

Universidad Politécnica de Valencia

Departamento de Biotecnología



**APORTACIONES A LA EPIDEMIOLOGÍA DE
Arcobacter Y *Helicobacter* spp.: APLICACIÓN DE
MÉTODOS MOLECULARES A SU DETECCIÓN E
IDENTIFICACIÓN EN ALIMENTOS**

Tesis Doctoral

Autor: Isidro Favian Bayas Morejón

Directoras: Dra. M^a Antonia Ferrús Pérez

Dra. Ana González Pellicer

Valencia, Octubre de 2016

DEDICATORIA

Este trabajo realizado con mucho esfuerzo lo dedico a mi hijo Anthony Fabián, el cual ha sido la fuerza principal que me impulsó día a día para seguir adelante; a mi amada esposa Rosa Angélica, que de manera incondicional y pese a la distancia me ha apoyado, y me ha dado fuerzas para continuar.

A mi querida madre Laura Judith, que sé que desde el cielo me ha estado iluminando en este largo camino.

A mi apreciado padre Elías Alberto, a mis queridas hermanas; Rocío, Maritza y Rosario que aunque a la distancia me supieron apoyar.

¡Los quiero mucho!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS por brindarme siempre nuevas oportunidades en los caminos de la vida para así aprender día a día lo maravilloso que es vivir.

Al finalizar esta tesis es muy satisfactorio expresar mi agradecimiento a mis directoras, M^a Antonia Ferrús y Ana González. Gracias por ofrecerme la oportunidad de trabajar con vosotras, por vuestra dirección, y por supuesto, por haberme guiado con buena voluntad, paciencia, amplio conocimiento y experiencia a lo largo de este trabajo.

También quiero agradecer a todos quienes conforman el Departamento de Biotecnología:

A Manuel Hernández, Jorge García, Rosa Montes y M^a Ángeles Castillo, gracias por brindarme vuestra confianza y valiosos consejos.

A Ana Jiménez y Salut Botella, gracias por haberme permitido compartir con vosotras esa bonita experiencia de impartir y aprender a través de la docencia en prácticas.

Al Instituto de Ingeniería de Agua y Medio Ambiente y en especial a Laura Moreno, Yolanda Moreno y J. Luis Alonso, por vuestro apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Gracias al Consorcio BABEL por la concesión de la beca que me ha posibilitado llegar hasta esta instancia.

A mis compañer@s y amig@s de laboratorio, Nancy, Alejandro y Javier, por el tiempo que dedicaron a ayudarme y por las charlas que hacen más fácil este camino.

Y sobre todo a mi familia, que siempre me ha apoyado en todas mis decisiones, y pese a la distancia y las adversidades, han estado ahí para ayudarme.

En resumen, gracias a todos.....

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación recibida de:

Consortio BABEL. Beca UE-LATAM BA12FD0681

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

ÍNDICE

<u>ÍNDICE</u>	i
<u>RESUMENES</u>	xi
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO <i>ARCOBACTER</i>	1
1.1. Antecedentes históricos	1
1.2. Situación taxonómica actual	2
1.3. Morfología y características bioquímicas	4
2. PATOGENICIDAD DEL GÉNERO <i>ARCOBACTER</i>	7
2.1. Importancia clínica en humanos	7
2.2. Mecanismo de virulencia	8
2.2.1. Mecanismo de adherencia y ataque	8
2.3. Sensibilidad y resistencia a antibióticos	9
3. EPIDEMIOLOGÍA Y RUTAS DE TRANSMISIÓN DE <i>ARCOBACTER</i>	10
3.1. Transmisión por alimentos	10
3.2. Transmisión por agua	12
4. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO <i>HELICOBACTER</i>	14
4.1. Antecedentes históricos	14
4.2. Situación taxonómica actual	15
4.3. Morfología y características bioquímicas	17
5. IMPORTANCIA CLÍNICA DEL GÉNERO <i>HELICOBACTER</i>	18
5.1. Patogenicidad de <i>H. pylori</i>	19
5.2. Patologías gástricas relacionadas con <i>H. pylori</i>	21
5.2.1. Gastritis	21
5.2.2. Úlcera péptica	21
5.2.3. Cáncer gástrico	22
5.2.4. Influencia de <i>H. pylori</i> en la aparición de enfermedades extragástricas	22
6. EPIDEMIOLOGÍA Y RUTAS TRANSMISIÓN DE <i>HELICOBACTER</i>	23
6.1. Epidemiología	23

6.2. Mecanismos de transmisión	23
6.2.1. Transmisión oral-oral	24
6.2.2. Transmisión gastro-oral	24
6.2.3. Transmisión fecal-oral	24
6.2.4. Transmisión por agua	24
6.2.5. Transmisión por alimentos	25
6.3. Otros <i>Helicobacter</i> gástricos	26
7. MÉTODOS DE DETECCIÓN POR CULTIVO	27
7.1. Detección de <i>Arcobacter</i> por cultivo	27
7.2. Detección de <i>Helicobacter</i> por cultivo	28
7.3. Identificación bioquímica de <i>Arcobacter</i> y <i>Helicobacter</i>	29
7.4. Formas viables no cultivables	29
8. MÉTODOS MOLECULARES DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	30
8.1. Detección directa	30
8.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
8.3. Detección de <i>Arcobacter</i> por PCR	30
8.4. Identificación de <i>Arcobacter</i> a nivel de especie	31
8.5. Detección de <i>Helicobacter</i> por PCR convencional	32
8.6. Detección de <i>Helicobacter</i> por PCR cuantitativa a tiempo real	33
<u>OBJETIVOS</u>	36
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	37
1. CEPAS BACTERIANAS	37
2. DETECCIÓN DE ARCOBACTER POR CULTIVO	37
2.1. Muestras de moluscos	37
2.2. Muestras de verduras	40
3. DETECCIÓN DE ARCOBACTER POR PCR	41
3.1. Aislamiento del ADN genómico bacteriano a partir de las muestras	41
3.2. Detección por PCR	42
4. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE ARCOBACTER	43
4.1. Identificación de <i>Arcobacter</i> spp.	43

4.2. Identificación de <i>Arcobacter</i> spp. mediante PCR-RFLP del gen 16S ARNr	43
4.2.1. Amplificación por PCR	43
4.2.2. Purificación del producto de PCR	44
4.2.3. Restricción enzimática del fragmento amplificado	45
5. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	46
5.1. Difusión en placa con disco y E-test	46
5.1.1. Preparación del inóculo y aplicación de los discos y tiras de E-test	46
5.1.2. Lectura de las placas e interpretación de los resultados	47
5.2. Determinación del mecanismo de resistencia a quinolonas	47
5.2.1. Amplificación del gen <i>gyrA</i>	47
5.2.2. Análisis de las secuencias producidas	48
6. DETECCIÓN DE <i>HELICOBACTER</i>	49
6.1. Extracción del ADN genómico	49
6.2. Detección de <i>Helicobacter</i> spp.	49
6.3. Detección de <i>Helicobacter pylori</i>	50
6.4. Detección de <i>H. pylori</i> por PCR a tiempo real	51
<u>RESULTADOS</u>	53
1. DETECCIÓN DE <i>ARCOBACTER</i> EN MUESTRAS DE MOLUSCOS	53
1.1. Aislamiento de <i>Arcobacter</i> mediante cultivo en placa	53
1.2. Detección directa de <i>Arcobacter</i> mediante PCR	54
1.3. Comparación de métodos de detección	55
2. DETECCIÓN DE <i>ARCOBACTER</i> EN MUESTRAS DE VERDURAS	56
2.1. Aislamiento de <i>Arcobacter</i> mediante cultivo en placa	56
2.2. Detección mediante PCR	57
2.3. Comparación de métodos de detección	58
3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS OBTENIDOS	59
3.1. Identificación de <i>Arcobacter</i> spp.	59
3.2. Identificación a nivel de especie mediante PCR-RFLP	60
3.2.1. PCR-RFLP del gen 16S ARNr de aislados de muestras de moluscos	61
3.2.2. PCR-RFLP del gen 16S ARNr de aislados de muestras de verduras	64

4. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS	71
4.1. Estudio de sensibilidad en placa	71
4.2. Estudio del mecanismo de resistencia a quinolonas	72
5. DETECCIÓN DE <i>HELICOBACTER</i> SPP. EN MUESTRAS DE MOLUSCOS Y VERDURAS	75
5.1. Detección de <i>Helicobacter</i> spp.	75
5.2. Detección de <i>H. pylori</i>	75
5.2.1. Detección por PCR convencional	75
5.2.2. Detección por PCR a tiempo real	76
<u>DISCUSIÓN</u>	81
<u>CONCLUSIONES</u>	88
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	90
<u>ANEXOS</u>	113

ÍNDICE DE TABLAS**INTRODUCCIÓN**

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

MATERIAL Y MÉTODOS

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

RESULTADOS

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

ÍNDICE DE FIGURAS**INTRODUCCIÓN**

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

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 4.	Esquema de detección de <i>Arcobacter</i> en muestras de moluscos	39
Figura 5.	Esquema de detección de <i>Arcobacter</i> en muestras de verduras	41

RESULTADOS

Figura 6.	Colonias de <i>Arcobacter</i> aisladas de moluscos en medio selectivo <i>Arcobacter</i> agar	53
Figura 7.	Morfología microscópica característica tras tinción Gram	54
Figura 8.	Amplificación del gen 23S ARNr de <i>Arcobacter</i> utilizando los iniciadores ARCO1 y ARCO2 para la detección en muestras de moluscos	55
Figura 9.	Amplificación del gen 23S ARNr de <i>Arcobacter</i> utilizando los iniciadores ARCO1 y ARCO2 para la detección en muestras de verduras	58
Figura 10.	Amplificación del gen 23S ARNr del género <i>Arcobacter</i> utilizando los iniciadores ARCO1 y ARCO2 para la identificación de los aislados	59
Figura 11.	Amplificación del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> usando los iniciadores CAH1a y CAH1b en diferentes muestras	60
Figura 12.	Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MseI</i>	60
Figura 13.	Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>BfaI</i>	61
Figura 14.	Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MnII</i>	61

Figura 15. Perfiles generados por restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MseI</i> en aislados procedentes moluscos	62
Figura 16. Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>BfaI</i> en aislados procedentes moluscos	63
Figura 17. Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MnII</i> en aislados procedentes moluscos	63
Figura 18. Perfiles generados por restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MseI</i> en aislados procedentes verduras	65
Figura 19. Perfiles generados por restricción del gen 16S ARNr de <i>Arcobacter</i> con la enzima <i>MnII</i> en aislados procedentes verduras	65
Figura 20. Prueba de difusión en disco, aislado resistente (A) y Prueba de E-test, aislado resistente (B)	71
Figura 21. Prueba de difusión en disco, aislado sensible (A) y Prueba de E-test, aislado sensible (B)	71
Figura 22. Amplificación de la región QRDR del gen <i>gyrA</i>	72
Figura 23. PCR específica para el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de moluscos	75
Figura 24. PCR específica para el gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> en muestras de verduras	76
Figura 25. Curva de amplificación a tiempo real para <i>H. pylori</i> en las 4 muestras de moluscos, junto con el control positivo <i>H. pylori</i> NCTC 11638	76
Figura 26. Curva de fusión a tiempo real para <i>H. pylori</i> en las 4 muestras de moluscos, junto con el control positivo <i>H. pylori</i> NCTC 11638	77
Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del gen <i>vacA</i> obtenidos por qPCR para la detección directa en muestras de moluscos	77
Figura 28. Curva de amplificación de PCR a tiempo real para <i>H. pylori</i> en las 5 muestras de verduras, junto con el control positivo	78
Figura 29. Curva de fusión de PCR a tiempo real para <i>H. pylori</i> en las 5 muestras de verduras, junto con el control positivo	78
Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen <i>vacA</i> obtenidos por qPCR para la muestra V1	79

- Figura 31.** Alineamiento de la secuencia del fragmento del gen de la toxina vacuolizante VacA de la cepa *H. pylori* NCTC 11638 con la secuencia obtenida por PCR a tiempo real para la muestra V1 79
- Figura 32.** Alineamiento de la secuencia del fragmento del gen de la toxina vacuolizante VacA de la cepa de *H. pylori* CCUG 17874 con la secuencia obtenida por PCR a tiempo real para la muestra V1 80

RESUMEN

Las bacterias del género *Arcobacter* son microorganismos pertenecientes a la familia *Campylobacteraceae*. Actualmente, el género *Arcobacter* comprende 23 especies, aisladas de una gran diversidad de hospedadores y nichos ecológicos. Las aguas de mar son consideradas el hábitat natural para muchas de ellas, aunque la mayor parte de las especies patógenas son de origen fecal. La transmisión al hombre parece estar asociada al consumo de alimentos crudos o poco cocidos. Sin embargo, la presencia de especies patógenas de *Arcobacter* en alimentos de origen marino y vegetales ha sido muy poco estudiada.

Cuando la detección e identificación de *Arcobacter*, se establece exclusivamente en función de métodos convencionales de cultivo, el proceso resulta lento, tedioso y poco efectivo en muchas ocasiones, originando frecuentes falsos negativos. Los métodos de detección molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pueden suponer una alternativa más rápida, sensible y fiable. Por todo ello, en este trabajo se ha realizado la detección de *Arcobacter* spp. mediante aislamiento por cultivo en placa y PCR, a partir de 100 muestras de moluscos y 100 de verduras. Los resultados obtenidos por ambos métodos confirman la existencia de *Arcobacter* en las muestras. La PCR, realizada tras un periodo de enriquecimiento, ha resultado ser más sensible que el cultivo para la detección del microorganismo en las muestras. En este trabajo se ha detectado contaminación por *Arcobacter* en el 71 % de las muestras de moluscos y el 20 % de las muestras de verduras.

Los aislados de *Arcobacter* obtenidos han sido identificados a nivel de especie mediante un análisis PCR-RFLP del gen 16 ARNr. Esta técnica ha permitido identificar las especies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. defluvii* de los aislados de moluscos, siendo la primera vez que es identificada *A. defluvii* de muestras de almejas. También es la primera vez que se detecta *Arcobacter* spp. en berberechos. En el caso de las verduras, se han aislado *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*. Esta última especie ha sido identificada por primera vez en este tipo de muestras.

También se ha estudiado la sensibilidad de los aislados obtenidos a ciprofloxacino y levofloxacino. El porcentaje de muestras contaminadas con cepas resistentes fue del 2 % en moluscos y del 1 % en verduras. Tres aislados procedentes de moluscos y 2 de verduras, identificados previamente como *A. butzleri*, han mostrado resistencia a ambas fluoroquinolonas. En todos ellos se ha detectado la existencia de una mutación en la posición 254 (C normal por T mutante) en la Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (QRDR) del gen *gyrA*. Nuestros resultados sobre la presencia del patógeno en ambos tipos de muestras son lo suficientemente relevantes como para considerar que el consumo de estos alimentos contaminados con *Arcobacter*, especialmente *A. butzleri*, podría suponer un riesgo para la salud humana.

Adicionalmente, en este trabajo se ha realizado un análisis de detección de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* mediante PCR convencional y PCR a tiempo real. El género *Helicobacter* comprende un gran número de especies consideradas patógenas. La especie más estudiada es *H. pylori*, uno de los patógenos más comunes en humanos, responsable del 90 % de las úlceras pépticas y relacionado estrechamente con el desarrollo de cáncer gástrico. Aunque

parece claro que *H. pylori* se transmite por la vía fecal-oral a través del agua, su presencia en los alimentos es poco conocida. Por lo tanto, en este estudio se tomó como objetivo estudiar la presencia de estos microorganismos en las muestras de moluscos y verduras. El análisis mediante PCR convencional no mostró resultados positivos para la detección de *Helicobacter* spp. ni *H. pylori*. La técnica PCR a tiempo real, sin embargo, ha permitido la detección de *H. pylori* en una muestra procedente de verduras (lechuga).

Los resultados de este trabajo demuestran que las especies patógenas de *Arcobacter* están presentes en porcentajes relevantes en verduras y moluscos. Por otra parte, se ha detectado *H. pylori* en verduras. Estos datos confirman la necesidad de seguir mejorando los métodos de detección y aislamiento de estos patógenos en alimentos para poder determinar, tanto su epidemiología como el riesgo real existente para los consumidores.

SUMMARY

Bacteria of the *Arcobacter* genus are microorganisms belonging to the *Campylobacteraceae* family. Currently, the *Arcobacter* genus comprises 23 species, isolated from a variety of hosts and ecological niches. Although most of the pathogenic species are from fecal origin, seawater is considered to be the habitat for most of them. The transmission to humans seems to be associated to the consumption of raw food or not entirely-cooked. In this regard, the presence of pathogenic *Arcobacter* species in food of marine origin and vegetables has not been deeply studied.

When the detection and identification of *Arcobacter* is performed exclusively using conventional culture-based methods, the process is slow, tedious and rarely effective many times, originating frequently false negatives. Molecular biology-based methods analyzing nucleic acids with the use of the Polymerase Chain Reaction (PCR), are alternative procedure characterized by being reliable, faster, more sensitive. In this thesis we have analysed the presence of *Arcobacter* spp in 100 samples from shellfish and another 100 samples from vegetables using both approaches, on one side through the isolation and characterization by plate culture in and on the other side by PCR. The results obtained by both methods confirm the presence of *Arcobacter* spp. in the samples. An enrichment period followed by PCR has proved to be more sensitive than culture for the detection of the microorganism in the samples. In this study, *Arcobacter* contamination has been detected in 71 % of the shellfish samples and 20 % of vegetable samples.

The obtained *Arcobacter* isolates have been identified to the species level analyzing the 16 rRNA gene by PCR-RFLP. This technique has allowed the identification of the species *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. defluvii* in the shellfish isolates, being the first time that *A. defluvii* is identified in clams. Additionally, it is also the first time that *Arcobacter* spp. is detected in cockles. *A. butzleri* and *A. cryaerophilus* have been isolated in vegetables being the last one the first time in this type of samples.

The sensitivity of the obtained isolates to ciprofloxacin and levofloxacin has also been studied. 2 % in analysed shellfish and 1 % in vegetables were contaminated with resistant strains. Three isolates from shellfish and 2 from vegetables, previously identified as *A. butzleri*, have shown resistance to both fluoroquinolones. In all of them, a mutation in the 254 position (C normal to T mutant) in the Quinolone Resistance-Determining Region (QRDR) of the *gyrA* gene has been detected. Our results regarding the presence of the pathogen in both types of samples are sufficiently relevant as to consider that the consumption of these contaminated foods with *Arcobacter*, especially *A. butzleri*, could suppose a risk for human health.

In addition, in this thesis the analisis of *Helicobacter* spp. and *H. pylori* by conventional PCR and real-time PCR has been carried out. The *Helicobacter* genus comprises a large number of species considered pathogenic. The most studied specie is *H. pylori*, one of the most common pathogens in humans and responsible of 90 % of peptic ulcers and closely related to the development of gastric cancer. Although it seems clear that *H. pylori* is

Summary

transmitted by fecal-oral route through the water, its presence in food is poorly known. Therefore, another objective of the present study has been to study the presence of these organisms in shellfish and vegetable samples. *Helicobacter* spp. or *H. pylori* could not be detected by conventional PCR. However, the real-time PCR technique allowed the detection of *H. pylori* in a sample from vegetables (lettuce).

In conclusion, we have demonstrated that the pathogenic species of *Arcobacter* are present in relevant percentages in vegetables and shellfish and additionally, *H. pylori* has been detected in vegetables. These data confirm the need for further improvement in the detection and isolation methods of these pathogens in food and to get a deeper insight in the epidemiology as the real risk concerning for the humans.

RESUM

Els bacteris del gènere *Arcobacter* són microorganismes pertanyents a la família *Campylobacteraceae*. Actualment, el gènere *Arcobacter* comprèn 23 espècies, aïllades d'una gran diversitat d'hostes i nínxols ecològics. Les aigües de la mar són considerades l'hàbitat natural per a moltes d'aquestes espècies, encara que la major part de les patògenes són d'origen fecal. La transmissió a l'home sembla estar associada al consum d'aliments crus o poc cuits. No obstant això, la presència d'espècies patògenes d'*Arcobacter* en aliments d'origen marí i vegetals ha sigut molt poc estudiada.

Quan la detecció i identificació d'*Arcobacter* s'estableix exclusivament en funció de mètodes convencionals de cultiu, el procés resulta lent, tediós i sovint poc efectiu, i origina amb freqüència falsos negatius. Els mètodes de detecció molecular basats en l'anàlisi d'àcids nucleics, com la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), poden suposar una alternativa més ràpida, sensible i fiable. Per tot això, en aquest treball s'ha realitzat la detecció d'*Arcobacter* spp. mitjançant aïllament per cultiu en placa i PCR, a partir de 100 mostres de mol·luscos i 100 de verdures. Els resultats obtinguts pels dos mètodes confirmen l'existència d'*Arcobacter* en les mostres. La PCR, després d'un període d'enriquiment, ha resultat ser més sensible que el cultiu per a la detecció del microorganisme en mostres de mol·luscos. En aquest treball, s'ha detectat contaminació per *Arcobacter* en el 71 % de les mostres de mol·luscos i el 20 % de les mostres de verdures.

Els aïllats d'*Arcobacter* obtinguts han sigut identificats a nivell d'espècie mitjançant una anàlisi PCR-RFLP del gen 16 ARNr. Aquesta tècnica ha permès identificar les espècies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* i *A. defluvii* en els aïllats de mol·luscos. Aquesta és la primera vegada que *A. defluvii* és identificada en mostres de cloïsses. També és la primera vegada que es detecta *Arcobacter* spp. en catxels. En el cas de les verdures, s'han aïllat *A. butzleri* i *A. cryaerophilus*. Aquesta última espècie ha sigut identificada per primera vegada en aquest tipus de mostres.

També s'ha estudiat la sensibilitat dels aïllats obtinguts a la ciprofloxacina i la levofloxacina. El percentatge de mostres contaminades amb soques resistents va ser del 2 % en mol·luscos i de l'1 % en verdures. 3 aïllats procedents de mol·luscos i 2 de verdures, identificats prèviament com *A. butzleri*, han mostrat resistència a ambdues fluoroquinolones. En tots aquests s'ha detectat l'existència d'una mutació en la posició 254 (C normal per T mutant) en la regió determinant de resistència a quinolones (QRDR) del gen *gyrA*. Els nostres resultats sobre la presència del patògen en els dos tipus de mostres són prou rellevants per a considerar que el consum d'aquests aliments contaminats amb *Arcobacter*, especialment *A. butzleri*, podria suposar un risc per a la salut humana.

Addicionalment, en aquest treball s'ha fet una anàlisi de detecció d'*Helicobacter* spp. i *H. pylori* mitjançant PCR convencional i PCR a temps real. El gènere *Helicobacter* comprèn un gran nombre d'espècies considerades patògenes. L'espècie més estudiada és *H. pylori*, un dels patògens més comuns en humans, responsable del 90% de les úlceres pèptiques i relacionada estretament amb el desenvolupament de càncer gàstric. Encara que sembla clar que *H. pylori* es transmet per la via fecal-oral a través de l'aigua, la

presència d'aquest bacteri en els aliments és poc coneguda. Per tant, en aquest estudi es va definir com a objectiu estudiar la presència d'aquests microorganismes en les mostres de mol·luscos i verdures. L'anàlisi mitjançant PCR convencional no va mostrar resultats positius per a la detecció d'*Helicobacter* spp. ni d'*H. pylori*. La tècnica PCR a temps real, en canvi, ha permès la detecció d'*H. pylori* en una mostra procedent de verdures (encisam).

Els resultats d'aquest treball demostren que les espècies patògenes d'*Arcobacter* estan presents en percentatges rellevants en verdures i mol·luscos. D'altra banda, s'ha detectat *H. pylori* en verdures. Aquestes dades confirmen la necessitat de seguir millorant els mètodes de detecció i aïllament d'aquests patògens en aliments per a poder-ne determinar tant l'epidemiologia com el risc real que hi ha per als consumidors.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO *ARCOBACTER*

1.1 Antecedentes históricos

Las bacterias del género *Arcobacter* forman parte de la familia *Campylobacteraceae*. Los microorganismos conocidos en la actualidad como campilobacterias, fueron observados por primera vez en 1881 por el alemán Escherich a partir de heces de niños con diarrea, y se incluyeron en un primer momento dentro del género *Vibrio* por su morfología espiral. McFadyean y Stockman, en 1913, describieron un microorganismo que presentaba una morfología curvada, implicado en casos de abortos e infertilidad en ganado bovino y, en 1919, Smith y Taylor aislaron un espirilo similar a partir de fluidos fetales bovinos, proponiendo el nombre de *Vibrio fetus* (Skirrow, 2006).

En 1931, Jones, Orcutt y Little aislaron unas bacterias de forma espiral causantes de enteritis en terneras, pero por diferenciarse de *V. fetus* en longitud y número de vueltas de la espiral, propusieron una nueva especie, *Vibrio jejuni*. Posteriormente, Doyle (1944) describió una bacteria similar aislada en el intestino de cerdos con disentería, dándole el nombre de *Vibrio coli* (Son, 2005).

A principios de los años 50, Florent denominó *Vibrio bubulus* a vibriones microaerófilos catalasa negativos, que habían sido aislados de la flora genital de toros y vacas con problemas de fertilidad. Así aparecían en la bibliografía *V. fetus*, *V. jejuni*, *V. coli* y *V. bubulus* como patógenos de animales (On, 2001).

En 1963, Sebald y Verón propusieron un nuevo género, *Campylobacter*, que etimológicamente significa "germen curvado", para agrupar y diferenciar las 4 especies ya anteriormente mencionadas, por su crecimiento microaerófilo, su metabolismo no fermentativo y la baja composición del ADN en bases G+C. Laanbroek *et al.* describieron por primera vez campilobacterias aerotolerantes en 1977 (On, 2001). Higgins y Degre, en 1979, aislaron a partir de abortos de bovinos y porcinos cepas que presentaban morfología helicoidal similar a la del género *Campylobacter*, pero que presentaban capacidad de crecer en presencia de oxígeno. De igual manera, Logan *et al.* (1982) aislaron campilobacterias aerotolerantes a partir de leche de vaca con mastitis, y Gill (1983) las aisló de la cavidad prepucial de ganado bovino.

La siguiente especie en ser descrita, *Campylobacter nitroflagilis* (McClung *et al.*, 1983) fue descubierta y aislada de raíces de *Spartina alterniflora* y sedimentos asociados a las mismas (Vandamme *et al.*, 1991). Años más tarde Neill *et al.* (1985) estudiaron un gran número de cepas de estas "campilobacterias aerotolerantes" extraídas de animales abortados, definiendo una nueva especie, *Campylobacter cryaerophila*, capaz de crecer en presencia de oxígeno ambiental a 30 °C después de un primer aislamiento en microaerofilia.

En 1991, Kiehlbauch y colaboradores aislaron un grupo de campilobacterias aerotolerantes de humanos y animales con enfermedades diarreicas, pero que presentaban

una homología ADN-ADN diferente a *C. cryaerophilus*, por lo que propusieron una nueva especie, *C. butzleri*.

Después de estudiar las especies del género *Campylobacter* por inmunotipificación, electroforesis en gel de poliacrilamida y estudios de hibridación de ADN-ARNr **Vandamme et al. (1991)** propusieron la formación de un nuevo género, de nombre *Arcobacter*, para agrupar estos microorganismos aerotolerantes similares a *Campylobacter*. *Campylobacter cryaerophila* se convirtió en *Arcobacter cryaerophilus* y *Campylobacter nitrofigilis* se convirtió en *Arcobacter nitrofigilis*, que fue seleccionada como especie tipo.

En el mismo año se aceptó la propuesta de **Vandamme y De Ley (1991)**, que consistió en la inclusión de una nueva familia, de nombre *Campylobacteraceae*, así como la agrupación en ella de los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter*. Este agrupamiento se hizo basándose en los caracteres fenotípicos y genotípicos que tenían en común y que a su vez los separaba de otros géneros.

El género fue modificado y ampliado por **Vandamme et al. (1992b)** con la inclusión de otra nueva especie, *Arcobacter skirrowii*, recuperado de animales enfermos así como de abortos. Los autores también propusieron la reclasificación de *Campylobacter butzleri* como *Arcobacter butzleri*.

1.2. Situación taxonómica actual

Hasta la actualidad, según la última clasificación descrita en el **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012)** el género *Arcobacter* forma parte de la familia *Campylobacteraceae* (**Vandamme et al., 1992b**), que junto con las familias *Helicobacteraceae* (**Vandamme, 2000**) y *Hydrogenimonaceae* (**Han et al., 2012**), conforman el orden *Campylobacterales* de las *Epsilonproteobacterias* (**Collado y Figueras, 2011**).

Tabla 1. Taxonomía de *Arcobacter*

Dominio	Bacteria
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	<i>Epsilonproteobacteria</i>
Orden I	Campylobacterales
Familia I	<i>Campylobacteraceae</i>
Género I	<i>Arcobacter</i>
Género II	<i>Campylobacter</i>
Género III	<i>Sulfurospirillum</i>

El género *Arcobacter* comprende 23 de especies: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. nitrofigilis*, *A. halophilus*, *A. cibarius*, *A. thereius*, *A. mytili*, *A. molluscorum*,

A. ellisii, *A. venerupis*, *A. bivalviorum*, *A. ebronensis*, *A. marinus*, *A. trophiarum*, *A. defluvii*, *A. cloacae*, *A. suis*, *A. aquimarinus*, *A. anaerophilus*, *A. lanthieri*, *A. pacificus*, *A. faecis*. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <http://www.bacterio.net/arcobacter.html>; **Whiteduck-Leveillee et al., 2015b**; **Zhang et al. 2015**) (Tabla 2).

Tabla 2. Especies del género *Arcobacter*

Nombre	Origen	Referencia
<i>A. anaerophilus</i>	Sedimentos estuarios	Sasi et al. (2013)
<i>A. aquimarinus</i>	Agua de río	Levican et al. (2015)
<i>A. bivalviorum</i>	Mejillones	Levican et al. (2012)
<i>A. butzleri</i>	Heces de humanos	Kiehlbauch et al. (1991) Vandamme et al. (1992b)
<i>A. cibarius</i>	Carne de pollo	Houf et al. (2005)
<i>A. cloacae</i>	Residuos urbanos	Levican et al. (2013)
<i>A. cryaerophilus</i>	Fetos de ovinos	Neill et al. (1985) Vandamme et al. (1991)
<i>A. defluvii</i>	Aguas residuales	Collado et al. (2011)
<i>A. ebronensis</i>	Mejillones	Levican et al. (2015)
<i>A. ellisii</i>	Mejillones	Figueras et al. (2011b)
<i>A. faecis</i>	Aguas residuales	Whiteduck-Leveillee et al. (2015b)
<i>A. halophilus</i>	Laguna hipersalina	Donachie et al. (2005)
<i>A. lanthieri</i>	Cerdo y estiércol de ganado lechero	Whiteduck-Leveillee et al. (2015a)
<i>A. marinus</i>	Aguas de mar, algas y estrella de mar	Kim et al. (2010)
<i>A. molluscorum</i>	Mejillones	Figueras et al. (2011a)
<i>A. mytili</i>	Mejillones	Collado et al. (2009a)
<i>A. nitrofigilis</i>	Raíces de <i>Spartina alterniflora</i>	McClung et al. (1983) Vandamme et al. (1991)
<i>A. pacificus</i>	Aguas de mar	Zhang et al. (2015)
<i>A. skirrowii</i>	Heces de ovinos	Vandamme et al. (1992)
<i>A. suis</i>	Heces de cerdo	Levican et al. (2013)
<i>A. thereius</i>	Abortos de porcinos y cloacas de pato	Houf et al. (2009)
<i>A. trophiarum</i>	Heces de cerdos de engorde y abortados	De Smet et al. (2011)
<i>A. venerupis</i>	Almejas	Levican et al. (2012)

La especie *A. cryaerophilus* engloba dos subgrupos, 1A y 1B en función de los diferentes perfiles de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los genes 16S y 23S ARNr (**Kiehlbauch et al., 1991**), además del contenido total de proteínas celulares y ácidos grasos (**Vandamme et al., 1992b**).

Las diferentes especies que comprenden el género *Arcobacter* han sido aisladas de muy diversos ambientes y hospedadores, circunstancia única entre las *Epsilonproteobacterias* (Tabla 2).

De las 23 especies del género, 4 se consideran patógenas para humanos y animales: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, y *A. thereius* (**Vandamme et al., 2005; Collado y Figueras, 2011; Šilha et al., 2015**).

1.3. Morfología y características bioquímicas

Los microorganismos de este género son bacilos Gram negativos, cortos, curvados o ligeramente curvados en forma de S o espiral cuando está en cultivo joven, y de forma cocoidal o esférica en cultivos viejos. Presentan un flagelo polar que las dota de movimiento típico en forma de sacacorchos y miden de entre 0,2 y 0,9 μm de ancho con una longitud de entre 0,5 y 3 μm . Las colonias de *Arcobacter* comúnmente carecen de pigmentación.

Son quimioorganótrofas y utilizan una gran variedad de fuentes de carbono, como ácidos orgánicos y aminoácidos (**Calvo et al., 2013**). Poseen actividad oxidasa y catalasa variable, presentan reacción negativa con el rojo de metilo y con la prueba de Voges-Proskauer y no producen indol, a excepción de las especies *A. mytili* y *A. molluscorum* (**Collado et al., 2009a**). Excepto *A. nitrofigilis*, *A. venerupis*, *A. defluvii* y *A. ebronensis*, las demás especies del género son ureasa negativas (**Levicán et al., 2015**). La mayoría de las especies reducen nitratos y no hidrolizan el hipurato (Tabla 3).

Estos microorganismos pueden crecer en un extenso rango de temperaturas, comprendido entre 15 y 42 °C. Aunque son microaerófilos, crecen en aerobiosis a 30 °C. No obstante, para el aislamiento inicial de la mayoría de ellas, el crecimiento óptimo ocurre bajo condiciones de microaerofilia (5-10 % O₂) y no requieren hidrógeno (**Calvo et al., 2013**).

Las especies de *Arcobacter* difieren en sus requerimientos nutritivos y condiciones de cultivo. La característica más importante es su dependencia del ion sodio. Las concentraciones mínimas requeridas de Na⁺ para conseguir un crecimiento óptimo se encuentran dentro de un rango que va desde 0,5 al 4 %; todas las especies reaccionan positivamente a la concentración mínima, a excepción de *A. halophilus* y *A. marinus* (**Levicán et al., 2015**).

Las especies de *Arcobacter* son difíciles de identificar, ya que puede confundirse fácilmente con *Campylobacter*, debido a que las pruebas bioquímicas utilizadas para diferenciar bacterias clínicas, como la fermentación o la oxidación de hidratos de carbono, a menudo producen resultados negativos o variables para estos géneros (**Collado y Figueras, 2011**). Sin embargo, *Arcobacter*, a diferencia de *Campylobacter* crece a una

temperatura más baja y en condiciones aeróbicas (**Vandamme *et al.*, 2005; Collado y Figueras, 2011; Ünver *et al.*, 2013**). En la tabla 3, se muestra un resumen de las diferencias fenotípicas y bioquímicas de las 23 especies de *Arcobacter*.

Introducción

Tabla 3. Características fenotípicas de las especies del género *Arcobacter*

1, *A. ebronensis*; 2, *A. aquimarinus*; 3, *A. nitrofigilis*; 4, *A. cryaerophilus*; 5, *A. butzleri*; 6, *A. skirrowii*; 7, *A. cibarius*; 8, *A. halophilus*; 9, *A. mytili*; 10, *A. thereius*; 11, *A. marinus*; 12, *A. trophiarum*; 13, *A. defluvii*; 14, *A. molluscorum*; 15, *A. ellisii*; 16, *A. bivalviorum*; 17, *A. venerupis*; 18, *A. cloacae*; 19, *A. suis*; 20, *A. anaerophilus*. 21, *A. lanthieri*; 22, *A. pacificus*; 23, *A. faecis*.

Especies	*1	2	3	4	5	6	7	8	*9	10	11	12	13	*14	*15	*16	*17	18	19	20	21	22	23
Crecimiento en /sobre																							
Aerobiosis a 37 °C	-	+	V(-)	V(+)	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+		+
CO2 a 37 °C	-	+	-	V(+)	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+		+
CO2 a 42 °C	-	-	-	-	V(+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-		-
0,5 % (p/v) NaCl	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
4 % (p/v) NaCl	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-		-
1 % (p/v) glicina	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	V(-)	-	-	-	-	-	-	-	+	+		-
0,05 % safranina	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V(+)	+	+	-	-	-	+	-	ND	ND		ND
0,1 % desoxicolato de sodio	+	+	V(-)	V(+)	+	+	+	-	+	V(-)	-	+	+	+	+	-	-	+	+	ND	ND		ND
1 % (p/v) oxgall	-	+	-	+	V(+)	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	ND		ND
0,04 % TTC	-	-	-	+	+	V(-)	V(-)	-	-	V(-)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND		ND
0,01 % TTC	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	ND	ND		ND
Medio mínimo	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	V(+)	+	ND	ND		ND
MacConkey	-	-	-	V(-)	+	-	+	-	+	V(+)	-	V(+)	+	+	V(+)	-	+	+	+	ND	+		+
CCDA	-	+	-	+	+	+	V(-)	-	-	V(-)	-	+	+	-	+	-	+	+	-	ND	+		+
Resistencia a: Cefoperazona (64 mg l ⁻¹)	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	V(+)	+	-	-	-	-	-	-	+		-
Actividad catalasa	-	+	+	+	V(+)	+	V(-)	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		+
Actividad Ureasa	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	V(-)	-	+	-	-	-	-		-
Reducción de nitrato	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+		+
Hidrólisis del indoxil-acetato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+

*: Especies aisladas por primera vez de moluscos bivalvos

2. PATOGENICIDAD DEL GÉNERO *ARCOBACTER*

2.1. Importancia clínica en humanos

El género *Arcobacter* llama cada vez más la atención de epidemiólogos y microbiólogos clínicos, debido a que algunos de sus miembros se consideran enteropatógenos emergentes y potenciales agentes zoonóticos (**Collado et al., 2009b; Ho et al., 2006a; Wesley y Miller, 2010**).

Aunque el papel de las especies de *Arcobacter* en enfermedades humanas aún no está bien establecido, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius* se han asociado con enfermedades gastrointestinales, tanto en estudios de población como en casos clínicos (**Collado y Figueras, 2011**). Estas especies han sido aisladas de muestras fecales de personas con diarrea, y en personas con bacteriemia, endocarditis y peritonitis (**Fernández et al., 2004; Houf y Stephan, 2007; Samie et al., 2007; Fera et al., 2010; Šilha et al., 2015**). Sin embargo, existen informes sobre la existencia de portadores asintomáticos de especies de *Arcobacter*, con lo cual persisten las incógnitas sobre el potencial patógeno de este género bacteriano (**Calvo et al., 2013**).

La gravedad del cuadro clínico en las infecciones por *Arcobacter* es muy variada. El síntoma principal es la diarrea acuosa persistente, en contraste con la diarrea inflamatoria encontrada en los casos de infección por *Campylobacter jejuni* (**Vandenberg et al., 2004**). Las manifestaciones clínicas, sin embargo, pueden ir desde infecciones asintomáticas (**Samie et al., 2007; Calvo et al., 2013**) o diarreas leves, hasta diarreas crónicas y abundantes, que exigen hospitalización. En un brote por *A. butzleri* que tuvo lugar en una escuela italiana, que afectó a 10 niños en el año 1992, el síntoma principal fue calambres abdominales recurrentes sin diarrea (**Vandamme et al., 1992a**).

Actualmente se considera que la importancia de las especies de *Arcobacter* está siendo subestimada, debido principalmente, a las limitaciones en los métodos de detección e identificación (**Levican et al., 2014**). No existe un método de aislamiento estándar para la identificación de bacterias de este género, provocando que los trabajos publicados ofrezcan valores distintos de prevalencia, y a su vez, no puedan ser comparados entre sí de manera eficaz (**Patyal et al., 2011; Calvo et al., 2013**). Sin embargo, numerosos informes evidencian que existe un impacto significativo de *Arcobacter* en la salud humana y animal. En tal sentido, mediante métodos de cultivo en muestras de heces diarreicas, las prevalencias informadas oscilan entre 0,1 % en África hasta un 2,4 % en Tailandia. No obstante, usando métodos moleculares se ha detectado una prevalencia mayor, que varía entre un 1,2 % en Francia y un 12,9 % en Sudáfrica (**Collado y Figueras, 2011**).

Por otra parte, el género *Arcobacter* presenta prevalencias similares en países con diferentes niveles de desarrollo, como Sudáfrica, Bélgica, Francia, Turquía, Nueva Zelanda, Chile o los Países Bajos (**Vandenberg et al., 2004; Prouzet-Mauleon et al., 2006; Samie et al., 2007; Mandisodza et al., 2012; Kayman et al., 2012; Collado et al., 2013; De Boer et al., 2013**).

Algo que es común en todos los estudios es que *A. butzleri* presenta la mayor prevalencia, seguido por *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (**Samie et al., 2007; Collado et al., 2014**). En

un estudio sobre la prevalencia de *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Arcobacter* desarrollado por **Samie et al. (2007)**, mediante métodos moleculares, en 322 muestras de heces de pacientes con y sin VIH en Sudáfrica, encontraron que *A. butzleri* era la tercera especie más frecuentes (6,2 %), después de *Helicobacter pylori* (50,6 %) y *Campylobacter jejuni* (10,2 %). De hecho, en dos estudios independientes realizados en Bélgica y Francia (**Vandenberg et al., 2004; Prouzet-Mauleon et al., 2006**), *A. butzleri* fue el cuarto microorganismo más frecuentemente recuperado de heces de pacientes con diarrea. También se ha demostrado la asociación de esta bacteria con la diarrea del viajero en turistas europeos y estadounidenses en México, Guatemala y la India, con una prevalencia cercana al 8 % (**Jiang et al., 2010**).

2.2. Mecanismo de virulencia

Los mecanismos de patogenicidad y virulencia de las especies *Arcobacter* son aún poco conocidos, a pesar de existir varios estudios que analizan su capacidad invasiva, de adherencia y citotoxicidad en varias líneas celulares, como CHO, Vero, HeLa e INT 407. En conjunto, estos estudios han mostrado grandes diferencias en la capacidad de adhesión, invasión, y la citotoxicidad de las cepas de *Arcobacter* (**Carbone et al., 2003; Ho et al., 2007; Gugliandolo et al., 2008; Karadas et al., 2013**). Los investigadores han llegado a la conclusión de que las diferencias observadas pueden ser debidas al origen de las cepas (ambientales frente a clínicas), así como a las diferentes líneas celulares utilizadas en los estudios.

