



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias Biológicas

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Luis Collado González.
Instituto de Bioquímica y Microbiología
Facultad de Ciencias.

EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PERTENECIENTES AL GÉNERO ARCOBACTER

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ciencias Biológicas.

ZIHOMARA MADELINE ROJAS SANTANA

VALDIVIA — CHILE
2011

A mis queridos padres...

AGRADECIMIENTOS

En primer, lugar quisiera agradecer al Instituto de Bioquímica y Microbiología de la Universidad Austral de Chile por brindarme la oportunidad y las herramientas necesarias para realizar este trabajo de investigación.

En forma especial, agradezco a mi profesor Patrocinante, el Dr. Luis Collado González por su apoyo, preocupación, exigencia y dedicación al enseñarme y guiarme durante este proceso, le agradezco de todo corazón.

Además, agradezco a todos los docentes del Instituto, en forma particular al profesor Valenzuela, profesor Leiva, Armin, a la Profe Isabel y Mónica, ya que, cada vez que los necesité estuvieron dispuestos a guiarme y ayudarme. Sin duda agradezco grandemente a Ronaldi por haber sido parte de este trabajo, por su acogida en el laboratorio, por su ayuda y amistad, gracias!!!

Agradezco a mis queridos padres por su incondicional apoyo y esfuerzo por entregarme lo mejor, por ayudarme durante esta etapa y por acompañarme cada vez a tomar muestras y hacer de esas tardes bellos momentos para disfrutar en familia. A mis hermanos Jerson, Jacsi y Vicente por su cariño y ayuda durante este trabajo. A mi querido Fabián por estar a mi lado siempre, por su ayuda, ánimo y sobre todo por su amor. A todos mis amigos y compañeros que siempre se preocuparon por darme ánimo y aliento, en especial a mi amiga Estefy por escucharme y apoyarme siempre, Muchas gracias!!!

Finalmente agradezco a todas las personas que hicieron posible este trabajo, a todos aquellos que me permitieron acceder a sus campos para tomar muestras y se interesaron por el presente estudio. A todos muchas gracias porque de alguna u otra manera fueron importante para mi durante todo este tiempo.

INDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Páginas
INDICE DE CONTENIDOS	I
INDICE DE TABLAS.....	IV
INDICE DE FIGURAS.....	V
INDICE DE ABREVIACIONES.....	VI
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCION	3
3.1 Taxonomía	3
3.2 Importancia clínica	6
3.2.1 Infección en humanos.....	6
3.2.2 Factores de virulencia	10
3.2.3 Infección en animales	11
3.3 Vías de transmisión	13
3.3.1 Transmision por los alimentos.....	14
3.3.2 Transmisión por el agua.....	15
3.3.3 Transmisión por contacto en animales	16
3.3.4 Transmisión persona a persona	16

3.4 Aislamiento y detección.....	16
3.5 Identificación.....	17
3.6 Hipótesis.....	20
3.7 Objetivos.....	20
3.7.1 Objetivo general.....	20
3.7.2 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIALES Y METODOS.....	21
4.1 Cepas tipo y de referencia.....	21
4.2 Cepas obtenidas de otros estudios.....	22
4.3 Muestras biológicas.....	22
4.4 Aislamiento de <i>Arcobacter</i>	22
4.5 Extracción de DNA.....	23
4.6 Genotipificación.....	23
4.7 Identificación molecular.....	24
4.7.1 PCR múltiple.....	24
4.7.2 PCR-RFLP.....	25
4.7.3 PCR específico del género <i>Arcobacter</i>	27
4.7.4 Secuenciación del gen <i>rpoB</i>	28
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Aislamiento de <i>Arcobacter</i> en muestras fecales.....	30

5.2 Tipificación de las cepas aisladas	31
5.3 Comparación entre m-PCR y PCR-RFLP	33
5.4 PCR de género y secuenciación del gen <i>rpoB</i>	39
6 DISCUSION	41
6.1 Prevalencia de <i>Arcobacter</i> en muestras fecales	41
6.2 Caracterización fenotípica y molecular	42
6.3 Conclusiones	46
7. LITERATURA CITADA	48

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Reporte de casos clínicos humanos por <i>Arcobacter</i>	8
TABLA 2: Prevalencia de <i>Arcobacter</i> en muestras fecales humanas.....	9
TABLA 3: Prevalencia de <i>Arcobacter</i> en muestras fecales de diversos animales domésticos....	13
TABLA 4: Comparación de los métodos m-PCR y PCR-RFLP para la identificación de <i>Arcobacter</i> spp.	19
TABLA 5: Cepas tipo y de referencia utilizadas en este estudio... ..	21
TABLA 6: Primers utilizados en este estudio.....	29
TABLA 7: Prevalencias de especies de <i>Arcobacter</i> aisladas de muestras fecales de ganado bovino, ovino y porcino.	32
TABLA 8: Identificación por m-PCR y PCR-RFLP de las cepas obtenidas de las muestras fecales.....	35
TABLA 9: Identificación por m-PCR y PCR-RFLP de las cepas obtenidas de otros estudios....	37
TABLA 10: Resumen de los resultados de la identificación molecular por m-PCR y PCR-RFLP de las cepas aisladas y obtenidas de otros estudios.....	38
TABLA 11: Comparación de los métodos de identificación m-PCR y PCR RFLP en cepas tipo y de referencia del género <i>Arcobacter</i>	38
TABLA 12: Resultados de la similitud del gen <i>rpoB</i> obtenidos mediante el programa BlastN...40	40

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Árbol filogenético basado en las secuencias (1400 pb) del gen 16S rRNA	5
FIGURA 2: Mecanismos de virulencia descritos para <i>Arcobacter</i>	11
FIGURA 3: Gel de agarosa al 2% mostrando los tamaños de los productos obtenidos por m-PCR	25
FIGURA 4: Gel de agarosa al 3% mostrando los patrones de restricción obtenidos mediante PCR-RFLP.....	27
FIGURA 5: Colonias de <i>Arcobacter</i> sembradas en agar sangre.	30
FIGURA 6: Gel de agarosa al 2% mostrando los genotipos de algunas cepas según el método ERIC-PCR	31
FIGURA 7: Gel de agarosa al 3% mostrando los patrones de restricción atípicos obtenidos para algunas cepas según el PCR-RFLP.....	34
FIGURA 8: Árbol filogenético basado en las secuencias (524 pb) del gen <i>rpoB</i>	40

INDICE DE ABREVIACIONES

AFLP	Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos Amplificados
CAT	Cefoperazona- Amfotericina B- Teicoplanina
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
DEPC	Di-etil pirocarbonato
DGGE	Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DSMZ	Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares
ERIC	Secuencias repetidas intergénicas de consenso en enterobacterias
LMG	Colección de bacterias del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ghent, Bélgica
m-PCR	PCR múltiple
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismos de Tamaños de Fragmentos de Restricción
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil sulfato sódico
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1. RESUMEN

El género *Arcobacter* corresponde a un grupo de microorganismos bacterianos de gran importancia para la salud de humanos y animales, pues algunos de sus miembros han sido considerados enteropatógenos emergentes y potenciales agentes zoonóticos. Recientemente han sido propuestos dos métodos moleculares (m-PCR y PCR-RFLP) para la identificación de especies de éste género, sin embargo ambos métodos han sido evaluados sólo en un número limitado de cepas. Por lo cual, el objetivo de esta investigación fue evaluar la especificidad de ambos métodos en un amplio número de cepas de diferentes orígenes. Para esto, se analizaron cepas aisladas de muestras fecales de ganado bovino, ovino y porcino, cepas aisladas de mariscos y cepas tipo y de referencia del género *Arcobacter*.

Arcobacter fue aislado en un 26,6%, 6,6% y un 20% de las muestras fecales de ganado bovino, ovino y porcino, respectivamente. La especie más prevalente fue *A. cryaerophilus*, seguida de *A. butzleri*, *A. skirrowii*, y *A. defluvii*. La identificación molecular por m-PCR y PCR-RFLP, originó la misma identidad para 37 de las 59 cepas de campo estudiadas. Las incongruencias observadas en las demás cepas fueron aclaradas por secuenciación del gen *rpoB*. Se observó que el m-PCR fue el método más específico, pues identificó correctamente a la mayoría de las cepas estudiadas. Sin embargo, ésta es una técnica limitada pues solo permite la identificación de 5 especies *Arcobacter*, mientras que el PCR-RFLP, aunque presentó menor especificidad, es la técnica que permite discriminar la mayoría de las especies de este género. Por lo que se sugiere la utilización de ambos métodos en paralelo para garantizar la correcta identificación de las cepas analizadas. Por otra parte, este estudio demuestra la necesidad de la creación de un nuevo método que permita discriminar entre todas las especies del género *Arcobacter*.

2. SUMMARY

The genus *Arcobacter* corresponds to a group of bacterial microorganism of increasing importance for humans and animals health, because some of its members have been considered emerging opportunist enteropathogens and potential zoonotic agents. Recently two molecular methods (m-PCR and PCR-RFLP) have been proposed for the identification of species belonging to this genus, however both methods have been assessed only in a limited number of strains. Therefore, the aim of this research was to assess the specificity of both methods on a wide number of strains of different origins. For that, were analyzed a group of strains isolated from fecal samples of cattle, sheep and pigs, as well as strains recovered from shellfish and type and reference strains of genus *Arcobacter*.

Arcobacter was isolated on 26,6%, 6,6% and 20% of the fecal samples of cattle, sheep and pigs, respectively. The most prevalent species was *A. cryaerophilus*, followed by *A. butzleri*, *A. skirrowii* and *A. defluvii*. The molecular identification by PCR-RFLP and by m-PCR reported the same identity for 37 out of 59 of the field strains. The observed inconsistencies in the other strains were clarified by sequencing of *rpoB* gene. It was observed that m-PCR is was the most specific method, because identified effectively the majority of the studied strains. However, is a limited technique because only allows the identification of 5 species of the genus *Arcobacter*, whereas that PCR-RFLP technique, although it presents less specificity, is the technique that allows to differentiate among the majority of the species of this genus. Therefore, it is suggested the utilization of both methods in parallel to obtain a correct identification of the studied strains. On the other hand, our results underscoring the need for the creation of a new method to discriminate between all species of the genus *Arcobacter*.

3. INTRODUCCION

Arcobacter es un género bacteriano que se caracteriza por poseer microorganismos de vida libre que se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente como también formando parte de la microbiota intestinal de diversas especies animales (McClung y col., 1983; Donachie y col., 2005; Ho y col., 2008). Actualmente, éste género cuenta con 12 miembros, entre los cuales se encuentran las especies patógenas *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* y *Arcobacter skirrowii*, las que pueden causar infección en humanos y animales (Vandenberg y col., 2004; Van Driessche y col., 2003; Wybo y col., 2004). El género *Arcobacter* posee bacterias de morfología bacilar y ligeramente curva, helicoidal o en forma de la letra “S”; Gram negativas, no esporuladas; con un tamaño de 0,2-0,9 µm de diámetro y de 1-3 µm de largo, móviles por presencia de un flagelo polar ubicado en uno o ambos extremos de la célula, el cual le otorga movimiento con giros rápidos en forma de sacacorchos (Vandamme y col., 1992). Estas bacterias son capaces de crecer bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas y en un rango de temperaturas que comprende entre los 15 a 37°C, aunque algunas cepas pueden crecer incluso a 42°C. Sin embargo, el crecimiento óptimo se produce a 30°C en condiciones de microaerofilia, es decir, en una atmosfera con un 3-10% de oxígeno (Ho y col., 2006), desarrollando colonias pequeñas y no pigmentadas a las 48-72 h de incubación (Vandamme y col., 1992).

3.1 Taxonomía

El género *Arcobacter* junto a los géneros *Campylobacter* y *Sulfurospirillum* conforman la familia *Campylobacteraceae* (Vandamme y De Ley, 1991b). El primer aislamiento de *Arcobacter* fue registrado en el año 1977 por Ellis y col., denominando “*Vibrio/spirillum*” a los microorganismos

aislados, los que fueron obtenidos a partir de muestras de abortos bovinos (Ellis y col., 1977). Estudios posteriores llevaron a clasificar a estos microorganismos como “*Campylobacter* aerotolerantes” debido a la semejanza fenotípica con el género *Campylobacter* (Ho y col., 2006). Sin embargo, a diferencia de miembros de este último género, los nuevos aislamientos presentaron la capacidad de crecer en aerobiosis y a menores temperaturas (On, 2001). Posteriormente, en el año 1991, se reclasificaron los *Campylobacter* aerotolerantes como un nuevo género bacteriano denominado *Arcobacter* incluyendo a las dos primeras especies: *Arcobacter cryaerophilus* y *Arcobacter nitrofigilis* (Vandamme y col., 1991a), distinguiéndose dos grupos para la especie *A. cryaerophilus*, denominados 1A y 1B, los que han sido definidos como tales tras diversos estudios como análisis de Polimorfismos de Tamaños de Fragmentos de Restricción (RFLP) de los genes 16S y 23S del rRNA, perfil proteico (SDS-PAGE), perfil de ácidos grasos de las célula bacteriana (FAME) y análisis de Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) (Kiehlbauch y col., 1991; On y col., 2003; Vandamme y col., 1992). Sin embargo, hasta el momento ambos grupos no han sido reconocidos como taxones diferentes debido a la compleja estructura taxonómica de esta especie y a la falta de test bioquímicos que diferencien claramente estos grupos (Debruyne y col., 2010). En cuanto a las prevalencias de ambos grupos, la mayoría de los estudios indican comúnmente al grupo 1B de esta especie, más prevalente que el grupo 1A (Collado y col., 2009b; Son y col., 2007; Schroeder-Tucker y col., 1996). Posteriormente, otras especies han sido adicionadas a este género tales como *Arcobacter skirrowii* y *Arcobacter butzleri*, ambas aisladas de muestras clínicas humanas y de animales de granja (Vandamme y col., 1992). En los años siguientes fueron descritas varias especies nuevas, tales como: *Arcobacter cibarius*, aislada de muestras de piel de pollos en Bélgica (Houf y col., 2005); *Arcobacter halophilus*, aislada de una laguna hipersalina en Hawaii

(Donachie y col., 2005); *Arcobacter mytili*, aislada de moluscos en España (Collado y col., 2009a); *Arcobacter thereius*, aislada de muestras de aborto porcino y muestras cloacales de pato en Bélgica (Houf y col., 2009); *Arcobacter marinus* aislada de aguas marinas en Corea (Kim y col., 2010); *Arcobacter trophiarum* aislada de muestras fecales de cerdo en Bélgica (De Smet y col., 2010) y *Arcobacter defluvii* aislada de aguas residuales en España (Collado y col., 2011). Por último, recientemente ha sido descrita la especie *Arcobacter molluscorum* aislada de mejillones y ostras en España (Figueras y col., 2011). La relación filogenética que existe actualmente entre todas las especies del género *Arcobacter* puede ser apreciada en la Figura 1.

