

**DISCURSO DE RECEPCIÓN
DEL ACADÉMICO ELECTO ILMO. SR. DR.
D. Javier Hernández Haba**

**DISCURSO DE CONTESTACIÓN
DEL ACADÉMICO NUMERARIO ILMO. SR. DR.
D. Enrique Hernández Giménez**

Leídos el 4 de diciembre de 2007
VALENCIA

DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO ELECTO
Ilmo. Sr. D. Javier Hernández Haba
Campylobacter: líder en patología intestinal infecciosa

EXCMO. SR. PRESIDENTE,
EXCMOS. E ILMOS. SRS. ACADÉMICOS,
SEÑORAS Y SEÑORES:

LA VIDA HUMANA está llena de momentos trascendentes, unas veces como consecuencia del propio interés y esfuerzo personal para alcanzar la meta propuesta y otras, por el contrario, aparecen sin pretenderlo ni merecerlo, por la bondad de la suerte o de los hombres. Hoy es para mí uno de estos momentos significativos, ante la benevolencia de esta docta y digna Corporación, cargada de historia y alto magisterio, que me abre sus puertas y me acoge en su seno. Bien sé que no es por méritos propios, sino por vuestra indulgencia al juzgarme y vuestra generosidad al aceptarme.

Es por ello justo que, con emoción y afecto, exprese mi agradecimiento a todos ustedes, Señores Académicos de la Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana por haberme otorgado este alto honor que para mí supone el formar parte de ella y poder participar en sus actividades. Soy consciente de la alta responsabilidad adquirida en este instante, y creo que la mejor manera de mostrar mi gratitud por vuestra gentileza, es prometeros desde ahora mismo mi total entrega para colaborar en las tareas corporativas, a cuyo fin no regatearé esfuerzo alguno. Estoy seguro que la preocupación que me produce esta responsabilidad se verá compensada, con creces, por la oportunidad que tendré de recibir vuestras sabias enseñanzas. Espero no defraudarles, y, con el tiempo, hacerme merecedor de este extraordinario e inmerecido privilegio junto con la confianza en mí depositada.

Pero permítanme que este agradecimiento lo sea de manera muy especial para aquellos que apoyaron mi candidatura y se pronunciaron favorablemente a mi ingreso, y muy especialmente a los Ilustrísimos Académicos Profesores, D. Juan Brines Solanes, D. Juan Esplugues Requena y D. Agustín Llopis González, quienes tuvieron la gentileza de proponer mi nombre.

Creo que también es justo y oportuno en este momento agradecer a Luisa, mi esposa, su inestimable apoyo y comprensión, su aliento y consideración durante todos estos años dedicados al estudio y al trabajo, además de haber envuelto mi hogar del amor y paz necesarios para nuestra convivencia familiar. Deseo expresar también unas palabras de cariño a mis hijos Gracia, Javier y Beatriz.

No hay duda que una de las consideraciones que más me emocionan en este momento, hondamente, es pensar que voy a pertenecer a la misma Corporación de la que forma parte el Ilmo. Prof. Dr. D. Enrique Hernández Giménez al cual, más que íntimos lazos familiares, me une una relación casi paternal, y a cuyo ejemplo debo mi vocación inicial como farmacéutico, y posteriormente como microbiólogo, científico y docente universitario. Durante los muchos años que llevamos compartiendo juntos tareas universitarias, él, además de con las palabras me ha enseñado con el ejemplo, como lo hacen los verdaderos maestros. El Prof. Hernández Giménez, a la vez que un magnífico docente y un científico admirable, es un “caballero universitario”. Así lo definió el Magfco. y Excmo. Rector de la Universidad Politécnica de Valencia D. Justo Nieto en el prólogo del libro homenaje que le dedicó su Universidad. De su brazo, del brazo de un hombre excepcional en lo humano y en lo profesional, inteligente y afectivo, me enorgullece hacer la entrada en esta Ilustre y Real Academia.

Antes de pasar a mi reglamentario discurso de recepción, debo cumplir el deber, no menos preceptivo, de glosar la personalidad de mi antecesor en el sillón de la Academia al que me destináis. Vengo, señores académicos, a ocupar el sillón que dejó vacante el Ilmo. Sr. D. Agustín Llopis Marí, uno de los farmacéuticos más brillantes, sin duda, de la Farmacia valenciana del pasado siglo.