La capacidad patógena *in vitro* se ha demostrado principalmente para *A. cryaerophilus* y *A. butzleri*, siendo esta última la especie más invasiva, con efectos citotóxicos en células CHO y Vero y en animales infectados experimentalmente (**Collado y Figueras, 2011; Karadas et al., 2013**). En un reciente estudio desarrollado por **Karadas et al. (2016)**, en el que se comparaba la patogenicidad de cepas de humanos con las aisladas de porcino, los autores demostraron que *A. butzleri* se adhiere e invade líneas celulares humanas de diferentes orígenes, tales como las células del colon HT-29/B6 (**Karadas et al., 2016**).

Aunque, *A. butzleri* está asociado con enfermedades humanas, muy poco se conoce sobre cuál es el rol que juegan en la infección las características del hospedador, incluyendo edad, sexo y estado inmunológico, pero al igual que con otros patógenos, se estima que son factores predisponentes, que facilitan o propician la infección (**Fera et al., 2010**).

2.2.1. Mecanismo de adherencia y ataque

A. butzleri tiene capacidad de adherencia al epitelio, lo que causa una disfunción de la barrera epitelial, induciendo cambios en las proteínas de unión estrecha y apoptosis celular, lo que produce una diarrea secretora (**Fernández et al., 2010; Bucker et al., 2009**). También se ha demostrado el efecto citotóxico sobre células Vero, probablemente debido a la producción de citotoxinas vacuolizantes (**Villarruel-López et al., 2003**). Por último, se ha sugerido que este microorganismo tiene el potencial de invadir otros órganos del cuerpo, ya que se ha aislado de pacientes con cirrosis hepática y apendicitis gangrenosa aguda (**Yan et al., 2000**).

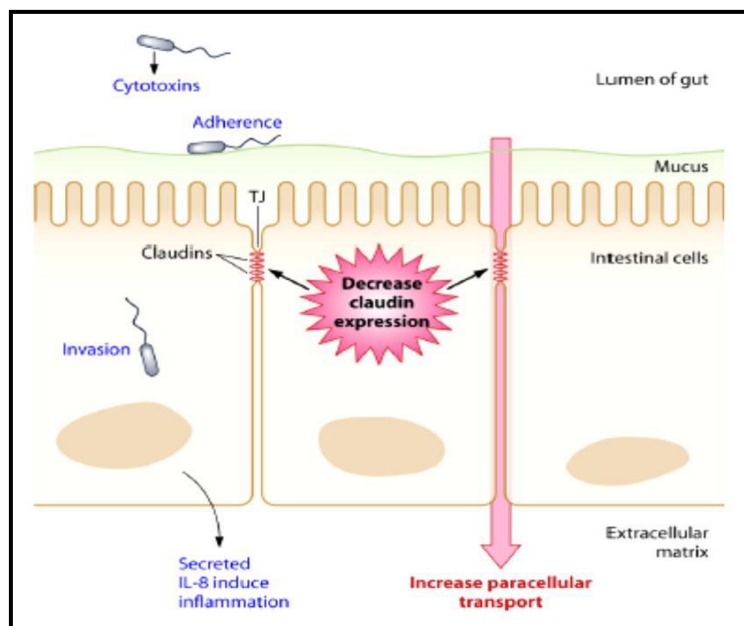


Figura 1. Mecanismos de virulencia descritos para *Arcobacter* (Collado y Figueras, 2011)

2.3. Sensibilidad y resistencia a antibióticos

Las enteritis por *Arcobacter* suelen ser autolimitadas, sin requerir tratamiento antimicrobiano (Collado y Figueras, 2011). Cuando es necesario, las fluoroquinolonas y tetraciclinas son el tratamiento de elección para *Arcobacter* (Houf *et al.*, 2004; Vandenberg *et al.*, 2006). Fera *et al.* (2003) indicaron que las fluoroquinolonas son eficaces frente a las especies *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*. Sin embargo, hay estudios en los cuales, algunas cepas de *Arcobacter* han resultado resistentes al ciprofloxacino y al ácido nalidíxico (Collado y Figuras, 2011).

No hay criterios establecidos para las pruebas de sensibilidad a antibióticos para las diferentes especies de *Arcobacter* (Mandisodza *et al.*, 2012). Los criterios más comúnmente utilizados para la interpretación de los resultados son los definidos por el “Clinical Laboratory and Standards Institute” (CLSI) para *C. jejuni* y *C. coli* o por el “National Antimicrobial Resistance Monitoring System” (NARMS, CDC, 2006) para *Campylobacter* spp. (Mandisodza *et al.*, 2012; Kayman *et al.*, 2012).

Ferreira *et al.* (2013), investigaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 43 aislados de *A. butzleri* recuperados de la piel del cuello de pollo y de agua de drenaje en Portugal, observando resistencia a ciprofloxacino en un 55,8 % de las cepas, y del 97,7 % al 100 % a amoxicilina, ampicilina, trimetoprim, vancomicina, piperacilina y cefoperazona. En contraste, en un estudio realizado por Shah *et al.* (2012b) sobre aislados de ganado, carne de vacuno, agua y leche, el 6,5 % presentaron resistencia a la tetraciclina, el 21,7 % a ciprofloxacino y el 26,1 % a gentamicina, mientras que la mayoría de las cepas mostraron resistencia a la eritromicina (69,6 %), ampicilina (73,9 %) y cefotaxima (69,6 %). En otras investigaciones, Van den Abeele *et al.* (2016), Vandenberg *et al.* (2006) y Mandisodza *et al.*, (2012) encontraron que el 72 %, 96,7 % y 100 % de los aislados clínicos, respectivamente, eran sensibles a ciprofloxacino. De igual manera, Fera

et al. (2003) y **Akincioglu (2011)** informaron que todos los aislados de *Arcobacter* obtenidos de muestras ambientales habían mostrado sensibilidad a fluoroquinolonas.

El mecanismo de acción de las quinolonas consiste en interferir en la síntesis de ADN, produciendo la muerte celular (**Lapongov et al., 2009**). Las quinolonas penetran la pared celular a través de porinas, inhibiendo directamente la replicación bacteriana al interactuar con dos enzimas: ADN girasa, una proteína tetramérica codificada por los genes *gyrA* y *gyrB* (**Maruri et al., 2012; Aldred et al., 2014**), y topoisomerasa IV, codificada por los genes *parC* y *parE* (**Aerstrup et al., 2001; Nitiss, 2009**). Estas dos enzimas son necesarias para realizar el superenrollamiento del ADN. La ADN girasa es el objetivo primordial en bacterias Gram negativas, mientras que la topoisomerasa IV lo es en bacterias Gram positivas (**Álvarez-Hernández et al., 2015**).

La resistencia de *Arcobacter* a fluoroquinolonas se atribuye fundamentalmente a mutaciones cromosómicas (**Ambrozic et al., 2007**), siendo las que afectan a *gyrA*, el gen que codifica la subunidad subunidad A del ADN girasa, el mecanismo que con mayor frecuencia se encuentra involucrado en estas resistencias (**Aldred et al., 2014**). Se ha puesto de manifiesto que la presencia de una mutación en la posición 254 de la región QRDR del gen *gyrA*, que origina la sustitución de un aminoácido en la posición 85 (Thr a Ile) de la proteína GyrA, está relacionada con la aparición de resistencia en *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* (**Abdelbaqi et al., 2007; Van den Abeele et al. 2016**).

3. EPIDEMIOLOGÍA Y RUTAS DE TRANSMISIÓN DE *ARCOBACTER*

La epidemiología de *Arcobacter* aún no está bien esclarecida. Las especies patógenas del género *Arcobacter*, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius*, son consideradas patógenos entéricos y su reservorio parece ser el intestino de los animales (**Fernández et al., 2004; Vandenberg et al., 2004; Šilha et al., 2015**).

La infección con *Arcobacter* puede ocurrir por contaminación cruzada mediante la manipulación de alimentos, el consumo de alimentos de origen animal, el consumo de agua contaminada o la contaminación directa con materia fecal, tanto animal como humana, así como por contacto con el individuo enfermo o reservorios animales (**Fernández et al., 2015**).

3.1. Transmisión por alimentos

Se ha demostrado que las bacterias del género *Arcobacter* pueden tolerar concentraciones altas de cloruro de sodio así como la desecación; pueden crecer a temperaturas de refrigeración y tienen la capacidad de unirse a distintos tipos de superficies (**Collado y Figueras, 2011**). Además, en un estudio llevado a cabo por **Ferreira et al. (2013)**, la mayoría de las cepas (72,2 %) mostraron la capacidad de formar biopelículas con un alto grado de resistencia a varios antibióticos, lo que podría explicar la persistencia de *Arcobacter* en la cadena alimentaria.

Se ha encontrado *Arcobacter* spp. en diferentes tipos de alimentos de origen animal. La incidencia en leche de ganado vacuno oscila entre el 3,2 % y el 46,0 % de las muestras (**Ertas et al., 2010; Shah et al., 2011, 2012a; Yesilmen et al., 2014**). Además, en un estudio en 13 granjas de vacas y 1 granja autorizada a vender leche cruda en Bolonia, Italia, se encontró *Arcobacter* en 7 granjas de vacas y una granja de búfalos, así como en quesos frescos (**Serraino et al., 2013; Yesilmen et al., 2014**).

Diversos estudios también han investigado los productos cárnicos, encontrando incidencias de entre el 14 % y el 53 % en carne de cerdo (**Zacharow et al., 2015; Collado et al., 2009b**), del 16,9 % al 46,8 % en carne de ternera, y del 10 % en la carne de conejo (**Shah et al., 2012c; Collado et al., 2009b**). Los resultados de estos estudios sugieren que la contaminación de los productos cárnicos ocurre probablemente por contaminación cruzada de las canales con las heces de los animales durante el faenado en el matadero (**Collado y Figueras, 2011**).

De Smet et al. (2010), investigaron la contaminación por *Arcobacter* de canales de bovinos en dos mataderos y encontraron la misma cepa de *A. butzleri* (determinado por amplificación de secuencias consenso repetitivas intragénicas, ERIC-PCR) en dos canales de animales procedentes de distintos lugares, pero sacrificados en el mismo día y en el mismo matadero. En un estudio llevado a cabo en mataderos portugueses, se observaron resultados similares en animales pertenecientes a manadas diferentes (**Ferreira et al., 2013**). En ese estudio, la misma cepa (determinado por electroforesis en campo pulsado, PFGE) fue aislada de muestras recogidas en diferentes puntos del matadero.

Aunque aún son pocos los estudios que han evaluado el potencial de transmisión de los moluscos y otros alimentos marinos, parece que podrían actuar como una importante fuente de transmisión de cepas virulentas, dado que a menudo son consumidos poco cocinados o crudos, y harían falta más estudios para determinar el papel real de estos alimentos en la infección por *Arcobacter* (**Collado et al., 2014**).

Collado et al. (2009b), encontraron una prevalencia de *Arcobacter* del 100 % en muestras de almejas y del 41,1 % en mejillones. En este y en otros estudios, la especie predominante fue *A. butzleri*, seguida de *A. cryaerophilus* y finalmente *A. skirrowii* (**Collado et al., 2009b; Figueras et al., 2011c**). En otro estudio desarrollado en España, **Collado et al. (2014)** detectaron que el 40,5 % de muestras de moluscos estaban contaminadas con *Arcobacter*. **Levicán et al. (2014)**, detectaron el microorganismo en el 32 % de las muestras analizadas. **Silha et al. (2015)**, en un trabajo llevado a cabo en la República Checa, aislaron *Arcobacter* del 46,2 % de moluscos.

La concentración de microorganismos del género *Arcobacter* tiende a aumentar en aguas más cálidas cuando existe una adecuada disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Su presencia es más común en temporadas del año con climas calientes (**Levicán et al., 2014**). De hecho, estudios realizados para detectar la presencia de bacterias del género *Arcobacter* en moluscos en las costas de España, indicaron que la concentración de estas bacterias era más elevada durante los meses de mayo a septiembre, mientras que la prevalencia era menor desde octubre hasta finales de marzo (**Collado et al., 2011; Levicán et al., 2014**).

Además de las especies de *Arcobacter* ya conocidas como patógenas, un gran número de nuevas especies, como *A. mytili*, *A. molluscorum*, *A. ellisii*, *A. venerupis*, *A. bivalviorum* y *A. ebronensis* han sido identificadas por primera vez a partir de moluscos (**Collado et al., 2009a; Figueras et al., 2011a; Figueras et al., 2011b; Levican, et al 2012; 2015**). No existen hasta ahora datos sobre la patogenicidad de estas nuevas especies.

Las verduras no parecen ser un reservorio para *Arcobacter*. Sin embargo, este tipo de alimento puede ser contaminado por el agua de riego, así como en el lavado de las verduras durante el manejo postcosecha. En este caso, la reutilización del agua de lavado o una desinfección insuficiente pueden conducir a la contaminación cruzada de las verduras (**Hausdorf et al., 2011; González y Ferrús, 2011**). Otra posible vía de contaminación de los vegetales es la presencia de partículas del suelo contaminadas con descargas fecales de animales (**Hausdorf et al., 2013**).

González y Ferrús (2011) aislaron *Arcobacter* a partir de lechugas frescas presentes en el mercado. **Hausdorf et al. (2011)** utilizaron secuencias del gen 16S ARNr para investigar las comunidades bacterianas presentes en el agua de lavado de una instalación de procesamiento de zanahoria, encontrando que *Arcobacter* era el cuarto género más prevalente (9 % de todos los aislados obtenidos).

De igual manera, en otra investigación realizada por **Hausdorf et al. (2013)**, se detectó la presencia de *Arcobacter* en diferentes áreas de una planta de procesamiento de espinacas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa a Tiempo Real (qPCR).

3.2. Transmisión por agua

Las aguas de mar son consideradas el hábitat natural para muchas especies del género *Arcobacter*, y el hecho de que en los últimos años un gran número de nuevas especies hayan sido aisladas inicialmente de moluscos, probablemente se deba a que éstos son grandes filtradores de agua (**Levican et al., 2012; Levican et al., 2013-2015**).

El agua residual también ha sido propuesta como otro reservorio importante de este género. De hecho, las aguas residuales han dado origen al descubrimiento de nuevas especies, como *A. defluvii* en 2011 y *A. faecis* en 2015 (**Collado et al., 2011; Whiteduck-Leveillee et al., 2015b**).

Por otra parte, estudios de prevalencia de *Arcobacter* en distintos tipos de aguas han revelado la presencia de este microorganismo en aguas subterráneas, residuales, de ríos, lagos y mares (**Rice et al., 1999; Moreno et al., 2003a; Fera et al., 2004; Morita et al., 2004**).

Se han descrito al menos tres brotes infecciosos asociados al consumo de agua contaminada por *Arcobacter*. El primero se registró en los Estados Unidos, en un campamento de verano en Idaho, y afectó a un grupo de niños que presentaron diarrea, náuseas y vómitos (**Rice et al., 1999**). El segundo, también ocurrido en los Estados Unidos (lago Erie, Ohio), se debió a una contaminación masiva de las aguas subterráneas, y afectó a 1.450 personas (**Fong et al., 2007**). El último, ocurrido en Eslovenia, fue causado por contaminación fecal del sistema de agua potable (**Kopilovic et al., 2008**). En

los últimos años, el número de brotes por consumo de agua se ha incrementado notablemente (**Little y Gillespie, 2008; Hausdorf et al., 2013; Jalava et al., 2014**).

La alta prevalencia de estos microorganismos en diferentes tipos de aguas ha hecho suponer que las especies de *Arcobacter* podrían ser autóctonas de ambientes acuáticos (**Fera et al., 2004; Collado et al., 2010**). Sin embargo, en todos los casos de brotes el agua potable presentaba contaminación fecal, por lo que su verdadero origen aún no ha podido ser totalmente probado (**Collado y Figueras, 2011**). La prevalencia de estos microorganismos aumenta en aguas contaminadas con heces de humanos y animales en comparación con otras que no lo están (**Collado et al., 2008**). Además, *Arcobacter* es muy prevalente en heces de ganado y en efluentes provenientes de la ganadería (**Chinivasagam et al., 2007**).

Diversas investigaciones han demostrado experimentalmente que estas bacterias pueden sobrevivir durante mucho tiempo en agua en presencia de materia orgánica (**Van Driessche y Houf, 2008**). Por ejemplo, la supervivencia ha sido registrada durante al menos 250 días a 4 °C con 1 % de material orgánico (**Van Driessche y Houf, 2008**). Además, se ha sugerido que *Arcobacter* podría tener la capacidad de adoptar el estado Viable pero No Cultivable, VNC (**Collado y Figueras, 2011**). Es posible que, en la transmisión hídrica tengan bastante que ver la participación de amebas de vida libre, como *Acanthamoeba castellanii*, con la cual *A. butzleri* puede establecer endosimbiosis, sobreviviendo en el interior del protozoo al menos durante 10 días (**Fernández et al., 2012**).

El agua sometida a un inadecuado proceso de potabilización ha sido señalada como un factor de riesgo importante en la adquisición de enfermedades diarreicas asociadas con *Arcobacter* (**Fong et al., 2007; Collado et al., 2008**). Aunque se ha demostrado que los tratamientos de potabilización del agua son eficaces en la eliminación de *Arcobacter* (**Collado et al., 2010**), hay estudios en los cuales se ha logrado recuperar *A. butzleri* y *A. skirrowii* del 3 % (3/100) de muestras de agua potable en Turquía (**Ertas et al., 2010**) y del 11,1 % (2/18) en Malasia (**Shah et al., 2012a**). Por otra parte, **Jacob et al. (1998)** y **Collado et al. (2010)** confirmaron la presencia de *Arcobacter* en plantas de tratamiento de agua potable en Alemania y en España, respectivamente.

Es de suponer que esta contaminación puede estar vinculada a la cloración inadecuada de agua o a la capacidad del microorganismo de adherirse a las tuberías y formar biopelículas bacterianas (**Assanta et al., 2002; Shah et al., 2012a**). De hecho, uno de los problemas registrados por el brote del campamento de verano en los Estados Unidos antes mencionado, fue un fallo en el sistema de cloración (**Rice et al., 1999**).

Las bacterias del género *Arcobacter*, han mostrado una alta prevalencia en aguas residuales y lodos de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), con niveles de detección de entre el 40 % y el 100 % de las muestras, según diferentes estudios (**Stampi et al., 1993 y 1999; Moreno et al., 2003a; González et al., 2007a y 2010; Collado et al., 2008 y 2010**). En tres de estos estudios, *Arcobacter* fue detectado incluso en el agua de salida postratamiento (**Stampi et al., 1993 y 1999; Moreno et al., 2003a**). Sin embargo, no está claro si la presencia de *Arcobacter* en las aguas residuales se debe a la contaminación fecal o si estos microorganismos son residentes que crecen en los sistemas de alcantarillado (**Collado y Figueras, 2011**).

Vandewalle et al. (2012) demostraron que la prevalencia de *Arcobacter* se correlaciona de forma positiva con los niveles de amoníaco, fósforo y sólidos en suspensión en agua. La presencia de estos microorganismos en aguas residuales es tan común que **Newton et al. (2013)**, han propuesto considerar al género *Arcobacter* como un indicador de contaminación con aguas residuales, junto con *Acinetobacter* y *Trichococcus*, los taxones más comunes en este tipo de agua.

4. INTRODUCCIÓN AL GÉNERO *HELICOBACTER*

4.1. Antecedentes históricos

En 1875, los investigadores alemanes Bottcher y Letulle descubrieron en la base y en los bordes de úlceras gástricas una bacteria pero, al no poder ser cultivada, la información no llamó la atención y fue olvidada (**Kidd y Modlin, 1998**). Años más tarde, en 1893, Bizzozero identificó un tipo de bacterias de forma espiral en la mucosa gástrica de perros, infiltrando las glándulas e incluso dentro del citoplasma y vacuolas de las células parietales del animal. Salomon, en 1896, describió la misma bacteria en el estómago de ratas; dicha bacteria fue nombrada en 1996, como *Helicobacter bizzozeronii* (**Kidd y Modlin, 1998; Hänninen et al., 1996**).

En 1899, el gastroenterólogo polaco Jaworski Walery describió bacterias alargadas de forma espiral en muestras de aspirados gástricos humanos, a las que llamó *Vibrio regula*, convirtiéndose en el primer investigador en informar sobre la posible participación del microorganismo en las enfermedades gástricas. Estos resultados, pese a ser publicados en un libro de gastroenterología, no tuvieron la difusión que merecía (**Konturek, 2003**). En 1906, Krienitz encontró bacterias espirales en la mucosa del estómago de pacientes con cáncer gástrico. En 1921, Edkins describe la presencia de *Helicobacter felis* en gatos (**Kidd y Modlin, 1998**).

En 1938, Doenges describe la relación entre espiroquetas e inflamación gástrica en monos macacos, informando también sobre la presencia de estos microorganismos en el 43 % de estómagos humanos estudiados en necropsias. Dos años más tarde, Freedberg y Barron, determinaron que las espiroquetas descritas por Doenges no cumplían ningún papel etiológico en las enfermedades gástricas del hombre. En el mismo año, 1940, Gorham postuló la hipótesis de que una “bacteria acidófila” era la causa de las úlceras gástricas (**Kidd y Modlin, 1998**).

En 1975, Steer y Jones estudiaron muestras de pacientes con úlcera gástrica, observando mediante microscopía electrónica la presencia de microorganismos espirales en la mucosa gástrica, asociados a respuesta inflamatoria. Marshall, Warren y Goodwin, en 1979, marcarían un hito histórico en la Microbiología, puesto que, por vez primera y tras varios intentos fallidos, lograron cultivar con éxito la bacteria de biopsias del antro gástrico. Para ello, utilizaron la metodología descrita por Skirrow en 1977 para el aislamiento de *Campylobacter* spp., pero no incubaron las placas durante 48 horas, según lo propuesto por Skirrow, sino que éstas permanecieron incubándose durante siete días, coincidiendo con el periodo vacacional de Semana Santa de aquel 1979 (**Marshall, 1987**).

Robin Warren, continuó estudiando biopsias de pacientes con gastritis y describiendo la presencia de bacterias de forma espiral entre la capa mucosa y la superficie del epitelio, pero su mayor mérito fue, sin duda, el asociar la presencia de la bacteria como posible factor causal o etiológico de alteraciones inflamatorias de grado variable de la mucosa gástrica.

Años más tarde, en 1981, el gastroenterólogo clínico Barry Marshall, confirma y apoya los descubrimientos de Robin Warren, y en 1982, logran el cultivo de la bacteria del moco obtenido de once pacientes con gastritis demostrada también por biopsia, mientras que no obtiene resultados en biopsias de pacientes normales. En 1983, tanto Warren como Marshall comunican los resultados de sus observaciones, con estudios histopatológicos y tinciones de plata, y al microorganismo lo denominan *Campylobacter pylori* (**Marshall y Warren, 1984**).

Para demostrar la patogenicidad de la bacteria, Barry Marshall, en 1985, se autoinfecta, ingiriendo una cepa cultivada y recuperada de un paciente con dispepsia no ulcerosa. Dos semanas más tarde presenta la misma sintomatología (crisis de dolor en epigastrio, náuseas y vómitos), se le practica una endoscopia y en las biopsias de su propia mucosa gástrica se identifican la presencia bacilos, demostrando así el cumplimiento de los postulados de Koch (**Konturek et al., 2006**).

Un estudio desarrollado en 1989 en Alemania demostró que la especie *Campylobacter pylori* era distinta de las especies de *Campylobacter* descritas hasta entonces, adoptándose la nueva denominación de *Helicobacter*, y pasándose a llamar *Helicobacter pylori* (**Goodwin et al., 1989**).

4.2. Situación taxonómica actual

El género *Helicobacter* junto con *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Wollinella* forma parte de la clase *Epsilobacteria* en la subdivisión *Thiobacteria* de la división Proteobacteria (**Cavalier-Smith, 2002**).

El género fue propuesto por primera vez en 1989 e incluía a las especies *Helicobacter pylori* y *Helicobacter mustelae*, que eran bacterias aisladas de la mucosa gástrica humana y de los hurones, respectivamente (**Goodwin et al., 1989**). La posterior revisión de géneros próximos permitió la inclusión de *Helicobacter cinaedi* y *Helicobacter fennelliae*, que habían estado incluidas dentro de *Campylobacter*.

En el momento actual el género comprende 36 especies validadas: *H. pylori* (especie tipo), *H. mustelae*, *H. felis*, *H. fennelliae*, *H. cinaedi*, *H. nemestrinae*, *H. muridarum*, *H. acinonychis*, *H. canis*, *H. hepaticus*, *H. pametensis*, *H. pollurum*, *H. bilis*, *H. bizzozerinii*, *H. trogontum*, *H. cholecystus*, *H. rodentium*, *H. salomonis*, *H. canadensis*, *H. mesocricetorum*, *H. aurati*, *H. typhlonius*, *H. ganmani*, *H. cetorum*, *H. marmotae*, *H. anseris*, *H. brantae*, *H. cynogastricus*, *H. mastomirinus*, *H. equorum*, *H. baculiformis*, *H. suis*, *H. heilmannii*, *H. macacae*, *H. valdiviensis* y *H. himalayensis* (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <http://www.bacterio.net/helicobacter.html>).

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

Tabla 4. Especies intestinales del género *Helicobacter*

Nombre	Hospedador	Referencia
<i>H. aurati</i>	Hamsters	Patterson <i>et al.</i> (2002)
<i>H. anseris</i>	Gansos	Fox <i>et al.</i> (2006)
<i>H. bilis</i>	Ratones, perros y hombre	Fox <i>et al.</i> (1997)
<i>H. brantae</i>	Gansos	Fox <i>et al.</i> (2006)
<i>H. canadensis</i>	Hombre	Fox <i>et al.</i> (2002)
<i>H. canis</i>	Perros, hombre	Stanley <i>et al.</i> (1994)
<i>H. cholecystus</i>	Hamsters	Franklin <i>et al.</i> (1997)
<i>H. cinaedi</i>	Hombre, hamsters y macacos	Totten <i>et al.</i> (1988) Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<i>H. equorum</i>	Caballos	Moyarert <i>et al.</i> (2007)
<i>H. fennelliae</i>	Hombre	Totten <i>et al.</i> (1988) Vandamme <i>et al.</i> (1991)
<i>H. ganmani</i>	Ratones, perros y hombre	Robertson <i>et al.</i> (2001)
<i>H. hepaticus</i>	Ratones, perros y hombre	Fox <i>et al.</i> (1994)
<i>H. macacae</i>	Monos	Fox <i>et al.</i> (2013)
<i>H. marmotae</i>	Gatos, marmotas	Fox <i>et al.</i> (2006)
<i>H. mastomirinus</i>	Ratones	Shen <i>et al.</i> 2006
<i>H. mesocricetorum</i>	Hamsters	Simmons <i>et al.</i> (2000)
<i>H. muridarum</i>	Ratones, ratas	Lee <i>et al.</i> (1992)
<i>H. pametensis</i>	Aves, cerdos	Dewhirst <i>et al.</i> (1994)
<i>H. pullorum</i>	Pollos, hombre	Stanley <i>et al.</i> (1995)
<i>H. rodentium</i>	Ratones	Shen <i>et al.</i> (1997)
<i>H. trogontum</i>	Ratas	Mendes <i>et al.</i> (1996)
<i>H. typhlonius</i>	Ratones	Franklin <i>et al.</i> (2002)
<i>H. valdiviensis</i>	Aves	Collado <i>et al.</i> (2014)

Tabla 5. Especies gástricas del género *Helicobacter*

Nombre	Hospedador	Referencia
<i>H. aurati</i>	Hamsters	Patterson <i>et al.</i> (2002)
<i>H. acinonychis</i>	Guepardos	Eaton <i>et al.</i> (1993)
<i>H. baculiformis</i>	Gatos	Baele <i>et al.</i> (2008)
<i>H. bizzozeronii</i>	Perros	Hänninen <i>et al.</i> (1996)
<i>H. bilis</i>	Ratones, perros y hombre	Fox <i>et al.</i> (1997)
<i>H. cetorum</i>	Delfines	Harper <i>et al.</i> (2006)
<i>H. cynogastricus</i>	Perros	Van de Bulck <i>et al.</i> (2006)
<i>H. felis</i>	Gatos, perros	Paster <i>et al.</i> (1991)
<i>H. heilmannii</i>	Gatos, hombre	Smet <i>et al.</i> (2012)
<i>H. himalayensis</i>	Marmotas	Hu <i>et al.</i> (2015)
<i>H. muridarum</i>	Ratones, ratas	Lee <i>et al.</i> (1992)
<i>H. mustelae</i>	Hurones	Fox <i>et al.</i> (1988) Goodwin <i>et al.</i> (1989)
<i>H. nemestrinae</i>	Macacos	Bronsdon <i>et al.</i> (1991)
<i>H. pylori</i>	Hombre, macacos	Marshall <i>et al.</i> (1985) Goodwin <i>et al.</i> (1989)
<i>H. salomonis</i>	Perros	Jalava <i>et al.</i> (1997)
<i>H. suis</i>	Cerdos	Baele <i>et al.</i> (2008)

4.3. Morfología y características bioquímicas

Las bacterias del género *Helicobacter* se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, espirales o rectos, helicoidales, de 1,5-5 μm de largo y 0,3-1,0 μm de ancho. Poseen extremos redondeados y forma curvada (Vandamme *et al.*, 1991).

Son móviles por múltiples flagelos polares en su extremo o en ambos extremos laterales, a excepción de *H. cinaedi* y *H. fennelliae*, que son móviles con un solo flagelo polar. Todos los flagelos son envainados, y se ha sugerido que dicha vaina es una adaptación para vivir y moverse a través de la mucosa y protegerse contra el ácido del estómago (Goodwin y Armstrong, 1990; Vargas y Toledo, 2003). La longitud de cada flagelo es de 30 nm y el grosor de 2,5 nm.

Se caracterizan por ser bacterias microaerófilas con metabolismo respiratorio. No metabolizan los carbohidratos. Crecen en medios específicos a 37 °C, aunque puede

desarrollarse en un rango de 35 °C a 39 °C (Mégraud, 1995). Las colonias son traslúcidas, no pigmentadas y tienen un diámetro aproximado de 1-2 mm. Bioquímicamente son catalasa y oxidas positivos, no hidrolizan gelatina, almidón, caseína o tirosina, son rojo de metilo y Voges-Proskauer negativas y producen H₂S. Las especies de *Helicobacter* de origen gástrico son ureasa positiva (Vandamme *et al.*, 1991).

H. pylori es la especie tipo del género *Helicobacter* y la más importante en patología humana, por su estrecha relación con la úlcera péptica y el cáncer gástrico (Dunn *et al.*, 1997). *H. pylori* es un bacilo espiral, en forma de “S”. En cultivos *in vitro* las células son menos espirales y aparecen como bacilos curvados, mientras que los cultivos viejos muestran una forma cocoide (Gamboa, 2003). Presenta de 4 a 6 flagelos bipolares, mide de 0,5 a 1 mm de ancho y aproximadamente 3 mm de largo. Es un microorganismo de crecimiento lento. Produce diversas enzimas que ayudan a su identificación bioquímica, como catalasa oxidasa y ureasa (Citterio, 2004; Agudo, 2010).

5. IMPORTANCIA CLÍNICA DEL GÉNERO *HELICOBACTER*

La infección por *H. pylori* afecta al 60 % de la población mundial, alcanzando el 80 % en países poco desarrollados. Esto implica que unos 3.000 millones de habitantes del planeta están infectados por la bacteria. En Europa, la prevalencia es mayor en los países del Sur y Este, llegando al 84 %. La incidencia anual en países desarrollados se estima en el 0,5 % de la población (FDA, 2014) y, aunque desde hace unos años se observa una disminución importante de la infección en estos países, este descenso se ha ido ralentizando (Eusebi *et al.*, 2014).

Existen evidencias de que la infección se adquiere durante la infancia y, a no ser que se trate con antibióticos, permanecerá de por vida sin que se produzcan remisiones espontáneas, ya que el microorganismo posee un gran número de estrategias de evasión de nuestro sistema inmune. Por el momento, no existen vacunas eficaces disponibles.

H. pylori es en la actualidad la única bacteria con acción carcinógena demostrada. En 1994 fue clasificado como carcinógeno humano Tipo I por la OMS (IARC-OMS, 1994) y recientemente, la USFDA lo ha incluido en su lista de microorganismos que suponen una amenaza seria a la Salud Pública (FDA, 2014).

La infección por *H. pylori* es la principal causa de cáncer gástrico, tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Venerito *et al.*, 2014). La prevalencia actual en España de cáncer gástrico es 31 casos por cada 100.000 habitantes (SEPD, 2015).

En 2014, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer presentó un estudio en el que se señalaba como una prioridad mundial establecer estrategias de prevención del cáncer gástrico mediante la erradicación de *H. pylori* (IARC-OMS, 2014). También ha aparecido recientemente una nueva hipótesis sobre la relación entre infección en la niñez y el riesgo del cáncer gástrico en adultos, lo que ha llevado a propugnar la necesidad de programas preventivos para reducir la infección en niños y adolescentes (Iwańczak y Francavilla, 2014). A pesar de ello, en estos momentos ningún país ha implementado

ningún tipo de estrategia de prevención, debido en gran parte al desconocimiento existente sobre su epidemiología (Axon, 2014).

5.1. Patogenicidad de *H. pylori*

Todas las personas infectadas por *H. pylori* presentan gastritis crónica superficial antral o tipo B. En la mayoría de los casos, sin embargo, los pacientes se mantendrán asintomáticos durante toda su vida. Sólo en un 15-20 % de los infectados, y tras varios años de colonización, la infección por *H. pylori* originará dispepsia, úlceras pépticas (15 %), gastritis atrófica, cánceres duodenales y gástricos (1-3 % de los casos), y linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas (linfoma tipo MALT, Mucose Associated Lymphoid Tissue, 0,1 % de los pacientes infectados) (Figueiredo *et al.*, 2005).

No está claro todavía el porqué la infección en algunos pacientes es asintomática, mientras que en otros genera enfermedades digestivas de diferente gravedad. Al parecer, ciertos factores genéticos, ambientales o diferencias en la patogenicidad de distintas cepas pueden tener un efecto en el desarrollo de la enfermedad.

Los mecanismos que contribuyen a la colonización del estómago por parte de *H. pylori* son muy complejos y se deben a la combinación sinérgica e incluso, en ocasiones, antagónica, de diversos factores. Ninguno de todos ellos, por separado, puede explicar el amplio espectro de enfermedades que produce y en la actualidad no disponemos de ningún factor de virulencia que pueda ser utilizado como marcador del progreso o pronóstico de la enfermedad (De Falco *et al.*, 2015).

Lo más extraordinario de esta bacteria es su capacidad de sobrevivir a un pH tan bajo que la mayoría de bacterias no pueden proliferar, así como su capacidad de persistencia durante varios años en el hospedador (Benítez-Bribiesca, 2004).

La movilidad facilitada por los flagelos de *H. pylori* es esencial para la colonización de la mucosa gástrica, ya que la bacteria tiene que ser capaz de atravesar la capa de moco y adherirse a las células epiteliales. Además su forma espiral contribuye a su adherencia en la capa de moco (Vargas y Toledo, 2003).

El lipopolisacárido de la pared celular cumple una importante función en la patogénesis de *H. pylori*. El potencial inmunogénico de esta bacteria es de menor magnitud que el de las enterobacterias, lo que ayuda a la persistencia de la infección (Suerbaum y Michetti, 2002).

H. pylori ha evolucionado para dar origen a una enzima ureasa que es imprescindible en el proceso de colonización de la mucosa gástrica. La ureasa, que requiere del níquel como cofactor, hidroliza la urea produciendo amonio, lo que proporciona un pH casi neutro a su alrededor, evadiendo de esta manera las propiedades bactericidas del ácido clorhídrico (Moblely *et al.*, 2001).

Entre los múltiples factores de virulencia del microorganismo, los más importantes descritos hasta el momento son la citotoxina vacuolizante VacA y la proteína asociada a la citotoxina (CagA).

El gen *vacA* codifica la citotoxina VacA. Esta toxina causa múltiples efectos sobre células epiteliales, incluidos la vacuolización mitocondrial, la muerte celular, la inhibición de la proliferación de células T y el incremento de neutrófilos. Genera un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior, haciendo que se capte agua por ósmosis, lo que origina una vacuolización alrededor del núcleo, y más tarde el estallido y muerte celular.

Aunque todas las cepas conocidas portan el gen *vacA*, la toxina es producida por aproximadamente el 50 % de las cepas de *H. pylori*. El gen *vacA* es muy heterogéneo entre poblaciones. Existen dos tipos de regiones “señal” en la región N-terminal, s1 y s2 y otros dos tipos de regiones “medias”, m1 y m2. La estructura del gen en estas regiones es determinante: el genotipo *vacA* s1/m1 produce toxina vacuolizante, mientras que s2/m1 y s2/m2 producen poco o nada de toxina. En los pacientes infectados, el genotipo s1/m1 se asocia a un riesgo 3,5 veces mayor de desarrollar cáncer a partir de lesiones premalignas de la mucosa gástrica (**Yamazadi et al., 2005; Paniagua et al., 2007**).

El gen *cagA* codifica la citotoxina CagA (cytotoxin-associated gene A). Está situado en una isla de patogenicidad (PAI), que codifica un sistema de secreción de tipo IV. La proteína CagA induce una respuesta inflamatoria que se caracteriza por una gran densidad de células polimorfonucleares en la mucosa gástrica. La presencia del gen *cagA* se asocia a síntomas graves, como la gastritis severa, la atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico (**Chromvarin et al., 2008**). Además, las cepas que proceden de pacientes con úlcera, son *cagA* positivas en porcentajes mayores que las cepas que proceden de pacientes con gastritis (**Erzin, 2006; Chiarini, 2009**).

Otro factor de virulencia es IceA, cuyo gen tiene dos principales variantes alélicas, *iceA1* e *iceA2*. La expresión del *iceA1* está vinculada con la úlcera péptica.

La adhesina de unión a antígeno de grupo sanguíneo (BabA) es una proteína de membrana externa codificada por el gen *babA2*, que se une a antígenos Lewis b y al antígeno ABO. Aunque han sido identificados tres alelos *bab* (*babA1*, *babA2*, y *babB*), sólo el producto del gen *babA2* es funcionalmente activo. Estudios en poblaciones occidentales han asociado la presencia del gen *babA2* con cáncer gástrico (**Chiurillo et al., 2013**).

Por último, hay que señalar que la especie *H. pylori* posee uno de los genomas más fluido dentro del reino procariota (**Cellini, 2014**). En la mayoría de los aproximadamente 1550 genes de su cromosoma las secuencias de los nucleótidos muestran una variación del 3 % al 5 %. Esta variabilidad genética es una característica única en comparación con otras bacterias Gram negativas. Por otra parte, la bacteria es altamente competente para captar y donar material genético de otros microorganismos vecinos mediante recombinación.

La persistencia de la infección y la resistencia de los aislados clínicos a antibióticos de uso común en la terapia de erradicación se han relacionado con esta variabilidad genética, así como con su capacidad para desarrollar biopelículas, demostrada mediante experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* (**García et al., 2014**).

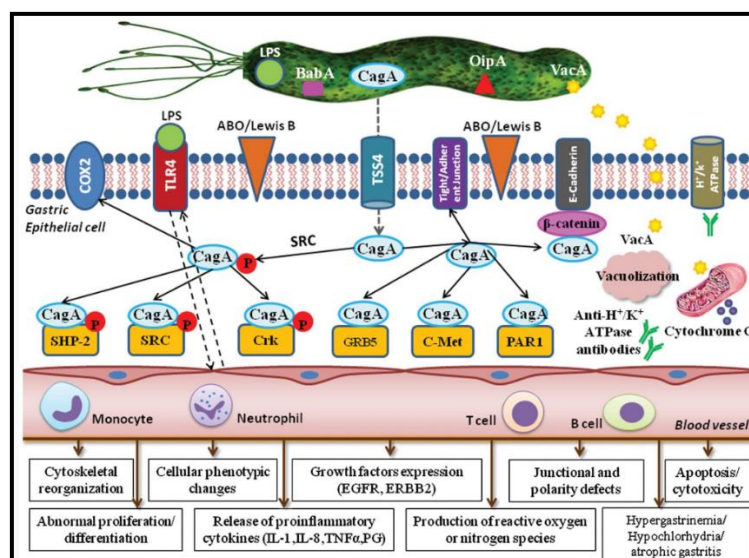


Figura 2. Patogénesis de *Helicobacter pylori* (Conteduca *et al.*, 2015)

5.2. Patologías gástricas relacionadas con *H. pylori*

Como ya se ha comentado, *H. pylori* produce gastritis, úlceras pépticas, cánceres duodenales y gástricos, y linfoma tipo MALT. Además, se ha asociado a diversas patologías extra-digestivas.

5.2.1. Gastritis

La gastritis se desarrolla después de la infección con *H. pylori*, y puede presentar o no manifestaciones clínicas características de gastritis aguda como náuseas, dolor epigástrico y vómitos (Di Lorenzo, 2005). Las gastritis crónicas que aparecen con más frecuencia son la gastritis atrófica multifocal y la gastritis antral difusa.

La gastritis atrófica multifocal se caracteriza por la pérdida de glándulas, reemplazo por epitelio de tipo intestinal (metaplasia intestinal) y aparición de focos de atrofia. Se asocia fundamentalmente a úlcera y adenocarcinoma gástrico. La gastritis antral difusa muestra un predominio de linfocitos en la mucosa antral (Suerbaum y Michetti, 2002). Esta lesión acompaña de forma constante a la úlcera péptica duodenal, siendo más rara la aparición del linfoma gástrico tipo MALT (Elizalde *et al.*, 2004).

5.2.2. Úlcera péptica

La infección por *H. pylori* guarda una relación causal con la mayoría de úlceras duodenales y gástricas (Adler *et al.*, 2014). En los pacientes con úlcera duodenal se reporta una prevalencia de infección por *H. pylori* entre el 90 al 95 % (Blaser y Atherton, 2004; Bittencourt *et al.*, 2006). Con respecto a la úlcera gástrica, también existe una clara relación, aunque sólo un 70 % de este tipo de úlceras está asociada a la presencia de *H. pylori*, mientras que el resto se asocian al consumo de antiinflamatorios no esteroideos. La sintomatología ulcerosa puede acompañarse de vómitos, anorexia, adelgazamiento y,

aunque con menos frecuencia, la úlcera puede dar lugar a hemorragia digestiva (Zetterström, 2006).

5.2.3. Cáncer gástrico

La infección por *H. pylori* parece ser un mecanismo fundamental en el inicio del adenocarcinoma gástrico, aunque no en su evolución: Se ha demostrado que la erradicación de la bacteria disminuye el riesgo de malignización de lesiones precancerosas. Sin embargo, a partir de un determinado “punto de no retorno”, la progresión es independiente de la presencia o no de la bacteria. De hecho, en la mayoría de los casos la gastritis crónica atrófica previa a la aparición de cáncer suele llevar aparejada la desaparición del microorganismo de la mucosa.