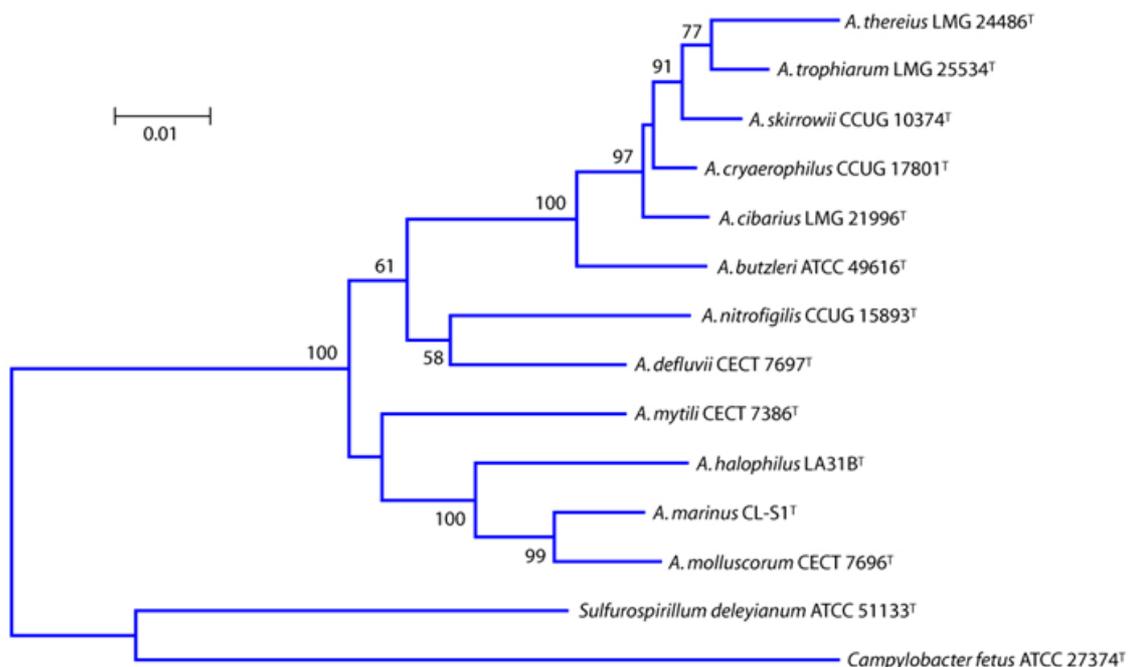


FIGURA 1. Árbol filogenético basado en las secuencias (1400 pb) del gen 16S rRNA.

Fuente: Collado y Figueras, 2011.

3.2 Importancia clínica

En los últimos años, el género *Arcobacter* ha adquirido una mayor relevancia debido a que algunos de sus miembros han sido considerados enteropatógenos oportunistas emergentes y potenciales agentes zoonóticos (Ho y col., 2006; Collado y col., 2009b; Wesley y Miller, 2010), esto debido a que ciertas especies han sido aisladas de muestras fecales de personas con diarrea y en algunos casos en personas con bacteremia, endocarditis y peritonitis, aunque también han sido aisladas de muestras fecales de personas asintomáticas (Fera y col., 2010; Fernández y col., 2004; Houf y Stephan, 2007; Hsueh y col., 1997; Lau y col., 2002; Lerner y col., 1994; Samie y col., 2007).

3.2.1 Infección en humanos

Diversos casos clínicos han indicado que *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* son las principales especies asociadas a enfermedad gastrointestinal (Burnens y col., 1992; Lerner y col., 1994; Wybo y col., 2004). Sin embargo, al menos en dos estudios se ha asociado también a *A. skirrowi* con infecciones en humanos. Uno de estos estudios registrado en Bélgica, afectó a un paciente con diarrea crónica (Wybo y col., 2004) y el segundo caso registrado en Sudáfrica, realizado en heces afectó a pacientes con y sin VIH (Samie y col., 2007). La Tabla 1, muestra los casos clínicos asociados a *Arcobacter*, siendo la diarrea acuosa y persistente el principal síntoma (Collado y Figueras, 2011). Recientemente, se ha asociado a *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* como agentes etiológicos de la llamada “diarrea del viajero” que afecta a millones de turistas cada año, el estudio realizado por Jiang y col. (2010) reveló que *A. butzleri* presenta una prevalencia de 8% en viajeros con diarrea aguda en México, Guatemala e India, por lo cual éste microorganismo se

incorpora como un agente patógeno responsable de esta enfermedad (Houf y Sthephan, 2007; Jiang y col., 2010). Por los antecedentes mencionados la International Commission on Microbiological Specifications for Foods ha considerado a *A. butzleri* como un serio peligro para la salud humana (ICMSF, 2002).

Los estudios de población han mostrado prevalencias de *Arcobacter* en muestras fecales humanas entre 0,1 y 3% en Sudáfrica e Italia respectivamente (Tabla 2). Sin embargo, debido a los escasos estudios que han sido publicados no es posible determinar si las prevalencias varían de forma significativa entre países desarrollados y en vías de desarrollo.

En la mayoría de los estudios se ha observado que la especie más prevalente es *A. butzleri* seguida de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*, tal como lo ha demostrado Samie y col. (2007) en un estudio realizado en muestras fecales humanas en Sudáfrica con prevalencias de 6,2% para *A. butzleri*, 2,9% para *A. cryaerophilus* y 1,9% para *A. skirrowii*; esta misma tendencia con respecto a las prevalencias se da en estudios de muestras de aguas, mariscos, heces de animales, entre otros. (Collado y col., 2010; Collado y col., 2009b; Van Driessche, 2003).

TABLA 1. Reporte de casos clínicos humanos por *Arcobacter*.^a

País	Sexo y edad del paciente	Síntomas clínicos	Especies detectadas	Referencia
Chile	Hombre, 2.6 años; Mujer, 1 año	Diarrea crónica	<i>A. butzleri</i>	Fernández y col., 2004
Bélgica	Hombre, 73 años	Diarrea crónica	<i>A. skirrowii</i>	Wybo y col., 2004
Hong Kong	Mujer, 69 años	Bacteremia	<i>A. butzleri</i>	Lau y col., 2002
Hong Kong	Hombre, 7 años	Bacteremia	<i>A. cryaerophilus</i>	Woo y col., 2001
Taiwán	Hombre, 60 años	Bacteremia	<i>A. butzleri</i>	Yan y col., 2000
Taiwán	Mujer, 72 años	Bacteremia	<i>A. cryaerophilus</i>	Hsueh y col., 1997
	Nonato	Bacteremia	<i>A. butzleri</i>	On y col., 1995
Alemania	Hombre, 48 años; Mujer, 52 años	Diarrea, calambres abdominales	<i>A. butzleri</i>	Lerner y col., 1994
Italia	Mujeres y hombres, 3 a 7 años	Dolor abdominal, vómito, fiebre	<i>A. butzleri</i>	Vandamme y col., 1992
	Mujer, 2 años	Gastroenteritis	<i>A. butzleri</i>	Burnens y col., 1992
Australia	Hombre, 35 años	Diarrea crónica	<i>A. cryaerophilus</i>	Tee y col., 1988

^a Fuente: Collado y Figueras, 2011.

TABLA 2. Prevalencia de *Arcobacter* en muestras fecales humanas. ^a

País	Muestras fecales ^b			Especies detectadas y/o aisladas	Síntomatología gastrointestinal	Referencia
	N	n	%			
EE.UU y Europa	201	16	8	<i>A. butzleri</i>	Diarrea	Jiang y col., 2010
Italia	99	46	46.5	<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	Asintomático	Fera y col., 2010
	99	3	3	<i>A. butzleri</i>	Asintomático	
Francia	345	4	1,2	<i>A. butzleri</i>	Diarrea	Adbelbaqi y col., 2007
	345	0				
Suiza	500	7	1.4	<i>A. cryaerophilus</i>	Asintomático	Houf y Stephan, 2007
Sudáfrica	322	35	11	<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> , <i>A. skirrowii</i>	Diarrea/Asintomático	Samie y col., 2007
India	400	5	1.25	<i>Arcobacter</i> spp.	Diarrea	Kownhar y col., 2007
Bélgica	67.599	77	0.1	<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	Diarrea y Asintomático	Vandenberg y col., 2004
Hong Kong	4.741	6	0.13	<i>A. butzleri</i>	Diarrea	Lau y col., 2002
Sudáfrica	300	1	0.3	<i>A. butzleri</i>	Diarrea	Lastovica y Le Roux, 2000
Sudáfrica	19.535	16	0.1	<i>A. butzleri</i>	Diarrea	Lastovica y Le Roux, 2000
Dinamarca	1.376	2	0.1	<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>	Diarrea	Engberg y col., 2000
Inglaterra	761	1	0.13	<i>A. cryaerophilus</i>	Diarrea	Tompkins y col., 1999
Tailandia	631	15	2.4	<i>A. butzleri</i>	Diarrea	Taylor y col., 1991
India	75	3	4	<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> , <i>A. skirrowii</i>	Diarrea	Patyal y col., 2011

^a Fuente: Collado y Figueras, 2011 y reportes posteriores.

^b N, número total de muestras; n, número de muestras positivas.

3.2.2 Factores de virulencia

Es escasa la información en cuanto a los mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia empleados por *Arcobacter*; aunque algunos estudios realizados en distintas líneas celulares han evidenciado la capacidad de adherencia, invasión y citotoxicidad de estos microorganismos (Ho y col., 2007; Johnson y Murano, 2002; Vandenberg y col., 2004). Sin embargo, es sabido que las diferencias respecto a la patogenicidad de *Arcobacter* podrían depender del origen de la cepa (clínica o ambiental) así como de la línea celular que se emplea para su estudio (Wesley y Miller., 2010). Wesley y col. (1996), indicó que *A. butzleri* puede ser la especie más invasiva en infecciones en animales. Los mecanismos por los cuales *A. butzleri* induce diarrea han sido investigados en células epiteliales de colon humano (HT-29/B6), indicando que se produce daño en la barrera epitelial por una reducción en la expresión de las proteínas Claudina-1, -5 y -8 así como la inducción de apoptosis epitelial dando lugar a la producción de diarrea (Bücker y col., 2009). Además, se ha observado producción de respuesta proinflamatoria inducida por la expresión de Interleuquina-8 en células epiteliales al ser enfrentadas a *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. cibarius* (Ho y col., 2007). La figura 2 resume los mecanismos de virulencia descritos para las especies patógenas del género *Arcobacter*.

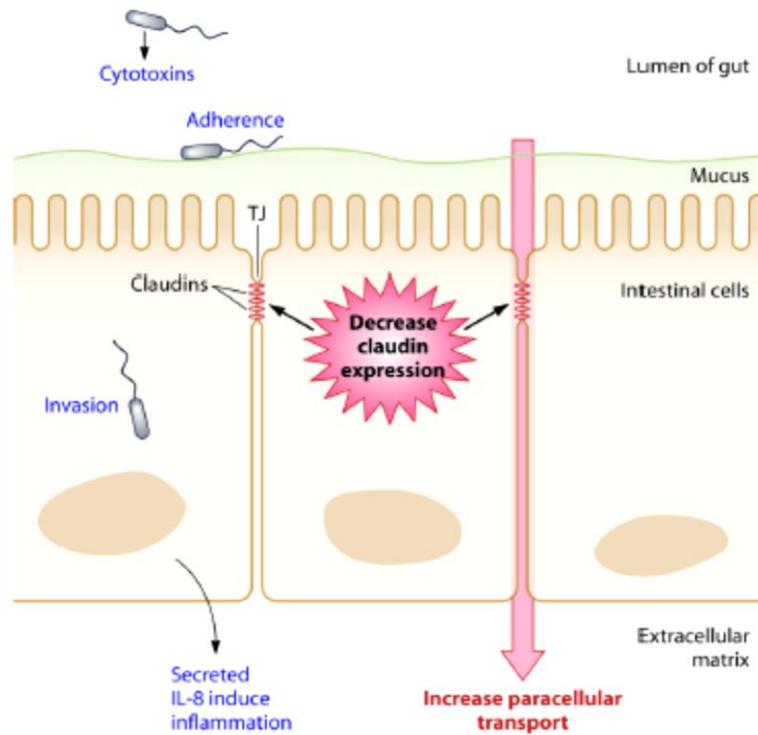


FIGURA 2. Mecanismos de virulencia descritos para *Arcobacter*.