Mi primer contacto con D. Agustín fue a través de sus hijos, Agustín y Juan, amigos y compañeros de vicisitudes en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, y actualmente profesores de las Facultades de Farmacia de Valencia y Granada, respectivamente. A él, personalmente lo conocí, y no sin cierto temor, cuando en 1975, y ejerciendo su labor de Inspector Provincial de Farmacia vino a realizar el Acta de Apertura de mi Oficina de Farmacia en Valencia. Hacía apenas tres meses que había ingresado en esta Real Academia con un discurso sobre “La Hidrogeología y las aguas de abastecimiento de Valencia”.

D. Agustín nació en Cullera, tierra luminosa y marinera, y desde siempre sintió la llamada del agua y el grito de la tierra surcada por su Júcar. En su discurso de recepción presentó, desde una clara perspectiva farmacéutica, un completo estudio hidrogeológico de nuestras aguas, a la vez que dejó sentadas las bases para las posteriores investigaciones que, como consecuencia de la expansión industrial y modernización, se han ido realizando en un tema de enorme relevancia actual como es la contaminación ambiental de nuestras aguas con pesticidas, detergentes y residuos industriales.

La personalidad científica del Dr. Llopis Marí empezó a forjarse con tesonera voluntad en los revueltos y difíciles años cuarenta, dentro de los estrechos límites de su Oficina de Farmacia en Fuente la Higuera y en la paz recoleta y serena de su pequeño laboratorio rural. Su trabajo solitario y aislado, pero entusiasta, le lleva a conseguir una Beca del Patronato “Ramón y Cajal” del C.S.I.C., que le permitirá realizar su Tesis Doctoral y acceder posteriormente al puesto de Profesor Ayudante en la Cátedra de Galénica de la Facultad de Farmacia de Madrid, obteniendo a su vez el “Premio Clariana” de la Real Academia Nacional de Farmacia por sus trabajos galénicos sobre aminoácidos, saponinas y glucósidos de la adelfa.

Además de por sus valiosas aportaciones galénicas, el Dr. Llopis Marí también destacó como analista clínico e incluso como botánico, afición esta última que le llevó a reunir en un interesantísimo libro la Flora Silvestre Valenciana (1978).

A partir de 1960, fecha en la que obtiene, por oposición, la plaza de Jefe de la Sección de Análisis Higiénico-Sanitarios e Inspector Provincial de Farmacia de Alicante, desarrolla una intensa labor científica fundamentalmente en los campos de la Hidrogeología y la Higiene, dirigiendo las campañas sanitarias promovidas por la Jefatura de Sanidad de Alicante y en 1970 aísla vibriones coléricos en heces de enfermos diarreicos y aguas de diversas localidades alicantinas.

Finalmente, en 1973 es trasladado a Valencia al quedar vacante la plaza de Inspector de Farmacia que ocupaba su antecesor, D. José Marqués, función que ejerció con auténtica devoción hasta su jubilación.

El Dr. Llopis Marí, a través de una limpia ejecutoria científica, fue recorriendo las diversas parcelas que integran su profesión, aparentemente heterogéneas, si bien congruentes con su misión fundamentalmente sanitaria. Fue un hombre de su tiempo, dotado de una inteligencia excepcionalmente aguda y brillante, que junto con su gran tesón, configuraron una personalidad recia, donde, en lo humano, la afectividad se recubría de un ropaje aparentemente

hosco para no delatar su carácter tremendamente sensible. Tímido, austero, tenaz, en una palabra, fue un hombre bueno, exigente primero consigo mismo y luego con los demás. D. Agustín evitaba el elogio, por ello, este breve panegírico en su honor, como silencioso homenaje de respeto a su persona.

Vengo a ocupar un sillón de farmacéutico y es que, a lo largo de los tiempos, la Farmacia siempre estuvo unida a la Medicina, y bajo su tutela permaneció hasta el año 1845 en que, durante el reinado de Isabel II, fueron creadas las Facultades de Farmacia alcanzando, en consecuencia, los estudios el máximo rango universitario.