Actualmente se piensa que la aparición del cáncer tras la infección por *H. pylori* depende de fenómenos inflamatorios crónicos, más que por la acción directa del microorganismo (Lamb y Chen, 2013).

Sólo alrededor del 1 % de las personas que portan *H. pylori* en su mucosa desarrollarán malignización. Sin embargo, la probabilidad de padecer cáncer gástrico entre los pacientes infectados por *H. pylori* es más de 20 veces mayor que entre los no infectados. Además, tanto los estudios epidemiológicos como múltiples ensayos clínicos han demostrado que cuando se erradica la bacteria, el riesgo de desarrollar cáncer en pacientes con lesiones pre-malignas disminuye en un 30-40 %. Sin embargo, existen otros factores como la obesidad, una dieta pobre en hierro o rica en nitrosaminas, elevadas ingestas de sal, consumo de alcohol o el tabaquismo que favorecen su aparición. Todos estos factores, por otra parte, aumentan los efectos carcinógenos de la inflamación crónica producida por la bacteria, en una asociación sinérgica en la que resulta difícil establecer la influencia directa de cada uno de estos factores sobre el riesgo total de la enfermedad (Wang *et al.*, 2014).

5.2.4. Influencia de *H. pylori* en la aparición de enfermedades extragástricas

H. pylori se ha relacionado con un aumento en el riesgo de padecer múltiples enfermedades tales como diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, adenoma y adenocarcinoma de colon, retinopatía serosa central idiopática y enfermedades autoinmunes como tiroiditis, síndrome de Sjogren o urticaria crónica (Mauget-Faysse *et al.*, 2002; Cotticelli, *et al.*, 2006; Dorer *et al.*, 2009; Papagiannakis, 2013; Axon, 2014; Eusebi *et al.*, 2014; Pereira y Medeiros, 2014; Wang *et al.*, 2014). Muchos de estos estudios epidemiológicos son contradictorios, y en otras ocasiones la asociación estadística es demasiado débil para ser considerada probada.

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

Todo lo que conocemos hasta el momento sobre los mecanismos de patogenicidad de *H. pylori* lleva a pensar que probablemente su intervención en estas enfermedades sea indirecta, mediante el desencadenamiento de los desórdenes autoinmunes a los que conduce la infección con este microorganismo (Palomino *et al.*, 2012). Sin embargo, aún se está lejos de conocer exactamente los mecanismos que interviene en su producción y el nivel de riesgo que aporta la infección (Eusebi *et al.*, 2014; Lin y Koskella, 2015).

6. EPIDEMIOLOGÍA Y RUTAS TRANSMISIÓN DE *HELICOBACTER*

6.1. Epidemiología

La infección con *H. pylori* es un fenómeno mundial. Sin embargo existen diferencias significativas en las tasas de infección entre países y en un mismo país (Castillo *et al.*, 2004).

Aunque en general no hay diferencia entre ambos sexos, en algunos países desarrollados, existe una mayor prevalencia de infección en hombres que en mujeres (Martel y Parsonnet, 2006).

La prevalencia de la infección por *H. pylori* en los adultos de cualquier edad en los países desarrollados oscila entre el 20 y el 40 %, y alcanza cifras del 60 al 80 % en países considerados del tercer mundo. La diferencia más importante entre los países de alta y baja prevalencia es la intensidad con la que se transmite la infección en la infancia y adolescencia temprana (Figuroa *et al.*, 2002).

En Estados Unidos la incidencia anual de infección oscila entre el 0,5 % y el 1 % para menores de 10 años, y la infección se presenta hasta en el 50 % en adultos. La prevalencia de la infección por *H. pylori* en países de Latinoamérica es alta, entre 30-90 %, con un promedio de 60 % dependiendo de las condiciones socioeconómicas. (Eusebi *et al.*, 2014).

En España se estima que el 50 % de la población está infectada por *H. pylori* y que la edad y el grado socioeconómico influyen en la prevalencia de la infección por este microorganismo (SEPD, 2015).

6.2. Mecanismos de transmisión

Actualmente no se conocen de forma definitiva de qué manera se transmite la infección. Sabemos que se transmite persona-persona, pero esta única ruta no puede explicar, por si sola, la alta incidencia ni la facilidad de adquisición. En este sentido, numerosos estudios apoyan que la transmisión puede ocurrir por la vía gastro-oral, oral-oral y fecal-oral.

6.2.1. Transmisión oral-oral

Se ha hallado *H. pylori* en placa dental y en saliva, lo que ha llevado a algunos autores a sugerir que la placa dental puede constituir un reservorio importante de este microorganismo. Sin embargo, aún no está claro si el microorganismo es un comensal habitual o alcanza la boca desde el estómago infectado, por regurgitación o vómitos (**Anand et al., 2014**).

6.2.2. Transmisión gastro-oral

Algunos brotes se han asociado con el manejo y desinfección inadecuada de gastroscopios. Además, *H. pylori* se encuentra con frecuencia en el vómito de las personas infectadas (**Mladenova, 2006**). Esto podría explicar las altas tasas de infección en niños, ya que estos vomitan con más frecuencia que los adultos, y además suelen llevarse objetos a la boca (**Rivas y Hernández, 2000**).

6.2.3. Transmisión fecal-oral

Cada vez parece más clara la transmisión fecal-oral de *H. pylori*. Desde hace ya varias décadas se conoce que el patrón epidemiológico de expansión de la enfermedad se ajusta perfectamente al de un microorganismo transmitido por la ruta fecal-oral, probablemente a través de agua contaminada. El riesgo de infección por *H. pylori* se asocia de forma clara a un bajo nivel socioeconómico, y es mucho mayor en poblaciones con peor nivel higiénico-sanitario (**Tous, 2002**).

Por otra parte, se sabe que *H. pylori* es eliminado por las heces (**Bellack et al., 2006**). Sin embargo, a pesar de que hay informes esporádicos sobre el aislamiento de la bacteria, esos hallazgos no son sistemáticos, lo que dificulta la verificación de dicha hipótesis (**Rivas y Hernández, 2000**).

6.2.4. Transmisión por agua

La prevalencia de la infección por *H. pylori* muestra una fuerte correlación con el acceso al agua. Numerosos estudios epidemiológicos lo confirman y la Organización Mundial de la Salud lo incluye en su lista de potenciales microorganismos patógenos emergentes cuya transmisión por el agua es plausible, aunque aún no haya sido confirmada. (**Aziz et al., 2015; Santiago et al., 2015**).

Mediante métodos moleculares, se ha detectado ADN de *H. pylori* en agua residual, agua de bebida y otras muestras ambientales por todo el mundo y se ha demostrado su capacidad de supervivencia en agua, incluso clorada. También se ha detectado en la red de distribución de agua potable (**Eusebi et al., 2014**). Estos hallazgos indican que el agua contaminada y los alimentos podrían jugar un papel vital en la supervivencia y diseminación de *H. pylori* en el ambiente y su transmisión al hombre.

El equipo de investigación que dirige la presente tesis doctoral ha detectado *H. pylori*, mediante métodos moleculares, en el 46 % de más de 100 aguas residuales, en un 40 % de muestras de agua de río y, lo que es más llamativo, un 66 % de 24 aguas de fuentes

públicas (Moreno *et al.*, 2003; Moreno y Ferrús, 2012), demostrando por primera vez la presencia de células indudablemente viables en aguas residuales (18 % de las muestras analizadas), agua de río (27 %) y de aguas de distribución de la red (25 %) (Santiago *et al.*, 2015).

Los niveles de cloro en sistemas de distribución de agua potable oscilan entre 0,1 y 0,3 mg/L. En tratamientos inadecuados, interrumpidos o intermitentes, es posible que no se produzca una adecuada inactivación de *H. pylori* que prevenga la entrada y persistencia de la bacteria dentro de los sistemas de distribución de agua, suponiendo un riesgo de infección para los individuos que consuman estas aguas (Baker *et al.*, 2002).

Por otra parte, *H. pylori* es capaz de sobrevivir en biopelículas cuando crece bajo altas condiciones de C:N (Percival y Suleman, 2014). La formación de biopelículas protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, aumenta la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento y además incrementa la frecuencia de transferencia de material genético (Donlan, 2002). Gião *et al.* (2008) observaron que *H. pylori* formaba biopelículas tras 24 horas de encontrarse en un ambiente desfavorable. La asociación de *H. pylori* con comunidades de biopelículas dentro de un sistema de distribución de aguas podría ofrecer a la bacteria protección frente a la desinfección y a la predación por protozoos (Watson *et al.*, 2004).

Actualmente hay autores que sugieren que las amebas de vida libre podrían actuar como un refugio para *H. pylori* frente a los diferentes tratamientos de desinfección, posibilitando así la transmisión a los seres humanos (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002; Smith y Ashbolt, 2012). Recientemente, se demostró por primera vez, que *H. pylori* puede ser fagocitado *in vitro* por amebas de vida libre en el agua, permaneciendo viable dentro de ellas hasta 24 horas, y sobreviviendo al tratamiento con cloro (Moreno-Mesonero *et al.*, 2016).

6.2.5. Transmisión por alimentos

Aquellos alimentos que poseen una actividad de agua (aw) $> 0,97$ y un pH entre 4,9 y 6,0 teóricamente proporcionan las condiciones idóneas para la supervivencia de *H. pylori* (Van-Duynhoven y De-Jonge, 2001; Beuchat, 2002). Sin embargo, es poco probable que *H. pylori* crezca en la mayoría de los alimentos, aunque podría sobrevivir en ellos en forma VNC (Beuchat, 2002).

La posibilidad de que los vegetales y la fruta puedan jugar un papel importante en la transmisión de *H. pylori* está basada sobre todo en estudios epidemiológicos retrospectivos. Hopkins *et al.* (1993), determinaron la presencia de anticuerpos para *H. pylori* en un grupo socioeconómico bajo en Chile y evaluaron los factores de riesgo de la infección, encontrando relación con el bajo nivel socioeconómico, el consumo de verduras crudas y la edad. Goodman *et al.* (1996), en un estudio realizado en niños de entre 1 a 9 años en una comunidad rural colombiana, concluyeron que los individuos que frecuentemente consumían hortalizas crudas y nadaban en piscinas, eran los que tenían mayor riesgo de adquirir la infección.

Las verduras suponen uno de los alimentos con mayor riesgo de contaminación fecal, ya que están en contacto con el suelo, agua de riego y otros ambientes contaminados, y se

consumen crudos. **Atapoor et al. (2014)** y **Yahaghi et al. (2014)** en Irán, lograron detectar y aislar *H. pylori* en el 10,86 % y el 13,68 % respectivamente, de más de 800 muestras de verduras. Sin embargo, estos hallazgos solo se han producido en un país, y harían falta nuevos estudios para confirmarlos.

Por otra parte, se ha demostrado la capacidad de *H. pylori* para sobrevivir en hojas de lechuga formando biopelículas (**Ng et al., 2014**). Estos hallazgos indican que los alimentos podrían jugar un papel importante en la supervivencia y diseminación de *H. pylori* en el ambiente y su transmisión al hombre.

También la leche podría actuar como vehículo para *H. pylori*. Varios estudios han demostrado que la bacteria es capaz de sobrevivir en leche inoculada dejada en refrigeración más de 6 días, o durante tres días a temperatura ambiente (**Boehmler et al., 1996**). Además, en una investigación desarrollada por **Fujimura et al. (2002)** se detectó la presencia del gen *ure* de *H. pylori* en 13 de 18 muestras de leche cruda (72,2 %) y en 11 de 20 muestras de leche pasteurizada para el comercio (55 %). En las muestras positivas, mediante microscopía electrónica se observaron microorganismos similares a *H. pylori*, y pudo ser cultivado a partir de una muestra de leche cruda.

Por otra parte, **Meng et al. (2008)** realizaron un estudio para detectar *H. pylori* en alimentos crudos o listos para el consumo, con el fin de acotar evidencias sobre los patrones de transmisión oral-oral y fecal-oral. Para ello, analizaron 11 pollos crudos y 18 muestras de carne de atún lista para el consumo (sushi). *H. pylori* fue detectada mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (m-PCR) en el 36 % (4/11) de los pollos y el 44 % (8/18) de las muestras de atún.

También se han realizado estudios sobre la presencia de *H. pylori* en moluscos. **Fernández et al. (2007)**, detectaron ADN de *H. pylori* en agua de mar, plancton y en ostras procedentes de tres regiones diferentes de Venezuela. Concluyeron que los moluscos podrían actuar como vehículos de transmisión de *H. pylori*, dado que se ingieren crudos, en aquellas zonas que presenten contaminación por el patógeno.

6.3. Otros helicobacters gástricos

Otras especies de *Helicobacter* no *H. pylori* (NHPH) presentes en animales se consideran potenciales productores de enfermedad en el hombre: *H. suis*, *H. felis*, *H. baculiformis*, *H. heilmannii*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis* y *H. cynogastricus* (**Menard et al., 2014**). Aunque su prevalencia es baja (0,2-6 % de pacientes) (**Baele et al., 2009; Yakoob et al., 2012**), el riesgo de desarrollar linfoma tipo MALT es más alto que para *H. pylori* (**Haesebrouck et al., 2009**). Debido a las dificultades para su aislamiento, su epidemiología apenas se conoce. Se cree que la mayoría son agentes zoonóticos transmitidos por contacto directo, pero para dos de estas especies se ha propuesto una posible vía de transmisión a través de alimentos:

H. suis es el NHPH más prevalente en humanos, asociado con úlcera péptica, linfoma tipo MALT y gastritis crónica (**Haesebrouck et al., 2009; Vermoote et al., 2011**). *H. suis* ha sido detectado en el intestino (60-90 %) y en carne de cerdo, y se ha demostrado que permanece viable varios días en ella (**Vermoote et al., 2011**).

H. pullorum es un comensal del intestino de aves, presente en heces y biopsias de pacientes con gastroenteritis, hepatopatía crónica y enfermedad inflamatoria intestinal. Se ha detectado en un 30 % de las canales y en carne de pollo procesada (**Kaakoush et al., 2014**) y existe consenso en considerarlo un patógeno emergente transmitido por alimentos (**Turk et al., 2012**). Un estudio previo del grupo que dirige la presente tesis doctoral lo ha detectado en carne de pollo (**González et al., 2008**). Sin embargo, no existen más datos sobre su incidencia en España.

7. METODOS DE DETECCIÓN POR CULTIVO

El método de aislamiento por cultivo es la técnica de elección para detectar cualquier microorganismo patógeno, ya que no solo permite asegurar su presencia, sino que su cultivabilidad se considera prueba de su capacidad infectiva (**EPA, 2015**).

7.1. Detección de *Arcobacter* por cultivo

Los métodos para el aislamiento y detección de *Arcobacter* todavía no están estandarizados, de tal manera, comparar los resultados obtenidos por diferentes autores resulta difícil.

Las especies del género *Arcobacter* crecen en agar sangre, agar McConkey, caldo cerebro-corazón (BHI) y en medio de triptosa soja, pero su comportamiento en los medios utilizados habitualmente para el aislamiento de patógenos entéricos es imprevisible y generalmente crecen con dificultad.

Se han propuesto diversos protocolos para la detección en carne de aves y muestras fecales (**Houf y Stephan, 2007**), tales como el uso de un caldo de enriquecimiento suplementado con cefoperazona, anfotericina B y teicoplanina (CAT), seguido de filtración pasiva del caldo a través de un filtro de 0,45 μm colocado sobre agar sangre (**Atabay y Corry, 1998**) o la incorporación de la anfotericina B, cefoperazona, 5-fluorouracilo, novobiocina y trimetoprim tanto en el enriquecimiento como en el medio de cultivo (**Houf et al., 2001**). Sin embargo, todavía existe una falta de consenso sobre cuál es el método más útil (**Collado y Figueras, 2011**).

Merga et al. (2011) compararon 5 métodos para el aislamiento de *Arcobacter* a partir de heces de animales, con el fin de determinar el método más sensible. Después de todos los ensayos, la combinación de enriquecimiento propuesto por **Houf et al. (2001)**, seguido de cultivo en el medio mCCDA suplementado con CAT les proporcionó significativamente mejores resultados que el resto de combinaciones.

En otro estudio, **Shah et al. (2011)** compararon la recuperación de *Arcobacter* de la leche, carne y de hisopos rectales de ganado con dos combinaciones de enriquecimiento y medio. El protocolo de **Atabay y Corry (1998)** presentó mejor sensibilidad, aunque con sólo el 34 % de especificidad. Los autores informaron que esta baja especificidad era debida principalmente al crecimiento rápido de bacterias competitivas como *Pseudomonas* y *Proteus* (**Shah et al., 2011**).

Además del medio de cultivo, otros factores pueden influenciar la tasa de recuperación de *Arcobacter* a partir de muestras de agua y alimentos. En muestras de carne de aves la etapa de enriquecimiento parece enmascarar los datos reales de prevalencia de las diferentes especies, aumentando el número de aislamientos de las especies que son más resistentes a los antibióticos utilizados en el caldo, o de aquellas cepas que crecen más rápido (**Collado y Figueras, 2011**), pero este hecho no ha sido demostrado experimentalmente todavía en otro tipo de muestras.

Condiciones tales como el tiempo de incubación o la atmósfera de cultivo también podrían afectar el aislamiento de *Arcobacter*. Por ejemplo, períodos de incubación menores de 48 h disminuyen el número de aislamientos (**Collado y Figueras, 2011**). En cuanto a la atmósfera de incubación, algunos autores indican que, en general, los arcobacters crecen mejor en condiciones microaeróbicas (**Vandamme et al., 2005; Ho et al., 2006a**). Sin embargo, sólo unos pocos estudios han evaluado hasta el momento el efecto de la atmósfera (aerobiosis o microaerofilia) en el aislamiento de *Arcobacter*. **González et al. (2007a)** analizaron 20 muestras de canales de pollo y encontraron que 7 eran positivas, 3 de ellas en condiciones microaeróbicas y de aerobiosis simultáneamente, otras 3 sólo en microaerofilia y una muestra sólo en aerobiosis. A pesar de que la recuperación era ligeramente superior bajo condiciones microaeróbicas, los resultados no fueron estadísticamente significativos. **Levican et al. (2014)**, en un estudio desarrollado en España en muestras de moluscos, encontraron mayor incidencia bajo microaerofilia que bajo aerobiosis. Sin embargo, aún se requieren estudios adicionales que evalúen las condiciones óptimas de incubación para la recuperación de arcobacters.

7.2. Detección de *Helicobacter* por cultivo

Incluso en condiciones óptimas *H. pylori* es extremadamente difícil de cultivar, debido a sus exigentes requerimientos nutricionales y su lento crecimiento. El cultivo de *H. pylori* suele ser lento, las primeras colonias suelen aparecer entre el quinto y el séptimo día, y pueden tardar hasta 10 días. Al ser un microorganismo microaerófilo requiere atmosferas con 5-10 % de O₂, 5-10 % de CO₂ y 80-90 % de N₂ a 35-37 °C, con una humedad del 90-95 % (**Castillo et al., 2004**).

Para conseguir un buen crecimiento de *H. pylori* en medio sólido se recomienda el uso de los medios Mueller-Hinton y Columbia, que deben ser suplementados con sangre o derivados. Resulta bastante difícil cultivarlo en medio líquido, aunque se logra con menor dificultad a partir de caldo *Brucella*, caldo cerebro-corazón, Mueller-Hinton y triptosa soja, que deben estar suplementados con nutrientes (**Mégraud, 1997**).

Para el aislamiento primario es recomendable utilizar inhibidores que eviten el sobrecrecimiento de biota acompañante, para lo cual se utilizan mezclas de antibióticos como el suplemento Dent, que contiene anfotericina B, trimetoprim, vancomicina y cefsoludina (**Boyanova, 2003; Andersen y Wadström, 2001**).

Aún en condiciones óptimas, como las muestras de biopsia, donde se encuentra en altas concentraciones y no existe biota competitiva, la tasa de éxito varía enormemente dependiendo del procesamiento de la muestra o el tipo de medio de cultivo utilizado, situándose entre un 40 y un 85 % (**Cover y Blaser, 1990**). Las muestras ambientales y de alimentos contienen microorganismos diversos, sales biliares, polisacáridos y numerosas

enzimas hidrolíticas (Delgado *et al.*, 2004; Van Tongeren *et al.*, 2005) que pueden impedir el crecimiento de bacterias como *H. pylori*, por lo que el éxito del cultivo es aún menor.

Hay varios métodos propuestos para el aislamiento selectivo en agua (Degnan *et al.*, 2003, Stevenson *et al.*, 2000, Al-Sulami, 2012) pero existen muy pocos estudios fiables en los que *H. pylori* se haya aislado de estas muestras (Ndip *et al.*, 2003). Este es el principal escollo para poder asegurar de forma fehaciente que *H. pylori* se transmite a partir de agua y alimentos.

No existen medios ni métodos de cultivo específicos para el cultivo de otras especies de *Helicobacter* (Vermoote *et al.*, 2011; Baele *et al.*, 2009).

7.3. Identificación bioquímica de *Arcobacter* y *Helicobacter*

Debido a su relativa inactividad metabólica, tanto *Arcobacter* spp. como *Helicobacter* spp. son difíciles de identificar utilizando pruebas fenotípicas (Collado y Figueras, 2011; Ünver *et al.*, 2013). Actualmente la identificación basada en pruebas bioquímicas no se realiza de forma rutinaria, debido a que es un método laborioso que lleva implícito problemas de reproducibilidad y ambigüedad, y en general presenta un bajo poder de discriminación para ambos géneros (Collado y Figueras, 2011; González *et al.*, 2007b).

7.4. Formas viables no cultivables

Se ha demostrado que, bajo condiciones de stress ambiental, muchos géneros bacterianos pueden entrar en una fase viable, en la que mantienen la actividad metabólica, y por tanto son potencialmente infectivos, pero no recuperable por cultivo denominada Viable pero No cultivable (VNC). Muchas de las especies que pueden permanecer en el ambiente en el estado VNC tienen la capacidad de revertir este estado, volviendo a ser cultivables, una vez las condiciones adversas se vuelven óptimas para su desarrollo (Ramamurthy *et al.*, 2014). Diversos estudios han demostrado la capacidad, tanto de *Arcobacter* como de *Helicobacter*, para entrar en estado VNC manteniendo su actividad metabólica y siendo capaces de ser recuperados (Bode *et al.*, 1993; Nilius *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2007; Fera *et al.*, 2008).

Actualmente se admite que el estado VNC de las células es una herramienta de supervivencia para persistir en ambientes adversos. La presencia de estos géneros en el ambiente en forma VNC podría explicar el fallo de las técnicas de cultivo a la hora de aislarlo, y ser el mecanismo por el que esta bacteria podría transmitirse a amplios segmentos de la población (Cellini, 2014). Esto representa un factor de riesgo para la Salud Pública. Por ello, cada vez es más necesario el desarrollo de técnicas capaces de detectar estas bacterias no cultivables en alimentos (Li *et al.*, 2014).

8. MÉTODOS MOLECULARES DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

8.1. Detección directa

Las dificultades para encontrar un medio apropiado, los requerimientos gaseosos, el tiempo necesario para su crecimiento y la pérdida de cultivabilidad debido a las condiciones de estrés, son los principales problemas derivados de la utilización del método de cultivo para la detección de diversos microorganismos. Además, los métodos basados en el cultivo, con frecuencia pueden originar identificaciones erróneas en el caso de especies que comparten un gran número de caracteres.

Los avances en las tecnologías basadas en el análisis de ácidos nucleicos han revolucionado el campo del diagnóstico microbiano. Hoy en día, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas más utilizadas para la detección e identificación de microorganismos, como alternativa a los métodos tradicionales de detección e identificación, debido al alto grado de precisión, discriminación, reproducibilidad, y rapidez que posee (Engberg *et al.*, 2000).

8.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa tiene como fin amplificar o reproducir *in vitro* un número de copias de una región específica de ADN, con la finalidad de reproducir cantidad suficiente de un fragmento para su evaluación. La técnica de la PCR puede aplicarse para la identificación de microorganismos a partir de ADN purificado, así como también para la detección directa desde muestras, tanto clínicas como de alimentos o ambientales, pudiendo aplicarse a poblaciones mixtas. Sin embargo, esta técnica presenta algunos inconvenientes. Fundamentalmente, no permite discriminar entre células vivas y muertas y puede originar falsos negativos por la presencia en la muestra de inhibidores de la reacción enzimática (Josephson *et al.*, 1993).

Para que la PCR sea llevada a cabo de manera adecuada se debe partir del diseño óptimo de cebadores o iniciadores (oligonucleótidos o moléculas de ADN mono-catenario de 15 - 30 nucleótidos). Es indispensable que los cebadores sean específicos del ADN que se vaya a amplificar, para lo cual previamente se debe recurrir a bases de datos informativas recopilada por otros investigadores. Su especificidad y sensibilidad debe además ser evaluada experimentalmente antes de su uso (Ye *et al.*, 2012).

8.3. Detección de *Arcobacter* por PCR

En la actualidad existen un gran número de métodos de detección molecular desarrollados con el fin de mejorar la sensibilidad y reducir así el tiempo que lleva la aplicación de los métodos de cultivo a este microorganismo en muestras de alimentos (Collado y Figueras, 2011).

Uno de los métodos más utilizados es el desarrollado por Houf *et al.* (2000), que consiste en una PCR múltiple del gen 16S ARNr de las especie *A. butzleri* y *A. skirrowii* y del gen 23S ARNr de la especie *A. cryaerophilus*. Sin embargo, el método no distingue entre *A. skirrowii*, *A. nitrofigilis* y *A. mytili* (Collado y Figueras, 2011) y entre las especies *A.*

thereius, *A. defluvii*, *A. molluscorum* y *A. cryaerophilus* (Collado *et al.*, 2008; Doudah *et al.*, 2010).

Otro método de utilidad consiste en una qPCR múltiple, desarrollada por De Boer *et al.* (2013) para detectar *A. butzleri* y bacterias del género *Campylobacter* de heces diarreicas de pacientes. Los genes usados son *hsp60*, para *A. butzleri*, y el gen 16S ARNr para *Campylobacter* spp. Con esta técnica, los autores determinaron que la sensibilidad de la qPCR para la detección de *A. butzleri* era 10^3 UFC g⁻¹ de heces, similar a la descrita para la PCR múltiple de Houf *et al.* (2000).

8.4. Identificación de *Arcobacter* a nivel de especie

Las limitaciones en los métodos de identificación que se utilizan actualmente para reconocer o identificar correctamente todas las especies son uno de los principales escollos para el establecimiento de la verdadera prevalencia de *Arcobacter* spp. en diferentes matrices ambientales como agua y alimentos.

Teniendo en cuenta la imprecisión de los métodos fenotípicos, habitualmente se recurre a métodos moleculares de identificación, como m-PCR, qPCR, RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción), PCR-DGGE (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Electroforesis en Gel con Gradientes de Desnaturalización), así como MALDI-TOF MS (Espectrometría de Masas mediante Desorción de Matriz Asistida por Láser/Ionización-TOF) (Collado y Figueras, 2011). La mayoría de los métodos mencionados fueron diseñados para detectar sólo las especies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*.

El método molecular más comúnmente utilizado es la m-PCR desarrollado por Houf *et al.* (2000), aunque con este método se registran errores de identificación con otras especies (Collado y Figueras, 2011). En 2003, Kabeya *et al.* propusieron una nueva m-PCR de diversos fragmentos del gen 23S ARNr para detectar *A. butzleri*, *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus*, que también fue capaz de diferenciar los dos subgrupos de *A. cryaerophilus* (1A y 1B).

Más tarde, Pentimalli *et al.* (2009) propusieron un método de identificación, mediante la utilización de los genes *gyrA* y 16S ARNr, que permite la detección e identificación de 4 especies, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. cibarius*. Sin embargo, la similitud entre los tamaños de las amplificaciones para cada una de las especies impide la detección de todas las especies en la misma reacción.

Por otra parte, Doudah *et al.* (2010) tuvieron en cuenta las limitaciones de la m-PCR de Houf *et al.* (2000) y propusieron un nuevo método de m-PCR, dirigida a los genes 23S ARNr y *gyrA*, capaz de identificar 5 especies ligadas a los seres humanos y otros mamíferos: *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius* y *A. thereius*. Un año más tarde se publicó un método de PCR para complementar el anterior, que era capaz de detectar la especie *A. trophiarum* (De Smet *et al.*, 2011).

La técnica PCR-RFLP es un método rápido y sencillo que se basa en el análisis de los polimorfismos del gen 16S ARNr, gen altamente distribuido en los microorganismos. Este método ofrece una serie de ventajas, ya que es más discriminatorio que los métodos

fenotípicos, y es más rápido y simple que las técnicas moleculares no basadas en la PCR, tales como la hibridación de ADN (Hurtado y Owen, 1997).

Figueras *et al.* (2008) diseñaron un método basado en la técnica PCR-RFLP, digiriendo el gen 16S ARNr con la endonucleasa *MseI*. Aparte de *A. butzleri*, *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus*, otras tres nuevas especies que habían sido descritas hasta ese momento, *A. cibarius*, *A. nitrofigilis* y *A. halophilus*, también podían ser identificadas con este método.

Más tarde, en 2009, esta técnica permitió describir una nueva especie, *A. mytili* (Collado *et al.*, 2009a). Además, se encontraron otros nuevos patrones de RFLP en algunas cepas, que correspondían a otras dos nuevas especies, *A. molluscorum* (Figueras *et al.*, 2011b) y *A. defluvii* (Collado *et al.*, 2011). Posteriormente, se describió que las especies *A. thereius* (Houf *et al.*, 2009) y *A. trophiarum* (De Smet *et al.*, 2011) presentaban el mismo patrón de RFLP descrito para *A. butzleri*. Del mismo modo, la especie *A. defluvii* compartía patrón RFLP con *A. suis*, así como *A. venerupis* con *A. marinus*.

Estos problemas se solucionaron utilizando dos enzimas de restricción adicionales (*MnII* y *BfaI*), lo que permitió la identificación de más especies, hasta llegar a la diferenciación de las 17 especies reconocidas hasta el año 2012 (Figueras *et al.*, 2012).

8.5. Detección de *Helicobacter* por PCR convencional

La PCR ha demostrado ser muy útil para la detección de *H. pylori* porque posee mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas convencionales, siendo mucho más rápida y de menor coste que el cultivo (Morales *et al.*, 2001; Kabir, 2004). A esta ventaja se le añade la posibilidad de determinar si la cepa detectada presenta genes que le confieran resistencias a antibióticos o una especial virulencia, realizando una tipificación simultánea (Rimbara *et al.*, 2013; Gazi *et al.*, 2013; Chiurillo *et al.*, 2013).

La técnica de PCR ha sido empleada en un gran número de estudios de detección de este patógeno en un variado tipo de muestras. Existen múltiples trabajos en los que se ha utilizado esta técnica para evaluar la presencia de *H. pylori* y de nuevas especies en muestras ambientales, placa dental y saliva (Song, *et al.*, 2000); heces (Kelly *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2002; MacKay *et al.*, 2003); leche cruda (Jiang y Doyle, 2002; Rahimi y Kheirabadi, 2012); vegetales (Atapoor *et al.*, 2014), moluscos (Fernández *et al.*, 2007) y en aguas superficiales y residuales (Krumbiegel *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2003b; Horiuchi *et al.*, 2001; Hulten *et al.*, 1996).

El gen de la ureasa de *H. pylori* es uno de los genes que más se ha empleado en muestras ambientales, resultando muy sensible y específico (Kabir, 2004). Otros iniciadores usados en muestras ambientales incluyen secuencias del ADN 16S (Bunn *et al.*, 2002; Hulten *et al.*, 1996), el gen que codifica para la adhesina BabA (Horiuchi *et al.*, 2001) y los genes de virulencia *cagA* y *vacA* (Mazari-Hiriart *et al.*, 2001).

Respecto a la detección de otras especies de *Helicobacter* por PCR, existen protocolos para detectar secuencias especie-específicas del gen 16S ADNr de *H. pullorum* (Gonzalez *et al.*, 2008; Kaakoush *et al.*, 2014; Ceelen *et al.*, 2006) en muestras de heces y de alimentos y el gen *cdtB* en biopsias y heces de ratón (Turk *et al.*, 2012). Existe

también un ensayo de PCR para detectar *H. suis* basada en el gen *carA* (Menard *et al.*, 2014).

El principal problema para la detección de otros helicobacters es la gran similitud genética existente entre todos ellos. La secuenciación de los genes codificantes 16S y 23S ARNr permite la diferenciación de *H. suis* de las otras especies gástricas no *H. pylori* mencionadas anteriormente, pero no pueden distinguir entre *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. cynogastricus*, *H. baculiformis* y *H. heilmannii*. Para la diferenciación entre estas especies, es útil la secuenciación del gen *Hsp60*, los genes *ureA* y *B*, y el gen *gyrB* (Yakoob *et al.*, 2012; Haesebrouck *et al.*, 2009). Por tanto, una primera PCR específica de grupo seguida de detección y secuenciación de otros genes parecería el abordaje con mayor probabilidad de éxito (Yakoob *et al.*, 2012; Baele *et al.*, 2009).

8.6. Detección de *Helicobacter* por PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) es una herramienta rápida, mediante la cual, la amplificación y el análisis ocurren al mismo tiempo. Esta técnica presenta todas las ventajas de PCR y además, realiza la cuantificación del DNA presente en la muestra, lo que permite conocer el grado de contaminación de la misma (Yang *et al.*, 2003).

El principio de la técnica de PCR a tiempo real consiste en la detección de la señal de fluorescencia emitida tras la excitación del o de los fluoróforos añadidos a la reacción, ciclo por ciclo, durante la fase de amplificación, siendo esta señal proporcional al número de copias generadas en cada ciclo (Figura 3), lo que permite conocer el ciclo en el cual inicia la fase exponencial de la amplificación del ADN, que a su vez está directamente relacionado con la cantidad de ADN inicial (Bustin *et al.*, 2005). La detección de fluorescencia puede realizarse mediante sistemas inespecíficos o específicos de secuencia (Lee *et al.*, 2004).

El término “a tiempo real” se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de temperatura (**detección cualitativa**). Por su parte, el término “cuantitativo” hace referencia a que, mediante la construcción de una curva estándar a partir de concentraciones conocidas de ADN diana, es posible conocer la cantidad de ADN en la muestra (**detección cuantitativa**), a diferencia de la PCR convencional en la cual no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas dos características representan grandes ventajas de la PCR a tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitorizado conforme transcurre la reacción, sin que haya la necesidad de manipular el gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa, como sucede en la PCR convencional (Bustin *et al.*, 2005).

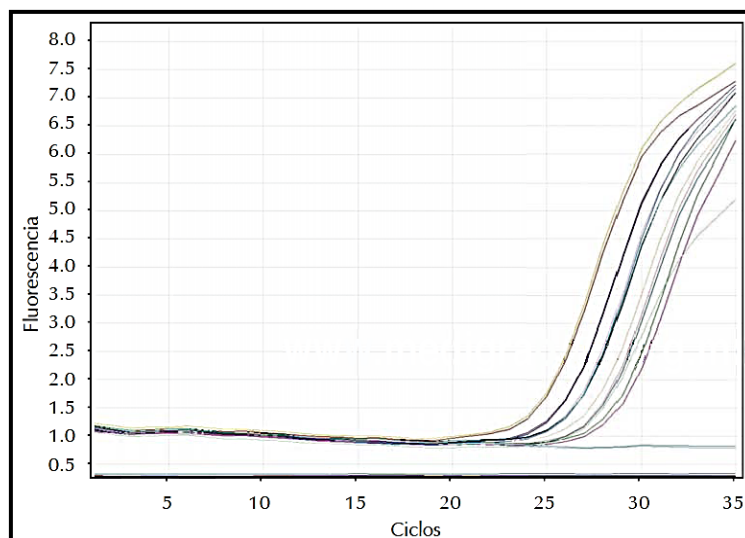


Figura 3. Representación gráfica del aumento de la fluorescencia con respecto al número de ciclos de la PCR (Curva de amplificación): En el eje “Y” se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje “X” los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN.

La PCR a tiempo real, aparte de ser el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos, permite la identificación de los productos de PCR, por las variaciones en la secuencia en función de sus temperaturas de fusión. Además, aun teniendo una cantidad muy pequeña de DNA diana, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia.

El instrumento empleado para realizar los análisis de PCR a tiempo real es el termociclador en tiempo real, que consiste en una cabina de enfriamiento, una cámara de calor, un fluorímetro, rotores, mandos electrónicos y fuente de energía. Existen varios modelos de termocicladores. Los más conocidos son los termocicladores que utilizan capilares y los termocicladores con micropillos de plástico.

El termociclador LightCycler® 1,5 de Roche, usado en el presente trabajo, utiliza tubos capilares para la detección y un fluorímetro de tres canales en la reacción. Un diodo azul (LED) con una emisión máxima de 470 nm sirve como fuente de energía para la excitación de las muestras. La fluorescencia se detecta a 530 nm, 640 nm y 710 nm con la ayuda de fotorhíbridos. Estos tres canales de detección permiten el marcaje de las muestras con varios fluorocromos, lo que posibilita el trabajo con PCR múltiple. Los nuevos termocicladores para PCR a tiempo real poseen 6 canales de detección, permitiendo así el análisis a varias longitudes de onda de emisión (530, 555, 610, 640, 670 y 705 nm), lo que posibilita la medida de emisiones de cuatro fluorocromos distintos.

Existen diversos protocolos de qPCR para *H. pylori*, la mayoría utilizados sólo en biopsias (Patel *et al.*, 2014; Kalach *et al.*, 2015), así como un ensayo para detectar *H. suis* en biopsias (Blaecher *et al.*, 2013). También se han publicado algunos protocolos para detectar *H. pylori* (Nayak y Rose, 2007; Moreno *et al.*, 2003b) y *H. pullorum* (González *et al.*, 2008; Kaakoush *et al.*, 2014; Ceelen *et al.*, 2006) en muestras de agua, heces y alimentos.

Cuando se revisa la gran cantidad de información disponible, se hace evidente que, a pesar de la infinidad de estudios dedicados a estos dos géneros, aún estamos lejos de conocer muchos de los factores determinantes de la epidemiología de *Arcobacter* y *Helicobacter*. Existen numerosas incertidumbres sobre su transmisión al hombre por el consumo de alimentos. En este sentido, disponer de datos fiables sobre su presencia en estas muestras y de métodos de diagnóstico rápidos y específicos, continúa siendo un objetivo fundamental para los microbiólogos.

OBJETIVOS

Actualmente se desconoce si los microorganismos de los géneros *Arcobacter* y *Helicobacter* pueden llegar al consumidor a través de los alimentos. Además, existen escasísimos datos sobre los niveles de contaminación por ambos géneros en diversos tipos de alimentos, así como del porcentaje de cepas resistentes a antibióticos que pueden encontrarse en ellos. Por otra parte, la detección e identificación de *Arcobacter* y *Helicobacter* por métodos de cultivo es extremadamente difícil, lo que hace necesario el desarrollo y aplicación de metodologías basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, como la PCR, para su estudio.

Teniendo todo esto en cuenta, la hipótesis de partida de este trabajo fue que determinados alimentos, que son susceptibles de presentar contaminación fecal y que se consumen crudos o poco cocinados, pueden actuar como vehículos de transmisión al hombre de especies patógenas de los géneros *Arcobacter* y *Helicobacter* y por tanto pueden suponer un riesgo para el consumidor.

El **objetivo global** de esta tesis fue, por tanto, contribuir al conocimiento de la epidemiología de las especies patógenas de los géneros *Arcobacter* y *Helicobacter*, mediante la investigación de su presencia en alimentos que pueden suponer un especial riesgo para el consumidor, como son los moluscos y las verduras. Para ello, se establecieron 3 **objetivos parciales**:

1. Obtención de datos sobre la presencia de *Arcobacter* y *Helicobacter* spp. en moluscos y verduras comercializados para su consumo, mediante el uso de métodos moleculares y convencionales:

- Aislamiento de cepas perteneciente al género *Arcobacter* a partir de muestras de los alimentos seleccionados.
- Detección directa de *Arcobacter* spp. y *Helicobacter* spp. en las muestras de alimentos mediante PCR convencional.
- Detección de *H. pylori* en las muestras de alimentos mediante PCR a tiempo real.

2. Identificación de las especies de *Arcobacter* presentes en moluscos y verduras comercializados para su consumo, mediante el uso de la técnica PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism).

3. Determinación de los porcentajes de cepas aisladas que presenten resistencia a antibióticos utilizados habitualmente en clínica y estudio de la posible presencia de mutaciones asociadas a las resistencias en las cepas encontradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

Para la realización de este trabajo se emplearon un total de 9 cepas de referencia: Ocho cepas del género *Arcobacter*, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DMSZ) y una cepa de *H. pylori* suministrada por la National Collection of Type Cultures de Londres (NCTC) (Tabla 6).

Tabla 6. Listado de cepas de referencia utilizadas en este estudio

Nº	Especies	Origen	Cepa
1	<i>A. butzleri</i>	Heces diarreicas humanas	DSM 8739
2	<i>A. cryaerophilus</i> 1A	Cerebro de fetos de bovino	CECT 8222
3	<i>A. defluvii</i>	Aguas residuales	CECT 7697
4	<i>A. ellisii</i>	Mejillones	CECT 7837
5	<i>A. marinus</i>	Agua de mar	CECT 7727
6	<i>A. mytili</i>	Mejillones	CECT 7386
7	<i>A. molluscorum</i>	Mejillones	CECT 7696
8	<i>A. venerupis</i>	Almejas	CECT 7836
9	<i>H. pylori</i>	Biopsia gástrica humana	NCTC 11638

El cultivo de las cepas de referencia se llevó a cabo siguiendo las instrucciones recomendadas por el manual de la colección de la que procedía cada cepa. Todas las cepas se conservaron por duplicado a -20 °C y -80 °C en crioviales (MICROBANK™). Antes de proceder a su congelación, así como tras la recuperación de las cepas, se comprobó la pureza del cultivo mediante tinción Gram.

2. DETECCIÓN DE *ARCOBACTER* POR CULTIVO

2.1. Muestras de moluscos

Se analizaron un total de 100 muestras de moluscos (41 de mejillones, 37 de almejas y 22 de berberechos) adquiridas en 12 pescaderías de la ciudad de Valencia, durante un periodo comprendido entre octubre de 2013 y junio de 2015 (Tabla 7). Las muestras fueron transportadas de forma inmediata al laboratorio y conservadas a temperaturas de refrigeración hasta su procesado, que se realizó en menos de 2 horas.