Fuente: de Collado y Figueras, 2011.

3.2.3 Infección en animales

Las enfermedades producidas por *Arcobacter* en animales domésticos incluyen abortos, mastitis y diarrea (Logan y col., 1982; Vandamme y col. 1992). La especie comúnmente asociada a abortos en animales es *A. cryaerophilus*. Sin embargo, *A. butzleri* y *A. skirrowii* también han sido asociadas, pero con menor frecuencia (On y col., 2003). Por otra parte, *A. butzleri* ha sido vinculada a diarrea y enteritis en cerdos, vacunos y caballos, mientras que *A. skirrowii* se ha relacionado a diarrea y colitis hemorrágica en bovinos y ovinos (Ho y col., 2006). Sin embargo, *Arcobacter* también ha sido aislada frecuentemente del tracto intestinal y de muestras fecales de

una variedad de animales asintomáticos incluyendo aves de corral como pollos, gallinas, patos pavos y gansos (Ho y col., 2006), además en otras aves silvestres como pelicanos y gorriones (Fernández y col., 2007) y de ganado bovino, ovino y porcino (Tabla 3). El aislamiento de estos microorganismos también ha sido estudiado en animales salvajes, tales como macacos cola de cerdo (Russel y col., 1992), primate gibón plateado (Stirling y col., 2008), mapaches (Hamir y col., 2004), tortugas galápagos, rinocerontes, gacelas, ñandú y alpaca (Wesley y col., 2003).

En Chile, los estudios que se han hecho para examinar la prevalencia de estos microorganismos en heces de animales, han sido realizados principalmente en aves de corral, tales como gansos, gallinas, patos y pavos (Fernández y col., 2007; Jara, 2006) y en menos proporción en animales bovinos, ovinos y porcinos (Collado, 2007; Jara, 2006; Ruiz, 2005) los que son de gran importancia para la ganadería de nuestro país.

Tabla 3. Prevalencia de *Arcobacter* en muestras fecales de diversos animales domésticos.

Muestra fecal	n° de muestras estudiadas	% muestras positivas	Método de identificación	País	Referencia
Vacunos	332	3.6	PCR	Japón	Kabeya y col., 2003b
	200	4.5		EE.UU	Golla y col., 2002
	51	39	m-PCR	Bélgica	Van Driessche y col., 2003
	1682	1.,3	PCR	EE.UU	Wesley y col., 2000
	254	41.7		España	Vilar y col., 2010
	276	11	m-PCR	Bélgica	Van Driessche y col., 2005
	28	25	m-PCR	Chile	Fernández y col., 2007
	40	52.5	m-PCR	Chile	Ruiz, 2005
Ovejas	18	40	PCR	U.K.	Merga y col., 2011
	68	0	m-PCR	Turquía	Aydin y col., 2007
	62	16	m-PCR	Bélgica	Van Driessche y col., 2003
	35	2.9	m-PCR	Chile	Collado, 2007
Cerdos	250	10	PCR	Japón	Kaveya y col., 2003b
	82	44	m-PCR	Bélgica	Van Driessche y col., 2003
	63	21	PCR	India	Patyal y col., 2011
	40	60	m-PCR	Chile	Ruiz, 2005
Gallinas	63	38	m-PCR	Chile	Jara, 2006
	60	20	m-PCR	Chile	Fernández y col., 2007
	62	19.4	m-PCR	Chile	Collado, 2007
	50	0	m-PCR	Chile	Ruiz, 2005
Patos	20	15	m-PCR	Chile	Jara, M. G., 2006
	25	40	m-PCR	Chile	Fernández y col., 2007
	28	0	m-PCR	Chile	Collado, 2007
Pavos	21	29	m-PCR	Chile	Fernández y col., 2007
Perros	105	23	m-PCR	Chile	Jara, M. G., 2006
	267	1.9	m-PCR	Bélgica	Houf y col., 2008
	60	3.3	m-PCR	Chile	Fernández y col., 2007
	103	0	m-PCR	Chile	Collado, 2007
Gatos	32	0	m-PCR	Chile	Jara, 2006
	61	0	m-PCR	Bélgica	Houf y col., 2008

3.3 Vías de transmisión

Se ha propuesto que las principales vías de transmisión de *Arcobacter* hacia humanos y animales

son probablemente los alimentos de origen animal (carne y leche) y el agua contaminada, aunque esto no ha podido ser demostrado aún (Miller y col., 2009).

3.3.1 Transmisión por los alimentos

Diversos estudios han coincidido en que la prevalencia más alta de *Arcobacter* está dada en carne de pollos, seguido de carne de cerdo y de vacuno (Lehner y col., 2005), tal como lo demostró Collado y col. (2009b) con una prevalencia de 64,3%, 53% y 31,3% respectivamente. Estos estudios han sugerido que la contaminación de los productos alimenticios ocurre probablemente cuando las fecas de los animales toman contacto con éstos cuando están siendo procesados en el matadero (Aydin y col., 2007). Por otra parte también se ha aislado *Arcobacter* de mariscos tales como almejas, mejillones y ostras (Collado y col., 2009b; Figueras y col., 2011), observándose en todos estos estudios que la especie predominante es *A. butzleri* seguida de *A. cryaerophilus* y finalmente *A. skirrowii* (Lehner y col., 2005; Pentimalli y col., 2009; Collado y col., 2009b). Por otra parte, la presencia de *Arcobacter* en muestras de leche también ha sido reportada (Logan y col., 1982). Un estudio hecho por Pianta y col., (2007), encontró una prevalencia de 3,8% para *Arcobacter* en muestras de leche de animales con signos de mastitis en Brasil, mientras que en un reciente estudio hecho en Turquía también se reportó la prevalencia de *Arcobacter*, pero de bovinos lecheros sanos (Ertas y col., 2010). Es probable que una persona o animal se pueda infectar con *Arcobacter* al consumir dichos alimentos contaminados.

3.3.2 Transmisión por el agua

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 y col., 1999; Moreno y col., 2003; Fera y col., 2004; Morita y col., 2004), además, en plantas de tratamiento de agua potable, tal como observó Jacob y col. (1998), en un estudio desarrollado en Alemania y como también recientemente lo confirmó Collado y col. (2010), en un estudio realizado en España. La alta prevalencia de estos microorganismos en diferentes tipos de aguas hizo proponer recientemente que las especies de *Arcobacter* podrían ser autóctonas de ambientes acuáticos (Fera y col., 2004). Sin embargo, la prevalencia de estos microorganismos aumenta en aguas contaminadas con heces de humanos y animales en comparación con otras que no lo están (Collado y col., 2008), lo que se correlaciona con otros estudios donde se ha encontrado que *Arcobacter* es muy prevalente en heces de ganado y en efluentes provenientes de la ganadería (Chinivasagam y col., 2007). El agua potable ha sido señalada como un factor de riesgo importante en la adquisición de enfermedades diarreicas asociadas con *Arcobacter* (Fong y col., 2007; Collado y col., 2008). Se han descrito al menos tres brotes infecciosos, asociados a *Arcobacter* y al consumo de agua contaminada, el primero ocurrido en Idaho (Estados Unidos) afectando a un grupo de niños que presentaban diarrea, náuseas y vómitos (Rice y col., 1999). El segundo, ocurrido en Ohio (Estados Unidos) provocándose una masiva contaminación de las aguas subterráneas afectando a 1.450 personas (Fong y col., 2007) y el último, ocurrido en Eslovenia, causado por contaminación fecal del sistema de agua potable (Kopilovic y col., 2008). Además la contaminación fecal del agua puede estar influenciada por la subsistencia de *Arcobacter* en diversos tipos de tuberías de distribución de aguas como acero inoxidable, cobre y plástico por la capacidad de estas de formar biopelículas bacterianas según lo demostrado por

Assanta y col. (2002). Aunque son pocos los estudios de la presencia de *Arcobacter* en aguas residuales, se ha verificado que no hay detección de este microorganismo finalizado el proceso de tratamiento de éstas aguas (Collado y col., 2010).

3.3.3 Transmisión por contacto con animales

Por otra parte, el hecho de que especies del género *Arcobacter* se hallan aislados de muestras fecales y fluido oral de animales domésticos como perros y gatos (Tabla 3), sugiere que estos podrían ser una importante ruta de difusión de *Arcobacter* al ambiente y al ser humano (Fera y col., 2009; Fernández y col., 2007).

3.3.4 Transmisión persona a persona

Se ha sugerido que se podrían dar las condiciones para la transmisión de *Arcobacter* desde una persona infectada a otra, debido al reporte de un par de casos clínicos específicos (Vandamme y col., 1993; On y col., 1995). En el primer caso, ocurrido en Italia, todas las cepas aisladas de los 10 pacientes afectados mostraron el mismo fenotipo y genotipo (Vandamme y col., 1992; 1993) y el segundo caso hace referencia a un recién nacido presumiblemente infectado a través de la placenta (On y col., 1995), en ambos casos clínicos la especie aislada fue *A. butzleri*.

3.4 Aislamiento y detección

El estudio de la prevalencia de las especies *Arcobacter* vinculadas a cuadros clínicos está constantemente entorpecido debido a dos grandes problemas que son: el aislamiento de

Arcobacter (debido a la inexistencia de medios de cultivos y procedimientos apropiados) y la identificación de las cepas aisladas.

A pesar de que se han utilizado varios medios de cultivo y diversos procedimientos para aislar *Arcobacter* de diferentes tipos de muestras, hasta ahora no ha sido propuesto un método óptimo para todas las especies del género (Collado y Figueras, 2011). Los procedimientos más comunes para el aislamiento de *Arcobacter* constan de una etapa de enriquecimiento en un medio selectivo y una posterior filtración del medio de cultivo sobre agar sangre, sin embargo se ha planteado que la etapa de enriquecimiento reduce la diversidad de especies *Arcobacter* y favorece la detección de especies con crecimiento más rápido como *A. butzleri* (Collado y Figueras, 2011).

3.5 Identificación

La identificación fenotípica de las especies del género *Arcobacter* resulta confusa y cuestionable debido a varias razones, entre ellas, el hecho que *Arcobacter* presenta características morfológicas muy parecidas a *Campylobacter*, además éstos microorganismos no utilizan carbohidratos por lo cual se reducen los test bioquímicos de utilidad en taxonomía y también debido a que algunos aislamientos presentan reacciones atípicas en los escasos test disponibles (Atabay y col., 2006). Es por esto, que han sido desarrollados varios métodos moleculares para la identificación a nivel de género y especie (Collado y col., 2008), aunque ninguno de estos permite la identificación de las 12 especies actualmente aceptadas en el género. De entre los métodos moleculares es posible mencionar: PCR-RFLP (González y col., 2009; Hurtado y Owen, 1997; Kärenlampi y col., 2004; Marshall y col., 1999), m-PCR (PCR múltiple) (Harmon y Wesley 1997; Houf y col., 2000; Kabeya y col., 2003a) y PCR-DGGE (Petersen y col., 2007),

todos dirigidos a la amplificación de los genes 16S o 23S del rRNA. Recientemente, dos nuevos métodos de identificación han sido publicados, el primero propuesto por Figueras y col. (2008), el cual consiste en un PCR-RFLP destinado a la identificación de seis especies del género: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. halophilus*, *A. nitrofigilis* y *A. cibarius*, pero que también identifica algunas de las especies descritas después de la publicación del método: *A. mytili*, *A. marinus*, *A. defluvii* y *A. molluscorum*, produciendo un patrón específico para cada una de estas especies (Figueras y col., 2011) El segundo método propuesto por Doudah y col. (2010), el cual consiste en un m-PCR para el gen 23S del rRNA y que permite la identificación de cinco especies correspondientes a: *A. butzleri*, *A. thereius*, *A. cibarius*, *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus*. Ambos métodos (m-PCR y PCR-RFLP) son los que actualmente permiten la caracterización de la mayoría de las especies del género *Arcobacter*. Sin embargo, se han encontrado reacciones inespecíficas en ambos métodos (Tabla 4). Además, hasta el momento estos métodos sólo han sido evaluados en un número limitado de cepas. Por este motivo, el presente estudio propone la evaluación de estos dos métodos respecto a su capacidad para caracterizar correctamente (a nivel de especie) un grupo de cepas de *Arcobacter* sp. aisladas de diversos orígenes, tales como muestras fecales de animales, cepas obtenidas en otros estudios, como también cepas tipo y de referencia del género *Arcobacter*.

Tabla 4. Comparación de los métodos m-PCR y PCR-RFLP para la identificación de *Arcobacter* spp.