En el año 1900, un Real Decreto modificaba las enseñanzas en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central y establecía la dotación, como asignatura de Doctorado de una Cátedra denominada “Microbiología, técnica bacteriológica y preparación de sueros medicinales”. Esta fue, por tanto, la primera vez que las enseñanzas de Microbiología se incorporaban a la Universidad. Ese mismo año, en la Facultad de Medicina se creó una Cátedra que con el nombre de “Higiene pública” dedicaba un capítulo a la Bacteriología.

Posteriormente se fueron estableciendo las Cátedras de Microbiología en los estudios de Veterinaria (1912) e Ingenieros Agrónomos (1925), siendo un farmacéutico zamorano, el Dr. Francisco de Castro y Pascual (1871-1949) el primer Catedrático de Microbiología de la Universidad Española, quien posteriormente en 1923 sería elegido Académico de Número de la Real Academia de Medicina.

He decidido pronunciar un discurso sobre la importancia en Seguridad Alimentaria de *Campylobacter*, un grupo de bacterias hasta hace muy poco desconocidas por el mundo científico y en los ambientes sanitarios. El motivo es doble, por un lado el haber constituido mi principal campo de investigación en los últimos 20 años, y por otro, intentar divulgar el conocimiento que tenemos sobre estos patógenos entéricos que en la actualidad constituyen la principal causa de gastroenteritis bacteriana por consumo de alimentos. Es por ello que a este discurso de recepción le podríamos poner el título de:

Campylobacter: líder en patología intestinal infecciosa

No cabe duda de que en los tiempos actuales los alimentos son objeto de atención e interés por parte de los medios de información y de otros muchos sectores de nuestra sociedad. La razón de esta importancia hay que buscarla en la necesidad de alimentarse que tiene el hombre y en la preocupación que hoy se vive por la salud en todos los ambientes.

De forma natural, todas las materias primas utilizadas para la elaboración de alimentos, ya sean de origen animal o vegetal, presentan una contaminación superficial por microorganismos íntimamente relacionados con los lugares donde esa materia prima ha sido criada o cultivada. Algunos tienen efectos deseables, tales como los utilizados en la producción de alimentos fermentados, mientras que otros causan alteraciones en sus características organolépticas inutilizándolos para su consumo o incluso pueden llegar a producir enfermedades en el consumidor.

En general, resulta difícil evitar la contaminación del alimento, por lo que las medidas prácticas tienden a inhibir o reducir la multiplicación de los microorganismos contaminantes, aplicando diversos procesos tecnológicos.

A diferencia de lo que ocurre con otros microorganismos patógenos asociados al consumo de alimentos, *Campylobacter* no forma parte del vocabulario popular ni tampoco aparece regularmente en los medios de comunicación. Ello no quita que su presencia sea constante en los recuentos epidemiológicos. Pese a su desconocimiento por parte del gran público, es la bacteria responsable del mayor número de infecciones vehiculizadas por alimentos en los países desarrollados.

Actualmente, la campylobacteriosis es un problema de Salud Pública con un coste social cada día más elevado. La incidencia de la campylobacteriosis se ha incrementado substancialmente a partir de 1990, no solamente en los países más avanzados, sino también en aquellos que están en vías de desarrollo, con tasas muy significativas de morbilidad y mortalidad entre la población infantil.

La publicación en el año 2000 de la secuencia genómica completa de la cepa tipo de *Campylobacter jejuni* ha contribuido a esclarecer muchos aspectos metabólicos, patogénicos y estrategias de supervivencia de estas bacterias.

De especial importancia en la actualidad es el elevado incremento del número de cepas resistentes a los antibióticos (macrólidos y fluoroquinolonas) y el reconocimiento del síndrome paralítico de Guillain-Barré (GBS) como una complicación seria de las infecciones por *Campylobacter*.

Se han identificado muchos factores de riesgo en la transmisión de la campylobacteriosis, especialmente el manejo y consumo de carne de ave, los alimentos de origen animal, la leche cruda, el agua inadecuadamente tratada, el contacto con animales de granja y domésticos, e incluso el turismo y la inmigración.