Tabla 7. Procedencia de las diferentes muestras de moluscos

Nº muestras	Procedencia	Tipo de molusco
43	Pescadería A	Mejillones, almejas, berberechos
40	Pescadería B	Mejillones, almejas, berberechos
5	Pescadería C	Mejillones, almejas
3	Pescadería D	Berberechos
2	Pescadería E	Mejillones, almejas
1	Pescadería F	Almejas
1	Pescadería G	Almejas
1	Pescadería H	Mejillones
1	Pescadería I	Mejillones
1	Pescadería J	Berberechos
1	Pescadería K	Mejillones
1	Pescadería L	Almejas
100		

De cada una de las muestras se pesaron 10 g en una bolsa de plástico estéril con filtro, a las que se añadieron 90 ml de *Arcobacter* Broth (AB) (Oxoid CM 0965). La mezcla fue homogeneizada durante dos minutos en un mezclador tipo Stomacher (Lab-Blender-400 Seward Medical).

A continuación se tomaron alícuotas de 1,5 ml a partir del caldo homogeneizado, que se utilizaron para la detección de *Arcobacter* mediante PCR antes del enriquecimiento (detección directa). Posteriormente se inocularon 20 ml del caldo en matraces con 20 ml de *Arcobacter* Broth suplementado con doble concentración de los antibióticos cefoperazona, anfotericina-B y teicoplanina (AB-[2CAT], Oxoid SR0174E).

Las muestras homogeneizadas y mezcladas con el medio AB-[2CAT] fueron sometidas a una etapa de enriquecimiento a 37 °C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia (10 % CO₂, 5 % O₂, y 85 % N₂). Transcurrido este tiempo, se tomaron nuevamente alícuotas de 1,5 ml del caldo enriquecido para la detección de *Arcobacter* mediante PCR.

Para el aislamiento de *Arcobacter*, después del enriquecimiento se inocularon 100 µl del caldo sobre un filtro de membrana estéril de 0,45 µm colocado previamente sobre una placa de *Arcobacter* Agar suplementado con 5 % de sangre de oveja (Oxoid SR 0051C) (*Arcobacter* Agar Sangre, AAS). Esta técnica fue desarrollada por **Atabay et al. (1997)** para aislar *Arcobacter* a partir de muestras de pollo, y se basa en la capacidad de *Arcobacter*, pero no de la biota acompañante, para pasar a través del filtro de membrana. De cada muestra se inocularon dos placas de AAS. Las placas se incubaron durante 1 hora a 30 °C en aerobiosis. Finalmente, los filtros fueron retirados y las placas se incubaron a 37 °C bajo condiciones de microaerofilia durante 48 horas.

Tras las 48 horas de incubación, se seleccionaron de 2 a 4 colonias por placa con la morfología típica de *Arcobacter* (pequeñas, redondas, de 1 mm de diámetro y de color grisáceo ligeramente translúcido) y se realizaron tinciones Gram, para observar si presentaban el aspecto típico de bacilos Gram negativos, curvados, en forma de “S” o espiral. Las colonias sospechosas de pertenecer al género *Arcobacter* fueron resembradas en placas de AAS, y finalmente fueron conservadas en crioviales a -20 °C y -80 °C (Figura 4).

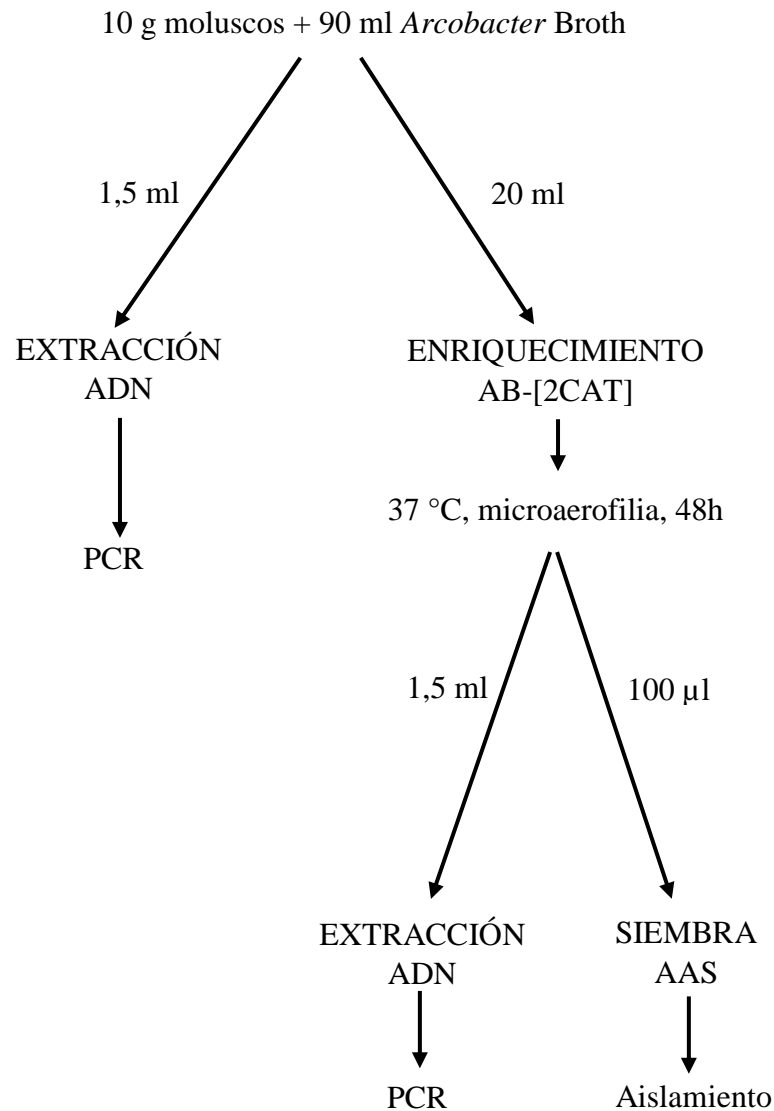


Figura 4. Esquema de detección de *Arcobacter* en muestras de moluscos.

2.2. Muestras de verduras

Se analizaron 100 muestras de verduras frescas: 41 muestras de lechugas, 21 muestras de espinacas, 34 muestras de acelga y 4 coles, compradas en 7 verdulerías de la ciudad de Valencia, durante el periodo comprendido entre noviembre 2014 y junio 2015. (Tabla 8). Al igual que en el muestreo anterior, las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio y se mantuvieron en refrigeración hasta su procesado, que se realizó en menos de 2 horas.

Tabla 8. Procedencia de las diferentes muestras de verduras

Nº muestras	Procedencia	Tipo de verdura
3	Verdulería A	Lechugas, col
30	Verdulería B	Lechugas, espinacas, acelgas, col
21	Verdulería C	Lechugas, espinacas, acelgas, col
4	Verdulería D	Lechugas, acelgas
24	Verdulería E	Lechugas, espinacas, acelgas, col
14	Verdulería F	Lechugas, espinacas, acelgas
4	Verdulería G	Lechugas, espinacas, acelgas
100		

El protocolo seguido es muy similar al descrito para el procesado de las muestras de moluscos, pero esta vez se pesaron 20 gramos de muestra, a los que se añadieron 180 ml de *Arcobacter* Broth. A continuación se tomaron alícuotas de 1,5 ml del caldo homogeneizado para la detección directa de *Arcobacter* por PCR. Además, 20 ml del caldo fueron inoculados en 20 ml del caldo selectivo de enriquecimiento AB-[2CAT] e incubados a 37 °C durante 48 h en condiciones de microaerofilia. Trascurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de 1,5 ml para la extracción de ADN y la posterior detección de *Arcobacter* por PCR. Otros 100 µl del caldo enriquecido fueron depositados sobre en un filtro de membrana de 0,45 µm colocado previamente sobre una placa de AAS. Tras filtración pasiva durante 1 hora a 30 °C, los filtros fueron retirados y las placas se incubaron a 37 °C en microaerofilia durante 48 h. De cada muestra se inocularon dos placas de AAS.

Transcurridas las 48 h de incubación, se seleccionaron de 2 a 4 colonias por placa con morfología típica de *Arcobacter* spp., se sembraron para obtener un cultivo masivo a partir de cada una de ellas y se realizaron tinciones Gram. Todas las colonias sospechosas de pertenecer al género *Arcobacter* fueron conservadas en crioviales a -20 °C y -80 °C. (Figura 5).

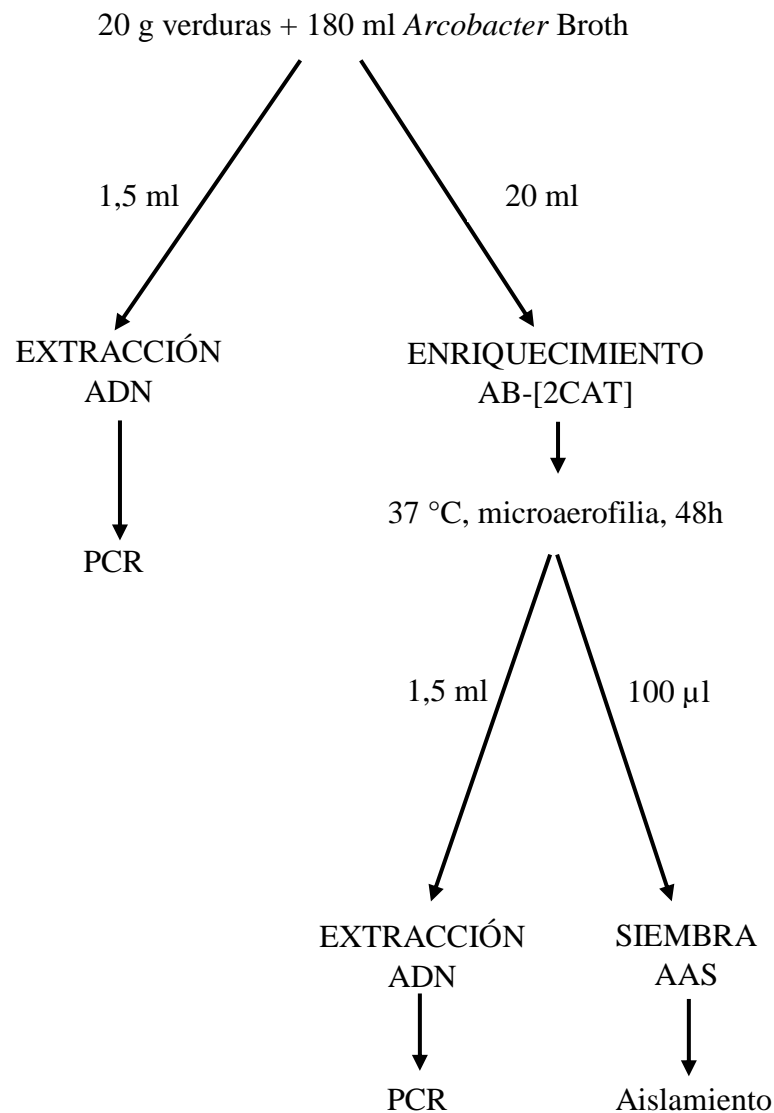


Figura 5. Esquema de detección de *Arcobacter* en muestras de verduras

3. DETECCIÓN DE *ARCOBACTER* POR PCR

3.1. Aislamiento del ADN bacteriano a partir de las muestras

Se partió del precipitado procedente de las alícuotas de 1,5 ml del caldo, tomadas antes y después del enriquecimiento, centrifugando a 16000 xg durante 2 minutos.

Se utilizó el kit de extracción de ADN “GenElute Bacterial Genomic DNA kit” (Sigma-Aldrich NA2110) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Este sistema combina las ventajas de una base de silicio con un formato de micro-columna, eliminando la necesidad de resinas costosas y compuestos orgánicos peligrosos, como fenol y cloroformo. Además, la presencia de sales caotrópicas fuertes inactiva las nucleasas

intracelulares, mientras que los tampones de extracción protegen los ácidos nucleicos aislados de la destrucción de nucleótidos.

3.2. Detección por PCR

La detección de *Arcobacter* en las muestras de moluscos y verduras, con y sin enriquecimiento, se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 331-pb del gen 23S ARNr específico para el género *Arcobacter*. Para ello se utilizaron los iniciadores descritos por **Bastyns et al. (1995)**:

ARCO 1: 5'-GTCGTGCCAAGAAAAGCCA-3'

ARCO 2: 5'-TTCGCTTGCGCTGACAT-3'

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, con 5 µl de ADN molde. En cada reacción se incluyó como control positivo ADN de la cepa de referencia *Arcobacter butzleri* DSM 8739, y como control negativo agua ultrapura estéril. Se comprobó la efectividad de los iniciadores seleccionados utilizando todas las cepas de referencia de *Arcobacter* incluidas en este estudio.

Tabla 9. Reactivos utilizados en la PCR de *Arcobacter*

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 X
dNTPs	0,2 mM/cada
MgCl ₂	1,5 mM
Iniciadores	0,5 µM/cada
<i>Taq</i> polimerasa	2,5 U

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca Eppendorf AG, según las condiciones descritas en la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones utilizadas en la PCR de *Arcobacter*

Nº de ciclos	Temperaturas (°C)	Tiempo	Fases
1	94	5 minutos	Desnaturalización
27	{ 94 61 72	1 minuto	Desnaturalización
		1 minuto	Unión de iniciadores
		1 minuto	Extensión
1	72	5 minuto	Extensión

Los productos resultantes de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % en tampón TAE 1 X, con la adición de 5 µl de RedSafe (Ecogen 21141), sometido a 100 voltios durante 45 minutos. Se utilizó un volumen de producto de PCR de 10 µl previamente mezclado con 2 µl de tampón de carga. En cada gel se incluyó un marcador de pesos moleculares de 100-pb (Thermo Fisher Scientific SM0323) para poder estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados. Finalmente, los fragmentos se visualizaron en un transiluminador bajo luz ultravioleta (UV).

Todos los ensayos se realizaron por duplicado para cada una de las muestras.

4. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *ARCOBACTER*

4.1. Identificación de *Arcobacter* spp.

Para la extracción de ADN bacteriano de los aislados obtenidos, se partió de un cultivo puro en fase exponencial de crecimiento (tras 48 horas de incubación) de cada uno de ellos, que a continuación se resuspendió en 300 µl de tampón TE y se centrifugó a 16000 xg durante 2 minutos. Tras este tiempo se procedió al aislamiento del ADN bacteriano, utilizando el kit de extracción de ADN “GenElute Bacterial Genomic DNA kit”, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La identificación a nivel de género de los aislados obtenidos, tanto de moluscos como de verduras, se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento de 331-pb del gen 23S ARNr específico del género *Arcobacter*, utilizando los iniciadores, reactivos y condiciones descritos previamente en el apartado 3.2.

Todos los ensayos de PCR se realizaron por duplicado. Los resultados dudosos o contradictorios fueron confirmados mediante la repetición de todo el ensayo (por duplicado) a partir de un nuevo cultivo puro del aislado correspondiente.

4.2. Identificación de *Arcobacter* spp. mediante PCR-RFLP del gen 16S ARNr

4.2.1. Amplificación por PCR

Con la finalidad de identificar la especie a la que pertenecían cada uno de los aislados obtenidos, se utilizó la técnica PCR-RFLP desarrollada por **Figueras et al. (2012)**. Para ello, se amplificó mediante PCR un fragmento de 1026-pb del gen 16S ARNr, utilizando los siguientes iniciadores:

CAH1a: 5'-AACACATGCAAGTCGAACGA-3'

CAH1b: 5'-TTAACCCAACATCTCAGAC-3'

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo 49 µl de la mezcla y 1 µl de ADN molde. En cada reacción de PCR se incluyó como control

positivo ADN de la cepa de referencia *A. butzleri* DSM 8739 y agua ultrapura estéril como control negativo.

Tabla 11. Reactivos utilizados para la mezcla de reacción en la PCR 16S ARNr

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 X
dNTPs	0,2 mM/cada
MgCl ₂	1,5 mM
Iniciadores	0,5 μM/cada
<i>Taq</i> polimerasa	5 U

El proceso de amplificación se efectuó siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de la PCR 16S ARNr

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Fases
1	94	2 minutos	Desnaturalización
30	{ 94 52 72	30 segundos	Desnaturalización
		30 segundos	Unión de iniciadores
		90 segundos	Extensión
1	72	10 minutos	Extensión

Los productos generados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, siguiendo las condiciones descritas previamente en el apartado 3.2.

Todos los ensayos de PCR se realizaron por duplicado. Los resultados dudosos o contradictorios fueron confirmados mediante la repetición de todo el ensayo (por duplicado) a partir de un nuevo cultivo puro del aislado correspondiente.

4.2.2. Purificación del producto de PCR

Los productos de PCR suelen contener restos de nucleótidos y de iniciadores que pueden interferir en su posterior procesamiento. Por este motivo se llevó a cabo un paso de purificación previa a la restricción enzimática de los productos de PCR. Para ello, se utilizó el kit de purificación “GenElute™ PCR Clean-Up Kit” (Sigma-Aldrich NA1020) siguiendo las condiciones descritas por el fabricante. Para comprobar la purificación del producto de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2 %.

4.2.3. Restricción enzimática del fragmento amplificado

Tras la purificación del producto de PCR se realizó la digestión con las enzimas de restricción, *MseI*, *MnII* y *BfaI*, que reconocen diferentes regiones del gen 16S ARNr, de acuerdo al método descrito por **Figuera et al. (2012)**.

La enzima *MseI* (Thermo Fisher Scientific ER0981) genera patrones de bandas específicos para 10 de las 17 especies de *Arcobacter* reconocidas hasta el 2012. Sin embargo, tras la digestión con esta enzima la especie *A. butzleri* presenta perfiles similares a las especies *A. thereius* y *A. trophiarum*; la especie *A. defluvii* es idéntica a *A. suis*, y *A. marinus* a *A. venerupis*. Por tal motivo, es necesario el uso de otras enzimas de restricción que permita diferenciarlas. La restricción con la enzima *MnII* (Thermo Fisher Scientific ER1072) genera perfiles de bandas diferentes para cada una de las especies *A. butzleri*, *A. thereius* y *A. trophiarum*, y también permite distinguir *A. marinus* de *A. venerupis*. La digestión con la enzima *BfaI* (Thermo Fisher Scientific, ER1762) genera patrones de bandas distintos para las especies *A. defluvii* y *A. suis*, lo que permite diferenciarlas (Tabla 13).

Tabla 13. Secuencias de reconocimiento de las enzimas utilizadas en este estudio

Secuencias de reconocimiento		
<i>MseI</i>	<i>MnII</i>	<i>BfaI</i>
5'.....T↓TAA.....3'	5'.....CCTC(N) ₇ ↓.....3'	5'.....C↓T AG.....3'
3'.....AAT↑T.....5'	3'.....GGAG(N) ₆ ↑.....5'	3'.....GA T↑C.....5'

Las digestiones se llevaron a cabo de forma individual para cada una de las enzimas antes mencionadas. Cada reacción fue preparada en un volumen final de 32 µl, conteniendo 10 µl del producto amplificado y 22 µl de la mezcla de reacción (Tabla 14).

Tabla 14. Reactivos utilizados en la digestión

Reactivos	Volumen	Concentración final
Enzima de restricción	2 µl	20 U
Tampón de reacción	2 µl	10 X
Agua milli-Q	18 µl	-

La digestión con la enzima *MseI* se desarrolló a 65 °C durante 5 horas, mientras que las digestiones con las enzimas *MnII* y *BfaI*, fueron llevadas a cabo a 37 °C durante 5 horas, siguiendo en todos los casos las condiciones descritas por el fabricante. La digestión se detuvo mediante la inactivación térmica de la enzima, colocando los tubos de reacción a 4 °C.

Los fragmentos digeridos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3,5 % en tampón TAE 1 X, a 90 voltios durante 3 horas. Se utilizaron 15 µl de producto de digestión, previamente mezclados con 5 µl de tampón de carga. En los geles se incluyó un marcador de pesos de 50-pb (Thermo Fisher Scientific SM 0373).

Tras la electroforesis, los geles fueron teñidos con GelRed™ 3 X (Biotium 41003). Para ello, se preparó una solución de 200 ml, conteniendo 60 µl de GelRed™ 10000 X y agua destilada. Los geles fueron sumergidos en dicha solución y mantenidos en agitación a 60 rpm durante 45 minutos. Finalmente, se visualizaron bajo luz UV.

Todos los ensayos de PCR-RFLP se realizaron por duplicado. Los resultados dudosos o contradictorios fueron confirmados mediante la repetición de todo el ensayo (por duplicado) a partir de un nuevo cultivo puro del aislado correspondiente.

Con el fin de conocer los patrones de bandas esperados para cada una de las especies de *Arcobacter*, se llevó a cabo un ensayo teórico computacional mediante el uso del programa REBASE (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>), utilizando la secuencia reconocida por los iniciadores CAH1am y CAH1b en cada especie. Las secuencias fueron digeridas de forma teórica con las enzimas *MseI*, *MnII* y *BfaI*. Los resultados nos permitieron comparar los perfiles obtenidos en el análisis experimental de todas las cepas aisladas con los perfiles teóricos generados *in silico*.

También, y previamente a su aplicación a los aislados, se obtuvieron experimentalmente los perfiles de restricción para todas las cepas de referencia de *Arcobacter*.

5. ANALISIS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

5.1. Difusión en placa con disco y E-test

Se estudió la sensibilidad de los aislados obtenidos a dos antibióticos del grupo de las quinolonas: ciprofloxacino y levofloxacino.

Para ambos antibióticos se utilizaron los métodos de difusión en disco (BD CIP: 231757, LEV: 231705) y tiras E-test (BioMérieux CIP: 508618, LEV: 527418). El método de gradiente antibiótico (E-test) es un método cuantitativo. El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco que permite, mediante lectura directa, determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Cada tira E-test posee un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones.

La concentración en discos de antibiótico fue de 5 µg por unidad, mientras en las tiras de E-test el rango de concentración por tira fue de 0,002 a 32 µg/ml.

5.1.1. Preparación del inóculo y aplicación de los discos y tiras de E-test

Todos los aislados obtenidos fueron sembrados en placas de AAS, que se incubaron a 37 °C durante 48 h en microaerofilia. A partir de este cultivo en fase exponencial de crecimiento, se preparó una suspensión en AB hasta una turbidez de 0,5 en la escala

McFarland. Posteriormente, con la utilización de un hisopo estéril, se realizó la siembra en placas de AAS de forma homogénea. Tras unos minutos en reposo, y con la ayuda de una pinza estéril, los discos y las tiras E-test fueron colocados sobre la superficie del agar. Se colocaron dos discos por placa, uno de cada antibiótico utilizado, y una tira por placa. Finalmente, las placas fueron incubadas bajo condiciones de microaerofilia a 37 °C durante 48 horas.

5.1.2. Lectura de las placas e interpretación de los resultados

Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición de los discos y las zonas de inhibición elipsoidal en el punto que confluyen con las tiras de E-test, que corresponde con la CMI. Dado que los géneros *Arcobacter* y *Campylobacter* pertenecen a la misma familia, y que no existen criterios o puntos de corte recomendados para el género *Arcobacter*, los resultados fueron interpretados de acuerdo a los criterios establecidos para *Campylobacter* según el Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI 2010, M45-A2) (Tabla 15).

Tabla 15. Criterios de interpretación de la sensibilidad de *Campylobacter jejuni/coli*

Agente antibiótico	Concentración en disco	Diámetro (mm)			CMI (µg/ml)		
		S	I	R	S	I	R
Ciprofloxacino	5 µg	-	-	6	≤ 1	2	≥ 4
Levofloxacino	5 µg	-	-	6	≤ 1	2	≥ 4

S: sensible; R: resistente; I: intermedia.

5.2. Determinación del mecanismo de resistencia a quinolonas

5.2.1. Amplificación del gen *gyrA*

Con el fin de investigar si la resistencia a las quinolonas se debía a una mutación cromosómica, se llevó a cabo la determinación y análisis de la secuencia de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) del gen *gyrA*. Para ello, todos los aislados que resultaron resistentes a ambos antibióticos, así como una representación de 15 aislados sensibles y la cepa de referencia *A. butzleri* DSM 8739, fueron analizados mediante PCR. Se amplificó un fragmento de 344-pb de la región QRDR del gen *gyrA* usando los iniciadores descritos por **Abdelbaqi et al. (2007)**:

F-QRDR: 5'-TGGATTAAGCCAGTTCATAGAAG-3'

R2-QRDR: 5'-TCATMGWATCATCATAATTTGGWAC-3'

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, conteniendo 45 µl de mezcla y 5 µl de ADN molde.

Tabla 16. Reactivos utilizados en la amplificación de la región QRDR del gen *gyrA*

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 X
dNTPs	0,2 mM/cada
MgCl ₂	2 mM
Iniciadores	0,5 µM/cada
<i>Taq</i> polimerasa	2,5 U

El proceso de amplificación se llevó a cabo en las condiciones descritas en la Tabla 17.

Tabla 17. Condiciones de temperatura utilizadas en la PCR *gyrA*

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo	Fases
1	95	5 minutos	Desnaturalización
35	{ 95 60 72	30 segundos	Desnaturalización
		30 segundos	Unión de iniciadores
		2 minutos	Extensión
1	72	5 minutos	Extensión final

Los productos generados en la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % en tampón TAE 1 X, con la adición de 5 µl de RedSafe, a 100 voltios durante 45 minutos. Se utilizó un volumen de 10 µl previamente mezclado con 2 µl de tampón de carga. En cada gel se incluyó un marcador de pesos moleculares de 100-pb. Finalmente, los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador bajo luz UV.

Tras la visualización de los amplificadas, el producto de la PCR fue purificado usando el kit “GenElute™ PCR Clean-Up”, siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Finalmente, el producto de PCR purificado fue enviado a secuenciar al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia (IBMCP-UPV).

5.2.2. Análisis de las secuencias producidas

Las secuencias obtenidas, tanto en los aislados resistentes como en los aislados sensibles, fueron analizadas. Se buscaron posibles mutaciones en la posición 254 de la región QRDR del gen *gyrA*. La mutación esperada consiste en el cambio de C normal por T mutante (Van den Abeele *et al.*, 2016).

6. DETECCIÓN DE *HELICOBACTER*

6.1. Extracción del ADN genómico

Para la detección de *Helicobacter* a partir de todas las muestras de alimentos, se partió de las alícuotas de 1,5 ml tomadas del caldo homogeneizado previamente al enriquecimiento, descrito en los apartados 2.1 y 2.2.

Se empleó el kit de extracción de ADN específico para muestras de alimentos “Realpure Spin Food Stool Bacterias kit” (Durviz, RBMEGS04), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2. Detección de *Helicobacter* spp.

La detección de *Helicobacter* spp. se llevó a cabo mediante la utilización de los iniciadores C05 y C97 descritos por **Shen-Ang *et al.* (1991)**. Este par de iniciadores permiten la amplificación de un fragmento específico de 1200-pb del gen 16S ARNr del género *Helicobacter*. Las secuencias de los iniciadores son las siguientes:

C97: 5'-GCTATGACGGGTATCC-3'

C05: 5'-ACTTCACCCCAGTCGCGT-3'

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final 50 µl, conteniendo 45 µl de mezcla y 5 µl de ADN genómico. En cada reacción de amplificación se utilizó como control positivo ADN de la cepa *H. pylori* 11638 NCTC y un control negativo en el que el ADN se reemplazó por agua estéril.

Tabla 18. Reactivos utilizados en la PCR de *Helicobacter*

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 X
dNTPs	0,2 mM/cada
MgCl ₂	1,5 mM
Iniciadores	0,5 µM/cada
<i>Taq</i> polimerasa	5 U

El proceso de amplificación se llevó a cabo según las condiciones descritas en la Tabla 19.

Tabla 19. Condiciones utilizadas en la PCR de *Helicobacter*

Nº Ciclos	Temperaturas (°C)	Tiempo	Fases
1	95	5 minutos	Desnaturalización
33	$\left\{ \begin{array}{l} 94 \\ 57 \\ 72 \end{array} \right.$	1 minuto	Desnaturalización
		1 minuto	Unión de iniciadores
		1 minuto	Extensión del producto
1	72	5 minutos	Extensión final

6.3. Detección de *Helicobacter pylori*

Para la detección de *H. pylori* se utilizaron dos pares de iniciadores. Cada mezcla de reacción se llevó a cabo por separado.

Los iniciadores HP1 y HP2 fueron descritos por **Choi *et al.* (2001)**, y amplifican un fragmento de 398-pb del gen 16S ARNr específico de *H. pylori*:

HP1: 5'-CCTAACCAATTGAGCCAAGAAG-3'

HP2: 5'-CTTTCTAACACTAACGCCCTCA-3'

Los iniciadores VacAR y VacAF (**Nilson *et al.*, 2002**) amplifican un fragmento de 394-pb del gen que codifica la proteína vacuolizante Vac, específico de *H. pylori*:

VacAF: 5'-GGCACACTGGATTTGTGGCA-3'

VacAR: 5'-CGCTCGCTTGATTGGACAGA-3'

Para ambas reacciones de amplificación se utilizaron las mismas concentraciones de los reactivos. El volumen final fue de 50 µl, conteniendo 45 µl de la mezcla y 5 µl de ADN molde. A las mezclas de reacción se les añadió Albúmina de Suero Bovino (BSA). La BSA incrementa la eficiencia de la PCR, ya que actúa como captadora de iones y sustancias presentes en la muestra que puedan interferir en la acción de la enzima *Taq* polimerasa (**Espinosa *et al.*, 2007**).

Tabla 20. Reactivos utilizados en la PCR de *H. pylori*

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 X
dNTPs	0,2 mM/cada
MgCl ₂	1,5 mM
Iniciadores	0,5 µM/cada
<i>Taq</i> polimerasa	5 U
BSA	10 mg/ml

Para ambas reacciones de PCR, la mezcla de reacción se sometió a las condiciones que se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Condiciones de temperatura utilizadas en la PCR para *H. pylori*

Nº Ciclos	Temperaturas (°C)	Tiempo	Fases
1	95	5 minutos	Desnaturalización
33	{ 94 57 72	1 minuto	Desnaturalización
		1 minuto	Unión de iniciadores
		1 minuto	Extensión
1	72	5 minutos	Extensión final

Los productos generados en esta reacción de amplificación se analizaron mediante electroforesis, para lo cual se utilizó un volumen de 10 µl, previamente mezclado con 2 µl de tampón de carga, en gel de agarosa al 1,2 % en tampón TAE 1 X, con la adición de 5 µl de RedSafe, sometido a 100 voltios durante 45 minutos. En cada gel se incluyó un marcador de pesos moleculares de 100-pb. Finalmente, los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador bajo luz UV.

6.4. Detección de *H. pylori* por PCR a tiempo real

La detección mediante PCR a tiempo real fue realizada siguiendo el protocolo descrito en el manual “LightCycler Operator’s Manual Versión 3.5” (Roche). Se emplearon los iniciadores VacAR y VacAF, usados anteriormente en la detección mediante PCR convencional.

Las condiciones de temperaturas en la reacción de PCR fueron las descritas por **Santiago et al. (2015)** (Tabla 22). El volumen final de reacción fue de 20 µl, conteniendo 18 µl de la mezcla y 2 µl de ADN genómico. En cada reacción de amplificación se utilizó ADN de la cepa de referencia *H. pylori* 11638 NCTC como control positivo, y un control negativo en el que el ADN se reemplazó por agua ultrapura estéril.

Tabla 22. Reactivos utilizados para la mezcla de reacción en la PCR a tiempo real

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 X
dNTPs	0,2 mM/cada
MgCl ₂	1,5 mM
Iniciadores	0,5 µM/cada
<i>Taq</i> polimerasa	5 U
BSA	10 mg/ml

El proceso de amplificación de la PCR a tiempo real se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 23.

Tabla 23. Condiciones utilizadas en la PCR a tiempo real para *H. pylori*

Nº Ciclos	Temperaturas (°C)	Tiempo (h:mm:ss)	Fases	Tipo de análisis
1	95	0:10:00	Desnaturalización	Ninguno
40	{ 95 62 72	0:01:00	Amplificación	Cuantificación
		0:01:00		
		0:01:00		
1	{ 95 72 95	0:00:00	Fusión	Curva de fusión
		0:00:15		
		0:00:00		
1	40	0:00:30	Enfriamiento	Ninguno

El análisis de los productos de PCR se llevó a cabo usando el LightCycler software 4.0 de Roche.

En el caso de obtener resultados positivos o dudosos, se procedió a la confirmación de los mismos. Para ello, cada reacción de PCR fue realizada por triplicado para poder recuperar suficiente ADN amplificado. El producto se recuperó de los capilares mediante el volcado de los mismos y su posterior centrifugación a 1000 rpm durante 10 segundos. El producto amplificado fue analizado mediante electroforesis, para lo cual se utilizó un volumen de 15-17 µl, previamente mezclado con 2 µl de tampón de carga, en un gel de agarosa al 1,5 % en tampón TAE 1 X con 1 µl de RedSafe, a 90 voltios durante 90 minutos. Se incluyeron marcadores de pesos moleculares de 100-pb y 50-pb. El gel fue visualizado bajo luz UV.

Tras la visualización del gel, y con el objeto de evitar falsos positivos, la banda que se encontraba a la altura del control positivo (394-pb) fue recuperada para su posterior purificación y secuenciación. La porción de gel recuperado que contenía el amplicón de interés fue colocado dentro de un tubo eppendorf de 1,5 ml y se llevó a cabo la purificación del producto de PCR presente en el gel mediante el Kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel band Purification” (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para determinar la concentración del producto de PCR recuperado, se utilizó un espectrofotómetro miniaturizado específico (Nanodrop, Roche LC1536). El producto recuperado y purificado fue enviado a secuenciar al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia (IBMCP-UPV).

La homología entre las secuencia amplificada y el fragmento del gen *vacA* de las cepas de referencia *H. pylori* NCTC 11638 y *H. pylori* CCUG 17874 fue determinada mediante un alineamiento BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

RESULTADOS

1. DETECCIÓN DE *ARCOBACTER* EN MUESTRAS DE MOLUSCOS

1.1. Aislamiento de *Arcobacter* mediante cultivo en placa

Tras una etapa de enriquecimiento selectivo, se aislaron cepas de *Arcobacter* a partir de 37 de las 100 muestras de moluscos analizadas (Tabla 25). En total, 17 de las 41 muestras de mejillones (41,46 %), 15 de 37 muestras de almejas (40,54 %) y 5 de 22 muestras de berberechos (22,73 %) mostraron contaminación por *Arcobacter* sp. (Tabla 24).

Tabla 24. Detección por cultivo en muestras de moluscos

Tipo de muestra	Nº de muestras	Nº de muestras positivas	Nº de aislados
Mejillones	41	17	21
Almejas	37	15	20
Berberechos	22	5	8
Total	100	37	49

A partir de las colonias que presentaban la morfología característica (Figura 6) se realizó tinción Gram, para confirmar que se trataba de bacilos Gram negativos, curvados, en forma de “S”, espiral o coma (Figuras 6 y 7). Se obtuvieron un total de 49 aislados: 21 de mejillones, 20 de almejas y 8 de berberechos (Tabla 24).

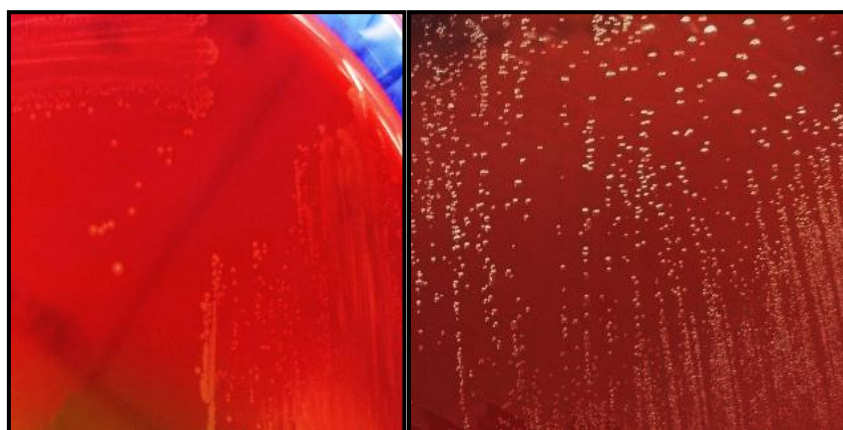


Figura 6. Colonias de *Arcobacter* aisladas de moluscos en medio selectivo *Arcobacter* agar



Figura 7. Morfología microscópica característica tras tinción Gram

La mayor parte de las muestras analizadas (83/100) procedían de 2 pescaderías (D y E). De las 37 muestras positivas por cultivo, 36 pertenecían a esas 2 pescaderías (Tabla 25).

Tabla 25. Procedencia y porcentajes de muestras de moluscos positivas por cultivo

Pescadería	Número de muestras positivas/número total de muestras			
	Mejillones	Almejas	Berberechos	Total
A	0/1	0/0	0/0	0/1
B	0/0	0/0	1/1	1/1
D	7/17	6/16	0/7	13/40
E	10/17	9/15	4/11	23/43
C, F, G, H, I, J, K, L	0/6	0/6	0/3	0/15
Total (%)	17/41 (41,46)	15/37 (40,54)	5/22 (22,73)	37/100

1.2. Detección directa de *Arcobacter* mediante PCR

De las 100 muestras analizadas por PCR con los iniciadores específicos para el género *Arcobacter* ARCO1 y ARCO2 (Bastyns *et al.*, 1995), 32 fueron positivas para *Arcobacter* directamente, sin enriquecimiento previo. Diecinueve muestras procedían de mejillones, 9 de almejas y 4 de berberechos. Tras 48 horas de enriquecimiento el nivel de detección se incrementó (Figura 8), llegándose a detectar *Arcobacter* en 68 muestras: 30 de mejillones, 28 de almejas y 10 de berberechos. De éstas, 29 fueron positivas para *Arcobacter* tanto antes como después del enriquecimiento. Por otro lado, en tres muestras (M05, M27 y M55) que habían resultado positivas para *Arcobacter* sin enriquecimiento, no fue posible la detección del microorganismo tras el enriquecimiento (Tabla 34).

De las 41 muestras de mejillones, el 46,32 % fueron positivas previamente al enriquecimiento y el 73,17 % tras el enriquecimiento. En las muestras de almejas el nivel de detección se incrementó del 24,32 % hasta el 75,67 %, tras el enriquecimiento. En las muestras de berberechos, la detección sin enriquecimiento fue del 18,80 % y tras el mismo, aumentó hasta el 45,45 % (Tabla 26).

Tabla 26. Resumen de la detección de *Arcobacter* spp. por PCR antes y después del enriquecimiento

Tipo de muestra	N°. de muestras	N° de muestras positivas (% respecto al tipo de muestra)	
		PCR antes del enriquecimiento	PCR después del enriquecimiento
Mejillones	41	19 (46,34)	30 (73,17)
Almejas	37	9 (24,32)	28 (75,67)
Berberechos	22	4 (18,18)	10 (45,45)
Total	100	32	68

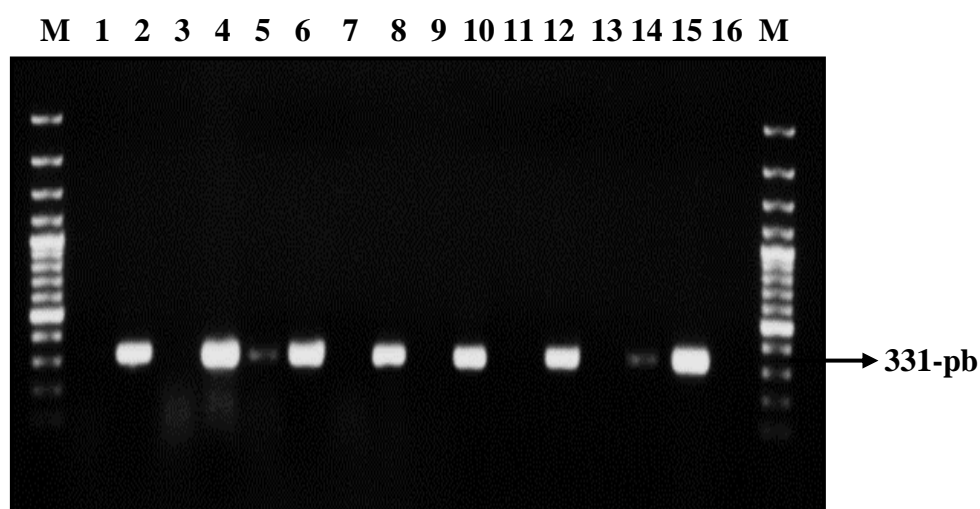


Figura 8. Amplificación del gen 23S ARNr de *Arcobacter* utilizando los iniciadores ARCO1 y ARCO2 para la detección en muestras de moluscos. Calles 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13: Muestras sin enriquecimiento; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14: Muestras tras enriquecimiento; 15: Control positivo *A. butzleri* DSM 8739; 16: Control negativo; M: Marcador de pesos moleculares (100-pb)

1.3. Comparación de métodos de detección

Por PCR, el 71 % (71/100) de las muestras fueron positivas para *Arcobacter* spp., 30 de mejillones, 30 de almejas y 11 de berberechos. Por cultivo en placa solo se obtuvieron resultados positivos en el 37 % de las muestras: 17 de las 41 muestras de mejillones (41,46

%), 15 de 37 muestras de almejas (40,54 %) y 5 de las 22 muestras de berberechos (22,73 %) (Tabla 27).

Hubo un resultado bastante llamativo: una muestra de mejillones (M55) y otra de berberechos (M99), que habían sido positivas por cultivo, fueron negativas para *Arcobacter* mediante PCR (Tabla 34).

Tabla 27. Comparación de los valores de detección obtenidos por los dos métodos en muestras de moluscos

Muestra	Cultivo (%)	PCR (%)
Mejillones	17/41 (41,46)	30/41 (73,17)
Almejas	15/37 (40,54)	30/37 (81,08)
Berberechos	5/22 (22,73)	11/22 (50,00)
Total	37/100	71/100

2. DETECCIÓN DE *ARCOBACTER* EN MUESTRAS DE VERDURAS

2.1. Aislamiento de *Arcobacter* mediante cultivo en placa

Tras 48 horas de enriquecimiento, 17 de las 100 muestras de verduras analizadas (17 %) fueron positivas para *Arcobacter* spp: 8 espinacas, 4 lechugas, 4 acelgas y una col (Tabla 29).

Se obtuvieron un total de 25 aislados, 13 de espinacas, 5 de lechugas, 6 de acelgas y 1 de col (Tabla 28). Las características morfológicas en placa y la morfología microscópica tras tinción Gram fueron las esperadas para el género *Arcobacter* (Figuras 6 y 7).

Tabla 28. Detección por cultivo en muestras de verduras

Tipo de muestra	Nº. de muestras	Nº de muestras positivas	Nº de aislados
Lechugas	41	4	5
Espinacas	21	8	13
Acelgas	34	4	6
Coles	4	1	1
Total	100	17	25

La mayor parte de las muestras de verduras analizadas (89/100) procedían de 4 verdulerías (B, C, E y F). De las 17 muestras positivas por cultivo, 15 procedieron de esas 4 verdulerías (Tabla 29).

En total, el 9,76 % de las lechugas, 38,10 % de las espinacas, el 11,76 % de las acelgas y el 25 % de las coles presentaban contaminación por *Arcobacter* spp. (Tabla 29).