Método	Gen	Especies que discrimina	Comentario	Referencia
m-PCR	23S rRNA	<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> , <i>A. skirrowii</i> , <i>A. cibarius</i> , <i>A. thereius</i>	La nueva especie <i>A. defluvii</i> produce la misma banda que <i>A. butzleri</i> (Collado y col., 2011)	Douidah y col., 2010
PCR-RFLP	16S rRNA	<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> 1A, <i>A. cryaerophilus</i> 1B, <i>A. skirrowii</i> , <i>A. cibarius</i> , <i>A. nitrofigilis</i> , <i>A. halophilus</i> .	La nueva especie <i>A. thereius</i> muestra el mismo patrón de restricción que <i>A. butzleri</i> (Houf y col., 2009). Patrones específicos fueron obtenidos para las nuevas especies <i>A. mytili</i> (Collado y col., 2009a), <i>A. defluvii</i> (Collado y col., 2011) <i>A. marinus</i> y <i>A. molluscorum</i> (Figueras y col., 2011)	Figueras y col., 2008

3.6 HIPOTESIS

En base a los antecedentes expuestos anteriormente, es que se plantea la siguiente hipótesis:

“Las técnicas moleculares de identificación, m-PCR y PCR-RFLP diseñadas para la identificación de *Arcobacter*, son capaces de caracterizar apropiadamente a nivel de especie aislamientos de diversos orígenes”

3.7 OBJETIVOS

3.7.1 Objetivo general:

Evaluar la especificidad de los métodos de identificación molecular m-PCR y PCR-RFLP, al aplicarlos en cepas aisladas de diversos orígenes.

3.7.2 Objetivos específicos:

- Aislar *Arcobacter* a partir de muestras fecales de bovinos, ovinos y porcinos.
- Tipificar los aislamientos mediante ERIC-PCR.
- Identificar las cepas aisladas en la presente investigación como también las obtenidas de otros estudios, mediante m-PCR y PCR-RFLP.

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1 Cepas tipo y de referencia:

Se analizaron un conjunto de 12 cepas tipo y 5 cepas de referencias, representativas de todas las especies de *Arcobacter* actualmente aceptadas, obtenidas de las colecciones bacterianas belga (LMG), española (CECT) y alemana (DSMZ). El origen y otras características de estas cepas pueden ser observados en la Tabla 5.

TABLA 5. Cepas tipo y de referencia utilizadas en este estudio.

Especies	Cepa tipo	Otras designaciones	Origen	País
<i>A. butzleri</i>	LMG 10828	ATCC 49616, CCUG 30485	Heces de humanos	EE.UU
<i>A. cryaerophilus</i> 1A	LMG 9904	CCUG 17801, LMG 7536	Feto de aborto bovino	Irlanda
<i>A. skirrowii</i>	LMG 6621	ATCC 51132, CCUG 10374	Heces de corderos con diarrea	
<i>A. nitrofigilis</i>	CECT 7204	ATCC 33309, LMG 7604	Raíces de <i>Spartina alterniflora</i>	Canadá
<i>A. cibarius</i>	CECT 7203	CCUG 48482, LMG 21996	Piel de pollos	Bélgica
<i>A. halophilus</i>	LA31B	ATCC BAA1022, CIP 108450	Agua de laguna hipersalina	Hawaii
<i>A. mytili</i>	CECT 7386	LMG 24559, F2075	Moluscos	España
<i>A. thereius</i>	LMG 24486	CCUG 56902, 16389	Feto de aborto bovino	Dinamarca
<i>A. marinus</i>	CL-S1	KCCM 90072, JCM 15502	Agua de mar	Corea
<i>A. trophiarum</i>	64	LMG 25534, CCUG 59229	Heces de cerdo	Bélgica
<i>A. defluvii</i>	SW28-11	CECT 7697, LMG 25694	Agua residual	España
<i>A. molluscorum</i>	F98-3	CECT 7696, LMG 25693	Mejillones	España
Especies	Cepa de referencia	Otras designaciones	Origen	País
<i>A. cryaerophilus</i> 1A	LMG 9865	CCUG 17808	Feto aborto porcino	Irlanda
<i>A. cryaerophilus</i> 1B	LMG 10241	Higgins 88-3421R	Feto aborto porcino	Canadá
<i>A. cryaerophilus</i> 1B	LMG 9861	CCUG 17802	Feto aborto bovino	U.K.
<i>A. trophiarum</i>	CECT 7650	FE2	Heces de gallina	Chile
<i>A. trophiarum</i>	LMG 25535	R-39974	Heces de porcinos	Bélgica

4.2 Cepas obtenidas de otros estudios:

Se analizaron un conjunto de 21 cepas de *Arcobacter* aisladas de mariscos (almejas, mejillones y navajuelas), obtenidas de otros estudios realizados en el Instituto de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.

4.3 Muestras biológicas:

Se recolectaron 135 muestras fecales de ganado bovino (N= 45), ovino (N= 45) y porcino (N= 45) en localidades del sur de Chile, tales como Río Bueno, ubicado en la región de Los Ríos; la localidad de Ayacara y sectores rurales cercanos a la localidad de Frutillar, ambas ubicadas en la región de Los Lagos.

4.4 Aislamiento de *Arcobacter*

Las muestras fecales fueron inoculadas en caldo de enriquecimiento para *Arcobacter* (compuesto de peptona 18 gr/l, NaCl 5 gr/l y extracto de levadura 1 gr/l) suplementado con los antibióticos cefoperazona (8 mg/l), anfotericina B (10 mg/l) y teicoplanina (4 mg/l), también denominado como caldo CAT (Atabay y Corry, 1997), y se incubó en aerobiosis por un periodo de 48 a 72 h a 28°C. Posteriormente, se tomaron 200 µl del caldo incubado y se filtró a través de filtros Millipore (con poros de 0,45 µm de diámetro), situados sobre placas de agar sangre (compuesto por agar base sangre 40 gr/l y sangre de cordero 5%). Luego de una filtración pasiva, por aproximadamente 20 min, se retiró el filtro y las placas fueron incubadas a 28°C en aerobiosis por un período de 48 a 72 h. De cada placa con crecimiento bacteriano se tomaron 5 colonias para sembrarlas en nuevas placas de agar sangre, las que se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, después de lo cual se tomó una colonia bacteriana pura para realizar una

identificación fenotípica a través de una tinción de Gram. Las colonias bacterianas que presentaron morfología (colonias pequeñas, circulares, translúcidas, blanquecinas o beige) y características microscópicas (bacilos Gram negativos, curvos, helicoidales o con forma de la letra S), correspondiente a *Arcobacter*, fueron seleccionadas para su posterior identificación molecular.

4.5 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó mediante el método de ebullición descrito por Houf y col. (2002). En tubos eppendorf, con 400 µl de agua destilada estéril, se inocularon varias colonias bacterianas hasta obtener una suspensión uniforme. La mezcla fue sometida a ebullición durante 10 min a 100°C. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 8.000 r.p.m durante 1,5 min. Finalmente se traspararon 200 µl del sobrenadante, el cual contiene el DNA, a un nuevo tubo Eppendorf y fue almacenado a 4°C hasta su utilización.

4.6 Genotipificación

La genotipificación se realizó para evitar la identificación redundante de cepas con el mismo genotipo, utilizando el método ERIC-PCR descrito por Houf y col. (2002), el cual consiste en la amplificación de secuencias repetidas intergénicas de consenso en enterobacterias (Versalovic y col., 1991). Para esto se preparó una mezcla de reactivos en un volumen final de 50 µl para cada tubo de PCR compuesta de buffer PCR, *Taq* polimerasa (5 U), dNTP's (0,2 mM), MgCl₂ (4 mM), primers ERIC 1R (0,5 µM) y ERIC 2 (0,5 µM) (Tabla 6), H₂O DEPC y DNA como templado. Las condiciones en el termociclador para la reacción de PCR fueron 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 25°C por 1 min y 72°C por 2 min, y finalmente un período de extensión de 10

min a 72°C. Los productos del PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio durante 1,5 h a 100 V, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb para luego visualizar el gel con sus amplicones en el Transiluminador UV. Los patrones de amplificación que presentaron al menos una banda de diferencia se consideraron cepas diferentes de acuerdo con los criterios establecidos por Houf y col. (2002).

4.7 Identificación molecular

La identificación molecular de cada cepa se realizó utilizando las técnicas de m-PCR y PCR-RFLP en paralelo. Si se obtuvo alguna incongruencia entre estos métodos, entonces las cepas fueron chequeadas empleando un PCR de género y una posterior secuenciación del gen *rpoB*.

4.7.1 PCR múltiple

Para el m-PCR se siguió el protocolo establecido por Doudah y col. (2010), el cual está dirigido a la amplificación de fragmentos específicos del gen 23S rRNA de las especies *A. butzleri*, *A. thereius*, *A. cibarius*, *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus*. Para la reacción de PCR se preparó una mezcla de 50 µl como volumen final para cada tubo de PCR, compuesta por buffer PCR, *Taq* polimerasa (1,5 U), dNTP's (0,2 mM), MgCl₂ (1,5 mmol), primers ButR, SkiR, CibR, ArcoF, GyraF y GyraR (50 pM de cada uno) (Tabla 6), H₂O DEPC y DNA. Las condiciones en el termociclador fueron 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 45 seg, 58°C por 45 seg y 72°C por 2 min, y finalmente un período de extensión de 5 min a 72°C. Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa preparado al 2% y teñido con bromuro de etidio durante 1 h a 100 V utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb. Posteriormente,

el gel fue observado en transiluminador UV y se compararon los tamaños obtenidos con los tamaños de amplificación descritos por Doudah y col. (2010), (Figura 3).

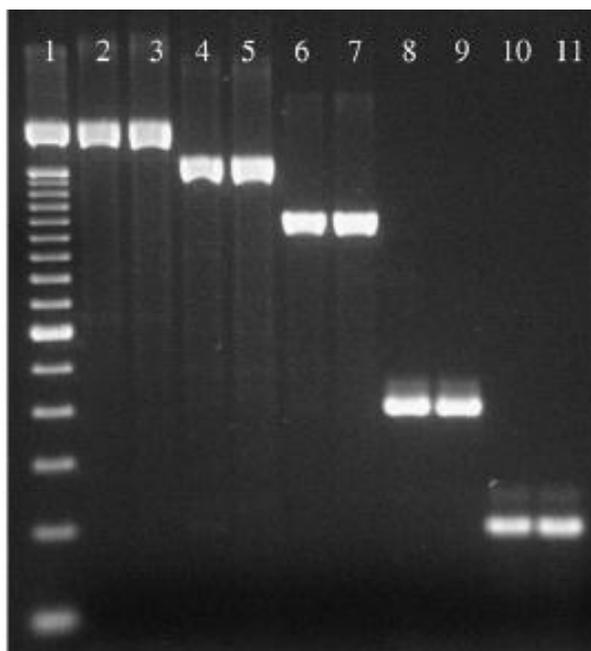


FIGURA 3. Gel de agarosa al 2% mostrando los tamaños de los productos obtenidos por m-PCR.

Líneas 1: Ladder 100 pb; 2 y 3: *A. butzleri* (2061 pb); 4 y 5: *A. thereius* (1590 pb); 6 y 7: *A. cibarius* (1125 pb); 8: *A. cryaerophilus* 1A (395 pb); 9: *A. cryaerophilus* 1B (395 pb); 10 y 11: *A. skirrowii* (198 pb).

Fuente: de Doudah y colaboradores, 2010.

4.7.2 PCR-RFLP

Para el PCR-RFLP, se siguió el protocolo descrito por Figueras y col. (2008), que consiste en una amplificación inicial de 1.026 pb del gen 16S rRNA y una posterior digestión del mismo mediante la endonucleasa *MseI*. Para el PCR inicial se preparó una mezcla de 50 μ l como volumen final para cada tubo de PCR compuesta por buffer PCR, *Taq* polimerasa (2,5 U), dNTP's (200 μ M), $MgCl_2$ (1,5 mM), Primers CAH 16S 1Am (0,5 μ M) y CAH 16S 1B (0,5 μ M)

(Tabla 6), H₂O DEPC y DNA. Las condiciones en el termociclador fueron de 95°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 52°C por 30 seg y 72°C por 90 seg y por último 72°C por 10 min como período de extensión final. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio, durante aproximadamente 1 h a 100 V. Posteriormente se procedió a realizar la digestión del amplicón utilizando 15 µl del producto de PCR, los cuales fueron incubados con la enzima *MseI* (10 U) a 37°C durante un período de 3 h. Finalmente los productos obtenidos de la digestión fueron separados en una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y corrido por un período de 1,5 h a 100 V, el que se observó en el transiluminador UV y se fotografió para analizar los amplicones obtenidos con respecto a los patrones restricción descritos por Figueras y col. (2008) para cada especie (Figura 4).