A pesar de ello, la gran mayoría de países carecen de infraestructuras adecuadas en sus laboratorios y de sistemas de seguimiento para cuantificar el coste sanitario y económico de la campylobacteriosis humana. Además, su capacidad para detectar y responder ante un brote es muchas veces insuficiente.

1. Antecedentes históricos

Algunas especies de *Campylobacter* ya fueron descritas hace prácticamente un siglo, aunque solo durante los últimos 30 años han sido reconocidas como causa importante de enfermedad en el hombre. Originariamente, fueron frecuentemente aisladas en los animales, particularmente en el ganado bovino y ovino, y por su morfología espiral fueron consideradas inicialmente como especies del género *Vibrio*.

Los microorganismos hoy considerados como *Campylobacter*, fueron probablemente observados por primera vez en 1886 por Theodor Escherich en Alemania quien publicó una serie de artículos sobre bacterias intestinales en la revista *Münchener Medizinische Wochenschrift*. Escherich observó al microscopio unas bacterias con morfología espiral a partir del mucus intestinal de niños recién nacidos que habían muerto de una enfermedad diarreaica que él denominó ‘cólera infantum’. Posteriormente, también observó microscópicamente esas formas espirales en las heces de otros niños que sufrían de enfermedad entérica. Todos sus intentos por cultivar en medios sólidos esos ‘vibrios’ fueron, sin embargo, infructuosos, concluyendo que su presencia constituía un valor de pronóstico más bien que un significado causal, es decir, pensó que no jugaban ningún papel etiológico. Desafortunadamente, sus trabajos fueron publicados en alemán, y no tuvieron repercusión durante décadas hasta que fueron resaltados por Manfred Kist en el transcurso del Tercer Congreso Internacional de *Campylobacter* celebrado en Ottawa en 1985.



Figura 1. Publicación y dibujo original de Escherich en 1886 de la bacteria espiral encontrada en el colon de un niño fallecido por ‘cólera infantum’.

La era veterinaria

En los inicios del siglo XX, los veterinarios ingleses John McFadyean y quién años más tarde sería su yerno Stewart Stockman, llevaron a cabo por encargo del gobierno británico un monumental trabajo con más de 250.000 ovejas preñadas para intentar esclarecer las causas de infertilidad y abortos epizoóticos en estos animales. Si bien la mayoría de sus investigaciones estaban relacionadas con la bacteria *Brucella abortus*, también involucraron a una bacteria de morfología espiral que habían aislado del moco uterino de una oveja y del contenido estomacal de su propio feto, como agente causal de lo que ellos denominaron 'aborto vibriónico' en ovejas. Estos hechos ocurrieron en 1906, aunque no publicaron sus hallazgos hasta 1913, si bien la 1ª Guerra Mundial impidió una más amplia difusión de sus trabajos.

Unos pocos años más tarde, en 1919, Theobald Smith y Marian Taylor en los EE.UU. observaron un organismo similar que ocasionaba abortos en bóvidos y comprobaron que no se trataba del 'bacilo de Bang' sino de la misma bacteria que habían aislado McFadyean y Stockman, proponiendo para ella el nombre de *Vibrio fetus*. En 1931 Jones, Orcutt y Little comprobaron que existía una relación causal entre un grupo de bacterias vibrioides microaerófilas aisladas de heces de terneros con diarrea y la disentería bovina, diferenciándose respecto de *V. fetus* en su longitud y número de vueltas de espira; la denominaron *Vibrio jejuni*. Posteriormente en 1944, Doyle describió una bacteria similar aislada del intestino de cerdo con disentería y propuso el nombre de *Vibrio coli*. Así pues, hace ya más de 60 años que aparecían descritos en la bibliografía como patógenos de animales las especies hoy conocidas como *Campylobacter fetus*, *C. jejuni* y *C. coli*.

El aborto vibriónico ha demostrado ser una de las principales causas de pérdida reproductiva en el ganado. Así, en 1947, Plastringe et al., descubrieron que había también una forma venérea de transmisión de la infección a partir del semen de toro que ocasionaba la muerte del feto en los estadios iniciales y, en consecuencia, provocaba infertilidad en la vaca. Este hallazgo ha sido de enorme importancia, puesto que ha conducido a la eliminación de los toros portadores de los programas de inseminación artificial. Las cepas causantes de esta infertilidad infecciosa fueron descritas en 1959 por Florent en Bélgica, siendo consideradas actualmente como *C. fetus* subsp. *venerealis*.