Tabla 29. Procedencia de las muestras de verduras y resultados de la detección por cultivo

Verdulería	Número de muestras positivas / número total de muestras				
	Lechugas	Espinacas	Acelgas	Coles	Total
A	0/2	0/0	0/0	0/1	0/3
B	1/10	2/9	3/10	0/1	6/30
C	1/7	3/5	0/8	1/1	5/21
D	0/2	0/0	0/2	0/0	0/4
E	2/13	0/2	0/8	0/1	2/24
F	0/6	2/4	0/4	0/0	2/14
G	0/1	1/1	1/2	0/0	2/4
Total (%)	4/41 (9,76)	8/21 (38,10)	4/34 (11,76)	1/4 (25,00)	17/100

2.2. Detección mediante PCR

La detección directa fue posible en 4 de las 100 muestras analizadas (2 espinacas, una lechuga y una acelga). Tras el periodo de enriquecimiento, se detectó *Arcobacter* en 20 muestras, de las cuales 9 procedían de espinacas, 6 de lechugas, 4 de acelgas y 1 de col (Tabla 30, Figura 9).

De las 41 muestras de lechugas, el 2,44 % fueron positivas previamente al enriquecimiento y el 14,63 % tras el enriquecimiento. En las muestras de espinacas el nivel de detección se incrementó del 9,5 % hasta el 42,86 %, tras el enriquecimiento. De la misma manera, en acelgas los niveles de detección pasaron del 2,9 % al 11,76%. En la única muestra de col positiva por PCR (25 %) solo se obtuvieron resultados positivos tras el enriquecimiento (Tabla 30).

Tabla 30. Resultados de la detección por PCR antes y después del enriquecimiento

Tipo de muestra	Nº. de muestras	Nº de muestras positivas (% respecto al tipo de muestra)	
		PCR antes del enriquecimiento	PCR después del enriquecimiento
Lechugas	41	1 (2,44)	6 (14,63)
Espinacas	21	2 (9,5)	9 (42,86)
Acelgas	34	1 (2,9)	4 (11,76)
Coles	4	0	1 (25)
Total	100	4	20

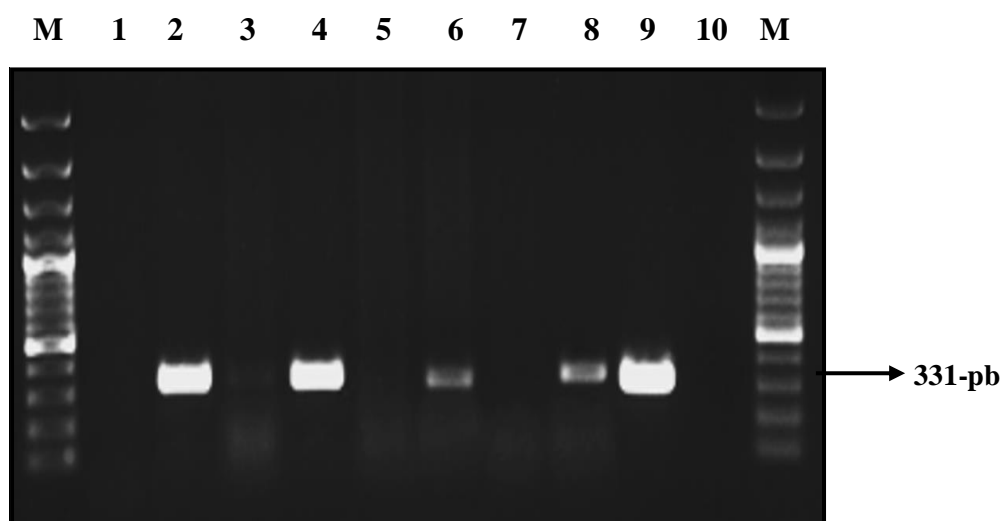


Figura 9. Amplificación del gen 23S ARNr de *Arcobacter* utilizando los iniciadores ARCO1 y ARCO2 para la detección en muestras de verduras. Calles 1, 3, 5 y 7: muestras sin enriquecimiento; 2, 4, 6 y 8: muestras tras enriquecimiento; 9: Control positivo *A. butzleri* DSM 8739; 10: Control negativo; M: Marcador de pesos moleculares (100-pb)

2.3. Comparación de métodos de detección

Por cultivo en placa solo 4 muestras (V33, V75, V76 y V77) de las 20 positivas por PCR fueron negativas. Al igual que en el caso de los moluscos, en una muestra que había sido positiva por cultivo en placa (V41, acelga) no fue posible la detección por PCR (Tabla 35).

Tabla 31. Comparación de los valores de detección obtenidos por los dos métodos en muestras de verduras

Muestra	Cultivo (%)	PCR (%)
Lechugas	4/41 (9,76)	6/41 (14,63)
Espinacas	8/21 (38,10)	9/21 (42,86)
Acelgas	4/34 (11,76)	4/34 (11,76)
Coles	1/4 (25,00)	1/4 (25,00)
Total	17/100	20/100

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS OBTENIDOS

3.1. Identificación de *Arcobacter* spp.

La identificación de los 74 aislados se realizó mediante amplificación por PCR con los iniciadores ARCO 1 y ARCO 2 (Bastyns *et al.*, 1995) de un fragmento de 331-pb del gen 23S ARNr específico del género *Arcobacter*. En todos los aislados se obtuvo la banda característica (Figura 10).

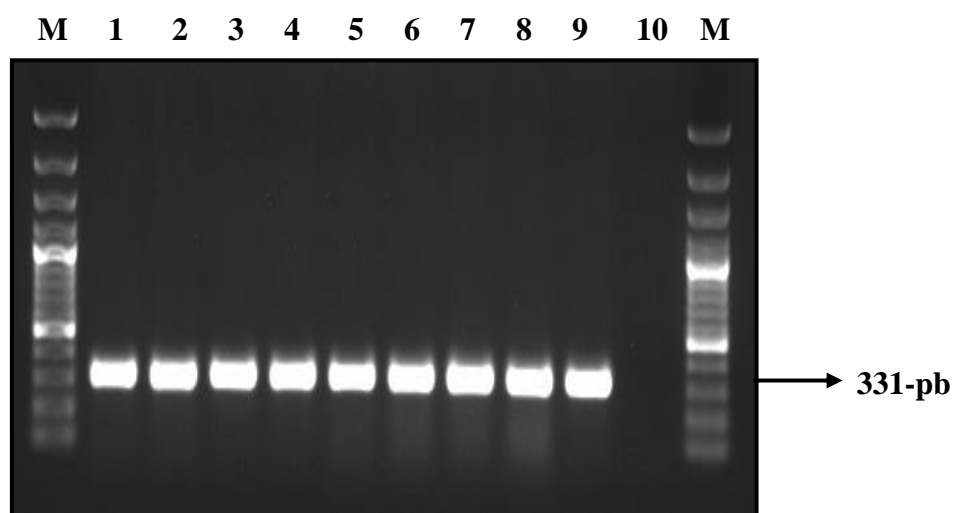


Figura 10. Amplificación del gen 23S ARNr del género *Arcobacter* utilizando los iniciadores ARCO1 y ARCO2 para la identificación de los aislados. 1: M6C1; 2: M12C2; 3: M29C3; 4: M34C2; 5: V1C1; 6: V10C1; 7: V22C3; 8: V41C1; 9: Control positivo *A. butzleri* DSM 8739; 10: Control negativo; M: Marcador de pesos moleculares (100-pb)

3.2. Identificación a nivel de especie mediante PCR-RFLP

La identificación de los aislados a nivel de especie se realizó mediante el método PCR-RFLP descrito por **Figueras *et al.* (2012)**. En todos los aislados y cepas de referencia se obtuvo un fragmento de 1026-pb del gen 16S ARNr, tras amplificación del ADN con los iniciadores CAH1am y CAH1b (Figura 11).

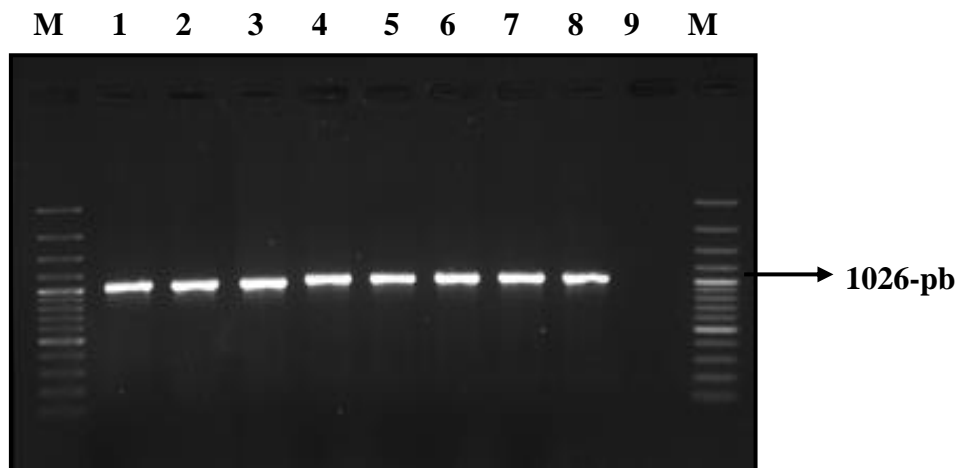


Figura 11. Amplificación del gen 16S ARNr de *Arcobacter* usando los iniciadores CAH1am y CAH1b en diferentes muestras. 1: M6C1; 2: M12C2; 3: M28C1; 4: M34C2; 5: M46C1; 6: M66C1; 7: M79C1; 8: *A. butzleri* DSM 8739; 9: Control negativo; M: Marcador de pesos moleculares (100-pb)

Previamente a su aplicación a los aislados, se obtuvieron los perfiles de restricción para todas las cepas de referencia de *Arcobacter* incluidas en el estudio, utilizando las 3 enzimas de restricción descritas previamente en el apartado de Material y Métodos (Figuras 12, 13 y 14).

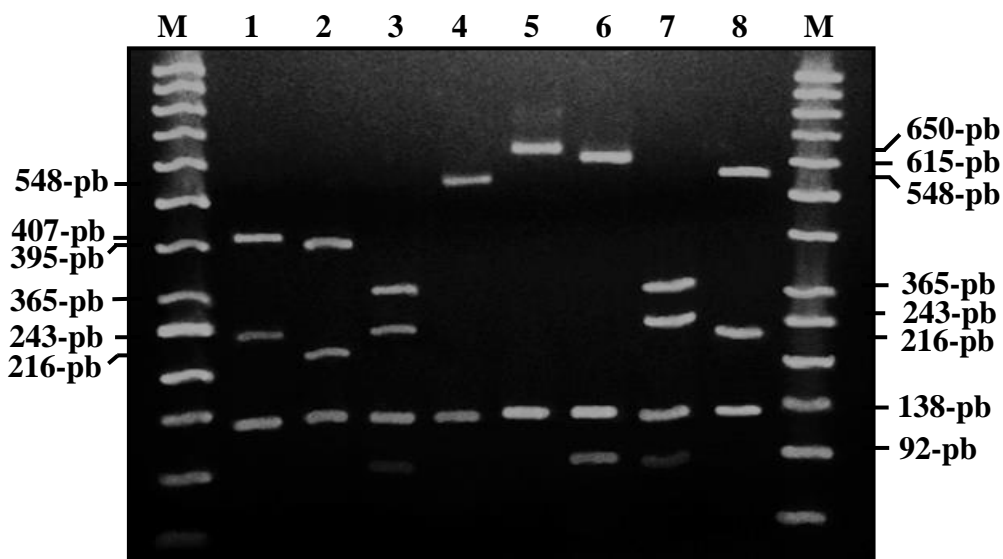


Figura 12. Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *MseI*. 1: *A. defluvii* CECT 7697; 2: *A. cryaerophilus* CECT 8222; 3: *A. venerupis* CECT 7836; 4: *A. molluscorum* CECT 7696; 5: *A. mytili* CECT 7386; 6: *A. ellisii* CECT 7837; 7: *A. marinus* 7727; 8: *A. butzleri* DSM 8739; M: Marcador de pesos moleculares (50-pb)

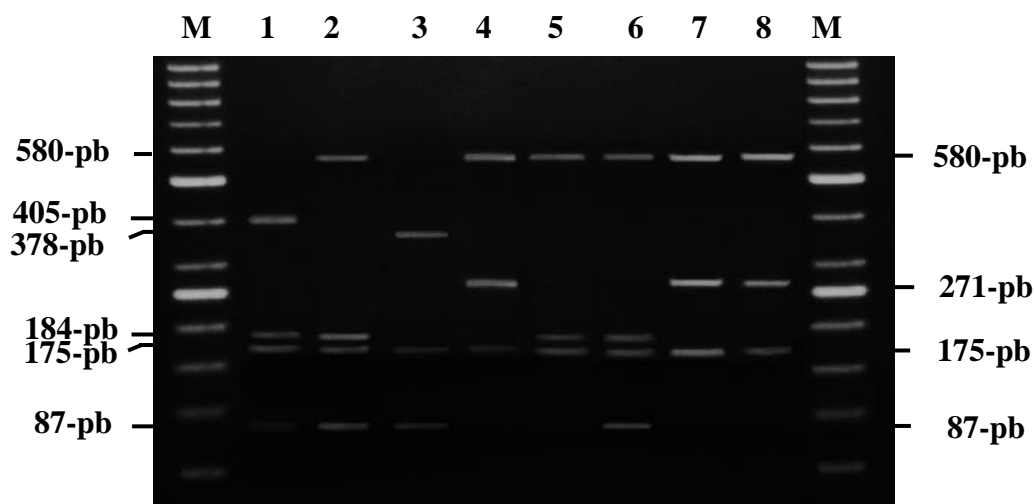


Figura 13. Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *BfaI*. 1: *A. defluvii* CECT 7697; 2: *A. cryaerophilus* CECT 8222; 3: *A. venerupis* CECT 7836; 4: *A. molluscorum* CECT 7696; 5: *A. mytili* CECT 7386; 6: *A. ellisii* CECT 7837; 7: *A. marinus* 7727; 8: *A. butzleri* DSM 8739; M: Marcador de pesos moleculares (50-pb)

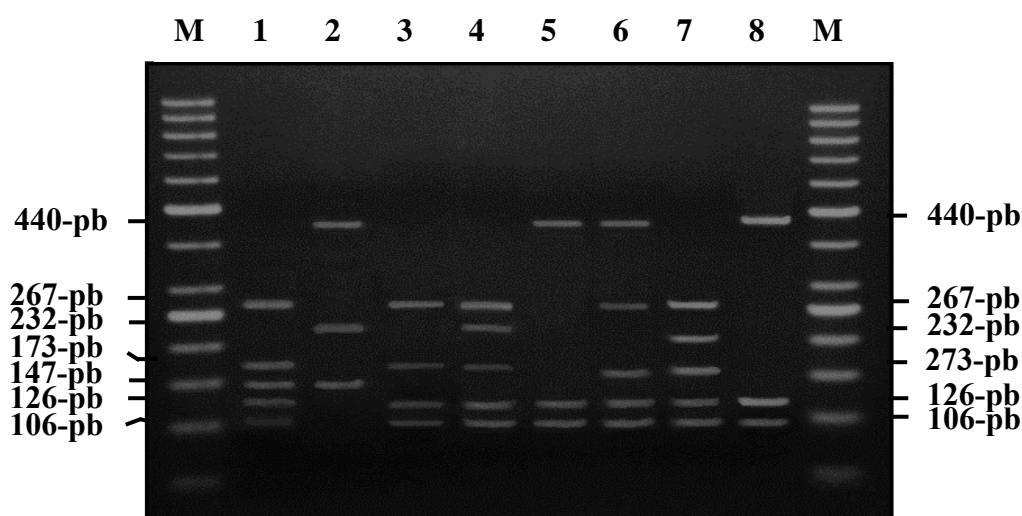


Figura 14. Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *MnlI*. 1: *A. defluvii* CECT 7697; 2: *A. cryaerophilus* CECT 8222; 3: *A. marinus* 7727; 4: *A. molluscorum* CECT 7696; 5: *A. mytili* CECT 7386; 6: *A. ellisii* CECT 7837; 7: *A. venerupis* CECT 7836; 8: *A. butzleri* DSM 8739; M: Marcador de pesos moleculares (50-pb)

3.2.1. PCR-RFLP del gen 16S ARNr de aislados de muestras de moluscos

El producto de PCR purificado obtenido para cada uno de los 49 aislados a partir de las muestras de moluscos fue sometido a digestión, usando la enzima de restricción *MseI*, obteniéndose tres perfiles distintos, con 3 bandas cada una de ellos, de pesos moleculares comprendidos entre 138 y 548-pb (Figura 15).

Todos los perfiles obtenidos de los aislados fueron comparados con los obtenidos en el ensayo computacional realizado mediante el uso del programa REBASE, y en el análisis de las cepas de referencia. El perfil I (365, 216 y 138-pb) es el característico de la especie *A. cryaerophilus*. El perfil II (407, 243 y 138-pb) es el que presentan las especies *A. defluvii* y *A. suis*. El perfil III (548, 216 y 138-pb) corresponde a las especies *A. butzleri*, *A. trophiarum* y *A. thereius*.

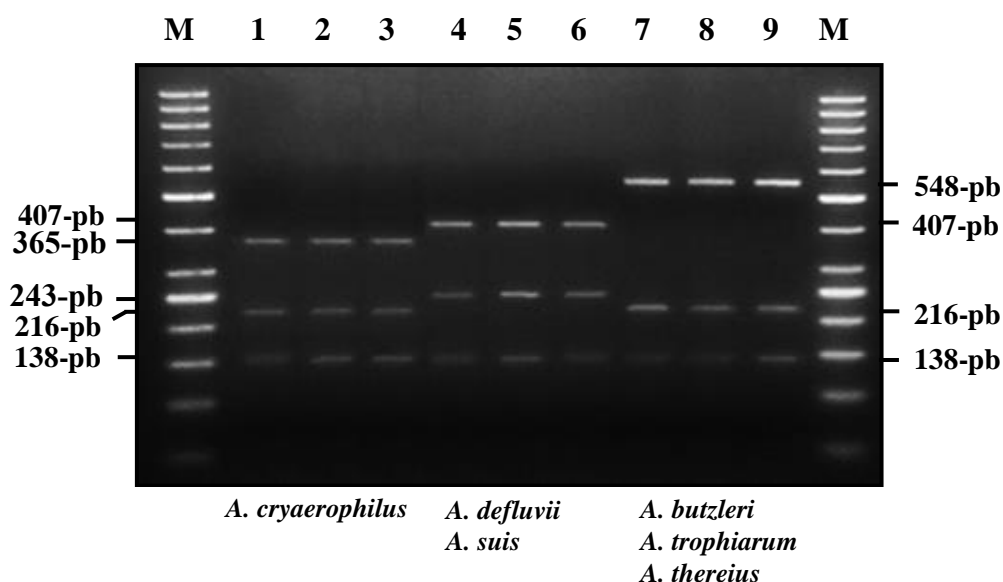


Figura 15. Perfiles generados por restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *MseI* en aislados procedentes moluscos. 1: M28C1; 2: M55C2; 3: *A. cryaerophilus* CECT 8222; 4: M67C2; 5: M93C1; 6: *A. defluvii* CECT 7697; 7: M12C3; 8: M71C2; 9: *A. butzleri* DSM 8739; M: Marcador de pesos moleculares (50-pb)

La digestión con la enzima *BfaI* de todos los aislados agrupados en el perfil II tras digestión con *MseI*, mostró un único perfil de bandas (407, 184, y 175-pb), correspondiente a la especie *A. defluvii* (Figura 16).

Tras la digestión con *MnII* de los aislados que presentaban el perfil III tras la digestión con la enzima *MseI*, se comprobó que todas ellas presentaban el mismo patrón de bandas (267, 173, 147, 126 y 106-pb), correspondiente a la especie *A. butzleri* (Figura 17).

En total, de los 49 aislados obtenidos de moluscos, 25 fueron identificados como *A. butzleri*, de los que 7 se aislaron en mejillones, 11 en almejas y 7 en berberechos. Diecinueve aislados pertenecían a la especie *A. cryaerophilus*, 13 procedentes de mejillones, 5 de almejas y 1 de berberechos. De los aislados identificados como *A. defluvii* uno procedía de una muestra de mejillón y 4 de 3 muestras de almejas (Tabla 34).

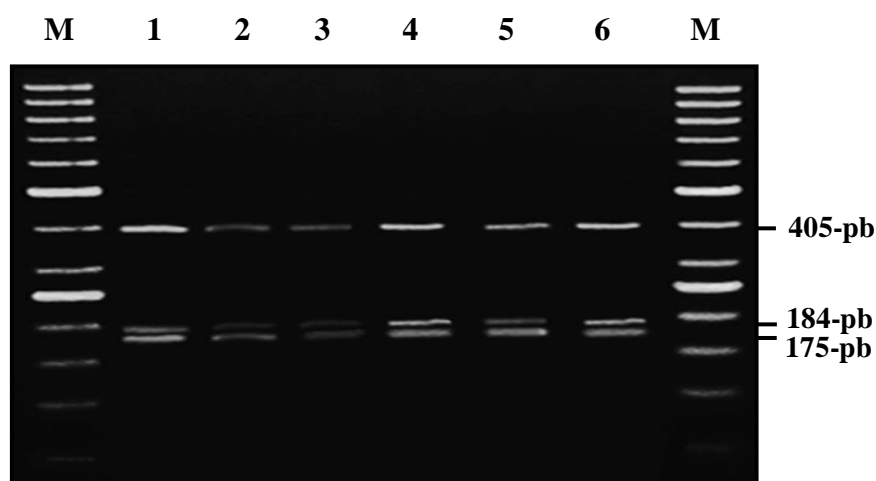


Figura 16. Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *BfaI* en aislados procedentes moluscos. 1: M67C2; 2: M93C1; 3: M96C3; 4: M106C1; 5: M106C2; 6: *A. defluvii* CECT 7697; M: Marcador de pesos moleculares (50-pb)

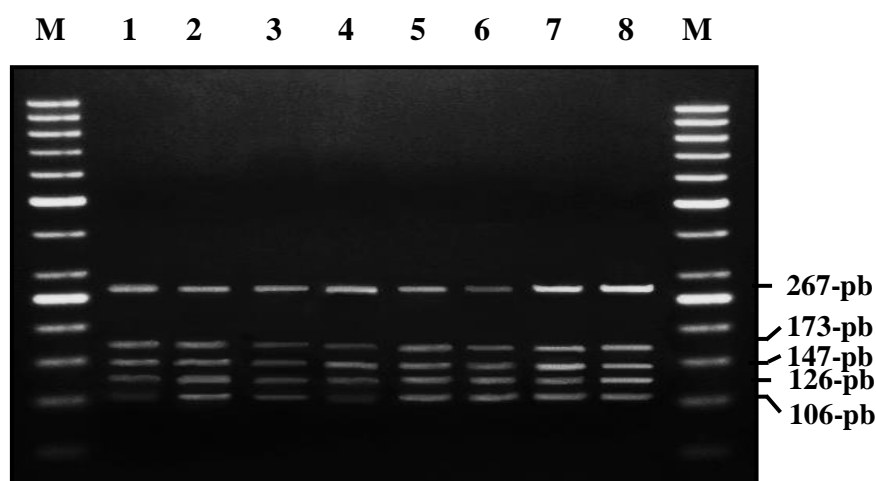


FIGURA 17. Perfiles generados por la restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *MnII* en aislados procedentes moluscos. 1: M6C1; 2: M66C1; 3: M71C2; 4: M80C2; 5: M90C2; 6: M92C2; 7: *A. butzleri* DSM 8739; M: Marcador de pesos moleculares (50-pb)

Once de las 41 muestras de mejillones presentaban contaminación por *A. cryaerophilus* y 6 por *A. butzleri*. En cinco muestras de almejas se aisló *A. cryaerophilus*, 7 presentaron contaminación por *A. butzleri*, y 3 por *A. defluvii*. En el caso de los berberechos, *A. butzleri* fue la especie predominante (4 positivas frente a 1 contaminada por *A. cryaerophilus*).

Sólo en una de las muestras de mejillón (M80) se aislaron dos especies diferentes, *A. cryaerophilus* y *A. butzleri*.

Por lo que respecta a las tasas de contaminación, almejas y berberechos fueron las muestras más contaminadas por *A. butzleri* (18,9 y 18,2 % respectivamente), mientras

que la mayor tasa de contaminación por *A. cryaerophilus* se encontró en mejillones (26,8 % de las muestras analizadas) (Tabla 32).

Tabla 32. Especies identificadas en las muestras de moluscos

Muestras analizadas (n)	<i>A. butzleri</i>		<i>A. cryaerophilus</i>		<i>A. defluvii</i>	
	N° muestras (% contaminación)	Aislados	N° muestras (% contaminación)	Aislados	N° muestras (% contaminación)	Aislados
Mejillones (41)	6 (14,6)	7	11 (26,8)	13	1 (2,4)	1
Almejas (37)	7 (18,9)	11	5 (13,5)	5	3 (8,1)	4
Berberechos (22)	4 (18,2)	7	1 (4,5)	1	0	0
Total	17	25	17	19	4	5

3.2.2. PCR-RFLP del gen 16S ARNr de aislados de muestras de verduras

Para la identificación de los aislados procedentes de verduras se utilizó el mismo método que para los aislados de moluscos. Se amplificó un fragmento de 1026-pb del gen 16S ARNr de cada aislado; luego el producto obtenido fue purificado y finalmente digerido usando la enzima de digestión *MseI* (Figueras *et al.*, 2012). Se obtuvieron dos perfiles distintos para los 25 aislados: El perfil I (365, 216 y 138-pb), característico de *A. cryaerophilus* y el perfil II (548, 216 y 138-pb), que engloba las especies *A. butzleri*, *A. trophiarum* y *A. thereius* (Figura 18).

Con el fin de diferenciar *A. butzleri* de *A. trophiarum* y *A. thereius*, se realizó una digestión con la enzima de *MnlI* a todos los aislados que presentaron el perfil II. Tras esta digestión, todos ellos mostraron un perfil idéntico (267, 173, 147, 126 y 106-pb), que correspondía a la especie *A. butzleri* (Figura 19).

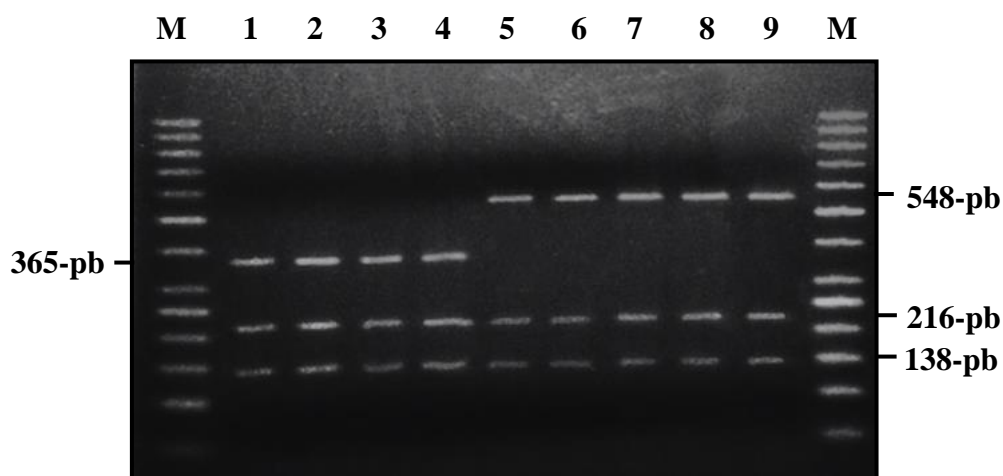


Figura 18. Perfiles generados por restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *MseI* en aislados procedentes verduras. 1: V1C2; 2: V10C1; 3: V32C1 4: *A. cryaerophilus* CECT 8222; 5: V17C2; 6: V22C2; 7: V36C1; 8: V74C1; 9: *A. butzleri* DSM 8739; M: Marcador de pesos moleculares (50-pb)

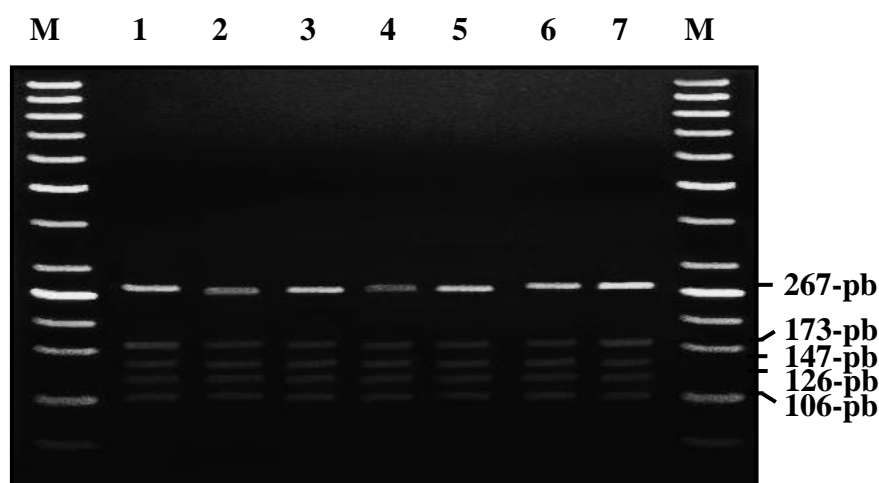


Figura 19. Perfiles generados por restricción del gen 16S ARNr de *Arcobacter* con la enzima *MnII* en aislados procedentes verduras. 1: V17C2; 2: V22C2; 3:V36C1; 4:V62C1; 5:V74C1; 6: V94C3; 7: *A. butzleri* DSM 8739; M: Marcador de pesos moleculares (50-pb)

De los 25 aislados procedentes de verduras, 17 fueron identificados como *A. butzleri*. De ellos, 2 se aislaron en lechugas, 11 en espinacas y 4 en acelgas. Ocho de los aislados pertenecían a la especie *A. cryaerophilus*, 3 procedentes de lechugas, 2 de espinacas, 2 de acelgas y 1 de col (Tabla 35).

En las muestras de acelgas, el número de muestras contaminadas por *A. cryaerophilus* y *A. butzleri* fue el mismo (2 muestras positivas para cada especie). En las muestras de espinacas, la especie *A. butzleri* se identificó en un mayor número de muestras (6 muestras positivas) que *A. cryaerophilus* (2 positivas). En el caso de las lechugas, *A. cryaerophilus* fue la especie presente en mayor número de muestras (3 positivas frente a dos

contaminadas por *A. butzleri*). Es de destacar que en una de las muestras procedente de lechuga (V38) se aislaron dos especies diferentes, *A. cryaerophilus* y *A. butzleri*.

Por lo que respecta a las tasas de contaminación, las espinacas fueron las muestras más contaminadas, tanto por *A. butzleri* (28,6 % de las muestras analizadas) como por *A. cryaerophilus* (9,5 %), seguidas por las acelgas (5,8 % para ambas especies) y lechugas (4,8 % en ambos casos) (Tabla 33).

Tabla 33. Especies identificadas en las muestras de verduras

Muestra analizadas (n)	<i>Arcobacter butzleri</i>		<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	
	Nº muestras (% contaminación)	Aislados	Nº muestras (% contaminación)	Aislados
Lechugas (41)	2 (4,8)	2	3 (7,3)	3
Espinacas (21)	6 (28,6)	11	2 (9,5)	2
Acelgas (34)	2 (5,8)	4	2 (5,8)	2
Coles (4)	-	-	1 (25)	1
Total	10	17	8	8

Tabla 34. Resultados de la detección de *Arcobacter* spp. en muestras de moluscos

Muestra	PCR (sin enriquecimiento)	PCR (con enriquecimiento)	Cultivo
M02	+	+	NA
M03	+	+	NA
M05 [†]	+	-	NA
M06	+	+	M6C1 (<i>A. butzleri</i>)
M10	-	+	NA
M12	-	+	M12C2 y M12C3 (<i>A. butzleri</i>)
M14	-	+	NA
M17	-	+	NA
M21	-	+	NA
M23	-	+	NA
M26	-	+	NA
M27 [†]	+	-	NA
M28	+	+	M28C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M29	+	+	M29C3 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M30	+	+	NA
M31	+	+	NA
M32	+	+	NA
M33	+	+	NA
M34	-	+	M34C2 y M34C3 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M35	-	+	NA
M40	-	+	M40C2 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M41	-	+	NA
M43	-	+	M43C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M45	-	+	M45C2 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M46	-	+	M46C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M48	-	+	NA
M50	+	+	NA
M53	+	+	M53C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M54	-	+	NA
M55*	+	-	M55C2 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M57	-	+	NA

Resultados

M58	+	+	M58C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M59	-	+	NA
M60	+	+	NA
M61	-	+	NA
M62	+	+	NA
M63	-	+	M63C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M64	+	+	NA
M66	+	+	M66C1 (<i>A. butzleri</i>)
M67	-	+	M67C2 (<i>A. defluvii</i>)
M68	+	+	M68C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M71	+	+	M71C1 y M71C2 (<i>A. butzleri</i>)
M74	+	+	M74C1 y M74C2 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M77	-	+	NA
M78	+	+	NA
M79	-	+	M79C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M80 ^{&}	+	+	M80C1 (<i>A. cryaerophilus</i>) M80C2 (<i>A. butzleri</i>)
M82	-	+	NA
M83	+	+	M83C2 (<i>A. butzleri</i>)
M84	+	+	M84C1 (<i>A. butzleri</i>)
M85	-	+	M85C1 (<i>A. butzleri</i>)
M86	+	+	M86C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M87	-	+	M87C1 y M87C2 (<i>A. butzleri</i>)
M88	-	+	NA
M90	-	+	M90C2 (<i>A. butzleri</i>)
M91	-	+	M91C1 y M91C3 (<i>A. butzleri</i>)
M92	-	+	M92C1 y M92C2 (<i>A. butzleri</i>)
M93	+	+	M93C1 (<i>A. defluvii</i>)
M94	-	+	NA
M95	-	+	M95C1 y M95C2 (<i>A. butzleri</i>)
M96	+	+	M96C3 (<i>A. defluvii</i>)
M98	-	+	M98C3 (<i>A. cryaerophilus</i>)
M99 ^{**}	-	-	M99C1 (<i>A. butzleri</i>)
M100	-	+	NA

M101	-	+	NA
M102	-	+	M102C1, M102C2 y M102C3 (<i>A. butzleri</i>)
M103	+	+	M103C1 (<i>A. butzleri</i>)
M104	-	+	NA
M106	-	+	M106C1 y M106C2 (<i>A. defluvii</i>)
M107	+	+	NA
M108	-	+	M108C4 (<i>A. butzleri</i>)
M110	+	+	NA
Total	32	68	37

NA: No se obtuvieron aislados

*: Muestra positiva para *Arcobacter* sin enriquecimiento previo, negativa tras el mismo

** : Muestra negativa por PCR pero positiva por cultivo

†: Muestras positivas para *Arcobacter* sin enriquecimiento previo, pero negativas tras el enriquecimiento y por cultivo

&: Muestra en la que se obtuvo dos aislados de diferente especie

Tabla 35. Resultados de la detección de *Arcobacter* spp. en muestras de verduras

Muestra	PCR (sin enriquecimiento)	PCR (con enriquecimiento)	Cultivo
V1	-	+	V1C2 (<i>A. cryaerophilus</i>)
V5	-	+	V5C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
V10	-	+	V10C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
V12	-	+	V12C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
V17	-	+	V17C2 (<i>A. butzleri</i>)
V22	+	+	V22C1, V22C2 y V22C3 (<i>A. butzleri</i>)
V25	+	+	V25C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
V32	-	+	V32C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
V33	+	+	NA
V36	-	+	V36C1 (<i>A. butzleri</i>)
V38 ^{&}	-	+	V38C1 (<i>A. cryaerophilus</i>) V38C2 (<i>A. butzleri</i>)
V41 [*]	-	-	V41C1 (<i>A. cryaerophilus</i>)
V62	-	+	V62C1 y V62C3 (<i>A. butzleri</i>)
V65	+	+	V65C2 y V65C3 (<i>A. butzleri</i>)
V68	-	+	V68C1 (<i>A. butzleri</i>)
V74	-	+	V74C1 (<i>A. butzleri</i>)
V75	-	+	NA
V76	-	+	NA
V77	-	+	NA
V93	-	+	V93C1, V93C2 y V93C4 (<i>A. butzleri</i>)
V94	-	+	V94C3 y V94C4 (<i>A. butzleri</i>)
Total	4	20	17

NA: No se obtuvieron aislados

*: Muestra negativa por PCR pero positiva por cultivo

&: Muestra en la que se obtuvo dos aislados de diferente especie

4. ANALISIS DE SENSIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS

4.1. Estudio de sensibilidad en placa

Se realizaron las pruebas de difusión en disco y E-test a todos los aislados procedentes de muestras de alimentos (Figuras 20 y 21). Los valores de CMI se encontraban en el rango de 0,012 a 0,94 $\mu\text{g/ml}$ para levofloxacino y de 0,004 a 0,64 $\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacino, en todos los aislados sensibles (Anexo VI).

Tres de los 25 aislados identificados previamente como *A. butzleri* (M102C2, M102C3 y M103C1) procedentes de moluscos (12 % de los aislados) y 2 de 17 aislados (V93C2 y V93C4) procedentes de verduras (11,76 %) pertenecientes a la misma especie, presentaron resistencia a ambos antibióticos (Figuras 20, 21). Las CMI fueron superiores a 32 $\mu\text{g/ml}$ en todos los casos, excepto para el aislado V93C2, que presentó valores de 12 $\mu\text{g/ml}$ para levofloxacino y de 8 $\mu\text{g/ml}$ para ciprofloxacino. Todos los aislados identificados como *A. cryaerophilus*, así como los aislados identificados como *A. defluvii* presentaron sensibilidad a los antibióticos antes mencionados.

En total, dos muestras de moluscos (2 % del total analizadas) y una de verduras (1 %) presentaron contaminación por cepas de *A. butzleri* resistente a las dos fluoroquinolonas testadas

Figura 20. Prueba de difusión en disco, aislado resistente (A) y Prueba de E-test, aislado resistente (B)

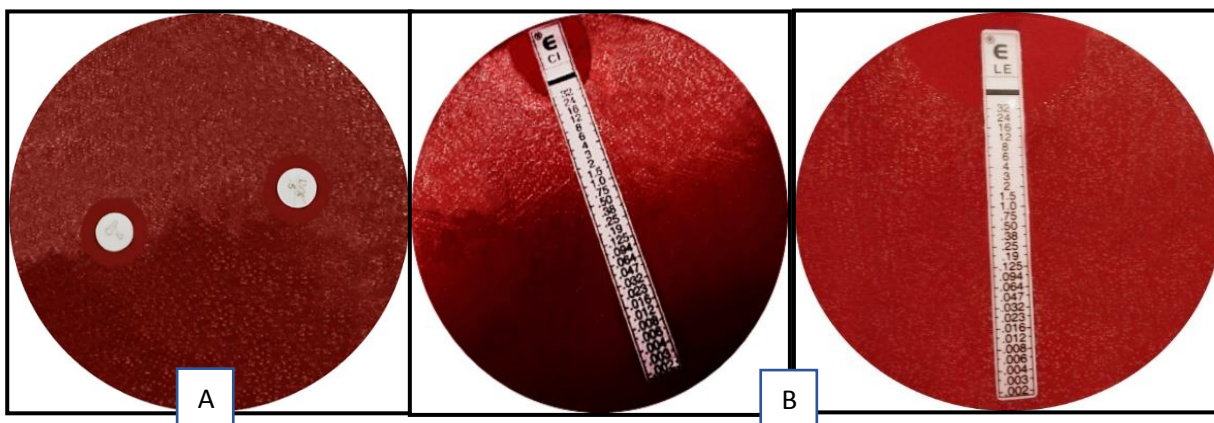
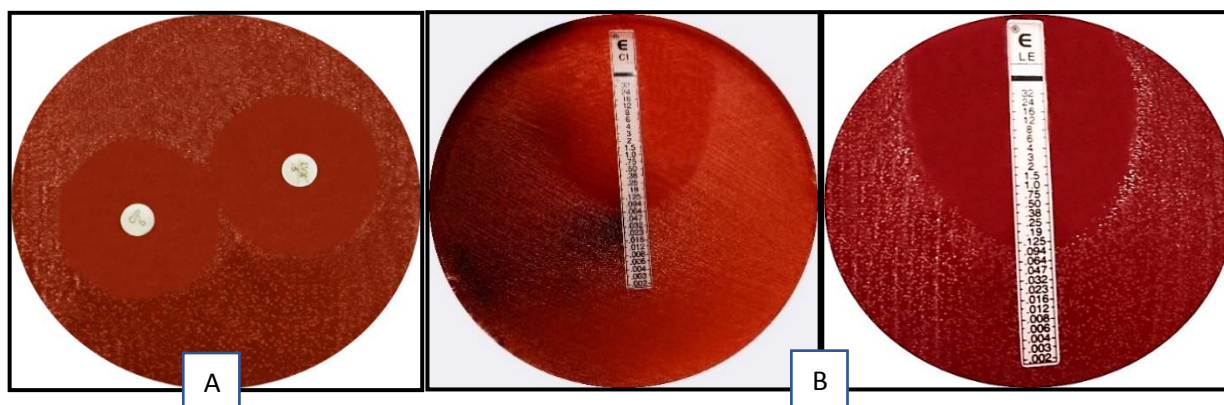


Figura 21. Prueba de difusión en disco, aislado sensible (A) y Prueba de E-test, aislado sensible (B)



4.2. Estudio del mecanismo de resistencia a quinolonas

Con el fin de conocer el mecanismo de resistencia a las quinolonas de los aislados, un fragmento de 344-pb de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) del gen *gyrA* fue amplificado usando los iniciadores F-QRDR y R2-QRDR (Abdelbaqi *et al.*, 2007).

Se realizó la amplificación de todos los aislados resistentes (M102C2, M102C3, M103C1, V93C2 y V93C4) así como de otros 15 sensibles. En todos los casos se obtuvo la banda de 344-pb de la región QRDR del gen *gyrA* (Figura 22).