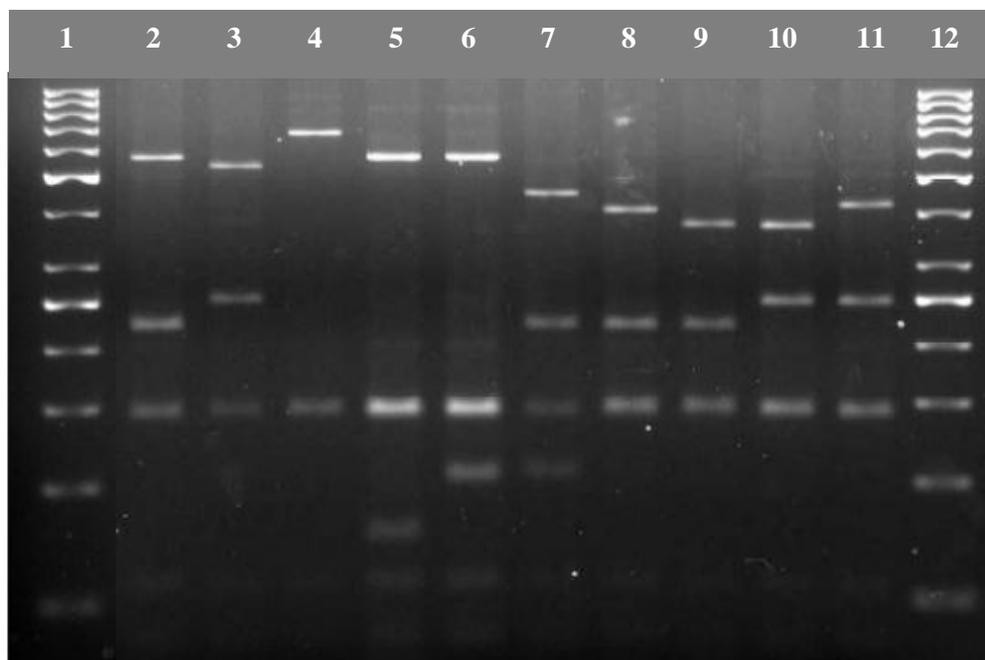


FIGURA 4. Gel de agarosa al 3% mostrando los patrones de restricción obtenidos mediante PCR-RFLP.

Líneas 1y 12: Ladder 50 pb; 2: *A. butzleri*; 3: *A. cibarius*; 4: *A. mytili*; 5: *A. molluscorum*; 6: *A. halophilus*; 7: *A. nitrofigilis*; 8: *A. cryaerophilus* 1A; 9: *A. cryaerophilus* 1B; 10: *A. skirrowii*; 11: *A. defluvii*.

Fuente: Figueras y colaboradores, 2008

4.7.3 PCR específico del género *Arcobacter*

Para la diferenciación de *Arcobacter* de otros géneros bacterianos, se utilizó el PCR específico del género *Arcobacter* descrito por Harmon y Wesley (1997). Se preparó un volumen final de 50 μ l de reacción compuesto de buffer PCR, *Taq* polimerasa (1,25 U), dNTP's (200 mmol/l de cada uno), $MgCl_2$ (3,5 mmol/l), primers Arco I y Arco II (25 pmol de cada uno) (Tabla 6), H_2O DEPC y DNA como templado. Las condiciones de PCR para cada muestra fueron 94°C por 4 min, seguido de 25 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 1 min, y finalmente un período de extensión de 7 min a 72°C. Los productos obtenidos del PCR fueron llevados a

electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, por un período de 1 h a 100 V utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb. Finalmente el gel fue observado en el transiluminador UV. El fragmento amplificado para miembros del género *Arcobacter* correspondió a 1.223 pb.

4.7.4 Secuenciación del gen *rpoB*

Para la secuenciación del gen *rpoB* (el cual codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa) fue amplificado un fragmento de 524 pb utilizando los primers CamrpoB-L y RpoB-R (Tabla 6), siguiendo las condiciones de PCR descritas por Korczak y col. (2006). Se comprobó la amplificación en el gel de agarosa y luego el producto obtenido fue purificado directamente del tubo de PCR empleando el kit Cycle-Pure, EZNA[®] (Omega Bio-Tek, USA), siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes. En los casos en que se obtuvieron bandas de amplificación inespecífica, se realizó la purificación de los 524 pb desde el gel de agarosa utilizando el kit MinElute Gel Extraction (Qiagen, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez purificado el producto de PCR, se realizó la cuantificación de DNA mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nano Quant, Tecan Infinite M200. Finalmente el DNA fue enviado al Servicio de Secuenciación Automática de ADN del Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas disponibles en la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando el programa BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides>). Además, estas secuencias fueron utilizadas para crear un árbol filogenético utilizando el software MEGA 4.0 (Tamura y col.,2007).

TABLA 6. Primers utilizados en este estudio.

Método	Primers	Secuencia 5´a 3´	Gen	Referencia
m-PCR	ButR	TCCTGATACAAGATAATTGTACG	23S rRNA	Douidah y col., 2010
	TherR	GCAACCTCTTTGGCTTACGAA	23S rRNA	Douidah y col., 2010
	CibR	CGAACAGGATTCTCACCTGT	23S rRNA	Douidah y col., 2010
	SkiR	TCAGGATACCATTAAAGTTATTGATG	23S rRNA	Douidah y col., 2010
	ArcoF	GCYAGAGGAAGAGAAATCAA	23S rRNA	Douidah y col., 2010
	CryF	CAGAGGAAGAGAAATCAAAT	23S rRNA	Douidah y col., 2010
	CryR	CCCCTATTCCATCAGTGAG	23S rRNA	Douidah y col., 2010
	GyrasF	AGAACATCACTAAATGAGTTCTCT	<i>GyrA</i>	Douidah y col., 2010
	GyrasR	CCAACAATATTTCCAGTYTTTGGT	<i>GyrA</i>	Douidah y col., 2010
PCR-RFLP	CAH 16S 1am	AACACATGCAAGTCGAACGA	16S rRNA	Figueras y col., 2008
	CAH 16S 1b	ATTCAACACCATCTCACGAC	16S rRNA	Marshall y col., 1999
ERIC- PCR	ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Genoma	Versalovic y col., 1991
	ERIC 2R	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Genoma	Versalovic y col., 1991
PCR género <i>Arcobacter</i>	Arco I	AGA GAT TAG CCT GTA TTG TAT C	16S rRNA	Harmon y Wesley, 1997
	Arco II	TAG CAT CCC CGC TTC GAA TGA	16S rRNA	Harmon y Wesley, 1997
PCR <i>rpoB</i>	CamrpoB-L	CCAATTTATGGATCAAAC	<i>rpoB</i>	Korczak y col., 2006
	RpoB-R	GTTGCATGTTNGNACCCAT	<i>rpoB</i>	Korczak y col., 2006

5. RESULTADOS

5.1 Aislamientos de *Arcobacter* en muestras fecales.

En las placas con crecimiento bacteriano, se obtuvieron colonias pequeñas y circulares de coloración beige o blancas translúcida típicas de *Arcobacter* (Figura 5). Sin embargo, también se obtuvieron otras colonias de tamaño, morfología y color diferente a *Arcobacter*, las que fueron excluidas tras la observación macroscópica y microscópica.

FIGURA 5. Colonias de *Arcobacter* sembradas en agar sangre.



Arcobacter fue aislado en un 17,8% del total de las muestras, con prevalencias para bovinos, ovinos y porcinos de 26,6%, 6,6% y 20% respectivamente. De entre las muestras positivas se obtuvieron 120 colonias bacterianas, pero 63 de estas fueron excluidas por no pertenecer al género *Arcobacter*. Entre las 57 colonias correspondientes a *Arcobacter* spp se determinaron 43 genotipos distintos y entre estas cepas la especie *A. cryaerophilus* fue la más prevalente (79,1%), seguida de *A. butzleri* (11,6%), *A. skirrowii* (7%) y *A. defluvii* (2,3%) (Tabla 7). De todos los aislamientos de *A. cryaerophilus* el grupo 1A fue el más predominante. Además, en dos muestras

se aisló más de una especie simultáneamente, las que correspondieron a *A. butzleri* junto con *A. cryaerophilus* en una muestra fecal de ganado bovino y *A. butzleri* junto con *A. defluvii* en una muestra fecal de ganado porcino.

5.2 Tipificación de las cepas aisladas

De los 57 aislamientos pertenecientes a *Arcobacter*, 43 presentaron genotipos distintos entre ellos. La mayor diversidad se encontró en *A. skirrowii*, ya que todos los aislamientos presentaron distintos perfiles de ERIC-PCR. Por otra parte, 5 de los 8 aislamientos de *A. butzleri*, 34 de los 44 aislamientos de *A. cryaerophilus* y 1 de los 2 aislamientos de *A. defluvii* mostraron genotipos diferentes mediante ERIC-PCR (Tabla 7). La Figura 6 representa los genotipos de algunas cepas representativas.

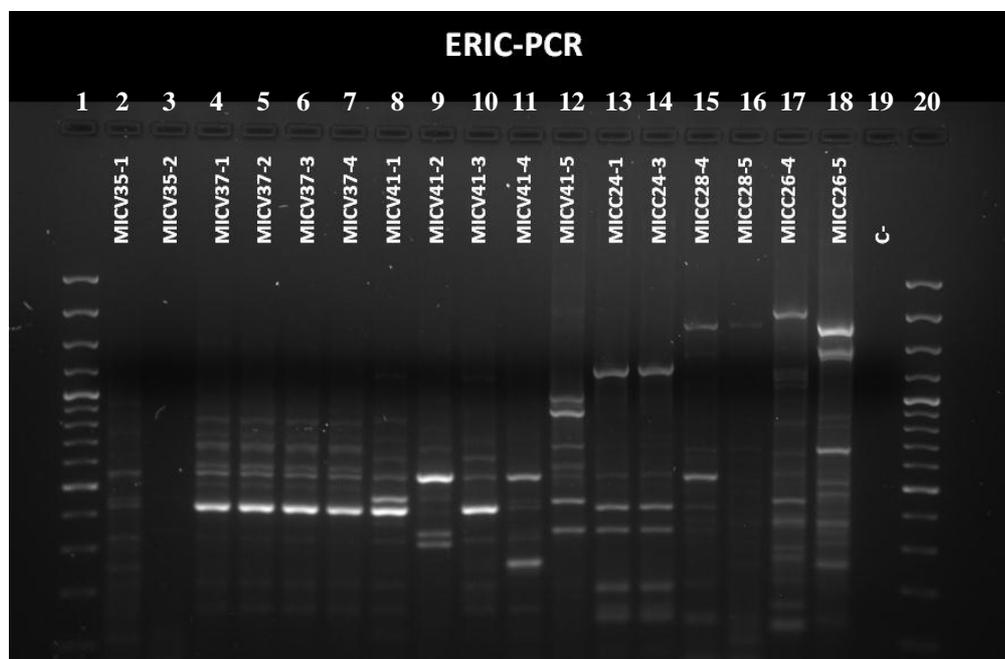


FIGURA 6. Gel de agarosa al 2% mostrando los genotipos de algunas cepas según el método ERIC-PCR

Líneas 1 y 20: Ladder 100 pb. C-: control negativo.

Tabla 7. Prevalencia de especies de *Arcobacter* aisladas de muestras fecales de ganado bovino, ovino y porcino.

Tipo de muestra	N° de Muestras	n° de Muestras + (%)	N° de colonias identificadas		Especies obtenidas de las muestras y sus genotipos							
			<i>Arcobacter</i> spp.	Otras especies	<i>A. butzleri</i>		<i>A. cryaerophilus</i>		<i>A. skirrowii</i>		<i>A. defluvii</i>	
					n° de colonias	Tipos de ERIC	n° de colonias	Tipos de ERIC	n° de colonias	Tipos de ERIC	n° de colonias	Tipos de ERIC
Bovinos	45	12 (26,6)	27	33	1	1	26	21				
Ovinos	45	3 (6,6)	4	11			3	3	1	1		
Porcinos	45	9 (20)	26	19	7	4	15	10	2	2	2	1
Total	135	24 (17,8)	57	63	8	5	44	34	3	3	2	1

5.3 Comparación entre m-PCR y PCR-RFLP

Las 59 cepas obtenidas de las muestras fecales (n=43) y de mariscos (n=16) (Tablas 8 y 9) fueron identificadas por los métodos de m-PCR y PCR-RFLP. De lo cual, 16 cepas fueron identificadas como *A. butzleri*, 14 cepas como *A. cryaerophilus* y 7 cepas como *A. skirrowi*. Sin embargo, para las demás cepas se obtuvieron resultados incongruentes, pues por m-PCR 10 cepas mostraron patrones específicos para *A. cryaerophilus*, mientras que por PCR-RFLP, estas cepas fueron identificadas como *A. butzleri*. Por otra parte, 9 cepas fueron identificadas como *A. cryaerophilus* por m-PCR, sin embargo por PCR-RFLP mostraron un patrón atípico (Figura 7). Además, para 3 cepas se observaron distintas incongruencias: Para una de ellas el m-PCR mostró una amplificación correspondiente a *A. skirrowii* mientras que el PCR-RFLP la identificó como *A. cryaerophilus*. En las otras 2 cepas, una aislada de una muestra fecal porcina y la otra de mejillón, el m-PCR produjo una amplificación correspondiente a *A. butzleri* mientras que el PCR-RFLP mostró patrones de restricción correspondientes a *A. defluvii* (Tabla 10).

Respecto a la identificación molecular de las cepas tipo y de referencia del género *Arcobacter*, los resultados están resumidos en la Tabla 11.