Primeras infecciones humanas

Aunque los campylobacters no han sido ampliamente reconocidos como patógenos humanos hasta finales de la década de los 1970, si es cierto que se han descrito aislamientos ocasionales.

La primera infección humana causada por *C. jejuni*, fielmente documentada por Levy en 1946, tuvo lugar en Mayo de 1938 en Illinois, USA. Fue un brote de diarrea ocasionado por el consumo de leche cruda que afectó a 355 internos de dos instituciones penitenciarias adyacentes. Los coprocultivos realizados a 73 enfermos fueron negativos, si bien en 31 de las muestras fecales se pudo observar al microscopio una bacteria, que sin duda alguna, era *C. jejuni*. De la sangre de 13 de 39 pacientes se obtuvo crecimiento en medio líquido, aunque no se pudo aislar en medio sólido.

En 1947, los franceses René Vinzent y Julien Dumas, consiguen aislar un vibrio microaerófilo, *V. fetus*, de la sangre de tres mujeres embarazadas que habían sido hospitalizadas debido a una fiebre de origen desconocido. La enfermedad remitió al cabo de unas cuatro semanas y dos de las tres mujeres acabaron sufriendo aborto espontáneo. El examen de la placenta demostró la existencia de inflamación y grandes áreas necróticas. La tercera paciente, tras ser tratada con penicilina y sulfonamidas, dio a luz un bebé de 2.130 g de peso.

Es en 1957 cuando Elizabeth King, en Atlanta, relaciona por primera vez los campylobacters con enfermedades de tipo entérico en el hombre y distingue dos grupos en base a sus características termofílicas. Presenta un estudio en el que un grupo de bacterias, concretamente *V. jejuni* y *V. coli*, a las que denomina 'vibrios afines' son aislados de heces de pacientes con diarrea. Estos vibrios tienen la característica diferencial respecto a *V. fetus* de ser capaces de crecer óptimamente a 42°C (termotolerantes), quizás como una forma de adaptarse a los animales de sangre caliente como las aves. King fue la primera en señalar que el síntoma

más importante de esta infección humana era la diarrea, y recalcó la enorme importancia que en un futuro tendrían estas bacterias en la diarrea infantil de etiología desconocida.

Hasta el año 1972, únicamente se habían registrado en la literatura 12 casos de infecciones por 'vibrios relacionados', en las que se vieron afectados siete recién nacidos, dos niños y tres adultos. La razón de este bajo número de comunicaciones era debido a la ausencia de técnicas de cultivo selectivas necesarias para el aislamiento del organismo a partir de las heces de los enfermos. Hasta entonces, la infección únicamente pudo ser diagnosticada a partir de la sangre de pacientes con bacteriemia. Elizabeth King también puso de manifiesto la necesidad urgente de disponer de un medio sólido para el cultivo selectivo de estas bacterias a partir de las heces de los enfermos. Desgraciadamente, en 1966 y a la edad de 54 años murió de cáncer y no pudo ver cómo sus 'vibrios afines' encabezaban las listas de patógenos entéricos, superando en mucho sus expectativas.

El punto de inflexión

El punto crucial para el avance en el conocimiento de estos microorganismos era el desarrollo de una técnica que permitiera el aislamiento de *Campylobacter* directamente a partir de las heces de los enfermos. Este hecho fue parcialmente logrado en 1968 por la colaboración de dos científicos belgas, Joseph Dekeyser en el Instituto Nacional de Investigaciones Veterinarias y Jean-Paul Butzler en el Hospital Universitario St. Peter de Bruselas. El 18 de julio de 1968

una mujer de 20 años de edad fue ingresada en el Hospital debido a una diarrea severa y fiebre de 40°C, sin ningún otro tipo de patología subyacente. Una bacteria espiral, *C. jejuni*, fue aislada de la sangre, y tras la utilización de una técnica de filtración especial se consiguió también aislarla de las heces. Esta técnica, publicada en 1972, consistía en pasar una suspensión de heces a través de un filtro de 0.65 µm de diámetro, lo cual permitió el paso de las células de *Campylobacter*. El filtrado fue posteriormente inoculado en un medio selectivo, de manera que ningún otro patógeno entérico se pudo aislar de las heces de la paciente. Este primer cultivo fecal demostró que la infección intestinal era la causa de la bacteriemia.