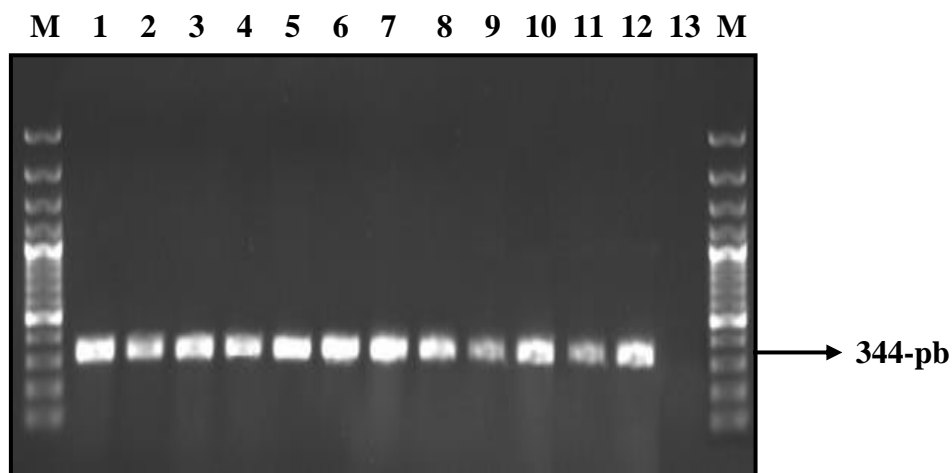


Figura 22. Amplificación de la región QRDR del gen *gyrA*. 1, 2 y 3: aislados resistentes de moluscos (M102C2, M102C3 y M103C1); 4, 5 y 6: aislados sensibles procedentes de moluscos (M6C1, M12C3 y M87C2); 7 y 12: *A. butzleri* DSM 8739; 8 y 9: aislados resistentes de verduras (V93C2 y V93C4); 10 y 11: Aislados sensibles de verduras (V 17C2 y V62C3); 13: Control negativo; M: Marcador de pesos moleculares (100-pb)

Los fragmentos de 344-pb fueron purificados y secuenciados. Las secuencias generadas fueron analizadas y se detectó la existencia de una mutación en la posición 254 (C normal por T mutante) de la región QRDR del gen *gyrA* en todos los aislados resistentes. En cambio, ni en la cepa de referencia *A. butzleri* DSM 8739 ni en ninguno de los aislados sensibles se detectó dicha mutación (Tabla 36).

Tabla 36. Secuenciación de la región QRDR del gen *gyrA* de los aislados resistentes y una representación de todos los aislados sensibles

G-M102C2 (Aislado resistente)

121 -----TGCA-ATGCACGATT-TAGTATCACT
 181 TCAAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
 241 CCTCATGGAG-ATA^TTTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAG-TTTCTCTTTA
 301 AGAGCACCAC-TTGTTGATGG-ACAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TCGATGGTGA-TAATGCAGCA
 361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
 421 GATAAAGATA-CAGTAAATTT-TGTTCCAAAT-TATGTGGATT-CGATGAAGAC-TGGACATCCA
 481 AACCTC

G-M102C3 (Aislado resistente)

121 -----TCA-ATGCACGATT-TAGTATCACT
 181 TCAAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
 241 CCTCATGGAG-ATA^TTTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAG-TTTCTCTTTA
 301 AGAGCACCAC-TTGTTGATGG-ACAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TCGATGGTGA-TAATGCAGCA
 361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
 421 GATAAAGATA-CAGTAAATTT-TGTTCCAAAT-TATGTGGATA-CGATGAAATG-TGGTCTCCTA
 481 CATT

G-M103C1 (Aislado resistente)

121 -----G-GCATGCACGA-TTTAGTATCA
 181 CTCAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
 241 CCTCATGGAG-ATA^TTTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAG-TTTCTCTTTA
 301 AGAGCACCAC-TTGTTGATGG-ACAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TCGATGGTGA-TAATGCAGCA
 361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
 421 GATAAAGATA-CAGTAAATTT-TGTTCCAAAT-TATGATGATA-CGATGAATCT-ACTCTCCCC
 481 AATT

G-M6C1 (Aislado sensible)

121 -----GCC-AATGCACGAT-TTAGTATTAC
 181 TTCAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
 241 CCTCATGGAG-ATA^CTTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAA-TTTCTCTTTA
 301 AGAGCTCCAC-TTGTTGATGG-TCAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TCGATGGTGA-TAATGCAGCG
 361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
 421 GACAAAGATA-CAGTAAACTT-TGTTCCAAAT-TATGATGATA-CGATGAATCC-TGATCGCTCG
 481 GCCGCCGG

G-M12C3 (Aislado sensible)

121 -----GGCA-ATGCACGATT-TAGTATTACT
 181 TCAAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
 241 CCTCATGGAG-ATA^CTTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAA-TTTCTCTTTA
 301 AGAGCTCCAC-TTGTTGATGG-TCAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TCGATGGTGA-TAATGCAGCG
 361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
 421 GACAAAGATA-CAGTAAACTT-TGTTCCAAAT-TATGATGATA-CGATGAGGGG-TTACTCCTTA
 481 TT

G-M87C2 (Aislado sensible)

121 -----TGC-ATGCACGATT-TAGTATCACT
181 TCAAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
241 CCTCATGGAG-ATAC[□]TTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAAG-TTTCTCTTTA
301 AGAGCACCAC-TTGTTGATGG-ACAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TCGATGGTGA-TAATGCAGCA
361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
421 GATAAAGATA-CAGTAAATTT-TGTTCCAAAT-TATGTGGATA-CGATGAAACGT-TGGCTTCCGC
481 GTAGC

G-V93C2 (Aislado resistente)

121 -----AGGCAA-TGCACGATTT-AAGTATTACT
181 TCAAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
241 CCTCATGGAG-ATAC[□]TTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAAG-TTTCTCTTTA
301 AGAGCTCCAC-TTGTTGATGG-ACAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TTGATGGTGA-TAATGCAGCG
361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
421 GATAAAGATA-CAGTAAACTT-TGTTCCAAAT-TATGATGATA-CGATGAAAGT-GCTAACATAC
481 TCTATT

G-V93C4 (Aislado resistente)

121 -----AGCA-ATGCACGATT-TAGTATTACT
181 TCAAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
241 CCTCATGGAG-ATAC[□]TTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAAG-TTTCTCTTTA
301 AGAGCTCCAC-TTGTTGATGG-ACAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TTGATGGTGA-TAATGCAGCG
361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
421 GATAAAGATA-CAGTAAACTT-TGTTCCAAAT-TATGATGATA-CGATGAAATAT-GGATCACTAT
481 AATGA

G-V17C2 (Aislado sensible)

121 -----TGCA-ATGCACGATT-TAGTATTACT
181 TCAAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
241 CCTCATGGAG-ATAC[□]TTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAAG-TTTCTCTTTA
301 AGAGCTCCAC-TTGTTGATGG-ACAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TCGATGGTGA-TAATGCAGCG
361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
421 GATAAAGATA-CAGTAAACTT-TGTTCCAAAT-TATGTGATTC-TATGAACACT-GGATTATTCT
481 ACA

G-V62C3 (Aislado sensible)

121 -----AGCC-ATGCACGATT-TAGTATTACT
181 TCAAAATCTG-CCTATAAAAA-ATCTGCAAGA-ATTGTTGGAG-ATGTTATTGG-TAAATATCAC
241 CCTCATGGAG-ATAC[□]TTCAGT-TTATGATGCA-CTTGTAAGAA-TGGCACAAAAG-TTTCTCTTTA
301 AGAGCTCCAC-TTGTTGATGG-ACAAGGAAAC-TTTGGTTCTA-TCGATGGTGA-TAATGCAGCG
361 GCTATGAGAT-ATACAGAAGC-TAGAATGACA-AGAATTGCTG-AAGAAGTTCT-AAGAGATTTA
421 GATAAAGATA-CAGTAAACTT-TGTTCCAAAT-TATGTGGATA-CGATGAAAAC-TGACTGACCA
481 GCCAT

XX: Posición del iniciador R2-QRDR

[□]: Posición 254 para Forward y 213 para Reverse (Transición C silvestre por T mutante en aislados resistentes)

5. DETECCIÓN DE *HELICOBACTER* SPP. EN MUESTRAS DE MOLUSCOS Y VERDURAS

5.1. Detección de *Helicobacter* spp.

Para la detección del género *Helicobacter* se utilizaron los iniciadores C97 y C05 (Fox *et al.*, 1998), que amplifican un fragmento de 1200-pb del gen 16S ARNr. Tras la amplificación ninguna de las muestras analizadas (100 moluscos + 100 verduras) generaron resultados positivos para el género *Helicobacter*.

5.2. Detección de *H. pylori*

5.2.1. Detección por PCR convencional

Mediante el uso de los iniciadores HP1 y HP2 (Choi *et al.*, 2001), que amplifican un fragmento del gen 16S ARNr específico de *H. pylori*, ninguna de las 200 muestras presentó la banda característica de 398-pb.

Sin embargo, con los iniciadores VacAR y VacAF (Nilsson *et al.*, 2002), específicos para un fragmento del gen que codifica la proteína vacuolizante VacA de *H. pylori*, se detectó la banda de 394-pb en 4 muestras de moluscos (M2, M3, M6 y M17) y otras 5 de verduras (V1, V18, V40, V62, V86) (Figuras 23 y 24). Dada la presencia de otras bandas inespecíficas, así como la baja intensidad de la señal obtenida, estas muestras fueron posteriormente analizadas por PCR a tiempo real para poder confirmar la presencia de *H. pylori*.

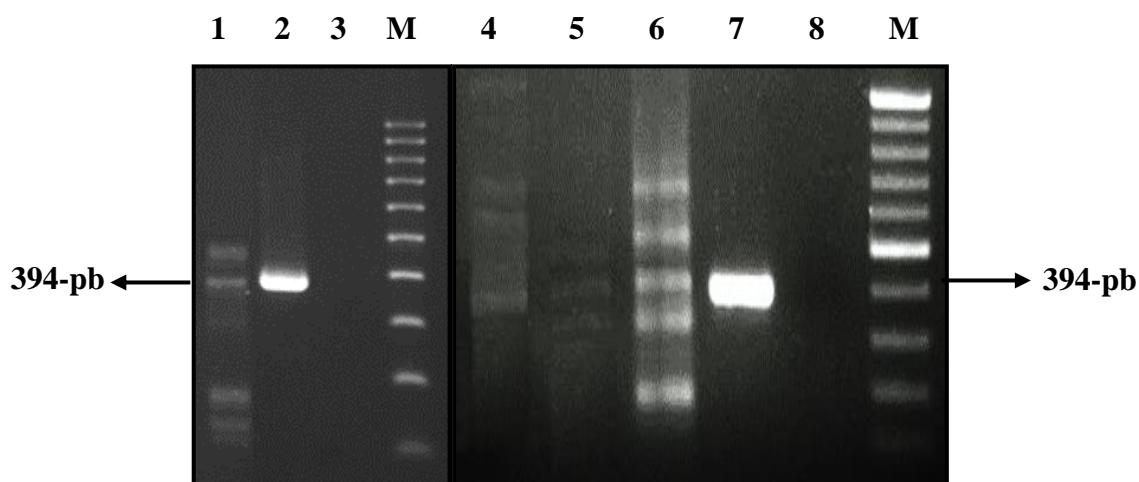


Figura 23. PCR específica para el gen *vacA* de *H. pylori* en muestras de moluscos. 1: M2; 2: Control positivo *H. pylori* NCTC 11638; 3: Control negativo; 4: M3; 5: M6; 6: M17; 7: Control positivo *H. pylori* NCTC 11638; 8: Control negativo; M: Marcador de pesos moleculares (100-pb)

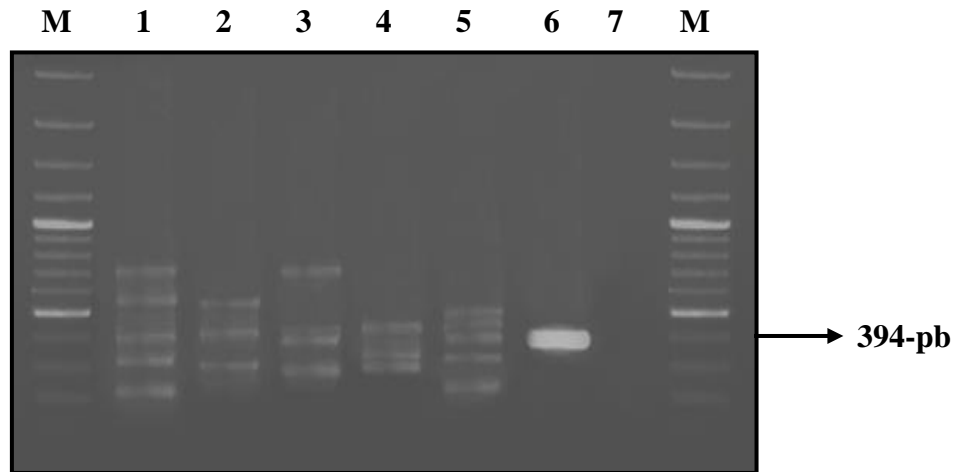


Figura 24. PCR específica para el gen *vacA* de *H. pylori* en muestras de verduras. 1: V1; 2:V18; 3: V40; 4: V62; 5: V86; 6: Control positivo *H. pylori* NCTC 11638; 7: Control negativo; M: Marcador de pesos moleculares (100-pb)

5.2.2. Detección por PCR a tiempo real

Tras el análisis de PCR a tiempo real de las muestras de moluscos que resultaron sospechosas mediante PCR convencional, sólo la muestra M6 presentó un valor de T_m de 81,06 -85,44, cercano a la T_m del control positivo (*H. pylori* NCTC 11638) cuyo rango es de 84,80 a 86,00 (Figuras 25 y 26).

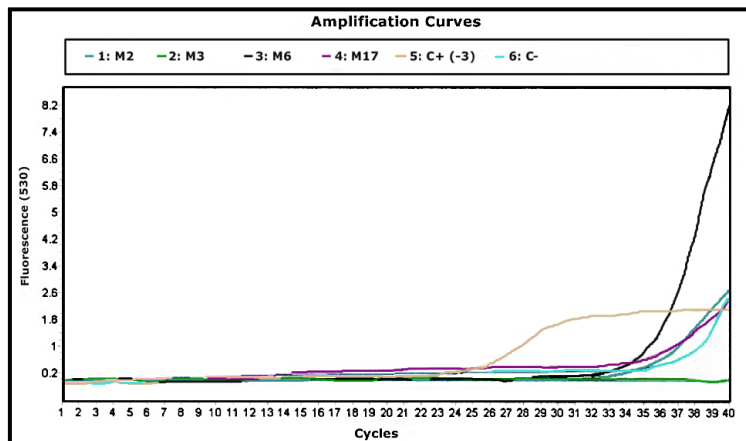


Figura 25. Curva de amplificación a tiempo real para *H. pylori* en las 4 muestras de moluscos, junto con el control positivo *H. pylori* NCTC 11638.

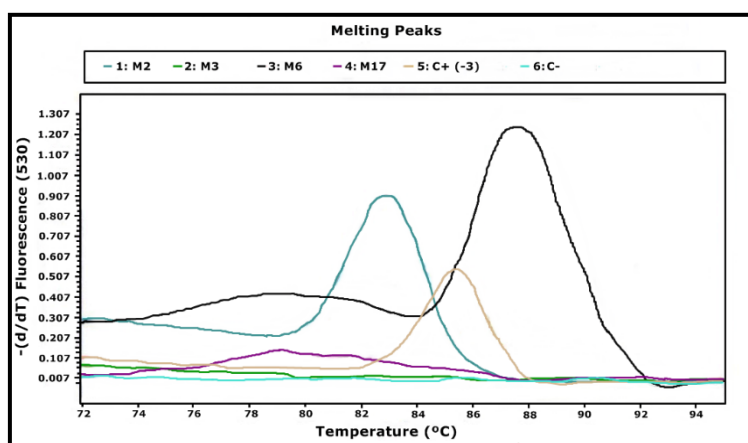


Figura 26. Curva de fusión a tiempo real para *H. pylori* en las 4 muestras de moluscos, junto con el control positivo *H. pylori* NCTC 11638.

Sin embargo, tras recuperar los productos amplificados y someterlos a detección en gel de agarosa, no se observó la banda característica de *H. pylori* en ninguna de las muestras (Figura 27).

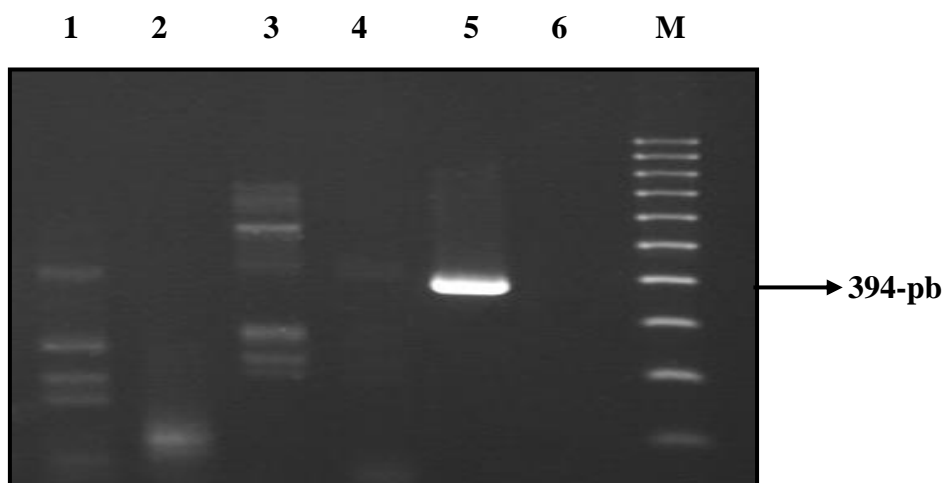
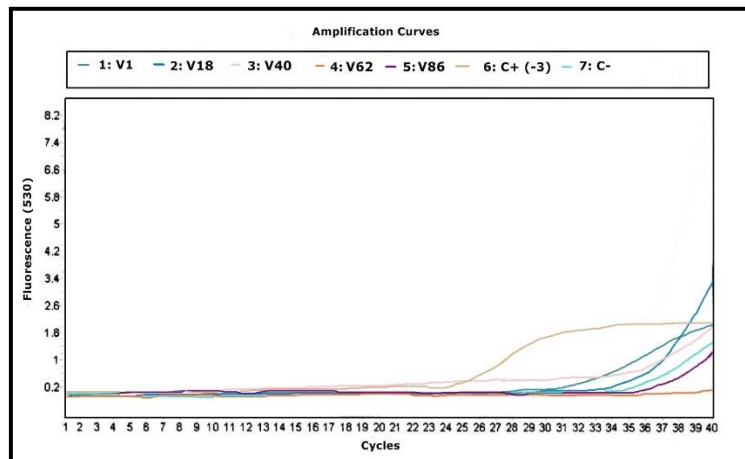


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del gen *vacA* obtenidos por qPCR para la detección directa en muestras de moluscos. 1: M2, 2: M3, 3: M6, 4: M17, 5: Control positivo *H. pylori* NCTC 11638, 6: Control negativo, M: Marcador de pesos moleculares (100-pb)

Tras el análisis de PCR a tiempo real a las 5 muestras de verduras que resultaron sospechosas mediante PCR convencional solo una de ellas (V1), procedente de lechuga, presentó valores de T_m de 81,46-85,5, cercanos al control positivo (Figuras 28 y 29).



Figuras 28. Curva de amplificación de PCR a tiempo real para *H. pylori* en las 5 muestras de verduras, junto con el control positivo

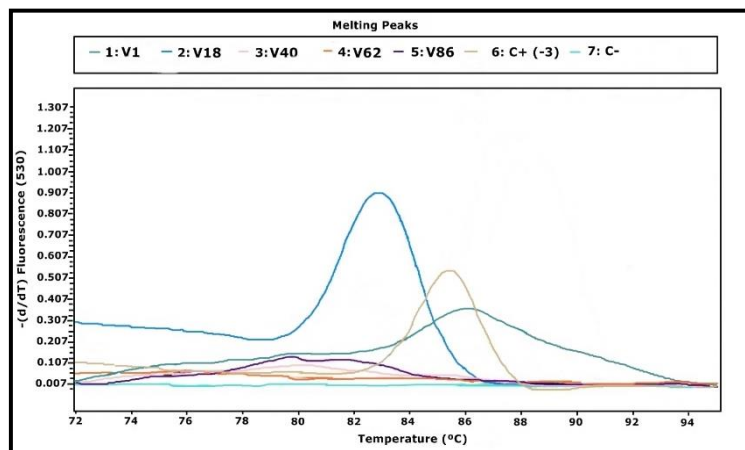


FIGURA 29. Curva de fusión de PCR a tiempo real para *H. pylori* en las 5 muestras de verduras, junto con el control positivo.

Tras la recuperación del producto amplificado y su posterior electroforesis en gel de agarosa, la muestra presentaba la banda esperada de 394-pb, pero con una baja intensidad y acompañada de otras bandas de varios pesos moleculares (Figura 30). Con el objetivo de confirmar la identificación del amplicón, y evitar falsos positivos, la banda fue recuperada del gel, y posteriormente purificada.

Finalmente, el producto purificado fue enviado a secuenciar. Tras la secuenciación, la homología entre secuencia amplificada y la correspondiente al fragmento del gen *vacA* de *H. pylori* fue determinada mediante un alineamiento en el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Los resultados indicaron que la muestra secuenciada era similar a la secuencia del gen *vacA* de *H. pylori* con un 99-100% de homología.

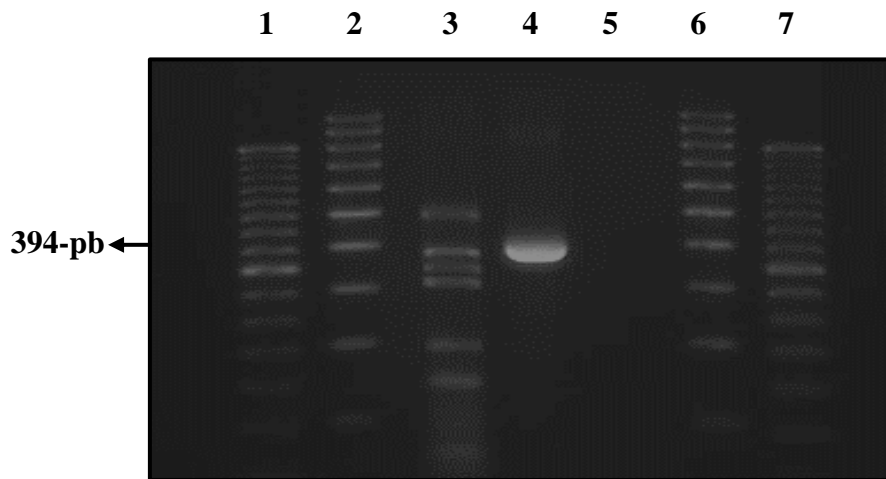


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *vacA* obtenido por qPCR para la muestra V1, mostrando la banda de 394-pb característica de *H. pylori*. 1 y 7: Marcador de pesos moleculares (100-pb); 2 y 6: Marcador de pesos moleculares (50-pb); 3: V1; 4: Control positivo (*H. pylori* NCTC 11638); 5: Control negativo

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
645 bits(349)	0.0	361/366(99%)	3/366(0%)	Plus/Minus
Query 2	CTTTGTCCGAATTGC -AATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAA-CCCTCCCACT	59		
Sbjct 1699	CTTTG-CCGATATGCAAATGAGCCGCATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTCCCACT	1641		
Query 60	CTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCGTGCTTTTGCCG	119		
Sbjct 1640	CTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTTGATGCGGTTGATATTGACAACCGTGCTTTTGCCG	1581		
Query 120	CCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTGTTTTTTCGCACTATTG	179		
Sbjct 1580	CCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTGCGTGGGTTGAACTTCTGTTTTTTCGCACTATTG	1521		
Query 180	GGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACTGCTCTCTTGTTTGTGTTTTTA	239		
Sbjct 1520	GGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACTATTATTTGACTGCTCTCTTGTTTGTGTTTTTA	1461		
Query 240	GCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTTGAGAAGGGGATTATTGGGTTTATCC	299		
Sbjct 1460	GCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGCACCCTTTGAGAAGGGGATTATTGGGTTTATCC	1401		
Query 300	TTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGT	359		
Sbjct 1400	TTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGATAATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGT	1341		
Query 360	GTGCCA 365			
Sbjct 1340	GTGCCA 1335			

Query: Producto amplificado
Sbjct: Cepa *H. pylori* NCTC 11638

Figura 31. Alineamiento de la secuencia del fragmento del gen *vacA* de la cepa *H. pylori* NCTC 11638 con la secuencia obtenida por PCR a tiempo real para la muestra V1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
621 bits(336)	4e-177	339/340(99%)	1/340(0%)	Plus/Minus
Query 27	ATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAA-CCCTCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTT			85
Sbjct 637	ATTGGTGGTAAGAGAAGCTTTAAACCCTCCCCTCTAATCGTGCCATCAGCGTTAGTGTT			578
Query 86	GATGCGGTTGATATTGACAACCGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTG			145
Sbjct 577	GATGCGGTTGATATTGACAACCGTGTCTTTGCCGCCCGCAAAGGCCCATCAATGACTTG			518
Query 146	CGTGGGTTGAACTTCTGTTTTTTCGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACT			205
Sbjct 517	CGTGGGTTGAACTTCTGTTTTTTCGCGCACTATTGGGTGGGTTAATGACCTGAGTGTTACT			458
Query 206	ATTATTTTGACTGCTCTCTTGTGTTTTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGC			265
Sbjct 457	ATTATTTTGACTGCTCTCTTGTGTTTTCGTTTTTAGCGCTTTCATTTTTGTCGTTTTTAGC			398
Query 266	ACCACTTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGAT			325
Sbjct 397	ACCACTTTGAGAAGGGGTATTATTGGGTTTATCCTTATAGCCACCTTCTGGAGGAGCGAT			338
Query 326	AATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCA		365	
Sbjct 337	AATGTTTAACCCGGCGCTTTGCCACAAATCCAGTGTGCCA		298	

Query: Producto amplificado
Sbjct: Cepa *H. pylori* CCUG 17874

Figura 32. Alineamiento de la secuencia del fragmento del gen *vacA* de la cepa de *H. pylori* CCUG 17874 con la secuencia obtenida por PCR a tiempo real para la muestra V1.

DISCUSIÓN

Arcobacter y *Helicobacter* son dos géneros de gran interés en Seguridad Alimentaria: aún se desconocen aspectos claves sobre su epidemiología y, a pesar de que cada día hay más trabajos dirigidos a detectar su presencia en alimentos, el riesgo real de infección a través de la cadena alimentaria está lejos de conocerse.

El presente trabajo se enmarca en este contexto. Nuestro objetivo fue contribuir al conocimiento sobre la prevalencia de ambos géneros en alimentos que puedan suponer un especial riesgo para el consumidor y evaluar la eficacia de los métodos disponibles actualmente para su detección en este tipo de muestras.

El estudio fue desarrollado en cuatro etapas: la primera de ellas consistió en la detección de *Arcobacter* en muestras de moluscos y verduras, comparando la efectividad de los métodos de cultivo y PCR convencional. Posteriormente se llevó a cabo un proceso de identificación de los aislados obtenidos, tanto a nivel de género como de especie. La tercera etapa consistió en el estudio de los niveles de resistencias de los aislados obtenidos a dos fluoroquinolonas, levofloxacino y ciprofloxacino, agentes de elección en el tratamiento de las infecciones por *Arcobacter*. Por último, se realizó un estudio de detección de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* en muestras de moluscos y verduras mediante PCR.

La detección de microorganismos por cultivo a partir de muestras de alimentos se basa en someter la muestra a una etapa de enriquecimiento en un medio líquido, seguida de un subcultivo en medios sólidos selectivos (Corry *et al.*, 1995). Generalmente, mediante la aplicación de estos métodos es posible detectar células subletalmente dañadas. Los resultados de este trabajo mostraron que el cultivo en medio selectivo *Arcobacter* Agar suplementado con 5 % de sangre de oveja (*Arcobacter* Agar Sangre) tras filtración pasiva es un buen método de detección en muestras enriquecidas, ya que permitió el crecimiento del microorganismo en un porcentaje importante de ellas. Sin embargo, el crecimiento es lento y escaso, y se requirieron varias resiembras para obtener un cultivo abundante.

En este trabajo, el 37 % de las muestras de moluscos fueron positivas para *Arcobacter*. De ellas se obtuvieron 49 aislados, 21 de mejillones, 20 de almejas y 8 de berberechos. Resultados similares fueron obtenidos en un trabajo llevado a cabo en España por Collado *et al.* (2014), quienes detectaron *Arcobacter* en el 40,5 % de las muestras analizadas. Así también, Levican *et al.* (2014) lo detectaron en el 32 % de las muestras analizadas y, en un trabajo llevado a cabo en la República Checa, se aisló *Arcobacter* en el 46,2 % de las muestras de moluscos analizadas (Silha *et al.*, 2015). Nuestros resultados son un poco más altos de los obtenidos por Mottola *et al.* (2016) en Italia, en el que solo el 22,9 % de 70 muestras de moluscos dieron positivas para *Arcobacter*. Por su parte, Laishram *et al.* (2016) y Patyal *et al.* (2011) en la India, lograron aislar *Arcobacter* solo en el 14,17 % y 17,33 % de las muestras, respectivamente.

No podemos asegurar que estas variaciones en las tasas de contaminación encontradas entre distintos trabajos se deban a diferencias reales de prevalencia entre países, ya que son demasiados pocos los estudios existentes. Dado que no se dispone de un protocolo estandarizado, podrían deberse al medio de cultivo empleado y al procedimiento elegido

para el aislamiento (**Merga et al., 2011**), la estación del año, clima e incluso el estado de la muestra (fresca, congelada, etc.) (**Golla et al., 2002; Mottola et al., 2016; Van Driessche et al., 2005; Wesley et al., 2000**).

En los estudios realizados por **Collado et al. (2009b; 2014)** y **Levican et al. (2014)**, el mayor número de aislados fue obtenido a partir de almejas, con 87 %, 100 % y 40 % seguido por mejillones con 33,3 %, 41 % y 55 %, respectivamente. En nuestro estudio, *Arcobacter* fue detectada por cultivo en el 40,54 % de las muestras de almejas y el 41,4 % de las muestras de mejillones. Además, en este estudio *Arcobacter* también fue aislada del 22,73 % de las muestras de berberechos, siendo la primera vez que se aísla esta bacteria a partir de este tipo de muestra.

Pese a que algunas especies de *Arcobacter* son consideradas patógenas emergentes transmitidas por alimentos y aguas, la presencia de *Arcobacter* en muestras de vegetales destinados al consumo humano es poco conocida, y la mayoría de estudios se han centrado en analizar alimentos de origen animal. Sin embargo, puesto que se trata de una bacteria que se transmite por vía fecal-oral (**Fernandez et al., 2015**), los vegetales podrían actuar como un vehículo transmisor de *Arcobacter* a humanos. Dado que el consumo de vegetales en los últimos años ha venido incrementándose, debido principalmente a que son considerados alimentos saludables y seguros, consideramos que resultaría de interés el estudio de estas muestras en nuestra área geográfica.

Las verduras no parecen ser un reservorio propicio para *Arcobacter* spp. Sin embargo, este tipo de alimento puede ser contaminado por contacto con el suelo contaminado, por el agua utilizada para el riego o en el lavado de las verduras durante su procesamiento, bien por la reutilización del agua de lavado o por una desinfección insuficiente (**Hausdorf et al., 2011; 2013**).

En el presente estudio seleccionamos cuatro tipos de verduras que crecen en contacto con el suelo y suelen consumirse crudos. La detección de *Arcobacter* por cultivo en ellas fue del 17 %: Ocho espinacas, 4 lechugas, 4 acelgas y una col. En total, el 14,63 % de las lechugas, 30,1 % de las espinacas, 11,76 % de las acelgas y el 25 % de las coles presentaban contaminación por *Arcobacter* spp.

De las 17 muestras positivas se obtuvieron 25 aislados de *Arcobacter*. Trece de ellos procedían de muestras de espinacas, 5 de lechugas, 6 de acelgas y 1 de col. **González y Ferrús, (2011)** aislaron *Arcobacter* en 7 de 50 muestras de lechuga (14 %), obteniendo 19 aislados. Este es el primer trabajo en el que se ha logrado aislar *Arcobacter* a partir de muestras de espinacas, acelgas y coles. Dado que no hay más información bibliográfica sobre el aislamiento de *Arcobacter* en muestras de verduras, no se han podido obtener más datos comparativos.

En los últimos años, intentando buscar mayor eficacia en la detección del género *Arcobacter*, se ha empleado la técnica PCR en diferentes matrices (**Collado et al., 2014**). Para la detección en alimentos de las especies relacionadas con gastroenteritis, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. cibarius* y *A. thereius*, existen diferentes ensayos de PCR simple y múltiple (**Houf et al., 2000; Houf et al., 2005; Van den Abeele et al., 2014**). También se ha desarrollado un método de PCR-RFLP para detección de *A. defluvii* y *A. bivalviorum* en moluscos (**Figueras et al., 2012**).

El punto crítico de la PCR es el diseño de iniciadores sensibles y suficientemente específicos. Entre los más utilizados para la detección de *Arcobacter* en muestras de aguas y alimentos destacan los diseñados por **Bastyns et al. (1995)** que amplifican un fragmento de 331-b del gen 23S ARNr (**Moreno et al., 2003; González y Ferrús, 2011**). En este trabajo se usaron estos iniciadores para la detección de *Arcobacter* en muestras, con y sin enriquecimiento.

Trabajos previos han demostrado que una etapa de enriquecimiento favorece la detección de *Arcobacter* en muestras ambientales (**González et al., 2007a; Aquincioglu et al., 2011; Bhrigwell et al., 2007; Collado et al., 2009b**). En nuestro trabajo, el 32 % de las muestras de moluscos fueron positivas para *Arcobacter* mediante detección directa, lo que sugiere que las muestras presentaban un alto grado de contaminación. Sin embargo, en 39 de las muestras la etapa de enriquecimiento fue fundamental para la detección del microorganismo y tras 48 h de enriquecimiento este nivel se incrementó hasta el 68 % de las muestras. En las muestras de almejas fue donde más se evidenció las ventajas del enriquecimiento para la detección de *Arcobacter*, ya que el nivel de detección se incrementó del 24,32 % hasta el 75,67 %, tras el enriquecimiento. Los niveles obtenidos son relativamente altos comparados con los obtenidos por **Collado et al. (2014)** y **Levicán et al. (2014)** quienes detectaron *Arcobacter* en el 40,5 % y 16,7 % de las muestras de moluscos analizadas mediante PCR tras una etapa de enriquecimiento.

En 2 muestras, una de berberechos y otra de almejas, se obtuvieron resultados positivos por PCR solamente antes del enriquecimiento, mientras que fueron negativas tras el enriquecimiento y por cultivo. **Denis et al., (2001)** destacaron que la combinación de PCR con un paso previo de enriquecimiento incrementa el número de células viables, mientras que las células muertas, que podrían detectarse en una PCR directa, son diluidas.

En el caso de las muestras de verduras, las tasas de detección por PCR y cultivo fueron similares (17 % por cultivo y 20 % por PCR) y sólo 4 muestras de las 20 positivas por PCR fueron negativas por cultivo. Por otra parte, únicamente 4 muestras de verduras fueron positivas antes del enriquecimiento, lo que confirma que un paso de enriquecimiento incrementa el nivel de células viables, permitiendo una mayor sensibilidad de detección también en este tipo de muestras.

Nuestro resultado es similar al compararlo con el obtenido por **González y Ferrús, (2011)**, quienes detectaron *Arcobacter* en el 14 % de muestras de lechugas. El presente trabajo, junto con el desarrollado por **González y Ferrús, (2011)** son los dos únicos estudios de detección de *Arcobacter* por PCR en verduras frescas. Sin embargo, **Hausdorf et al. (2013)**, mediante la aplicación de una PCR cuantitativa específica de género (qPCR), detectaron que el 35 % de las muestras de espinacas obtenidas de un planta de procesamiento estaban contaminadas con *Arcobacter*. Estos datos son bastante similares a los obtenidos en nuestro trabajo, con una tasa detección del 42,9 % en este tipo de muestra.

Al comparar los distintos métodos de detección, es evidente que el número de muestras, tanto verduras como moluscos, que dieron positivas por PCR tras el enriquecimiento fueron mayores que aquellas obtenidas por cultivo, lo que demuestra que las muestras estaban contaminadas con *Arcobacter*, aunque no se pudieran recuperar en placa. Sin embargo, se obtuvo un resultado llamativo en dos casos: un aislado procedente de

moluscos y otro de verduras fueron obtenidos por cultivo a partir de muestras que dieron negativo por PCR tanto con y sin enriquecimiento. Este resultado podría deberse a sustancias inhibitoras de la PCR presentes en la muestra o en el caldo de enriquecimiento (Klancnik *et al.*, 2012; Rahimi *et al.*, 2014).

El método de cultivo en medio selectivo agar sangre resultó ser un método poco eficaz, en comparación con los métodos moleculares, sobre todo para la detección de *Arcobacter* spp. en moluscos. La presencia de células en estado VNC (Collado y Figueras, 2011; Fernández *et al.*, 2012) o el alto grado de contaminación por microbiota competitiva son los motivos que con mayor probabilidad justifican este resultado.

Las diferencias observadas al comparar la efectividad de la PCR frente al cultivo para detectar *Arcobacter* en los dos tipos de matrices analizados (71 % frente a 37 % en moluscos, 20 % frente a 17 % en verduras) parecen deberse a que las muestras de moluscos presentan mucha mayor microbiota capaz de crecer en los medios selectivos para *Arcobacter*, enmascarando su crecimiento. Sin embargo, el trabajo realizado en este estudio no permite descartar que las verduras presenten una mayor concentración de estas bacterias. Harían falta otro tipo de estudios, especialmente de recuento microbiano, para determinar esta discrepancia.

La técnica PCR-RFLP es un método rápido y sencillo que se basa en el análisis de los polimorfismos del gen 16S ARNr. Este método ofrece una serie de ventajas a nivel práctico, ya que es más discriminatorio que los métodos fenotípicos y es más rápido y simple que las técnicas moleculares no basadas en la PCR, tales como la hibridación de ADN (Hurtado y Owen, 1997).

En este trabajo se empleó la técnica PCR-RFLP del gen 16S ARNr desarrollada por Figueras *et al.* (2012). Con este método se utilizan 3 enzimas, *MseI*, *BfaI* y *MnlI*, con las que se obtienen perfiles de restricción que permiten discriminar todas las especies descritas hasta el año 2012. Se trata de una metodología relativamente fácil, y su nivel de precisión fue muy alto: Por una parte, los perfiles obtenidos *in silico* y para las cepas de referencia coincidieron exactamente con los publicados por los autores. Por otra, la técnica permitió la identificación de la especie a la que pertenecían los 74 aislados obtenidos en este estudio.

Tras la aplicación de la técnica PCR-RFLP, de los 49 aislados de moluscos el 51,03 % (25/49) fueron identificadas como *A. butzleri*. La segunda especie más frecuentemente identificada entre los aislados obtenidos fue *A. cryaerophilus*, identificado en el 38,77 % de los aislados (19/49).

Aunque *A. butzleri* ha sido descrita como la especie más frecuentemente aislada de alimentos de origen animal (Fernández *et al.*, 2015; Collado y Figueras, 2011), en nuestro trabajo las tasas de muestras contaminadas por *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* fueron idénticas, 17 %. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Collado *et al.* (2014) y Levican *et al.* (2014), quienes obtuvieron porcentajes mayores de aislados pertenecientes a la especie de *A. butzleri*, de aproximadamente el 60 %.

En el caso de *A. cryaerophilus*, Collado *et al.* (2014) obtuvieron tasas de contaminación por esta especie similares a las nuestras, del 21 %. Sin embargo, Fernández *et al.* (2015)

y **Levicán et al. (2014)** informaron resultados más bajos, 4,7 % y 5,1 %, respectivamente. Las diferencias en las tasas de aislamiento de *Arcobacter* a partir de muestras de moluscos podrían atribuirse a varios factores, como las condiciones ambientales o el tipo de muestra (**Levicán et al., 2014; Mottola et al., 2016**).

A. butzleri se aisló de cuatro de las cinco muestras positivas por cultivo de berberechos, lo que sugiere que estos moluscos podrían ser una significativa fuente de transmisión al hombre. No existen estudios previos sobre la detección *Arcobacter* en muestras de berberechos, siendo la primera vez que *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* son aislados de este tipo de alimentos.

A. defluvii fue la tercera especie aislada de moluscos en este trabajo, aunque con poca presencia, ya que sólo se obtuvieron cinco aislados de cuatro muestras positivas por cultivo. Nuestro resultado es alto comparado con los obtenidos por **Collado et al. (2014)** y **Levicán et al. (2014)**, quienes aislaron *A. defluvii* en el 1 % (1/100) y menos del 1 % (1/118) de muestras de moluscos analizadas. Significativamente, la aplicación del método PCR-RFLP ha permitido por primera vez la identificación de aislados de *A. defluvii* de muestras de almejas,

De los 25 aislados de verduras, el 68 % de los aislados (17/25) pertenecían a la especie *A. butzleri* y el 32 % (8/25) fueron identificados como *A. cryaerophilus*.

En este estudio, *A. butzleri* fue la especie más prevalente en verduras (10 % de las muestras) seguida por *A. cryaerophilus*, con niveles muy cercanos (8 %). *A. butzleri* también fue la especie más prevalente en las muestras de espinacas. Sin embargo, los porcentajes de contaminación por *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* fueron muy similares en el resto de muestras de verduras.

Poco se ha trabajado para la detección e identificación de especies de *Arcobacter* en muestras de verduras. Sin embargo, en el estudio desarrollado en España por **González y Ferrús (2011)** todos los aislados obtenidos a partir de lechugas pertenecían a la especie *A. butzleri*. Es importante recalcar que esta es la primera vez que *A. cryaerophilus* es aislada a partir de muestras de verduras. Dado que se consumen crudas, las verduras podrían jugar un papel importante en la transmisión del microorganismo y harían falta más estudios para complementar los resultados obtenidos en este trabajo.

La tercera etapa de este estudio se centró en analizar la sensibilidad antibiótica de cada uno de los aislados a las fluoroquinolonas, que son los fármacos de primera línea para el tratamiento de la infección por *Campylobacter* y *Arcobacter* en humanos (**Houf et al., 2004; Vandenberg et al., 2006**).

Todos los aislados de moluscos y verduras previamente identificados como *A. cryaerophilus* y *A. defluvii*, así como 37 aislados de *A. butzleri* fueron sensibles a ambas fluoroquinolonas (levofloxacino y ciprofloxacino). El porcentaje de sensibilidad fue del 93,9 % en aislados de molusco y 92 % en aislados de verduras. Resultados similares, fueron obtenidos por otros autores, pero a partir de diferentes tipos de muestra: **Van den Abeele et al. (2016); Vandenberg et al. (2006)** y **Mandisodza et al. (2012)** encontraron un 72 %, 96,7 % y 100 % de aislados clínicos sensibles a ciprofloxacino, respectivamente. En otros estudios, **Fera et al. (2003)** y **Akincioglu, (2011)** informaron que todos los

aislados de *Arcobacter* obtenidos de muestras ambientales habían mostrado sensibilidad a fluoroquinolonas.