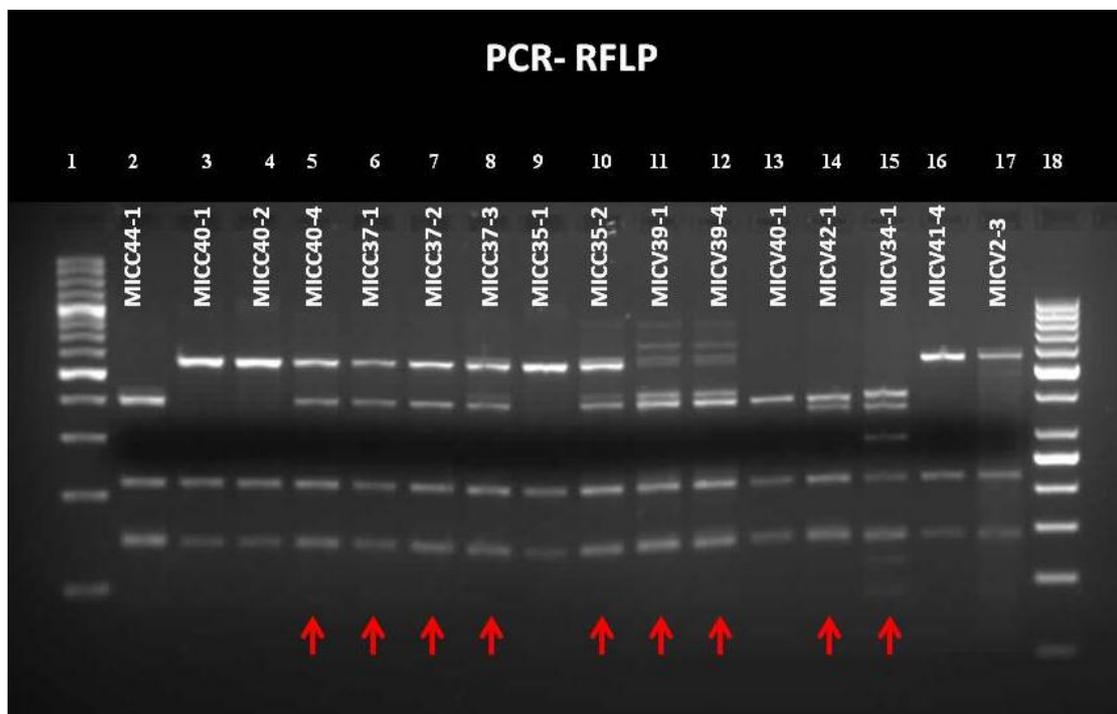


FIGURA 7. Gel de agarosa al 3% mostrando los patrones de restricción atípicos obtenidos para algunas cepas según el PCR-RFLP.

Líneas: 1 y 18: Ladder 50 y 100 pb respectivamente.
Flechas rojas señalando las cepas que presentaron patrones atípicos.

Tabla 8. Identificación por m-PCR y PCR-RFLP de las cepas obtenidas de las muestras fecales.

Cepas de ganado Bovino	Identificación molecular	
	m-PCR	PCR-RFLP
MICV1-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICV2-3	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICV2-4	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
MICV3-2	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICV5-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i>
MICV5-2	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i>
MICV5-4	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i>
MICV5-5	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i>
MICV34-1	<i>A. cryaerophilus</i>	Perfil Atípico
MICV35-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICV35-2	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1A
MICV37-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1B
MICV39-1	<i>A. cryaerophilus</i>	Perfil Atípico
MICV39-4	<i>A. cryaerophilus</i>	Perfil Atípico
MICV40-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1A
MICV41-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1A
MICV41-2	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1A
MICV41-3	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1A
MICV41-4	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICV41-5	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1A
MICV42-1	<i>A. cryaerophilus</i>	Perfil Atípico
MICV45-2	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1A

Cepas de ganado Ovino	Identificación molecular	
	m-PCR	PCR-RFLP
MICO8-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICO8-6	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICO27- 1	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. skirrowii</i>
MICO40-1	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1A

Cepas de ganado Porcino	Identificación molecular	
	m-PCR	PCR-RFLP
MICC2-1	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. skirrowii</i>
MICC4-1	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
MICC4-2	<i>A. butzleri</i>	<i>A. defluvii</i>
MICC4-3	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
MICC4-5	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
MICC10-1	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
MICC24-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1B
MICC31-4	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. skirrowii</i>
MICC35-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICC35-2	<i>A. cryaerophilus</i>	Perfil Atípico
MICC37-1	<i>A. cryaerophilus</i>	Perfil Atípico
MICC37-2	<i>A. cryaerophilus</i>	Perfil Atípico
MICC37-3	<i>A. cryaerophilus</i>	Perfil Atípico
MICC40-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICC40-2	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>
MICC40-4	<i>A. cryaerophilus</i>	Perfil Atípico
MICC44-1	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. cryaerophilus</i> 1A

Tabla 9. Identificación por m-PCR y PCR-RFLP de las cepas obtenidas de otros estudios ^a.

Cepa	Origen	Identificación molecular	
		m- PCR	PCR-RFLP
N1-2	Navajuela	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. skirrowii</i>
N1-3	Navajuela	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. skirrowii</i>
N1-4	Navajuela	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. skirrowii</i>
N1-5	Navajuela	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. skirrowii</i>
N3-2	Navajuela	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
N6-1	Navajuela	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
N6-2	Navajuela	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
N7-4	Navajuela	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
A16-1	Almeja	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
A16-4	Almeja	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
A16-5	Almeja	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
A17-3	Almeja	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
A19-1	Almeja	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
A19-5	Almeja	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
CH7-1	Mejillón	<i>A. butzleri</i>	<i>A. butzleri</i>
CH8-2	Mejillón	<i>A. butzleri</i>	<i>A. defluvi</i>

^aCepas recibidas de Charles H. Telsaint, U. Austral de Chile

Tabla 10. Resultados de la identificación molecular por m-PCR y PCR-RFLP de las cepas aisladas y obtenidas de otros estudios.

Cepas de muestras Fecales		Cepas de otros estudios	
m-PCR /PCR RFLP	Nº de cepas	m-PCR /PCR RFLP	Nº de cepas
<i>A. butzleri</i> / <i>A. butzleri</i>	5	<i>A. butzleri</i> / <i>A. butzleri</i>	11
<i>A. cryaerophilus</i> / <i>A. cryaerophilus</i>	14	<i>A. skirrowii</i> / <i>A. skirrowii</i>	4
<i>A. skirrowii</i> / <i>A. skirrowii</i>	3	<i>A. butzleri</i> / <i>A. defluvii</i>	1
<i>A. butzleri</i> / <i>A. defluvii</i>	1		
<i>A. skirrowii</i> / <i>A. cryaerophilus</i>	1		
<i>A. cryaerophilus</i> / <i>A. butzleri</i>	10		
<i>A. cryaerophilus</i> /Patrón atípico	9		

Tabla 11. Comparación de los métodos de identificación m-PCR y PCR-RFLP en cepas tipo de referencia del género *Arcobacter*.

Especie (cepas tipo)	m-PCR		RFLP	
	Amplicón (pb)	Especie identificada	Fragmentos de restricción (pb)	Especie identificada
<i>A. butzleri</i> (LMG 10828)	2061	<i>A. butzleri</i>	548/216/138	<i>A. butzleri</i>
<i>A. cryaerophilus</i> 1A (LMG 9904)	395	<i>A. cryaerophilus</i>	395/216/143/138	<i>A. cryaerophilus</i> 1A
<i>A. skirrowii</i> (LMG 6621)	198	<i>A. skirrowii</i>	395/243/143/138	<i>A. skirrowii</i>
<i>A. halophilus</i> (LA31B)	N/A ^a		551/143/138/101	<i>A. halophilus</i>
<i>A. nitrofigilis</i> (CECT 7204)	N/A		434/216/138/101	<i>A. nitrofigilis</i>
<i>A. cibarius</i> (CECT 7203)	1125	<i>A. cibarius</i>	519/243/138	<i>A. cibarius</i>
<i>A. mytili</i> (CECT 7386)	N/A		650/143/138	<i>A. mytili</i>
<i>A. thereius</i> (LMG 24486)	1590	<i>A. thereius</i>	548/216/138	<i>A. butzleri</i>
<i>A. marinus</i> (CL-S1)	N/A		308/243/138	<i>A. marinus</i>
<i>A. trophiarum</i> (LMG 25534)	N/A		548/216/38	<i>A. butzleri</i>
<i>A. defluvii</i> (CECT 7697)	2061	<i>A. butzleri</i>	434/243/143/138	<i>A. defluvii</i>
<i>A. molluscorum</i> (CECT 7696)	N/A		551/143/138/72	<i>A. molluscorum</i>
Especie (cepas de referencia)	Amplicón (pb)	Especie identificada	Fragmentos de restricción (pb)	Especie identificada
<i>A. cryaerophilus</i> 1A (9865)	395	<i>A. cryaerophilus</i>	395/216/143/138	<i>A. cryaerophilus</i> 1A
<i>A. cryaerophilus</i> 1B (LMG10241 y LMG 9861)	395	<i>A. cryaerophilus</i>	365/216/143/138	<i>A. cryaerophilus</i> 1B
<i>A. trophiarum</i> (CECT 7650 y LMG 25535)	N/A		548/216/138	<i>A. butzleri</i>

^a N/A, no amplifica

5.4 PCR de género y secuenciación del gen *rpoB*

El PCR específico del género *Arcobacter*, descrito por Harmon y Wesley (1997) fue aplicado a la mayoría de las cepas que durante la identificación molecular dieron lugar a resultados confusos, ya sea por incongruencias entre ambos métodos o por amplificaciones inespecíficas y permitió diferenciar eficazmente a *Arcobacter* de otros géneros bacterianos.

De entre las 10 cepas que mostraron patrones específicos para *A. cryaerophilus* por m-PCR y patrones específicos para *A. butzleri* por PCR-RFLP, se eligieron 2 para secuenciar el gen *rpoB*, de igual manera 2 cepas se eligieron de entre las otras 9 cepas que fueron identificadas como *A. cryaerophilus* por m-PCR y que por el PCR-RFLP mostraron un patrón atípico, y también 2 de las cepas que fueron identificadas como *A. butzleri* por el m-PCR pero como *A. defluvii* por el PCR-RFLP. Además, la única cepa que fue identificada como *A. skirrowii* por el m-PCR y como *A. cryaerophilus* en el PCR-RFLP también fue secuenciada. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias de *Arcobacter* existentes en la base de datos produciéndose diversas similitudes específicas para cada cepa (Tabla 12). Sin embargo, dichos resultados por ser presuntivos fueron confirmados a través del siguiente árbol filogenético (Figura 8).

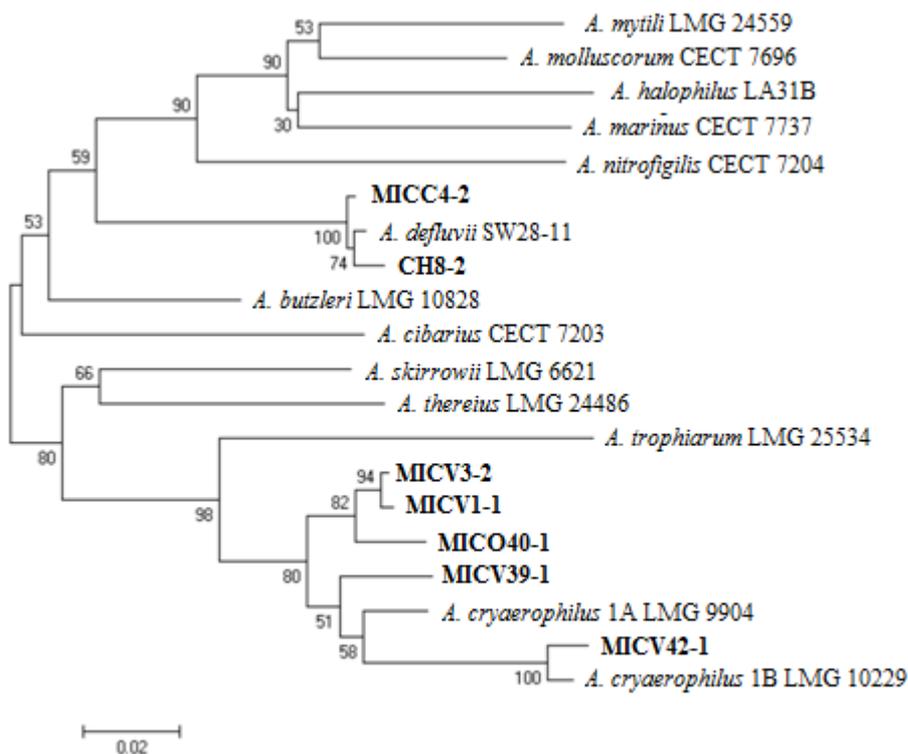


FIGURA 8. Árbol filogenético basado en las secuencias (524 pb) del gen *rpoB*.

Tabla 12. Resultados de la similitud del gen *rpoB* obtenidos mediante el programa BlastN.

m-PCR /PCR RFLP	Cepas secuenciadas	Secuenciación gen <i>rpoB</i>	Similitud (%)
<i>A. butzleri</i> / <i>A. defluvii</i>	MICC4-2	<i>A. defluvii</i>	99
	CH8-2		99
<i>A. skirrowii</i> / <i>A. cryaerophilus</i>	MICO40-1	<i>A. cryaerophilus</i>	95
<i>A. cryaerophilus</i> / <i>A. butzleri</i>	MICV1-1	<i>A. cryaerophilus</i>	96
	MICV3-2		96
<i>A. cryaerophilus</i> /Patrón atípico	MICV42-1	<i>A. cryaerophilus</i>	97
	MICV39-1		99

6. DISCUSIÓN

6.1 Prevalencia de *Arcobacter* en muestras fecales.

Las prevalencias de *Arcobacter* en heces de ganado bovino, ovino y porcino del presente estudio, se encuentran dentro de los rangos descritos por otros autores, los cuales están entre 3,6 a 42% en bovinos, 0 a 40% en ovinos y 10 a 44% en porcinos (Tabla 3). Sin embargo, se dificulta la comparación con cada uno de los estudios previos, pues en la mayoría de ellos se han utilizado metodologías de aislamiento distintas a la empleada en nuestra investigación. Las diferencias respecto a la menor o mayor prevalencia de estos microorganismos es atribuida principalmente al medio de cultivo empleado y al procedimiento elegido para el aislamiento, lo que ha sido corroborado recientemente por Merga y col. (2011) quien comparó 5 diferentes métodos de aislamiento. Sin embargo, otras causas también pueden influir en la detección de *Arcobacter*, tales como la estación del año, clima y lugar geográfico en el que se toma la muestra, la edad y alimentación del animal estudiado y también el estado de la muestra (fresca, congelada, etc.) (Golla y col., 2002; Van Driessche y col., 2005; Wesley y col., 2000).

