, A. Moschini, M. de Boni, y P. G. Isaacson. 1993. «Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*». *Lancet* 342 (8871) (septiembre 4): 575-577.
- Wu, J.Y., J. J. Kim, R. Reddy, W. M. Wang, D. Y. Graham, y D. H. Kwon. 2005. «Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (2) (febrero): 578-583.
- Wündisch, T., C. Thiede, A. Morgner, A. Dempfle, A. Günther, H. Liu, H. Ye, *et al.* 2005. «Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication». *Journal of Clinical Oncology* 23 (31) (noviembre 1): 8018-8024.
- Yaghoobi, M., F. Farrokhyar, Y. Yuan, y R. H. Hunt. 2010. «Is there an increased risk of GERD after *Helicobacter pylori* eradication?: a meta-analysis». *The American Journal of Gastroenterology* 105 (5) (mayo): 1007-1013; quiz 1006, 1014.
- Yamaoka, Y. 2010. «Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 7 (11) (noviembre): 629-641.
- Yamaoka, Y., S. Kikuchi, H. M. T. el-Zimaity, O. Gutiérrez, M. S. Osato, y D. Y. Graham. 2002. «Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production». *Gastroenterology* 123 (2) (agosto): 414-424.
- Yamaoka, Y., T. Kodama, O. Gutierrez, J. G. Kim, K. Kashima, y D. Y. Graham. 1999. «Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries». *Journal of Clinical Microbiology* 37 (7) (julio): 2274-2279.
- Yamaoka, Y., T. Kodama, K. Kashima, D. Y. Graham, y A. R. Sepulveda. 1998. «Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases». *Journal of Clinical Microbiology* 36 (8) (agosto): 2258-2263.
- Yamaoka, Y., D. H. Kwon, y D. Y. Graham. 2000. «A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (13) (junio 20): 7533-7538.
- Young, I., I. Wang, y W. D. Roof. 2000. «Phages will out: strategies of host cell lysis». *Trends in Microbiology* 8 (3) (marzo): 120-128.

BIBLIOGRAFÍA

- Zambon, C. F., F. Navaglia, D. Basso, M. Rugge, y M. Plebani. 2003. «*Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA*, and *s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia». *Journal of Clinical Pathology* 56 (4) (abril): 287-291.
- Zhang, J., R. Chiodini, A. Badr, y G. Zhang. 2011. «The impact of next-generation sequencing on genomics». *Journal of Genetics and Genomics = Yi chuan xue bao* 38 (3) (marzo 20): 95-109.