En este trabajo, cinco aislados (3 de moluscos y 2 de verduras) identificados como *A. butzleri* fueron resistentes a las quinolonas, tanto en la prueba de difusión en disco como en E-test. El porcentaje de muestras contaminadas con cepas resistentes fue del 2 % en moluscos y del 1 % en verduras.

Con el objeto de estudiar el mecanismo de resistencia, se analizó la secuencia de la región QRDR del gen *gyrA* de los aislados resistentes, así como también de algunos aislados sensibles y de la cepa de referencia *A. butzleri* DSM 8739. **Abdelbaqi et al. (2007)** y **Van den Abeele et al. (2016)** propusieron que la resistencia de *Arcobacter* a quinolonas podría ser debida a una mutación en la posición 254 de la región QRDR del gen *gyrA*, que conduce a la sustitución de un aminoácido en la posición 85 (Thr a Ile) en la proteína GyrA. En nuestro trabajo, la secuenciación de los 344-pb del producto amplificado de los 5 aislados resistentes reveló una mutación en la posición 254 del gen *gyrA*, consistente en la transición de C a T. Esta mutación estaba ausente en todos los aislados sensibles, así como en la cepa de referencia, lo que parece confirmar la hipótesis de los autores. Desarrollar métodos moleculares que detecten esta mutación en cepas patógenas podría ser un método para conocer mejor la prevalencia de cepas resistentes en el ambiente y para evitar tratamientos ineficaces en la práctica clínica

La última parte de nuestro estudio consistió en la detección de *Helicobacter* spp. y *H. pylori* en las muestras de moluscos y verduras. A pesar del interés de la comunidad científica por las bacterias del género *Helicobacter*, y sobre todo por *H. pylori*, aún no se conoce con exactitud su forma de transmisión.

Algunos investigadores sugieren que el agua y los alimentos actúan como vehículo de transmisión (**Azevedo et al., 2003; Atapoor et al., 2014**). No obstante, la metodología para el aislamiento del microorganismo se encuentra dirigida a específicamente a biopsias, que presentan niveles mucho menores de contaminación por biota competitiva, y su rendimiento es muy escaso en muestras distintas al tejido gástrico. El aislamiento de *H. pylori* se ve obstaculizado por su extrema sensibilidad a las condiciones de cultivo, por su conversión en estado viable no cultivable (VNC) en el ambiente y por su presencia en bajo número en este tipo de muestras. Debido a esto, las técnicas moleculares, como la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), representan una alternativa para la detección del microorganismo en muestras de alimentos.

La detección e identificación de patógenos mediante PCR depende en gran medida de la especificidad de los iniciadores utilizados en la reacción de amplificación. En este estudio se decidió utilizar los diseñados por **Sheng-Ang et al. (1991)**, específicos para la detección de *Helicobacter* spp. Todas las muestras analizadas (100 de moluscos y 100 de verduras) resultaron negativas para *Helicobacter* spp.

Para la detección de *H. pylori* se utilizaron en un primer momento los iniciadores HP1 y HP2 diseñados por **Choi et al. (2001)**. Al igual que lo sucedido en la detección de *Helicobacter* spp., todas las muestras resultaron negativas.

Se decidió entonces utilizar los iniciadores VacAR y VacAF, que amplifican el gen que codifica la proteína vacuolizante Vac presente en todas las cepas de *H. pylori* (Nilsson *et al.*, 2002), debido a que estos iniciadores han venido siendo utilizados con éxito por este grupo de investigación para la detección del patógeno en muestras de agua (Moreno-Mesonero *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2015).

Con el uso de este protocolo se detectaron 4 muestras de moluscos y 5 muestras de verduras sospechosas de estar contaminadas con *H. pylori*, puesto a que mostraban fragmentos a la altura de 394-pb, junto con bandas inespecíficas.

Todas las muestras que resultaron sospechosas para *H. pylori* por PCR convencional fueron posteriormente analizadas mediante PCR a tiempo real, debido a su mayor precisión (Costa, 2004). La PCR en tiempo real ha sido utilizada por varios autores de este grupo de investigación para la detección de *Helicobacter* en muestras de agua (Moreno-Mesonero *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2015). Sin embargo, no hay datos publicados sobre la aplicación de esta técnica a muestras de alimentos.

Mediante este método, en ninguna de las 4 muestras sospechosas de moluscos se confirmó la presencia de *H. pylori*. Sin embargo, tras la recuperación del producto amplificado y su posterior electroforesis en gel de agarosa, la muestra V1, procedente de una lechuga, presentaba la banda esperada de 394-pb.

A fin de confirmar este resultado y evitar falsos positivos, se procedió a la recuperación de la banda a partir del gel, purificación y posterior secuenciación (Santiago *et al.*, 2015). El análisis mediante un alineamiento BLAST mostró que la secuencia era similar en un 99-100 % a la secuencia del gen *vacA* de *H. pylori* NCTC 11638 obtenida del GenBank.

No existen apenas trabajos que hayan investigado la presencia de *H. pylori* en moluscos o vegetales. Únicamente Fernández *et al.* (2007) utilizaron un ensayo de PCR para investigar la presencia de *Helicobacter* y *H. pylori* en ostras en Venezuela, detectando una muestra positiva, pero sin éxito al cultivarla. Recientemente se han publicado algunos estudios que detectan *H. pylori* en el 10-15% de muestras de vegetales en Irán (Yahaghi *et al.*, 2013; Atapoor *et al.*, 2014). Dado que no se han encontrado en bibliografía otros trabajos sobre la presencia de *H. pylori* en muestras de verduras en España, no podemos determinar si nuestros resultados son generalizables a nuestra área geográfica.

Los bajos niveles de detección podrían deberse a una escasa presencia en alimentos, o a que los protocolos existentes no son eficaces en este tipo de matrices. Por tal motivo, serían necesarios más estudios centrados, entre otros, en el diseño y utilización de nuevos iniciadores que ofrezcan mayor sensibilidad y especificidad para la detección del patógeno, la valoración de la efectividad de una etapa de enriquecimiento previo o el uso de diversos métodos de extracción de ADN.

Los resultados de este trabajo confirman la necesidad de seguir mejorando los métodos de detección y aislamiento del microorganismo en alimentos para poder determinar, tanto su epidemiología como el riesgo real existente para los consumidores.

CONCLUSIONES

1. La eficacia del método de aislamiento por filtración pasiva y cultivo en medio AAS tras enriquecimiento selectivo, está muy condicionada por el tipo de matriz a analizar, y es conveniente asociarlo a un método de detección por PCR para evitar falsos negativos.
2. En el 37 % de las muestras de moluscos y el 17 % de las verduras analizadas se ha podido aislar *Arcobacter* spp. Dado que tanto moluscos como verduras son consumidos con frecuencia crudos o poco cocidos, estos resultados confirman que estos alimentos pueden actuar como vehículo de transmisión de especies patógenas de *Arcobacter* al hombre.
3. Se ha aislado *Arcobacter* por primera vez de muestras de espinacas, acelgas y coles frescas. También ha sido posible el aislamiento de *Arcobacter* por primera vez en muestras de berberechos, demostrando de esta manera la gran variabilidad de nichos en los que este microorganismo puede estar presente.
4. La PCR convencional es una metodología eficaz para la detección de *Arcobacter* en muestras de moluscos, reduciendo considerablemente el tiempo de ensayo y mostrando una mayor sensibilidad que el método de cultivo, incrementándose los porcentajes de detección hasta un 71 % en este tipo de muestras.
5. Cuando se realiza la detección por PCR, es necesario un periodo de enriquecimiento para detectar de manera efectiva *Arcobacter* spp., ya que aumentan de forma significativa los niveles de detección, tanto en moluscos como en verduras.
6. El análisis mediante PCR-RFLP del gen 16S ARNr ha permitido la identificación de todos los aislados obtenidos, mostrando una gran especificidad y reproducibilidad.
7. La aplicación del método PCR-RFLP ha permitido, por primera vez la identificación de aislados de *A. defluvii* de muestras de almejas, así como de *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* de muestras de berberechos. Además, la especie *A. cryaerophilus* ha sido identificada por primera vez en muestras de verduras.
8. El porcentaje de muestras contaminadas con cepas resistentes a fluoroquinolonas ha sido del 2 % en moluscos y del 1 % en verduras. En los todos aislados resistentes ha sido detectado una mutación en la posición 254 (C normal a T mutante) de la Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (QRDR) del gen *gyrA*, lo que confirma la hipótesis de que esta mutación está directamente relacionada con la aparición de resistencias.
9. La presencia de aislados de *A. butzleri* resistentes a las quinolonas podría suponer un riesgo para la salud pública, ya que son los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo.

10. No se ha detectado *Helicobacter* spp. en ninguna muestra de moluscos ni verduras analizadas. Tampoco se ha conseguido la detección de *H. pylori* en muestras de moluscos. Sin embargo, se ha detectado *H. pylori* en una muestra de lechuga.
11. La técnica de PCR a tiempo real se muestra como una técnica prometedora para la detección de *H. pylori* en muestras de alimentos. Sin embargo, los resultados de este trabajo demuestran la necesidad de seguir mejorando los métodos de detección y aislamiento del microorganismo en alimentos para poder determinar tanto su epidemiología, como el riesgo real existente para los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

Abdelbaqi, K., Menard, A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P., Mégraud, F. (2007). Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 49: 337-345.

Adler, I., Muiño, A., Aguas, S., Harada, L., Diaz, M., Lence, A., Labbrozzi, M., Muiño, J.M., Elsner, B., Avagnina, A., Denninghoff, V. (2014). *Helicobacter pylori* and oral pathology: Relationship with the gastric infection. *World J. Gastroenterol*, 7; 20 (29): 9922-9935.

Aerstrup, F.M. and Engberg, J. (2001). Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet. Res*, 32: 311-321.

Agudo, S., Pérez-Pérez, G., Alarcón, T. and López-Brea, M. (2010). High Prevalence of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Strains and Risk Factors Associated with Resistance in Madrid, Spain. *J. Clin. Microbiol*, 48 (10): 3703-3707.

Ahmed, K.S., Madompoyil, B., Ahí, J.D., Khan, A.A., Tiwari, S.K., Habeeb, M.A. (2014). A study on the transmission of *Helicobacter pylori* from food prepared and consumed under hygienic and unhygienic conditions: A first study using biopsy samples. *Health*, 4: 274-283.

Akincioglu, F. (2011). Isolation of *Arcobacter* species from different water sources and characterization of isolated species by molecular techniques (Master Thesis). İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey, pp 88.

Aldred, K. J., Kerns, R. J., Osherof, N. (2014). Mechanism of Quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53: 1565-1574.

Al-Sulami, A.A, Al-Edani, T.A., Al-Abdula, A.A. (2012). Culture method and PCR for the detection of *Helicobacter pylori* in drinking water in Basrah Governorate Iraq. *Gastroenterol. Res. Pract*, ID 245167: 5 pages.

Álvarez-Hernández, D.A., Garza-Mayén, G.S., Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev. Chilena Infectol*, 32 (5): 499-504.

Anand, P.S, Kamath, K.P, Anil, S.(2014). Role of dental plaque, saliva and periodontal disease in *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol*, 20(19):5639-53.

Ambrozic, A.J., Keber, R., Zerjavic, K., Orazem, T., Grabnar, M. (2007). Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac (6')-Ib-cr* in extended spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrob. Agents Chemother*, 51: 4171-3.

Andersen, L.P. and Wadström, T. (2001). Chapter 4 basic bacteriology and culture, *Helicobacter pylori*: physiology and genetics, *NCBI. Bookshelf*, pp 120.

- Assanta, M.A., Roy, D., Lemay, M.J. and Montpetit, D. (2002). Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces. *J. Food Prot*, 65: 1240-1247.
- Atabay, H.I. and Corry, J.E. (1997). The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol*, 83: 619-626.
- Atabay, H.I. and Corry, J.E. (1998). Evaluation of a new *Arcobacter* enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp. *Int. J. Food. Microbiol*, 41: 53-58.
- Atapoor, S., Safarpour Dehkordi, F., Rahimi, E. (2014). Detection of *Helicobacter pylori* in various types of vegetables and salads. *Jundishapur J. Microbiol*, 7 (5): e10013.
- Axon, A. (2014). *Helicobacter pylori* and Public Health. *Helicobacter*, 19 (S1): 68-73.
- Azevedo, N. F., Vieira, M. J., Keevil, C. W. (2003). Establishment of a continuous model system to study *Helicobacter pylori* survival in potable water biofilms. *Water Sci. Tech*, 47 (5): 155-160.
- Aziz, R.K., Khalifa, M.M., Sharaf, R.R. (2015). Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J. Adv. Res*, 6 (4): 539-547.
- Baele, M., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. (2009). Non-*Helicobacter pylori* helicobacters detected in the stomach of humans comprise several naturally occurring *Helicobacter* species in animals. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 55 (3): 306-313.
- Baker, K.H., Hegarty, J.P., Redmond, B., Reed, N.A., Herson, D.S. (2002). Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol*, 68 (2): 981-4.
- Bastyns, K., Cartuyvels, D., Chapelle, S., Vandamme, P., Goossens, H., Dewachter, R. (1995). A variable 23S rDNA region is a useful discriminating target for genus-specific and species-specific PCR amplification in *Arcobacter* species. *Syst. Appl. Microbiol*, 18: 353-356.
- Bellack, N.R., Koehoorn, M.W., MacNab, Y.C., Morshed, M.G. (2006). A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiol. Infect*, 137 (3): 439-449.
- Benítez-Bribiesca, L. (2004). Las estrategias de *Helicobacter pylori*. *Acta Méd. Grup. Ángeles*, Vol 1 N°1.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2012). Taxonomic outline of Prokaryotes, *Campylobacteraceae* family. DOI 10.1007/bergeysoutline.

- Beuchat, L.R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microb. Infect*, 4 (4): 413-423.
- Bittencourt, P.F., Rocha, G.A., Penna, F.J., Queiroz, D.M. (2006). Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. *J. Pediatr*, 82: 325-334.
- Blaecher, C., Smet, A., Flahou, B., Pasmans, F., Ducatelle, R., Taylor, D., Weller, C., Bjarnason, I., Charlett, A., Lawson, A.J., Dobbs, R.J., Dobbs, S.M and Haesebrouck, F. (2013). Significantly higher frequency of *Helicobacter suis* in patients with idiopathic parkinsonism than in control patients. *Aliment. Pharmacol. Ther*, 38 (11-12): 1347-1353.
- Blaser, M.J. and Atherton, J.C. (2004). *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Investig*, 113: 321-333.
- Bode, G., Mauch, F., Malfertheiner, P. (1993). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* (3): 483-90.
- Boehmler, G., Gerwert, J., Scupin, E., Sinell, H.J. (1996). Epidemiology of *H. pylori* in man: Studies on the survival of the agent in food. *Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr*, 103: 438-443.
- Boyanova, L. (2003). Influence of transport conditions and media on *Helicobacter pylori* isolation. *J. Med. Microbiol*, 52 (12): 1129-1130.
- Bucker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M. and Schulzke, J. (2009). *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal Ht-29/B6 cells. *J. Infect. Dis*, 200: 756-764.
- Bunn, J., MacKay, W.G., Thomas, J.E., Reid, D.C. and Weaver, L.T. (2002). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett. App. Microbiol*, 34: 450-454.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *J. Mol. Endocrinol*, 34 (3): 597-601.
- Calvo, G., Arias, M.L., Fernández, H. (2013). *Arcobacter*: un patógeno emergente de origen alimentario. *Archivos Lat. Nutr*, 63 (2): 164-172.
- Carbone, M., Maugeri, T.L., Giannone, M., Gugliandolo, C., Midiri, A. and Fera, M.T. (2003). Adherence of environmental *Arcobacter butzleri* and *Vibrio* spp. isolates to epithelial cells in vitro. *Food Microbiol*, 20: 611-616.
- Castillo, R.G., Mazarí, H. M., López, V.Y. (2004). *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública Mex*, 46 (6): 538-48.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The neomuran origin of *Archaeobacteria*, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 52 (1): 7-76.

- Ceelen, L.M., Decostere, A., Van den Bulck, K., On, S.L.W., Baele, M., Ducatelle, R. and Haesebrouck, S. (2006). *Helicobacter pullorum* in Chickens, Belgium. *Emerg. Infect. Dis*, 12 (2): 263-267.
- Cellini, L. (2014). *Helicobacter pylori*: A chameleon-like approach to life. *World J. Gastroenterol*, 20 (19): 5575-5582.
- Chiarini, A., Calà, C., Bonura, C., Gullo, A., Giuliana, G., Peralta, S., D'Arpa, F., Giammanco, A. (2009). Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from Western Sicily, Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 28: 437-46.
- Chinivasagam, H.N., Corney, B.G., Wright, L.L., Diallo, I.S., Blackall, P.J. (2007). Detection of *Arcobacter* spp. in piggery effluent and effluent-irrigated soils in southeast Queensland. *J. Appl. Microbiol*, 103: 418-426.
- Chiurillo, M.A., Moran, Y., Cañas, M., Valderrama, E., Granda, N., Sayegh, M., Ramírez, J.L. (2013). Genotyping of *H. pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. *Intl. J. Infect. Dis*, 17 (9): 750-756.
- Choi, Y. K., Han, J. H. and Joo, H. S. (2001). Identification of novel *Helicobacter* species in pig stomachs by PCR and partial sequencing. *J. Clin. Microbiol*, 39 (9): 3311-2215.
- Chromvarin, C., Namwat, W., Chaicumpar, K., Mairiang, P., Sangchan, A., Sripa, B., Tor-Udom, S., Vilaichone, R.K. (2008). Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int. J. Infect. Dis*, 12 (1): 30-36.
- Citterio, B., Casaroli, A., Pierfelici, L., Battistelli, M., Falcieri, E., Baffone, W. (2004). Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. *New Microbiol*, 27 (4): 353-360.
- CLSI. (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M45-A2. Twenty-first informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, USA.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J. and Figueras, M.J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environ. Microbiol*, 10 (6): 1635-1640.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P. and Figueras, M.J. (2009a). *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 59 (6): 1391-1396.
- Collado, L., Guarro, J. and Figueras, M.J. (2009b). Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *J. Food. Prot*, 72 (5): 1102-1106.
- Collado, L., Kasimir, G., Pérez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, J.M., Figueras, M.J. (2010). Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat

River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. *J. Water Res*, 44 (12): 3696-3702.

Collado, L., Levican, A., Perez, J., Figueras, M.J. (2011). *Arcobacter defluvii* sp. Nov., isolated from sewage samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 61: 2155-2161.

Collado, L. and Figueras, M.J. (2011). Taxonomy, epidemiology and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin. Microbiol. Rev*, 24 (1):174-192.

Collado, L., Gutierrez, M., González, M., Fernandez, H. (2013). Assessment of the prevalence and diversity of emergent campylobacteria in human stool samples using a combination of traditional and molecular methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 75 (4): 434-436.

Collado, L., Jara, R., Vásquez, N., Telsaint, C. (2014). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Arcobacter* isolates recovered from edible bivalve molluscs. *Food Contr*, 46: 508-512.

Conteduca, V., Sansonno, D., Lauletta, G., Russi, S., Ingravallo, G., Dammacco, F. (2015). *H. pylori* infection and gastric cancer: State of the art (Review). *Int. J. Oncol*, 42 (1): 5-18.

Corry, J.E., Post, D.E., Collin, P., Laisney, M.J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *Int. J. Food Microbiol*, 26: 43-76.

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*, 22 (5): 299-305.

Cotticelli, L., Borrelli, M., D'Alessio, A.C., Menzione, M., Villani, A., Piccolo, G., Montella, F., Iovene, M.R., Romano, M. (2006). Central serous chorioretinopathy and *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Ophthalmol*, 16 (2): 274-278.

Cover, T.L and Blaser, M.J. (1990). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem*, 267 (15): 10570-10575.

De Boer, R.F, Ott, A., Güren, P., van Zanten, E., van Belkum, A. (2013). Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol*, 51 (1): 253-259.

De Falco, M., Lucariello, A., Iaquinto, S., Esposito, V., Guerra, G., De Luca, A. (2015). Molecular Mechanisms of *Helicobacter pylori* Pathogenesis. *J. Cell. Physiol*, 230 (8):1702-7.

De Smet, S., De Zutter, L., Van Hende, J., Houf, K. (2010). *Arcobacter* contamination on pre- and post-chilled bovine carcasses and in minced beef at retail. *J. Appl. Microbiol*, 108 (1): 299-305.

- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S.L., Doudah, L., Houf, K. (2011). *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61: 356-361.
- Degnan, A.J., Sonzogni, W.C and Standrige, J.H. (2003). Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (5): 2914-2918.
- Delgado, S., Suarez, A., Otero, L., Mayo, B. (2004). Variation of microbiological and biochemical parameters in the feces of two healthy people over a 15 day period. *Eur. J. Nutr.*, 43 (6): 375-80.
- Denis, M., Refrégier-Petton, J., Laisney, M. J., Ermel, G., Salvat, G. (2001). *Campylobacter* contamination in french chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J. Appl. Microbiol.*, 91 (2): 255-267.
- Di Lorenzo, C. (2005). Chronic abdominal pain in children. Subcommittee on chronic abdominal pain. *Pediatrics*, 115 (3): 370-381.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emer. Infect. Dis.*, 8 (9): 881-890.
- Dorer, M.S. Talarico, S., Salama, N.R. (2009). *Helicobacter pylori* 's unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog.*, 5: 6 pages.
- Doudah, L., De Zutter, L., Vandamme, P., Houf, K. (2010). Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. *J. Microbiol. Meth.*, 80 (3): 281-286.
- Dunn, B.E., Cohen, H. and Blaser, M. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10: 720-741.
- Elizalde, J.I., Pérez-Pujol, S., Heras, M., Sionis, A., Casanovas, N., Martorell, T., Lozano, M., González, J., Escolar, G., Sanz, G., Piqué, J.M. (2004). Effects of *Helicobacter pylori* eradication on platelet activation and disease recurrence in patients with acute coronary syndromes. *Helicobacter*, 9 (6): 681-689.
- Engberg, J., On, S.L., Harrington, C.S., Gerner-Smidt, P. (2000). Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by are evaluation of isolation methods for campylobacters. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 286-291.
- Environmental Protection Agency (EPA) (2015). Special Considerations for Culture-based Microbiological Test Methods. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-01/documents/final_microbiology_method_guidance. Enero 2016.

Ertas, N., Dogruer, Y., Gonulalan, Z., Guner, A., Ulger, I. (2010). Prevalence of *Arcobacter* species in drinking water, spring water, and raw milk as determined by multiplex PCR. *J. Food Prot*, 73: 2099-2102.

Erzin, Y., Koksall, V., Altun, S., Dobrucali, A., Aslan, M., Erdamar, S., Dirican, A., Kocazeybek, B. (2006). Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, babA* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*, 11: 574 - 580.

Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México, pp 517-526.

Eusebi, L.H., Zagari, R.M., Bazzoli, F. (2014). Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 19 (Sup 1): 1-5.

Fera, M.T., Maugeri, T.L., Giannone, M., Gugliandolo, C., La Camera, E., Blandino, G., Carbone, M. (2003). In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21: 488-491.

Fera, M.T., Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Giannone, M., La Camera, E., Carbone, M. (2004). Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea. *Appl. Environ. Microbiol*, 70: 1271-1276.

Fera, M.T., Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., La Camera, E., Lentini, V., Favalaro, A., Bonanno, D., Carbone, M. (2008). Induction and resuscitation of viable nonculturable *Arcobacter butzleri* cells. *Appl. Environ. Microbiol*, 74 (10): 3266-8.

Fera, M.T., Russo, G.T., Di Benedetto, A., La Camera, E., Orlando, A., Giandalia, A., Ruffa, V.F., Lanza, G., Lentini, V., Perdichizzi, G., Cucinotta, D. (2010). High prevalence of *Arcobacter* carriage in older subjects with type 2 diabetes. *J. Biomed. Biotechnol*, ID 489784, 7 pages.

Fernández, H., Krause, S., Villanueva, M.P. (2004). *Arcobacter butzleri* an emerging enteropathogen: communication of two cases with chronic diarrhea. *Braz. J. Microbiol*, 35 (8): 216-218.

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

Fernández, H., Flores, S. and Inzunza, F. (2010). *Arcobacter butzleri* strains isolated from different sources display adhesive capacity to epithelial cells in vitro. *Acta Sci. Vete*, 38 (3): 283-287.

Fernández, H., Villanueva, M. y Medina, G. (2012). Endosimbiosis de *Arcobacter butzleri* en *Acanthamoeba castellanii*. *Rev. Arg. Microbiol*, 44 (2): 133.

Fernández, H., Villanueva, M.P., Mansilla, I., Gonzalez, M., Latif, F. (2015). *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile. *Brazilian J. Microbiol*, 46 (1): 145-147.

Ferreira, S., Fraqueza, M., Queiroz, J., Domingues, F., Oleastro, M. (2013) Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *Int. J. Food Microbiol*, 162 (1): 82-88.

Figueiredo, C., Machado, J.C, Yamaoka, Y. (2005). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 10: 14-20.

Figueras, M.J., Collado, L. and Guarro, J. (2008). A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 62 (1): 11-15.

Figueras, M.J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J., Yustes, C. (2011a). *Arcobacter molluscorum* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst. Appl. Microbiol*, 34 (2): 105-109.

Figueras, M.J., Levican, A., Collado, L., Inza, M.I., Yustes, C. (2011b). *Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels. *Syst. Appl. Microbiol*, 34 (6): 414-418.

Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Collado, L., Martínez-Murcia, A. (2011c). Recommendations for a new bacterial species description based on analyses of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter*. *The Bulletin of BISMIS*, 2: 1-16.

Figueras, M.J, Levican, A., Collado, L. (2012). Updated 16S rRNA-RFLP method for the identification of all currently characterized *Arcobacter* spp. *BMC Microbiol*, 12: 292.

Figueroa, G., Troncoso, M., Toledo, M.S., Faúndez, G., Acuña, R. (2002). Prevalence of serum antibodies to *Helicobacter pylori* VacA and CagA and gastric diseases in Chile. *J. Med. Microbiol*, 51 (4): 300-304.

Fong, T.T., Mansfield, L.S., Wilson, D.L., Schwab, D.J., Molloy, S.L. y Rose, J.B. (2007). Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environ. Health Perspect*, 115 (6): 856-864.

Food and Drug Administration (FDA). (2014). Establishing a List of Qualifying Pathogens Under the Food and Drug. Act Federal Register/Vol. 79, No. 108. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2014-06-05/pdf/2014-13023.pdf>. Mayo 2016.

Fujimura, S., Kawamura, T., Kato, S., Tateno, H., Wanatabe, A. (2002). Detection of *Helicobacter pylori* in cow's milk. *Lett. Appl. Microbiol*, 35: 504-507.

Gamboa, J.L. (2003). Infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcerosa péptica. *Univ. Diag*, 3 (1): 20-24.

- García, A. Salas-Jara, M.J., Herrera, C., González, C. (2014). Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. *World J. Gastroenterol*, 20 (19): 5632-5638.
- Gazi, S., Karameris, A., Christoforou, M., Agnantis, N., Rokkas, T., Stefanou, D. (2013). Real-Time PCR detection and quantitation of *Helicobacter pylori* clarithromycin-resistant strains in archival material and correlation with Sydney classification. *Annals. Gastroenterol*, 26 (3): 226-232.
- Gião, M.S., Azevedo, N.F., Wilks, S.A., Vieira, M.J., Keevil, C.W. (2008). Persistence of *Helicobacter pylori* in Heterotrophic Drinking-Water Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol*, 74 (19): 5898-5904.
- Gill, K.P.W. (1983) Aerotolerant *Campylobacter* strain isolated from a bovine preputial sheath washing. *Vet. Rec*, 112 (19): 459.
- Golla, S.C., Murano, E.A., Johnson, L.G., Tipton, N.C., Cureington E.A., Savell, J.W. (2002). Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods. *J. Food Prot.* 65 (12): 1849-53.
- González, A., Botella, S., Montes, R.M., Moreno, Y. y Ferrus, M.A. (2007a). Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Spain. *J. Food Prot*, 70 (2): 341-347.
- González, A., Ferrús, M.A., González, R. and Hernández, J. (2007b). Molecular fingerprinting of *Campylobacter* and *Arcobacter* isolated from chicken and water. *Int. Microbiol*, 10 (2): 85-90.
- González, A., Piqueres, P., Moreno, Y., Cañigral, I., Owen, R.J., Hernández, J., Ferrús, M.A. (2008). A novel real-time PCR assay for the detection of *Helicobacter pullorum*-like organisms in chicken products. *Intl. Microbiol*, 11 (3): 203-208.
- González, A., Suski, J., Ferrus, M.A. (2010). Rapid and accurate detection of *Arcobacter* contamination in commercial chicken products and wastewater samples by real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog. Dis*, 7 (3): 327-338.
- González, A. and Ferrús, M.A. (2011). Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *Int. J. Food Microbiol*, 145 (1): 311-314.
- Goodman, K.J., Correa, P., Tenganá, H.J., Ramírez, H., DeLany, J.P., Guerrero, O., et al (1996). *Helicobacter pylori* infection in the colombian Andes: A population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol*, 144 (3): 290-299.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnell, W., Harper, W. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. Nov. and *Helicobacter mustelae* com. Nov., respectively. *Ins. Syst. Bacteriol*, 39: 397-405.

- Goodwin, C.S. and Armstrong, J.A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur. J. Clin. Microbiol*, 9: 1-13.
- Gugliandolo, C., Irrera, G.P., Lentini, V. and Maugeri, T.L. (2008) Pathogenic *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arcobacter* spp. associated with copepods in the Straits of Messina (Italy). *Mar Pollut Bull*, 56: 600-606.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., Decostere, A., Ducatelle, R. (2009). Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clin. Microbiol. Reviews*, 22 (2): 202-223.
- Han, C., Kotsyurbenko, O., Chertkov, O., Held, H., Lapidus, L., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J., Tapia, R., Goodwin, L., Pitluck, S., et al. (2012). Complete genome sequence of the sulfur compounds oxidizing chemolithoautotroph *Sulfuricurvum kujiense* type strain (YK-1^T), *Stand Genomic Sci*, 19; 6 (1): 94–103.
- Hänninen, M.L., Happonen, I., Saari, S., Jalava, K. (1996). Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 46 (1): 160-166.
- Hausdorf, L., Fröhling, A., Schlüter, O., Klocke, M. (2011). Analysis of the bacterial community within carrot wash water. *Can. J. Microbiol*, 57 (5): 447-452.
- Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K. (2013). Fröhling A, Schlüter O, Klocke M. Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays. *Syst. Appl. Microbiol*, 36 (4): 235-243.
- Ho, H.T., Lipman, L.J. and Gaastra, W. (2006). *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent!. *Vet. Microbiol*, 115 (1-3): 1-13.
- Ho, H.T., Lipman, L.J., Hendriks, H.G., Tooten, P.C., Ultee, T. and Gaastra, W. (2007). Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 50: 51-58.
- Hopkins, R.J., Vial, P.A., Ferreccio, C., Ovelle, J., Prado, P., Sotomayor, V., Russell, R. G., Wasserman, S. S., Morris, J. G. Jr. (1993). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as a route of transmission. *J. Infect. Dis*, 168 (1): 222-226.
- Horiuchi, T., Ohkusa, T., Watanabe, M., Kobayashi, D., Miwa, H., Eishi, Y. (2001). *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiol. Immunol*, 45 (7): 515-519.
- Houf, K., Tutenel, A., De Zutter, L., Van Hoof, J., Vandamme, P. (2000). Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiol. Lett*, 193 (1): 89-94.

Houf, K., Devriese, L.A., De Zutter, L., Van Hoof, J., Vandamme, P. (2001). Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. *Int. J. Food. Microbiol*, 71 (2-3). 189-196.

Houf, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.P., van Hoof, J., *et al.* (2004). Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. *Microb. Drug. Resis*, 10 (3): 243-247.

Houf, K., On, S.L., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J., Vandamme, P. (2005). *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 55 (2): 713-717.

Houf, K. and Stephan, R. (2007). Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool. *J. Microbiol. Methods*, 68 (2): 408-413.

Houf, K., On, S. L., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S., Vandamme, P. (2009). *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 59 (10): 2599-2604.

Hulten, K., Han, S.W., Enroth, H., Klein, P.D., Opekun, A.R., Gilman, R.H., Evans, D.G., Engstrand, L., Graham, D.Y., El-zaatari, F.A.K. (1996). *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterol*, 110 (4): 1031-1035.

Hurtado, A. and Owen, R.J. (1997). A molecular scheme based on 23S rRNA gene polymorphisms for rapid identification of *Campylobacter* and *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol*, 35 (9): 2401-2404.

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1994). Infection with *Helicobacter pylori*. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Vol. 61) pp.177-240.

IARC-WHO (International Agency for Research on Cancer- World Health Organization) (2014). *Helicobacter pylori* Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer. Working Group Reports (Vol. 8) 190 pag. Available from: <https://www.iarc.fr/en/publications/pdfsonline/wrk/wrk8/HelicobacterpyloriEradication.pdf>. Mayo 2016

Iwańczak, B. and Francavailla, R. (2014). *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter*, 19 (1): 46-51.

Jacob, J., Woodward, D., Feuerpfeil, I. and Johnson, W.M. (1998). Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking water treatment plants in Germany. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed*, 201 (2): 189-198.

Jalava, K., Rintala, H., Ollgren, J., Maunula, L., Gomez-Alvarez, V., Revez, J., Palander, M., Antikainen, J., Kauppinen, A., Räsänen, P., Siponen, S., Nyholm, O., Kyyhkynen, A., Hakkarainen, S., Merentie, J., Pärnänen, M *et al.*, (2014) Novel

microbiological and spatial statistical methods to improve strength of epidemiological evidence in a community-wide waterborne outbreak. *PLoS One*, (9): 8 e 104713.

Jiang, X. and Doyle, M.P. (2002). Optimizing enrichment culture conditions for detecting *Helicobacter pylori* in foods. *J. Food Prot*, 65 (12): 1949-1954.

Jiang, Z.D., Dupont, H.L., Brown, E.L., Nandy, R.K., Ramamurthy, T., Sinha, A., Ghosh, S., Guin, S., Gurleen, K., Rodrigues, S., Chen, J.J., McKenzie, R., Steffen, R. (2010). Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala and India importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol*, 48 (4): 1417-1419.

Josephson, K.L., Gerba, C. P., Pepper, I.L. (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 59 (10): 3513-3515.

Kaakoush, O.N., Sodhi, N., Chenu, J.W., Cox, J.M., Riordan, S.M., Mitchell, H.M. (2014). The interplay between *Campylobacter* and *Helicobacter* species and other gastrointestinal microbiota of commercial broiler chickens. *Gut Pathog*, 6:18.

Kabeya, H., Kobayashi, Y., Maruyama, S., Mikami, T. (2003). One-step polymerase chain reaction-based typing of *Arcobacter* species. *Int. J. Food Microbiol*, 81 (2): 163-168.

Kabir, S. (2004). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by Polymerase Chain Reaction: a Review. *Helicobacter*, 9 (2): 115-123.

Kalach, N., Gosset, P., Dehecq, E., Decoster, A., Spyckerelle, C., Papadopoulos, S., Dupont, C., Raymond, J. (2015). Usefulness of gastric biopsy-based Real-Time Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*, 61 (3): 307-310.

Karadas, G., Sharbatii, S., Hanel, I., MesselhauerBer, U., Glocker, E., Alter, T., *et al.* (2013). Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *J. Appl. Microbiol.* 115, 583-590.

Karadas, R., Bücken, R., Sharbati, S., Schulzke, J. D., Alter, T., Gözl, G. (2016). *Arcobacter butzleri* isolates exhibit pathogenic potential in intestinal epithelial cell models. *J. Appl. Microbiol*, 120 (1): 218-225.

Kayman, T., Abay, S., Hizlisoy, H., Atabay, H.I., Diker, K.S., Aydin, F. (2012). Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in acute gastroenteritis: molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated arcobacters. *J. Med. Microbiol*, 61 (10): 1439-1444.

Kelly, S.M., Geraghty, J.M. and Neale, G. (1994). *H. pylori*, gastric carcinoma and MALT lymphoma. *Lancet*, 343 (8894): p418.

Kidd, M. and Modlin, I.M. (1998). Century of *Helicobacter pylori* Paradigms Lost – Paradigms Regained (Review). *Digestion*, 59 (1): 1-15.

Kiehlbauch, J.A., Plikaytis, B.D., Swaminathan, B., Cameron, D.N. and Wachsmuth, I.K. (1991). Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal genes for species identification and subtyping of aerotolerant *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol*, 29 (8): 1670-1676.

Klancnik, A., Kovac, M., Toplak, N., Piskernik, S., Jersek, B. (2012). PCR in Food Analysis, Polymerase Chain Reaction, Dr Patricia Hernandez-Rodriguez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0612-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/pcr-in-food-analysis>.

Konturek, J.W. (2003). Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and cancer gastric. *J. Physiol. Pharmacol*, 54 (3): 23-41.

Konturek, P.C., Konturek, S.J., Brzozowski, T. (2006). Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *J. Physiol. Pharmacol*, 57 (Sup 3): 51-65.

Kopilovic, Ucakar, V., Koren, N., Krek, M and Kraigher, A. (2008). Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008. *Eurosurveillance*, 13 (34): 1-3.

Krumbiegel, P., Lehmann, I., Alfreider, A., Fritz, G.J., Boeckler, D., Rolle-Kampzyk, U., Richter, M., Jorks, S., Muller, L., Richter, M.W. and Herbarth, O. (2004). *Helicobacter pylori* determination in non-municipal drinking water and epidemiological findings. *Isot. Environ. Health. Stud*, 40 (1): 75-80.

Laishram, M., Rathlavath, S., Lekshmi, M., Kumar, S., Nayak, B.B. (2016). Isolation and characterization of *Arcobacter* spp. from fresh seafood and the aquatic environment. *Int. J. Food. Microbiol*, 232: 87-89.

Lamb, A. and Chen, L.F. (2013). Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. *J. Cell. Biochem*, 114 (3): 491-497.

Lapongov, I., Sohi, M.K., Veselkov, D.A., Pan, X.S., Saehney, R., Thompson, A.W., et al. (2009). Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol*, 16 (6): 667-669.

Lastovica, A.J., On, S.L.W., Zhang, L. (2014). The Family *Campylobacteraceae*. *The Prokaryotes*, 307-335.

Lee, D.S., Wu, M.H., Ramesh, U., Lin, C.W., Lee, T.M., Chen, P.H. (2004). A novel real-time PCR machine with a miniature spectrometer for fluorescence sensing in a micro liter volume glass capillary. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 100 (3): 401-410.

Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A.L., Romalde, J.L., Figueras, M. J. (2012). *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst. Appl. Microbiol*, 35 (3): 133-138.

- Levican, A., Collado, L., Figueras, M. J. (2013). *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Syst. Appl. Microbiol*, 36 (1): 22-27.
- Levican, A., Collado, L., Yustes, C., Aguilar, C., Figueras, M. J. (2014). Higher water temperature and incubation under aerobic and microaerobic conditions increase the recovery and diversity of *Arcobacter* spp. from shellfish. *Appl. Environ. Microbiol*, 80 (1): 385-391.
- Levican, A., Rubio, S., Martínez, A., Collado, L., Figueras, M.J. (2015). *Arcobacter ebronensis* sp. Nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. Nov., two new species isolated from marine environment. *Syst. Appl. Microbiol*, 38 (1): 30-35.
- Li, L., Mendis, M., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol*, 5: 258.
- Lin, D. and Koskella, B. (2015). Friend and foe: factors influencing the movement of the bacterium *Helicobacter pylori* along the parasitism-mutualism continuum. *Evol. Appl*, 8 (1): 9-22.
- Little, C.L. and Gillespie, I.A. (2008). Prepared salads and public health. *J Appl. Microbiol*, 105 (6): 1729-43.
- Logan, E.F., Neill, S.D. and Mackie, D.P. (1982). Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*. *Vet. Rec*, 110 (10): 229-230.
- LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature). Especies del género *Helicobacter* reconocidas. <http://www.bacterio.net/helicobacter.html>.
- LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature). Especies del género *Helicobacter* reconocidas. <http://www.bacterio.net/arcobacter.html>.
- Lu, Y., Redliner, T.E., Avitia, R., Galindo, A., Goodman, K. (2002). Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl. Env. Microbiol*, 68 (3): 1436-1439.
- MacKay, W.G., Williams, C.L., McMillan, M., Ndip, R.N., Shepherd, A.J., Weaver, L.T. (2003). Evaluation of a protocol using gene capture and PCR for detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces. *J. Clin. Microbiol*, 41 (10): 4589-4593.
- Mandisodza, O., Burrows, E., Nulsen, M. (2012). *Arcobacter* species in diarrhoeal faeces from humans in New Zealand. *N. Z. Med. J*, 1353 (1353): 40-46.
- Marshall, B.J and Warren, R.J. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1 (8390): 1311-1315.
- Marshall, B.J., Armstrong, J.A., McGeachie, D.B., Glancy R.J. (1985). Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust*, 142 (8): 436-439.

- Marshall, B. and Goodwin, C. (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Inf. J. Syst. Bacteriol*, 37 (1): p 68.
- Martel, C. and Parsonnet, J. (2006). *Helicobacter pylori* Infection and Gender: A Meta-Analysis of Population-Based Prevalence Surveys. *Dig. Dis. Sci*, 51 (12): 2292-30.
- Maruri, F., Sterling, T.R., Kaiga, A.W., Blackman, A., van der Heijden, Y.F., Mayer, C., Cambau, E., Aubry, A. (2012). A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J. Antimicrob. Chemother*, 67 (4): 819-31.
- Mauget-Faÿsse, M., Kodjikian, L., Quaranta, M., Ben Ezra, D., Trepsat, C., Mion, F., Mégraud, F. (2002). *Helicobacter pylori* in central serous chorioretinopathy and diffuse retinal epitheliopathy. Results of the first prospective pilot study. *J. Fr. Ophthalmol*, 25 (10):1021-5.
- Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Calva, J.J. (2001). *Helicobacter pylori* in water systems for human use in Mexico City. *Water. Sci. Technol*, 43 (12): 93-98.
- McClung, C.R., Patriquin, D.G and Davis, R.D. (1983). *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 33: 605-612.
- Mégraud, F. (1995). Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Clin. Gastroenterol*, 9: 507 – 18.
- Mégraud, F. (1997). Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11 (Sup 1): 43-53.
- Menard, A., Péré-Védrenne, C., Haesebrouck, F., Flahou, B. (2014). Gastric and Enterohepatic Helicobacters other than *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 19 (Sup 1): 59-67.
- Meng, X., Zhang, H., Law, J., Tsang, R., Tsang, T. (2008). Detection of *Helicobacter pylori* from food sources by a novel multiplex PCR assay. *J. Food. Safe*, 28 (4): 609-619.
- Merga, J.Y., Leatherbarrow, A.J., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C.A., Miller W.G., Williams, N.J. (2011). Comparison of *Arcobacter* isolation methods, and diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol*, 77 (5): 1646-1650.
- Mladenova, I., Durazzo, M., Pellicano, R. (2006). Transmission of *Helicobacter pylori*: are there evidences for a fecal-oral route? *Minerva Med*, 97 (1): 15-18.
- Mobley, H.L.T., Mendz, G.L., Hazell, S.L. (2001). *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. *ASM Pres*, 10: 213-219.
- Morales, M., Castillo, R.G., López, V.Y., Cravioto, A. (2001). *Helicobacter pylori* Laboratorio de Inmunología Molecular Microbiana Facultad de Medicina, Universidad

Nacional Autónoma de México (UNAM), disponible en: http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/capitulo_15/capitulo.pdf.

Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrús, M. A., Hernández, M., Hernández, J., (2003a). Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol*, 69 (2): 1181-1186.

Moreno, Y., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Jiménez, A. y Hernández, J. (2003b). Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Res*, 37 (9): 2251-2256.

Moreno, Y., Alonso, J.L., Botella, S., Ferrus, M.A., Hernandez, J. (2004). Survival and injury of *Arcobacter* after artificial inoculation into drinking water. *Res. Microbiol*, 155 (9): 726e730.

Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J.L., Jiménez, A., González, A., Ferrús, M.A. (2007). Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res*, 41 (15): 3490-3496.

Moreno, Y. and Ferrus, M.A. (2012). Specific Detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from Wastewater Treatment Plants. *Helicobacter*, 17 (5): 327-332.

Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J.L., Ferrús, M.A. (2016). DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii*. *Res. Microbiol*, 167 (1): 29-34.

Morita, Y., Maruyama, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Nimsuphan, B., Nagai, A., Kozawa, K., Nakajima, T., Mikami, T., Kimura, H. (2004). Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter* spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand. *Microbiol. Immunol*, 48 (7): 527-533.

Mottola, A., Bonerba, E., Figueras, M.J., Pérez-Cataluña, A., marchetti, P., Serraino, A., Bozzo, G., Terio, V., Tantillo, G., Di Pinto, A. (2016). Occurrence of potentially pathogenic arcobacters in shellfish. *Food Microbiol*, 57: 23-27.

NARMS (2006) Centers for Disease Control. National Antimicrobial Resistance Monitoring System, enteric bacteria, human isolates final report. <http://www.cdc.gov/narms/reports.htm>.

Nayak, A.K. and Rose, J.B. (2007). Detection of *Helicobacter pylori* in sewage and water using a new quantitative PCR method with SYBR_ green. *J. Appl. Microbiol*, 103 (5): 1931-1941.

Ndip, R.N., MacKay, W.G., Farthing, M.J., Weaver, L.T. (2003). Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr*, 36 (5): 616-622.

- Neill, S.D., Cambell, J.N., O'Brien, J.J., Weatherup, S.T.C., Ellis, W.A. (1985). Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 35 (3): 342-356.
- Newton, R., Bootsma, M., Morrison, H., Sogin, M., McLellan, S. (2013). A microbial signature approach to identify fecal pollution in the waters off an urbanized coast of lake Michigan. *Microb. Ecol*, 65 (4): 1011-1023.
- Ng, C.G., Hassanbhai, A.M., Loke, M.F., Wong, H. J., Goh, K.L., Vadivelu, J., Ho, B.(2014). *Helicobacter pylori* biofilm - the probable mode and source of transmission? *Helicobacter*, 19 (Sup 1): 104.
- Nilius, M., Ströhle, A., Bode, G., Malfertheiner, P. (1993). Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. *Zentralbl Bakteriol*, 280 (1-2): 259-72.
- Nilsson, H., Blom, J., Al-Soud, W., Ljungh A., Andersen, L. and Eadström, T. (2002). Effect of cold starvation, acid stress and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol*, 68 (1): 11-19.
- Nitiss, J.L. (2009). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat. Rev. Cancer*, 9 (5): 327-37.
- O'Connor, A. Vaira, D., Gisbert, J.P., O'Morain, C. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2014. *Helicobacter*, 19 (Sup 1): 38-45.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (1994). Prevención del cáncer. www.who.int/cancer/prevention/es/ - 32k.
- On, S.L.N. (2001). Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *J. Appl. Microbiol*, 90, (6): 1-15.
- Palomino, C. y Tomé, E. (2012). *Helicobacter pylori*: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. *An. Venez. Nutr*, 25(2): 85-93.
- Paniagua, G.L., Monroy-Pérez, E., Alcántara-Carmona, M.L., García-González, O., Vaca-Pacheco, S. (2007). Prevalencia de *Helicobacter pylori* y de los genotipos *vacA* y *cagA* en la saliva de pacientes con gastritis. *Rev. Méd. Hospital Gral. México*, 70 (3): 107-114.
- Papagiannakis, P., Michalopoulos, C., Papalex, F., Dalampoura, D., Diamantidis, M.D. (2013). The role of *Helicobacter pylori* infection in hematological disorders. *Eur. J. Intern. Med*, 24 (8): 685-690.
- Patel, S.K., Pratap, C.B., Jain, A.K., Gulati, A.K., Nath, G. (2014). Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard?. *World J. Gastroenterol*, 20 (36): 12847-12859.

- Patyal, A., Rathore, R., Mohan, H., Dhama, K., Kumar, A. (2011). Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including seafood from India. *Transbound. Emerg. Dis*, 58 (5): 402-410.
- Pentimalli, D., Pegels, N., Garcia, T., Martin, R. and Gonzalez, I. (2009). Specific PCR detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in chicken meat. *J. Food. Prot*, 72 (7): 1491-1495.
- Percival, S.L. and Suleman, L. (2014). Biofilms and *Helicobacter pylori*: Dissemination and persistence within the environment and host. *World J. Gastrointest. Pathophysiol*, 5 (3): 122-132.
- Pereira, M.I. and Medeiros, J.A. (2014). Role of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World Gastroenterol*, 20 (3): 684-98.
- Prouzet-Mauleón, V., Labadi, L., Bouges, N., Menard, A. and Mégraud, F. (2006) *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. *Emerg. Infect. Dis*, 12 (2): 307-309.
- Rahimi, E. and Kheirabadi, E.K. (2012). Detection of *Helicobacter pylori* in bovine, buffalo, camel, ovine, and caprine milk in Iran. *Foodborne Pathog. Dis*, 9 (5): 453-6.
- Rahimi, E. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran. *Br. Poult. Sci*, 55 (2): 174-180.
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G.P., Shinoda, S. (2014). Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Front Public Health*, 2:103
- Rice, E.W., Rodgers, M.R., Wesley, I.V., Johnson, C.H., Tanner, S.A. (1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Lett. Appl. Microbiol*, 28 (1): 31-35.
- Rimbara, E., Sasatsu, M., Graham, D.Y. (2013). PCR Detection of *Helicobacter pylori* in Clinical Samples. *Methods. Mol. Biol*, 943: 279-287.
- Rivas, F. y Hernández, F. (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev. Biomed*, 11 (3): 187-205.
- Samie, A., Obi, C.L., Barrett, L.J., Powell, S.M., Guerrant, R.L. (2007). Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *J. Infect*, 54 (6): 558-566.
- Santiago, P., Moreno, Y and Ferrús, M.A. (2015). Identification of viable *helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques. *Helicobacter*, 20 (4): 252-259.
- Serraino, A., Florio, D., Giacometti, F., Piva, S., Mion, D., Zanoni, G. (2013). Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of water buffalo dairy farm in Italy. *J. Dairy Sci*, 96 (5): 2801-2807.

- Shah, A.H., Saleha, A., Zunita, Z., Murugaiyah, M. (2011). *Arcobacter* - An emerging threat to animals and animal origin food products?. *Trends Food Sci. Tech*, 22 (5): 225-236.
- Shah, A.H., Saleha, A., Zunita, Z., Cheah, Y.K., Murugaiyah, M., Korejo, N.A. (2012a). Genetic characterization of *Arcobacter* isolates from various sources. *Vet. Microbiol*, 160 (3-4): 355-361.
- Shah, A.H., Saleha, A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Aliyu, A.B. (2012b). Antimicrobial susceptibility of an emergent zoonotic pathogen, *Arcobacter butzleri*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 40 (6): 569-570.
- Shah, A.H., Saleha, A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Zunita, Z., Menon, A.A. (2012c). Prevalence and Distribution of *Arcobacter* spp. in Raw Milk and Retail Raw Beef. *J. Food Prot*, 75 (8): 1474-1478.
- Sheng-Ang, H., Hoyle, J., Lewis, F.A., Secker, A.D., Cross, D., Mapstone, N.P., Dixon, M.F., Wyatt, J.I., Tompkins, D.S., Taylor, G.R. and Quirke, P. (1991). Direct polymerase chain reaction for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J. Clin. Microbiol*, 29: 2543-2549.
- Šilha, D., Šilhová, H.L., Vytřasová, J. (2015). Modified isolation method of *Arcobacter* spp. from different environmental and food samples. *Folia Microbiol (Praha)*, 60 (6): 515-521.
- Skirrow, M. (2006). John McFadyean and the Centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clin. Infect. Dis*, 43:1213-7.
- Smith, C.D. and Ashbolt, N.J. (2012). The fate of *Helicobacter pylori* phagocytized by *Acanthamoeba polyphaga* demonstrated by fluorescent in situ hybridization and quantitative polymerization chain reaction tests. *Curr Microbiol*, 65 (6):805-12.
- SEPD. (2015). Congreso: Semana de las enfermedades digestivas, Sevilla. Sociedad Española de Patología Digestiva.
- Son, I. (2005). Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial resistance patterns of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. Doctoral thesis, University of Georgia.
- Song, Q., Lange, T., Spahr, A., Adler, G. and Bode, G. (2000). Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J. Med. Microbiol*, 49 (4): 349-353.
- Stampi, S., Varoli, O., Zanetti, F., De Luca, G. (1993). *Arcobacter cryaerophilus* and thermophilic campylobacters in a sewage treatment plant in Italy: two secondary treatment compared. *Epidemiol. Infect*, 110 (3): 633-639.

- Stampi, S., De Luca, G., Varoli, O., Zanetti, F. (1999). Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic campylobacters and *Arcobacter* in sewage sludge. *Zentralbl Hyg. Umweltmed*, 202 (1):19-27.
- Stevenson, T.H., Castillo, A., Lucia, L.M and Acuff, G.R. (2000). Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Lett. Appl. Microbiol*, 30 (3): 192-196.
- Suerbaum, S. and Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* Infection. *N. Engl. J. Med*, 47 (15): 175-1186.
- Tous, G.E. (2002). Manejo de la Infección por *Helicobacter pylori* en Atención Primaria Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Medicina.
- Turk, M.L., Cacioppo, L.D., Ge, Z., Shen, Z., Whary, M.T., Parry, N., Boustin, S., Klein, H.J., Fox, J.G. (2012). Persistent *Helicobacter pullorum* colonization in C57BL/6NTac mice: a new mouse model for an emerging zoonosis. *J. Med. Microbiol*, 61 (5): 720-728.
- Ünver, A., Atabay, H. I., Şahin, M., Çelebi, Ö. (2013). Antimicrobial susceptibilities of various *Arcobacter* species. *Turk. J. Med. Sci*, 43: 548-552.
- Van den Abeele, A.M., Vogelaers, D., Van Hende, J., Houf, K. (2014). Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008– 2013. *Emerg. Infect. Dis*, 20 (10): 1731-1734.
- Van den Abeele, A.M., Vogelaers, D., Vanleare, E., Houf, K. (2016). Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients. *J. Antimicrob. Chemother*, 71 (5): 1241- 1244.
- Van Driessche, E., Houf, K., Vangroenweghe, F., De Zutter, L., Van Hoof, J. (2005). Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Vet. Microbiol*, 105 (2): 149-154.
- Van Driessche, E. and Houf, K. (2008). Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions. *J. Appl. Microbiol*, 105 (2): 443-451.
- Van Tongeren, S.P., Slaets, J.P., Harmsen, H.J., Welling, G.W. (2005). Fecal microbiota composition and frailty. *Appl. Environ. Microbiol*. 71 (10): 6438-6442.
- Vandamme, P. and De Ley, J. (1991). Proposal for a new family, Campylobacteraceae, *Int. J. System. Bact*, 41 (4): 451-455.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 41 (1): 88-103.

Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J.P., Lior, H., Lauwers, S. (1992a). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *J. Clin. Microbiol*, 30 (9): 2335-2337.

Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., van den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J. (1992b). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 42 (3): 344-356.

Vandamme, P., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., On, S.L.W. (2005). Genus II. *Arcobacter* Vandamme, Falsen, Rossau, Segers, Tytgat and De Ley 1991a, 99VP. In: Brenner, D.J., Kreig, N.P., Staley, J.T., Garrity, G.M. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second ed., Springer, New York, pp. 1161–1165.

Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zisis, G., Butzler, J.P and Vandamme, P. (2004). *Arcobacter* species in humans. *Emerg. Infect. Dis*, 10 (10): 1863-1867.

Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J.P., Dediste, A. (2006). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium. *J. Antimicrob. Chemother*, 57 (5): 908-913.

Vandewalle, J.L., Goetz, G.W., Huse, S.M., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Hoffmann, R.G., Yan, K., McLellan, S.L. (2012). *Acinetobacter*, *Aeromonas* and *Trichococcus* populations dominate the microbial community within urban sewer infrastructure. *Environ. Microbiol*, 14 (9): 2538-2552.

Van-Duynhoven, Y.T.H.P. and De-Jonge, R. (2001). Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food?. *Bull World Health Organ*. 79 (5): 455-460.

Vargas, E. y Toledo, O. (2003). Infección por *Helicobacter pylori*. *Rev. Inst. Med. Sucre*; 122: 31-33.

Venerito, M., Nardone, G., Selgrad, M., Rokkas, T., Malfertheiner, P. (2014). Gastric cancer-epidemiologic and clinical aspects. *Helicobacter*, 19 (1): 32-37.

Vermoote, M., Vandekerckhove, T.T.M., Flahou, B., Pasmans, F., Smet, A., De Groote, D., Van Criekinge, W., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. (2011). Genome sequence of *Helicobacter suis* supports its role in gastric pathology. *Vet. Res*, 42 (1): 51.

Villarruel-López, A., Márquez-González, M., Garay-Martínez, L.E., Zepeda, H., Castillo, A., Mota de la Garza, L., Murano, E.A., Torres-Vitela, R. (2003). Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against vero cells. *J. Food Prot*, 66 (8): 1374-8.

Wang, F. Meng, W., Wang, B., Qiao, L. (2014). *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Letters*, 345 (2): 196-202.

- Watson, C.L., Owen, R.J., Said, B., Lai, S., Lee, J.V, Surman-Lee, S., Nichols, G. (2004). Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *J. Appl. Microbiol*, 97 (4): 690-8.
- Wesley, I.V. Wells, S.J., Harmon, K.M., Green, A., Schroeder-tucker, L., Glover, M and Siddique, I. (2000). Fecal Shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in Dairy Cattle. *Appl. Environ. Microbiol*, 66 (5): 1994-200.
- Wesley, I.V and Miller, G.W. (2010). *Arcobacter*: an opportunistic human foodborne pathogen. In W.M. Scheld, M. L. Grauson, and J. M. Hughes (ed.), *Emerging infections 9. ASM Press*, Washington, DC, pp. 185-211.
- Whiteduck-Leveillee, K., Whiteduck-Leveillee, J., Cloutier, M., Tambong, J.T., Xu, R., Topp, E., Arts, M.T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C.A., Lapen, D.R, Villemur, R., Talbot, G., Khan, I.U.H. (2015a). *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 65 (8): 2709-2716.
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J.T. Xu, R., Topp, E., Arts, M.T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C.A., Lapen, D.R., Villemur, R., Talbot, G., Khan, I.U.H. (2015b). Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank. *Syst. Appl. Microbiol*, 39 (2): 93-99.
- Winiiecka-Krusnell, J., Wreiber, K., von Euler, A., Engstrand, L., Linder, E. (2002). Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Infect. Dis*, 34 (4): 253-260.
- Yahaghi, E., Khamesipour, F., Mashayekhi, F., Safarpour Dehkordi, F., Hossein, S.M., Masoudimanesh, M., Khayyat, K.M. (2014). *Helicobacter pylori* in vegetables and salads: genotyping and antimicrobial resistance properties. *BioMed Res. Int*, ID 757941, 11 pages.
- Yakoob, J., Abbas, Z., Khan, R., Naz, S., Ahmad, Z., Islam, M., Awan, S., Jafri, F., Jafri, W. (2012). Prevalence of non *Helicobacter pylori* species in patients presenting dyspepsia. *BMC Gastroenterol*, (12): 3.
- Yamazadi, S., Yamakawa, A., Okuda, T., Ohtani, M., Suto, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Keida, Y., Higashi, H., Hatakeyama, M., Azuma, T. (2005). Distinct diversity of *vacA*, *cagA* and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *J. Clin. Microbiol*, 43 (8): 3906-3916.
- Yan, J.J., Ko, W.C., Huang, A.H., Chen, H.M., Jin, Y.T., Wu, J.J. (2000). *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *J. Formos Med. Assoc*, 99 (2): 166-169.
- Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C., Yin, Y. (2003). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *F.E.M.S. Immunol. Med. Microbiol*, 38 (3):265-271.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, M., Madden L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13: 134.

Yesilmen, S., Vural, A., Erkan, M.E., Yildirim, I.H. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. *Int. J. Food Microbiol*, 188: 11-14.

Zacharow, I., Bystron, J., Walecka-Zacharska, E., Podkowik, M., Bania, M. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from retail meat in Lower Silesia region, Poland. *Polish J. Vet. Sci*, 18; (1): 63-69.

Zetterström, R. (2006). The Nobel Prize in 2005 for the discovery of *Helicobacter pylori*: implications for child health. *Acta Paediatrica*, 95 (1): 3-5.

Zhang, Z., Yu, C., Wang, X., Yu, S., Zhang, X.H. (2016). *Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the South Pacific Gyre. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 66: 542-547.

ANEXOS

ANEXO I: Abreviaturas empleadas

AB	Caldo de <i>Arcobacter</i> (<i>Arcobacter Broth</i>)
AAS	<i>Arcobacter</i> Agar Sangre
ASM	Medio selectivo para <i>Arcobacter</i>
Aw	Actividad del agua
BHI	Caldo cerebro-corazón (<i>Brain Heart Infusion</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAT	Suplemento Cefoperazona, anfotericina B y teicoplanina
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DMSZ	Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>)
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
Ile	Isoleucina
Kb	Kilobases (1000 pb)
kDa	KiloDaltons
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosa
mCCDA	Agar Carbón Cefoperazona Desoxicolato modificado (<i>Modified Coal Cefoperazone Deoxycholate Agar</i>)

m-PCR	PCR múltiple (<i>multiplex PCR</i>)
NARMS	Sistema de Monitorización Nacional de Resistencia a Antimicrobianos de Bacterias Entéricas (<i>National Antimicrobial Resistance Monitoring System</i>)
NCTC	Colección Nacional de Cultivos Tipo de Londres (<i>National Collection of Type Cultures</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFGE	Electroforesis en Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
QRDR	Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (<i>Quinolone Resistance Determining Region</i>)
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real (<i>Real Time quantitative PCR</i>)
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
Thr	Treonina
Tm	Temperatura de fusión (<i>melting temperature</i>)
TAE	Tris-acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
TTC	Cloruro de trifenil tetrazolio
u.f.c.	Unidades formadoras de colonia
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VNC	Viable No Cultivable

ANEXO II: Medios de cultivo**Composición de los medios de cultivo referida a un litro de agua destilada****Medios generales líquidos*****Arcobacter* Broth (Oxoid CM0965)**

Peptona.....	18 g
Extracto de levadura.....	1 g
Cloruro sódico.....	5 g

Suplemento para *Arcobacter* Broth

Cefoperazona, Anfotericina B y Teicoplanina (CAT) (Oxoid DC9876)

Brain Heart Infusion (Merck VM074493)

Sustrato alimenticio (extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona).	27,5 g
D (+)-glucosa.....	2 g
Cloruro sódico.....	5 g
Hidrogenofosfato disódico.....	2,5 g

Medios sólidos***Arcobacter* Broth (Oxoid CM0965)**

Peptona.....	18 g
Extracto de levadura.....	1 g
Cloruro sódico.....	5 g

Bacto Tryptic Soy Broth (BD 211825)

Digerido pancreático de caseína.....	17 g
Digerido papaínico de soja.....	3 g
Dextrosa.....	2,5 g
Cloruro sódico.....	5 g
Fosfato dipotásico.....	2,5 g

Agar-agar (Scharlau DF2356)..... 18 g

Suplemento de sangre para medio sólido

Los medios sólidos *Arcobacter* Broth y Bacto Tryptic Soy Broth son suplementados con 5 % de sangre desfibrinada de oveja (Thermo Scientific SR0051C)

Difco Agar Marine Broth (BD 279110)

Peptona.....	5 g
Extracto de levadura.....	1 g
Citrato férrico.....	0,1 g
Cloruro sódico.....	19,45 g
Cloruro de magnesio.....	5,9 g
Sulfato de magnesio.....	3,24 g
Cloruro de calcio.....	1,8 g
Cloruro de potasio.....	0,55 g
Bicarbonato de sodio.....	0,16 g
Bromuro de potasio.....	0,08 g
Cloruro de estroncio.....	34 g
Ácido bórico.....	22 g
Silicato de sodio.....	4 g
Fluoruro de sodio.....	2,4 g
Nitrato de amonio.....	1,6 g
Fosfato disódico.....	8 g
Agar-agar (Scharlau DF2356).....	18 g

Caldo nutritivo de conservación de cepas

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

Composición para g/l:		
	Polvo “Lav-Lemco”.....	10
	Peptona.....	10
	Cloruro sódico.....	5

10 % de Glicerol

Generación de microaerofilia

Sobres con mezclas generadoras de microaerofilia_(CampyGen, Oxoid CN35)

ANEXO III: SOLUCIONES Y REACTIVOS PARA PCR**Extracción de DNA**

Arcobacter: “GeneElute Bacterial Genomic DNA Kit” (Sigma-Aldrich, NA2110)

Helicobacter y *H. pylori*: “Realpure Genomic DNA Extraction Kit” (Durviz, Spain, RBMEG03)

Tampón TE

Tris- HCl.....	10 mM
EDTA.....	1 mM
pH	8

Tampón TAE 1X

Tris-HCl.....	0,02 M
EDTA.....	0,002 M
Ácido acético glacial.....	0,02 M

Reacción de amplificación

dNTPs (PCR Nucleotide Mix, Bioline BIO-39028)	50 µmol
Taq DNA polimerasa (Bioline, 1011005)	500 U
Tampón de reacción 10X (Bioline, 1011005)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	160 mM
Tris-HCl (pH = 8,8)	670 mM
Teewn-20	0,1 %
MgCl ₂ (Bioline 1011005)	50 mM

Purificación de producto de PCR

Kit de purificación de PCR: “GenEluete™ PCR Clean-Up Kit” (Sigma-Aldrich NA1020)

Kit de purificación de PCR y purificación de geles “Illustra GFX PCR DNA and Gel band Purification” (GE Healthcare)

Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Gel de Agarosa

Agarosa Grado de Biología Molecular (Roche Diagnostics 03573788001)

RedSafe (Ecogen 21141)

GelRed™ 3X (Biotium 41003)

Pesar la agarosa y transferir a un matraz. Añadir el tampón TAE 1X, calentar hasta que rompa a hervir, agitar y atemperar hasta 50 °C. Añadir 5 µl de RedSafe por cada 100 ml de tampón TAE 1X y verter en el molde.

Marcadores de pesos moleculares

Gene Ruler 100 Base Pair Plus DNA Ladder, ready –to-use (Thermo Fisher Scientific SM0323): de 100 a 3000-pb.

Gene Ruler 50 Base Pair Plus DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific SM 0373): de 50 a 1000-pb. Concentración: 0,05 µg/µl

Tampón de carga (6X Loading Dye Solution, Fermentas R0611)

Azul de bromofenol 1 %	2,5 ml
Ficoll	2,5 g
EDTA 0,5 M	1 ml
H2O.....	4 ml
pH.....	8

ANEXO IV: ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, INICIADORES Y ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

Tabla 1: Iniciadores (Tib Molbiol®)

INICIADOR	SECUENCIA	LONGITUD (pb)	DIANA	AMPLICÓN	REFERENCIA
ARCO1	5'-GTCGTGCCAAGAAAAGCCA	19	23S ARNr	331-pb	Bastyns <i>et al.</i> (1995)
ARCO2	5'-TTCGCTTGCGCTGACAT	17	23S ARNr	331-pb	
CAH1am	5'-AACACATGCAAGTCGAACGA	20	16S ARNr	1026-pb	Figueras <i>et al.</i> (2008)
CAH1b	5'-TTAACCCAACATCTCACGAC	20	16S ARNr	1026-pb	
F – QRDR	5'-TGGATTAAAGCCAGTTCATAGAAG	24	<i>gyrA</i>	344-pb	Abdelbaqi <i>et al.</i> (2007)
R2 – QRDR	5'-TCATMGWATCATCATAATTTGGWAC	25	<i>gyrA</i>	344-pb	
C97	5'-GCTATGACGGGTATCC	16	16S ARNr	1200-pb	Shen-Ang <i>et al.</i> (1991)
C05	5'-ACTTCACCCCAGTCGCGT	18	16S ARNr	1200-pb	
VacAR	5'-GGCACACTGGATTTGTGGCA	20	<i>VacA</i>	394-pb	Nilson <i>et al.</i> (2002)
VacAF	5'-CGCTCGCTTGATTGGACAGA	20	<i>VacA</i>	394-pb	
HP1	5'-CCTAACCAATTGAGCCAAGAAG	22	16S ARNr	398-pb	Choi <i>et al.</i> (2001)
HP2	5'-CTTTCTAACACTAACGCCCTCA	22	16S ARNr	398-pb	

Tabla 2: Enzimas de restricción

Enzimas de restricción	
<i>Mse</i> I (Thermo Fisher Scientific ER0981)	10 U/ μ l
<i>Mn</i> II (Thermo Fisher Scientific ER1072)	10 U/ μ l
<i>Bfa</i> I (Thermo Fisher Scientific ER1762)	10 U/ μ l

Tabla3: Antibióticos

Método	Antibiótico
Difusión en disco	Ciprofloxacino (BD 231757)
	Levofloxacino (BD 231705)
Tiras E-test	Ciprofloxacino (BioMérieux 508618)
	Levofloxacino (BioMérieux 527418)

ANEXO V: MUESTRAS ANALIZADAS

Tabla 1. Tipo de muestra, lugar de muestreo y fecha de recogida de las muestras de moluscos analizados

Muestra	Tipo de muestra	Pescadería	Fecha de recogida
M1	Almejas	G	16/10/2013
M2	Mejillones	I	16/10/2013
M3	Berberechos	D	16/10/2013
M5	Berberechos	D	23/10/2013
M6	Mejillones	A	23/10/2013
M8	Almejas	L	13/11/2013
M9	Berberechos	A	13/11/2013
M10	Almejas	C	20/11/2013
M11	Mejillones	C	20/11/2013
M12	Berberechos	J	20/11/2013
M13	Mejillones	K	27/11/2013
M14	Almejas	B	27/11/2013
M15	Berberechos	D	27/11/2013
M16	Almejas	E	01/12/2013
M17	Mejillones	H	01/12/2013
M18	Berberechos	B	01/12/2013
M19	Mejillones	E	08/01/2014
M20	Almejas	F	08/01/2014
M21	Berberechos	B	08/01/2014
M22	Berberechos	B	15/01/2014
M23	Mejillones	C	15/01/2014
M25	Mejillones	B	05/02/2014
M26	Almejas	B	05/02/2014
M27	Almejas	A	12/02/2014
M28	Berberechos	A	12/02/2014
M29	Mejillones	A	12/02/2014
M30	Berberechos	A	19/02/2014
M31	Almejas	A	19/02/2014
M32	Mejillones	C	19/02/2014
M33	Almejas	C	19/02/2014
M34	Mejillones	B	26/02/2014
M35	Berberechos	B	26/02/2014
M36	Mejillones	B	26/02/2014

M37	Mejillones	A	05/03/2014
M39	Berberechos	A	26/03/2014
M40	Mejillones	A	26/03/2014
M41	Almejas	B	02/04/2014
M42	Berberechos	B	02/04/2014
M43	Mejillones	A	09/04/2014
M44	Berberechos	A	09/04/2014
M45	Mejillones	A	30/04/2014
M46	Almejas	A	30/04/2014
M47	Berberechos	A	07/05/2014
M48	Almejas	A	07/05/2014
M50	Mejillones	A	14/05/2014
M51	Mejillones	B	21/05/2014
M53	Mejillones	B	18/05/2014
M54	Almejas	B	18/05/2014
M55	Almejas	A	18/05/2014
M57	Almejas	B	04/06/2014
M58	Mejillones	B	04/06/2014
M59	Almejas	A	04/06/2014
M60	Mejillones	A	04/06/2014
M61	Almejas	B	11/06/2014
M62	Mejillones	B	11/06/2014
M63	Almejas	A	11/06/2014
M64	Mejillones	A	11/06/2014
M66	Mejillones	A	18/06/2014
M67	Almejas	B	18/06/2014
M68	Mejillones	B	18/06/2014
M69	Almejas	B	25/06/2014
M70	Mejillones	B	25/06/2014
M71	Almejas	A	25/06/2014
M72	Mejillones	A	25/06/2014
M74	Mejillones	A	02/07/2014
M76	Almejas	A	02/07/2014
M77	Almejas	B	17/09/2014
M78	Mejillones	B	17/09/2014
M79	Almejas	A	17/09/2014
M80	Mejillones	A	17/09/2014
M81	Berberechos	A	17/09/2014

M82	Berberechos	A	24/09/2014
M83	Mejillones	A	24/09/2014
M84	Almejas	A	24/09/2014
M85	Mejillones	B	24/09/2014
M86	Almejas	B	24/09/2014
M87	Almejas	B	01/10/2014
M88	Berberechos	B	01/10/2014
M89	Mejillones	B	01/10/2014
M90	Almejas	A	01/10/2014
M91	Berberechos	A	08/10/2014
M92	Berberechos	A	08/10/2014
M93	Mejillones	A	08/10/2014
M94	Almejas	B	08/10/2014
M95	Mejillones	B	08/10/2014
M96	Almejas	B	08/10/2014
M97	Berberechos	B	15/10/2014
M98	Mejillones	B	15/10/2014
M99	Berberechos	A	15/10/2014
M100	Almejas	A	15/10/2014
M101	Mejillones	B	06/05/2015
M102	Almejas	B	06/05/2015
M103	Almejas	A	06/05/2015
M104	Mejillones	A	06/05/2015
M105	Mejillones	B	20/05/2015
M106	Almejas	B	20/05/2015
M107	Mejillones	A	20/05/2015
M108	Almejas	A	20/05/2015
M109	Almejas	B	27/05/2015
M110	Mejillones	B	27/05/2015

Tabla 2. Tipo de muestra, lugar de muestreo y fecha de recogida de las muestras de verduras

Muestra	Tipo de muestra	Verdulería	Fecha de recogida
V1	Lechuga	E	05/11/2014
V2	Acelga	E	05/11/2014
V3	Lechuga	E	05/11/2014
V4	Acelga	E	12/11/2014
V5	lechuga	E	12/11/2014
V6	col	E	12/11/2014
V7	Acelga	D	12/11/2014
V8	lechuga	D	12/11/2014
V9	Acelga	C	17/11/2014
V10	col	C	17/11/2014
V11	Lechuga	C	17/11/2014
V12	Espinaca	G	17/11/2014
V13	Acelga	G	17/11/2014
V14	Acelga	E	24/11/2014
V15	lechuga	E	24/11/2014
V16	Lechuga	E	24/11/2014
V17	Lechuga	B	24/11/2014
V18	Col	B	24/11/2014
V19	Lechuga	E	01/12/2014
V20	Lechuga	E	01/12/2014
V21	Acelga	E	01/12/2014
V22	Acelga	B	01/12/2014
V23	Espinaca	B	01/12/2014
V24	Acelga	C	10/12/2014
V25	Espinaca	C	10/12/2014
V26	Lechuga	C	10/12/2014
V27	Espinaca	B	10/12/2014
V28	Acelga	B	10/12/2014
V29	Espinaca	B	12/01/2015
V30	Acelga	B	12/01/2015
V31	Lechuga	B	12/01/2015
V32	Acelga	G	12/01/2015
V33	Lechuga	G	12/01/2015
V34	Lechuga	B	19/01/2015
V35	Espinaca	B	19/01/2015

V36	Acelga	B	19/01/2015
V37	Acelga	C	19/01/2015
V38	Lechuga	C	19/01/2015
V39	Espinaca	B	26/01/2015
V40	Lechuga	B	26/01/2015
V41	Acelga	B	26/01/2015
V42	Espinaca	E	26/01/2015
V43	Lechuga	E	26/01/2015
V44	Lechuga	A	02/02/2016
V45	Lechuga	A	02/02/2015
V46	Col	A	02/02/2015
V47	Acelga	C	02/02/2015
V48	Lechuga	C	02/02/2015
V49	Espinaca	E	09/02/2015
V50	Acelga	E	09/02/2015
V51	Lechuga	B	09/02/2015
V52	Lechuga	B	09/02/2015
V53	Acelga	B	09/02/2015
V54	Acelga	C	16/02/2015
V55	Espinaca	C	16/02/2015
V56	Lechuga	C	16/02/2015
V57	Acelga	D	16/02/2015
V58	Lechuga	D	16/02/2015
V59	Acelga	E	23/02/2015
V60	Lechuga	E	23/02/2015
V61	Lechuga	F	23/02/2015
V62	Espinaca	B	23/02/2015
V63	Acelga	B	23/02/2015
V64	Acelga	B	02/03/2015
V65	Espinaca	B	02/03/2015
V66	Acelga	F	02/03/2015
V67	Lechuga	F	02/03/2015
V68	Espinaca	F	02/03/2015
V69	Lechuga	F	09/03/2015
V70	Espinaca	F	09/03/2015
V71	Acelga	F	09/03/2015
V72	Lechuga	B	09/03/2015
V73	Lechuga	E	09/03/2015

V74	Espinaca	C	22/03/2015
V75	Acelga	C	22/03/2015
V76	Lechuga	C	22/03/2015
V77	Espinaca	B	22/03/2015
V78	Lechuga	B	22/03/2015
V79	Lechuga	C	15/04/2015
V80	Acelga	C	15/04/2015
V81	Espinaca	C	15/04/2015
V82	Lechuga	F	15/04/2015
V83	Acelga	F	15/04/2015
V84	Espinaca	F	20/04/2015
V85	Lechuga	F	20/04/2015
V86	Acelga	F	20/04/2015
V87	Lechuga	E	20/04/2015
V88	Acelga	E	20/04/2015
V89	Lechuga	B	04/05/2015
V90	Acelga	B	04/05/2015
V91	Espinaca	B	04/05/2015
V92	Lechuga	F	04/05/2015
V93	Espinaca	F	04/05/2015
V94	Espinaca	C	18/05/2015
V95	Acelga	C	18/05/2015
V96	Lechuga	B	18/05/2015
V97	Acelga	B	18/05/2015
V98	Acelga	E	25/05/2015
V99	Lechuga	E	25/05/2015
V100	Lechuga	E	25/05/2015

ANEXO VI: DATOS DE SENSIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS DE LOS AISLADOS DE *ARCOBACTER*

Tabla 1. Aislados de moluscos

Aislado	Especie	Difusión en disco		E-test		R/S
		Diámetro (mm)		CMI (µg/ml)		
		LEV	CIP	LEV	CIP	
M6C1	<i>A. butzleri</i>	39	40	.064	.047	S
M12C2	<i>A. butzleri</i>	44	42	.94	.64	S
M12C3	<i>A. butzleri</i>	42	40	.094	.094	S
M28C1	<i>A. cryaerophilus</i>	45	44	.064	.047	S
M29C3	<i>A. cryaerophilus</i>	38	40	.047	.016	S
M34C2	<i>A. cryaerophilus</i>	45	47	.032	.016	S
M34C3	<i>A. cryaerophilus</i>	38	40	.047	.032	S
M40C2	<i>A. cryaerophilus</i>	36	40	.064	.064	S
M43C1	<i>A. cryaerophilus</i>	38	40	.064	.064	S
M45C2	<i>A. cryaerophilus</i>	54	48	.047	.023	S
M46C1	<i>A. cryaerophilus</i>	29	28	.064	.032	S
M53C1	<i>A. cryaerophilus</i>	39	42	.047	.047	S
M55C2	<i>A. cryaerophilus</i>	30	32	.064	.094	S
M58C1	<i>A. cryaerophilus</i>	48	51	.047	.032	S
M63C1	<i>A. cryaerophilus</i>	38	45	.064	.047	S
M66C1	<i>A. butzleri</i>	38	43	.032	.032	S
M67C2	<i>A. defluvii</i>	35	37	.047	.016	S
M68C1	<i>A. cryaerophilus</i>	30	33	.064	.064	S
M71C1	<i>A. butzleri</i>	35	41	.064	.064	S
M71C2	<i>A. butzleri</i>	42	44	.064	.047	S
M74C1	<i>A. cryaerophilus</i>	42	48	.032	.032	S
M74C2	<i>A. cryaerophilus</i>	38	42	.064	.047	S
M79C1	<i>A. cryaerophilus</i>	41	41	.094	.047	S
M80C1	<i>A. cryaerophilus</i>	35	35	.064	.047	S
M80C2	<i>A. butzleri</i>	35	35	.047	.023	S
M83C2	<i>A. butzleri</i>	35	37	.047	.016	S

M84C1	<i>A. butzleri</i>	36	34	.032	.016	S
M85C1	<i>A. butzleri</i>	40	40	.094	.032	S
M86C1	<i>A. cryaerophilus</i>	35	37	.064	.016	S
M87C1	<i>A. butzleri</i>	45	42	.016	.006	S
M87C2	<i>A. butzleri</i>	39	37	.032	.016	S
M90C2	<i>A. butzleri</i>	36	39	.012	.016	S
M91C1	<i>A. butzleri</i>	37	40	.047	.016	S
M91C3	<i>A. butzleri</i>	43	42	.064	.012	S
M92C1	<i>A. butzleri</i>	32	40	.064	.047	S
M92C2	<i>A. butzleri</i>	35	39	.094	.064	S
M93C1	<i>A. defluvii</i>	35	37	.032	.032	S
M95C1	<i>A. butzleri</i>	34	40	.064	.047	S
M95C2	<i>A. butzleri</i>	38	39	.064	.032	S
M96C3	<i>A. defluvii</i>	43	45	.064	.032	S
M98C3	<i>A. cryaerophilus</i>	36	36	.032	.023	S
M99C1	<i>A. butzleri</i>	37	39	.047	.023	S
M102C1	<i>A. butzleri</i>	27	30	.019	.064	S
M102C2	<i>A. butzleri</i>	2	2	≥32	≥32	R
M102C3	<i>A. butzleri</i>	0	1	≥32	≥32	R
M103C1	<i>A. butzleri</i>	0	0	≥32	≥32	R
M106C1	<i>A. defluvii</i>	32	34	.094	.094	S
M106C2	<i>A. defluvii</i>	32	35	.125	.094	S
M108C4	<i>A. butzleri</i>	30	31	.125	.094	S
DSM 8739	<i>A. butzleri</i>	45	47	.047	.069	S

Tabla 2. Aislados de verduras

Aislado	Especie	Difusión en disco		E-test		R/S
		Diámetro (mm)		CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
		LEV	CIP	LEV	CIP	
V1C2	<i>A. cryaerophilus</i>	53	50	.047	.032	S
V5C1	<i>A. cryaerophilus</i>	38	35	.047	.032	S
V10C1	<i>A. cryaerophilus</i>	62	58	.047	.047	S
V12C1	<i>A. cryaerophilus</i>	33	34	.032	.023	S
V17C2	<i>A. butzleri</i>	45	45	.064	.032	S
V22C1	<i>A. butzleri</i>	45	47	.019	.064	S
V22C2	<i>A. butzleri</i>	43	45	.125	.64	S
V22C3	<i>A. butzleri</i>	42	45	.25	.094	S
V25C1	<i>A. cryaerophilus</i>	45	45	.012	.012	S
V32C1	<i>A. cryaerophilus</i>	34	35	.125	.094	S
V36C1	<i>A. butzleri</i>	32	35	.094	.047	S
V38C1	<i>A. cryaerophilus</i>	46	45	.032	.023	S
V38C2	<i>A. butzleri</i>	60	63	.064	.032	S
V41C1	<i>A. cryaerophilus</i>	37	40	.047	.032	S
V62C1	<i>A. butzleri</i>	45	42	.023	.004	S
V62C3	<i>A. butzleri</i>	33	35	.125	.047	S
V65C2	<i>A. butzleri</i>	40	40	.047	.023	S
V65C3	<i>A. butzleri</i>	37	40	.023	.016	S
V68C1	<i>A. butzleri</i>	47	48	.064	.032	S
V74C1	<i>A. butzleri</i>	38	43	.094	.032	S
V93C1	<i>A. butzleri</i>	28	30	.19	.125	S
V93C2	<i>A. butzleri</i>	0	0	12	8	R
V93C4	<i>A. butzleri</i>	2	3	≥ 32	≥ 32	R
V94C3	<i>A. butzleri</i>	32	33	.064	.032	S
V94C4	<i>A. butzleri</i>	31	32	.064	.047	S
DSM 8739	<i>A. butzleri</i>	45	47	.047	.069	S

ANEXO VII: DIRECCIONES DE INTERÉS EN INTERNET

Direcciones de grupos especializados consultadas en este trabajo:

Dirección	Portal
National Center for Biotechnology Information (USA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/
European Molecular Biology Laboratory (Europe)	www.embl.org/
Food and Drug Administration	http://www.fda.gov/
Infectious Disease Society of America	www.idsociety.org
Infectious Disease Surveillance Center	http://idsc.nih.go.jp/
Centres for Disease Control and Prevention	http://www.cdc.gov/
European <i>Helicobacter</i> Study Group	http://www.helicobacter.org/
The <i>Helicobacter</i> Foundation	www.helico.com
Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica - SEIMC	http://www.seimc.org/
Clinical and Laboratory Standard Institute	http://clsi.org/
Asociación Latinoamericana de Microbiología	http://www.microbiologialatinoamericana.org/

Buscadores de publicaciones periódicas utilizados en este trabajo:

Dirección	Portal
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
BioMedNet Journal Collection	http://journals.bmn.com/journals
Science Direct	www.sciencedirect.com/
Biblioteca UPV	www.upv.es/revistas/

Herramientas de análisis:

Dirección	Portal
BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
REBASE	http://rebase.neb.com/rebase/rebase.htm