Con respecto a los estudios que han utilizado un procedimiento similar al nuestro (un enriquecimiento en caldo CAT y una posterior filtración en agar sangre), podemos decir que las prevalencias para *Arcobacter* han sido variadas, pues algunos de ellos, hechos en muestras fecales de ovejas han revelado una prevalencia de 40% en el Reino Unido (Merga y col., 2011), mientras que en Turquía estos microorganismos no pudieron ser aislados en éste tipo de muestra (Aydin y col., 2007) (Tabla 3).

En el presente estudio la especie más prevalente fue *A. cryaerophilus* (79,1%) seguida de *A. butzleri* (11,6%) y *A. skirrowii* (7%), lo cual difiere con la mayoría de los estudios realizados en heces de animales como en otros tipos de muestras biológicas (aguas, mariscos, alimentos

cárnicos, piel y órganos internos de animales, heces de humanos y de animales), en los cuales *A. butzleri* es generalmente la especie predominante, seguida de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Collado y col., 2010; Collado y col., 2009b; Samie y col., 2007; Pejchalová y col., 2008). Sin embargo, en el reciente estudio de Vilar y col. (2010), en el que se analizaron 254 muestras fecales de vacas lecheras en España, utilizando una metodología similar a la empleada en nuestra investigación, *A. cryaerophilus* fue también la especie predominante. Además, en nuestro estudio el grupo 1A de la especie *A. cryaerophilus* fue más prevalente que el grupo 1B, lo cual es contrario a lo reportado en otras investigaciones donde se ha empleado algún método capaz de diferenciar entre los grupos 1A y 1B de ésta especie (Collado y col., 2009b; Figueras y col., 2008; Kabeya y col., 2003a).

Durante el estudio, se aisló *A. defluvii* de una muestra fecal de ganado porcino. Por lo cual, este es el primer reporte del aislamiento de dicha especie luego de su descripción original, en donde fue obtenida de aguas residuales en el Noreste de España (Collado y col., 2011). Sin embargo, dentro de las cepas estudiadas, correspondientes a aislamientos obtenidos de mariscos, también se logró identificar una cepa de *A. defluvii*, por lo cual este estudio revela que ésta especie puede ser obtenida de diversos orígenes y lugares geográficos, lo que confirma la amplia distribución de *Arcobacter* en el medio ambiente y su capacidad de colonizar diversos reservorios.

6.2 Caracterización fenotípica y molecular

La identificación fenotípica, a través de la observación macroscópica y microscópica permitió seleccionar a aquellas colonias que presentaba características correspondientes a *Arcobacter*. Sin embargo, cuando se aplicaron los métodos moleculares de identificación, algunas de las colonias elegidas no produjeron ninguna amplificación o ésta era inespecífica, por lo cual, la posterior

aplicación del PCR de género permitió aclarar que aquellos aislamientos no correspondían a *Arcobacter*. Esto confirma que la identificación fenotípica puede causar confusión y demuestra la necesidad de aplicar métodos moleculares para la identificación a nivel de especie.

La genotipificación realizada mediante ERIC-PCR permitió diferenciar los aislamientos de *Arcobacter* con el mismo genotipo para así evitar la posterior identificación redundante de cepas iguales o clonales.

Utilizando los métodos de identificación m-PCR y PCR-RFLP en paralelo, se obtuvo la misma identidad para 37 de las 59 cepas estudiadas, lo que indica un 63% de concordancia entre ambos métodos moleculares. De entre las restantes cepas con resultados incongruentes, 19 fueron identificadas como *A. cryaerophilus* por m-PCR, pero 10 de ellas presentaron un perfil de PCR-RFLP correspondientes a *A. butzleri*, y las otras 9 cepas dieron patrones de restricción atípicos. De éstas 19 cepas, la posterior secuenciación del gen *rpoB* de 4 cepas representativas (MICV1-1, MICV3-2, MICV42-1 y MICV39-1) reveló que todas ellas correspondían a la especie *A. cryaerophilus* (Tabla 12), validando los resultados entregados por el m-PCR. Por lo tanto, este sería el primer estudio donde se observa que el PCR-RFLP podría originar una identificación incorrecta de algunas cepas pertenecientes a la especie *A. cryaerophilus*.

Por otra parte, 2 cepas (MICC4-2 y CH8-2) fueron identificadas como *A. butzleri* por m-PCR, pero como *A. defluvii* mediante el PCR-RFLP. La posterior secuenciación del gen *rpoB* corroboró que ambas cepas pertenecían a la especie *A. defluvii* (Tabla 12). Dichos resultados concuerdan con la descripción de ésta especie por Collado y col. (2011), en la cual ya se había reportado esta amplificación inespecífica al aplicar el m-PCR, ésta podría ser justificada porque el m-PCR de Doudah y col. (2010) no fue diseñado para la identificación de *A. defluvii*, pues en ese entonces

esta especie aún no era descrita, no obstante, esta amplificación inespecífica puede dar origen a resultados erróneos si solo se aplica el m-PCR durante la identificación molecular.

Por último, otra cepa (MICO40-1) fue identificada como *A. skirrowii* por el m-PCR pero el PCR-RFLP y la secuenciación del gen *rpoB* revelaron que correspondía a *A. cryaerophilus* (Tabla 12), lo cual demuestra que el m-PCR también puede producir la identificación errónea de especies para el cual fue diseñado.

Respecto a la identificación molecular de las cepas tipo y de referencia, se corroboró lo expuesto por Collado y Figueras (2011), en cuanto a que el PCR-RFLP en *A. thereius* y *A. trophiarum* produce el mismo patrón de restricción que para *A. butzleri*, lo que ocurre probablemente por similitud en las secuencias del gen 16S rRNA en donde digiere la enzima *MseI*, no obstante, existen test bioquímicos que permiten diferenciar a ambas especies de *A. butzleri* (De Smet y col., 2010; Houf y col., 2009). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el PCR-RFLP, aun cuando presenta falencias con respecto a su especificidad, es el método que permite la identificación molecular de la mayoría de las especies *Arcobacter*.

Un nuevo método molecular para la identificación de especies de *Arcobacter* ha sido propuesto recientemente llamado MALDI-TOF MS (Desorción e ionización mediante laser asistida por matriz) (Alispahic y col., 2010), el cual permite diferenciar las especies más comunes de *Arcobacter* (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*) , además es una técnica rápida y muy fiable, sin embargo, ésta no puede ser utilizada de forma masiva por la poca disponibilidad de centros que cuenten con el equipo, lo cual lo convierte en una técnica de difícil acceso en comparación a la aplicación de un PCR convencional.

Para la confirmación final de la verdadera identidad de las cepas aisladas de muestras fecales y de otros estudios, se construyó el árbol filogenético basado en el gen *rpoB* (Figura 8), el cual mostró

a las cepas MICC4-2 y CH8-2 agrupadas con *A. defluvii* formando parte de un mismo cluster. Las demás cepas fueron similares a la especie *A. cryaerophilus*, sin embargo, en éstas cepas se generaron 2 subgrupos, al primero lo denominamos como grupo A e incluyó a las cepas MICV3-2, MICV1-1 y MICO40-1 y el segundo denominado grupo B que incluyó a las cepas MICV39-1 y MICV42-1. De entre éstos, el subgrupo A al estar un poco más alejado de la cepa tipo y de referencia de *A. cryaerophilus*, se correlaciona con lo expuesto por Debruyne y col. (2010) quien al estudiar 101 cepas de *Arcobacter* de diversos orígenes, encontró muchos subgrupos dentro de esta misma especie. Además, otros estudios que han analizado la taxonomía de *A. cryaerophilus* (Kiehlbauch y col., 1991; Neil y col., 1985; Vandamme y col., 1992), concluyen que es incorrecto separarla en sólo 2 grupos (*A. cryaerophilus* 1A y 1B) por ser una especie muy heterogénea. Por lo cual, deberían realizarse futuras investigaciones para determinar si el subgrupo A de nuestro estudio podría representar una nueva especie o subespecie del género *Arcobacter* y para redefinir la taxonomía de la especie *A. cryaerophilus*.

La mayoría de las incongruencias observadas en este estudio muestran claramente que dichas diferencias se producen al tratar de identificar la especie *A. cryaerophilus*, lo cual ocurre probablemente por la condición heterogénea de ésta especie. Por lo tanto, otro método que se emplee durante su identificación molecular no está ajeno a la producción de amplificaciones inespecíficas. Sin embargo, es posible detectar éstas inespecificidades si se utilizan tanto el m-PCR como el PCR-RFLP en paralelo, tal como se comprobó en éste estudio.

El m-PCR por su parte es el método que mostró mayor especificidad (95%) (calculada como el porcentaje de cepas correctamente identificadas), pues identificó acertadamente a la mayoría de las cepas en estudio, además posee la ventaja de ser más rápido, sencillo y económico que el PCR-RFLP. Pero es una técnica limitada pues permite la identificación de sólo 5 especies del

género *Arcobacter* y no permite diferenciar entre *A. butzleri* y *A. defluvii*, lo que es relevante, pues implica la identificación errónea de una especie de importancia clínica, tanto en humanos como en animales. Por otra parte, el PCR-RFLP (con una especificidad de 68%), es un método que si permite la identificación de un número mayor de especies *Arcobacter* incluso de las descritas posterior a su publicación, por lo que también es un método útil para reconocer potenciales nuevas especies. Sin embargo, no permite la identificación de la totalidad de las especies que conforman actualmente el género *Arcobacter*, pues como se observó falla en la identificación de las especies *A. thereius* y *A. trophiarum*. Por lo tanto, se evidencia la necesidad de crear un nuevo método o la modificación de alguno de los métodos existentes, que permita discriminar entre todas las especies del género *Arcobacter*.

6.3 Conclusiones

- -Se comprueba la presencia de *Arcobacter* en heces de ganado bovino, ovino y porcino de sectores del sur del país, por lo cual éstos animales constituirían un reservorio para dichos microorganismos en nuestra zona.
- Se ha confirmado la amplia distribución de *Arcobacter* en el ambiente y su capacidad de colonizar diversos reservorios al aislar *A. defluvii* de una muestra fecal de ganado porcino y al identificar como tal una cepa proveniente de marisco.
- Se corrobora que *A. cryaerophilus* debe ser reevaluada como especie o conjunto de especies, debido a su compleja estructura taxonómica.
- Ambos métodos, m-PCR y PCR-RFLP, presentan deficiencias en su especificidad, sin embargo el uso de ambos métodos en paralelo permite identificar a la mayoría de las especies *Arcobacter*.

- Este estudio demuestra la necesidad de un nuevo método de identificación accesible y confiable que permita discriminar entre todas las especies del género *Arcobacter*.

7. LITERATURA CITADA

Adesiji, Y.O., Coker, A.O. and Oloke, J.K. 2011. Detection of *Arcobacter* in feces of healthy chickens in Osogbo, Nigeria. *J. Food Prot.* 74(1): 119-21.

Abdelbaqi, K., Alice, B., Prouzet-Mauleon, V., Gresser, J., Wesley, I., Mégraud, F. and Ménard, A. 2007. Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 45:3015–3021.

Alispahic, M., Hummel, K., Jandreski-Cvetkovic, D., Nöbauer, K., Razzazi Fazeli, E., Hess, M. and Hess, C. 2010. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *J. Med. Microbiol.* 59:295–301.

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. *Journal 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., Waino, M. and Madsen, M. 2006. Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *Int.J. Food Microbiol.* 109: 139-145.

Aydin, F., Gumussoy, K. S., Atabay, H. I., Ica, T. and Abay, S. 2007. Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *J. Appl. Microbiol.* 103:27–35.

Bücker, R., Troeger, H., Kler J., Fromm, M. and Schulzke, J. D. 2009. *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *J. Infect. Dis.* 200:756–764.

Burnens, A. P., U. B. Schaad, and J. Nicolet. 1992. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a girl with gastroenteritis on Yersinia selective agar. *Med. Microbiol. Lett.* 1:251–256.

Chinivasagam, H. N., Corney, B. G., Wright, L. L., Diallo, I. S. and Blackall, P. J. 2007. Detection of *Arcobacter* spp. in piggery effluent and effluentirrigated soils in southeast Queensland. *J. Appl. Microbiol.* 103:418–426.

Collado, L. R. 2007. Distribución y caracterización molecular de *Campylobacter* y *Arcobacter* aislados de heces de animales y de humanos en Valdivia, Chile. Tesis, Magíster, Fac. de Medicina. Univ. Austral de Chile.

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: 1391-1396.

Collado, L., Guarro, J. and Figueras, M. J. 2009b. Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *J. Food Prot.* 72(2): 1102-1106.

Collado, L., Kasimir, G., Pérez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, J.M. and Figueras, M.J. 2010. Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat River catchment, at sewage effluent and in a drinking water treatment plant. *Water Res.* 44 (12): 3696-3702.

Collado, L. and Figueras, M.J. 2011. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev.* 24 (1):174-92.

Collado, L., Levican, A., Perez, J. and Figueras, M.J. 2011. *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. *Int. J. Syst.Evol.* 61 (9): 1895-1901.

Debruyne, L., K. Houf, L. Doudiah, S. De Smet, and P. Vandamme. 2010. Reassessment of the taxonomy of *Arcobacter cryaerophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 33:7–14.

De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S.L., Doudah, L. and Houf, K. 2010. *Arcobacter trophiarum* sp. nov. isolated from fattening pigs. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 356-61.

De Smet, S., De Zutter, L., Debruyne, L., Vangroenweghe, F., Vandamme, P. and Houf, K. 2011. *Arcobacter* population dynamics in pigs on farrow-to-finish farms. Appl Environ Microbiol. 77(5):1732-8.

Donachie, S. P., Bowman, J.P., On, S.L. and Alam, M. 2005. *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1271-1277.

Doudah, L., De Zutter, L., Vandamme, P. and Houf; K. 2010. Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by novel multiplex-PCR assay. J. Microbiol. Methods. 80(3): 281-286.

Ellis, W.A., Neill, S. D., O'Brien, J.J., Ferguson, H. W. and Hanna, J. 1977. Isolation of Spirillum/Vibrio-like organisms from bovine fetuses. Vet. Rec. 100: 451-452.

Engberg, J., On, S. L., Harrington, C. S. and Gerner-Smidt, P. 2000. Prevalence of Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter and Sutterella spp. in human fecal samples as estimated by are evaluation of isolation methods for campylobacters. J. Clin. Microbiol. 38: 286-291.

Ertas, N., Yusuf, D., Zafer, G., Ahmet, G. and Ismail, U. 2010. Prevalence of *Arcobacter* species in drinking water, spring water, and raw milk as determined by multiplex PCR. *J. Food Prot.* 73(11): 2099-2102.

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

Fera, M.T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D. and Pennisi, M.G. 2009. Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in Southern Italy. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1661-1666.

Fera, M. T., Russo G. T., Di Benedetto A., La cámara 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.* 2010:489784

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

Fernández, H., Vera, F. and Villanueva, M. P. 2007. Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 39(2): 163-165.

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.* 62:11-15.

Figueras, M. J., Collado L , Levican A , Pérez J , Solsona MJ , Yustes C. 2011. *Arcobacter molluscorum* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Syst. Appl. Microbiol.* 34 (2): 105-9.

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

González, A., Suski, J. and Ferrus, M.A. 2009. 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): 327-328.

Golla, S.C., Murano, E.A., Johnson, L.G., Tipton, N.C., Cureington E.A. and 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.

Hamir, A. N., Sonn, R. J., Franklin, S. and Wesley, I. V. 2004. *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter* species associated with intussusceptions in a raccoon (*Procyon lotor*). *Vet. Rec.* 155: 338-340

Harmon, K. M. and Wesley, I.V. 1997. Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from other arcobacters. *Vet. Microbiol.* 58: 215-227.

Ho, H.T, Lipman, L. J. and Gaastra, W. 2006. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent. *Vet. Microbiol.* 115:1-13.

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.

Ho, H.T, Lipman, L. J. and Gaastra, W. 2008. The introduction of *Arcobacter* spp. In poultry slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 223-229.

Houf, K., Tutenel, A., De Zutter, L., Van Hoof, J. and 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: 89-94.

Houf, K., De Zutter, L., Van Hoof, J. and Vandamme, P. 2002. Assesment of the genetic diversity among *Arcobacters* isolated from poultry products by using two PCR-Based typing methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2172-2178.

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

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

Houf, K., De Smet, S., Baré, J. and Daminet, S. 2008. Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*. Vet Microbiol.130(1-2): 208-13.

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

Hsueh, P. R., Teng L. J, Yang P. C, Wang S. K, Chang S. C, Ho S. W, Hsieh W. C, Luh K. T. 1997. Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B. J. Clin. Microbiol. 35:489–491.

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. 35:2401-2404.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2002. Microorganisms in foods. 7. Microbiological testing in food safety management. Kluwer Academic/Plenum.

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: 189-198.

Jara, M. G. 2006. Especies del género *Campylobacter* y del género *Arcobacter* en muestras de deposiciones humanas y animales. Tesis, Esc. de Ciencias, Facultad de Ciencias. Univ. Austral de Chile.

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. 48:1417–1419.

Johnson, L. G. and Murano, E. A. 2002. Lack of a cytolethal distending toxin among *Arcobacter* isolates from various sources. J. Food Prot. 65: 1789–1795.

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

Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Kubo, M., Yamamoto, K., Arai, S., Izumi, T., Kobayashi, Y., Katsube, Y. and Mikami, T. 2003b. Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan. *Vet. Microbiol.* 93:153–158.

Kärenlampi, R.I., Tolvanen, T.P. and Hanninen, M.L. 2004. Phylogenetic analysis and PCR restriction fragment length polymorphism identification of *Campylobacter* species based on partial *groEL* gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5731-5738.

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

Kim, H.M., Hwang, C.Y., Cho, B.C. 2010. *Arcobacter marinus* sp. nov. *Int. Journal. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 531-536.

Kopilovic, B., 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.* 13:1-3.

Korczak, B.M., Stieber, R., Emler, S., Burnens, A.P., Frey, J. and Kuhnert, P. 2006. Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from *rpoB* sequences. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 937-945.

Kownhar, H., Shankar E. M., Rajan R., Vengatesan A., and Rao U. A. 2007. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and enteric bacterial pathogens among hospitalized HIV infected versus non-HIV infected patients with diarrhoea in southern India. *Scand. J. Infect. Dis.* 39:862–866.

Lastovica, A. J. and Le Roux, E. 2000. Efficient isolation of campylobacteria from stools. *J. Clin. Microbiol.* 38:2798–2799.

Lau, S. K., Woo, P. C., Teng, J. L., Leung, K. W. and Yuen, K. Y. 2002. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Mol. Pathol.* 55:182–185.

Lerner, J., Brumberger V., and Preac-Mursic V. 1994. Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:660–662.

Lehner, A., T. Tasara, and R. Stephan. 2005. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 127-135.

Logan, E. F., Neill, S.D. and Mackie, D. P. 1982. Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*. *Vet. Rec.* 110: 229-230.

Marshall, S.M., Melito, P.L., Woodward, D.L., Johnson, W., Rodgers, F.G. and Mulvey, M.R. 1999. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4158-4160.

McClung, C.R., Patriquin, D. G. and Davis, R. E. 1983. *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 33:605-612.

Merga, J.Y., Leatherbarrow, A.J., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C.A., Miller and 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): 1646-50.

Miller, W.G., Wesley, I.V., On, S.L., Houf, K., Megraud, F., Wang, G., Yee, E., Srijan, A. and Mason, C.J. 2009. First multi-locus sequence typing scheme for *Arcobacter* spp. *BMC Microbiol.* 9: 196.

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

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

Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, I. S. T. C. and Ellis, W. A. 1985. Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 342-356.

On, S. L., Stacey, A. and Smyth, J. 1995. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteremia. *J. Infect.* 31:225-227.

On, S.L. 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 30: 1S-15S.

On, S. L., Harrington, C. S. and Atabay, H. I. 2003. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. *J. Appl. Microbiol.* 95:1096-1105.

Patyal, A., Rathore, R.S., Mohan, H.V., Dhama, K., Kumar, A. 2011. Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including sea food from India. *Transbound Emerg. Dis.* (En Prensa).

Pejchalová, M., Dostalíkova, E., Slamova, M., Brozkova, I. and Vytr Asova, J. 2008. Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech Republic. *J. Food Prot.* 71: 719-727.

Pentimalli, D., Pegels, N., Garcia, T., Martin, R. and González, I. 2009. Specific PCR detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in chicken meat. *J. Food Prot.* 72: 1491-1495.

Petersen, R.F., Harrington, C.S., Kortegaard, H.E. and On, S.L. 2007. A PCR-DGGE method for detection and identification of *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* and related Epsilonbacteria and its application to saliva samples from humans and domestic pets. *J. Appl. Microbiol.* 103:2601-2615.

Pianta, C., Daniel, T. P., Diego, H. and de Oliveira, S. D. 2007. Isolation of *Arcobacter* spp. from the milk of dairy cows in Brazil. *Ciencia Rural, Santa María.* 37(1): 171-174.

Prouzet-Mauleon, V., Labadi, L., Bouges, N., Menard, A., and Megraud, F. 2006. *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 307-309.

Rice, E.W., Rodgers, M.R., Wesley, I.V., Johnson, C.H. and Tanner, S.A. 1999. Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. Lett. Appl. Microbiol. 28: 31-35.

Russell, R. G., Kiehlbauch, J. A., Gebhart, C. J. and DeTolla, L. J. 1992. Uncommon *Campylobacter* species in infant *Macaca nemestrina* monkeys housed in a nursery. J. Clin. Microbiol. 30:3024–3027.

Ruiz, L. A. 2005. Comparación de tres medios selectivos para el aislamiento de especies del género *Arcobacter*. Tesis, Esc. De Tecnología Médica, Fac. de Medicina. Univ. Austral de Chile.

Samie, A., Obie, C.L., Barrett, L. J., Powell, S.M. and 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: 558-566.

Schroeder-Tucker, L., Wesley, I.V., Kiehlbauch, J.A., Larson D.J., Thomas, L.A. and Erickson, G.A. 1996. Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses. J.Vet. Diagn. Invest. 8:186–195.

Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray P, J. and Harrison, M. A. 2007. Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. Int. J. Antimicrob. Agents 29:451–455.

Stirling, J., Griffith, M., Blair, I., Cormican, M., Dooley, J. S. G., Goldsmith, C. E., Glover, S. G., Loughrey, A., Lowery, C. J., Matsuda, M., McClurg, R., McCorry, K., McDowell, D., McMahon, A., Cherie Millar B., Nagano Y., Rao, J. R., Rooney P. J., Smyth, M., Snelling, W. J., Xu, J. and Moore, J. E. 2008. Prevalence of gastrointestinal bacterial pathogens in a population of zoo animals. *Zoonoses Public Health* 55:166–172.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

Taylor, D., Kiehlbauch, J., Tee, W., Pitarangsi, C. and Echeverria, P. 1991. Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea. *J. Infect. Dis.* 163:1062-1067.

Tee, W., Baird, R., Dyall-Smith, M. and Dwyer, B. 1988. *Campylobacter cryaerophila* isolated from a human. *J. Clin. Microbiol.* 26:2469–2473.

Tompkins, D. S., Hudson, M., Smith, H., Eglin, R., Wheeler, J., Brett, M., Owen R., Brazier J., Cumberland, P., King, V. and Cook, P. 1999. A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun. Dis. Public Health* 2:108-113.

Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and De Ley, J. 1991a. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 88-103.

Vandamme, P. and De Ley, J. 1991b. Proposal for a new Family, *Campylobacteraceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 451-455.

Vandamme, P., Vancaneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van Den Borre, C., Higgins, R., Homme, J., Kersters, K., Butzler, J. P. and Goossens, H. 1992. 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. Inter. J. Syst. Bacteriol. 344-356.

Vandamme, P., Giesendorf, B. A., van Belkum, A., Pierard, D., Lauwers, S., Kersters, K., Butzler, J.P., Goossens, H. and Quint, W.G. 1993. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Arcobacter butzleri* by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 31: 3317-3319.

Vanderberg, 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.

Van Driessche, E., Houf, K., Van Hoof, J., De Zutter, L. and Vandamme, P. 2003. Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. FEMS Microbiol. Lett. 229:243-248.

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.

Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19(24): 6823-6831.

Vilar, M.J., Peña, F.J., Pérez, I., Diéguez, F.J, Sanjuán, M.L., Rodríguez-Otero, J.L., Yus, E. 2010. Presence of *Listeria*, *Arcobacter*, and *Campylobacter* spp. in dairy farms in Spain. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*123(1-2):58-62.

Wesley, I. V., Baetz, A. L. and Larson, D. J. 1996. Infection of cesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*. *Infect. Immun.* 64:2295–2299.

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. and Environ Microbiol.* 1994–2000

Wesley, I. V., Schroeder-Tucker, L. and Franklin, S. L. 2003. Recovery of *Arcobacter* species from exotic animal species. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 57

Wesley, I.V. and Miller, W.G. 2010. *Arcobacter*: An opportunistic human foodborne pathogen? In: Scheld, W.M., Grayson, M.L., Hughes, J.M., editors. Emerging Infections 9. Washington, DC: American Society of Microbiology Press. p. 185-211.

Woo, P., Chong, K., Leung, K., Que, T. and Yuen, K. 2001. Identification of *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim with bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 40:125–127.

Wybo, I., Breynaert, J., Lauwers, S., Lindenburg, F. and Houf, K. 2004. Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1851-1852.

Yan, J., Ko, W., Huang, A., Chen, H., Jin, Y. and Wu, J. 2000. *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *J. Formos. Med. Assoc.* 99:166–169.