Tras este éxito, ambos científicos belgas realizaron un estudio más general en el que lograron aislar *C. jejuni* y *C. coli* del 5.3% de 3.000 niños con diarrea, pero tan sólo de un 1.6% de un total de 7.200 personas sin diarrea, demostrando además la gran susceptibilidad de éstas células a la eritromicina, antibiótico que desde entonces se ha venido utilizado para su tratamiento. Aunque estos trabajos fueron publicados en revistas internacionales, inexplicablemente no suscitaron ningún tipo de respuesta por parte de la comunidad científica hasta transcurridos varios años.

El gran salto cualitativo y, por tanto, la fecha de nacimiento o punto de partida del conocimiento actual sobre la infección por *Campylobacter* tuvo lugar en 1977, el mismo año en que se asoció el sarcoma de Kaposi al SIDA y la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró erradicada la viruela del planeta tras el último caso natural aparecido en Somalia. Fue entonces cuando, en Worcester, Inglaterra, el médico Martin B. Skirrow describe la enteritis por *Campylobacter* como una "nueva" enfermedad y tras el empleo de una técnica simple de cultivo en medio sólido selectivo, adicionado de vancomicina, polimixina y trimetoprim, y sin necesidad de filtración alguna, consigue aislar *C. jejuni* de las heces del 7.1% de un total de 803 pacientes con diarrea, incluido adultos, observando una mayor incidencia en niños de corta edad. La magnitud de este trabajo es tal que en la actualidad ocupa el segundo lugar en el ranking de las publicaciones más citadas en la prestigiosa revista *British Medical Journal*.

El desarrollo por parte de Skirrow de este medio selectivo permitió a los laboratorios microbiológicos de análisis rutinario la detección de *campylobacters* y la evaluación de su importancia clínica. A partir de este momento, la consiguiente mejora en las técnicas de aislamiento junto con el desarrollo de nuevos medios de cultivo selectivos, conduce al reconocimiento de *C. jejuni* como un importante agente enteropatógeno y principal causa bacteriana de gastroenteritis humana en la mayoría de los países desarrollados. Dos años más tarde, Butzler y el propio Skirrow publican conjuntamente el primer estudio completo sobre la gastroenteritis humana por *Campylobacter*.

2. Revisión taxonómica

En 1963, los franceses Madeleine Sebald y Michel Veron observan que los organismos denominados por Elizabeth King como ‘vibrios afines’ son distintos del resto de los miembros del género *Vibrio*, debido a su menor composición en bases G+C (30-34 moles%), a su crecimiento microaerofílico y a la ausencia de metabolismo de tipo fermentativo. Esto los conduce a reclasificarlos en el nuevo género *Campylobacter* (que deriva de la palabra griega ‘kampylos’ que significa curvado y ‘bacter’ bacilo). Diez años más tarde, en 1973, el propio Michel Veron junto con R. Chatelain, establecen las bases del actual sistema de clasificación y reconocen 4 especies: *C. fetus* (especie tipo), *C. jejuni*, *C. coli* y *C. sputorum*.

En la 8ª edición del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” publicada en 1974, *Campylobacter* constituía, junto con el género *Spirillum*, la familia Spirillaceae. La agrupación de estos dos géneros en la misma familia se basaba principalmente en características morfológicas. En 1984, cuando fue publicada la 1ª edición del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, todavía no se conocían las relaciones filogenéticas entre estos microorganismos, y se decidió eliminar esta denominación de familia. *Campylobacter* fue agrupado conjuntamente con los géneros *Spirillum*, *Aquaspirillum*, *Oceanospirillum* y *Azospirillum*, basándose en sus similitudes morfológicas o fisiológicas (Krieg, 1984). En esta edición el género *Campylobacter* estaba compuesto por cinco especies: *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. sputorum* y *C. concisus*.

En los años siguientes nuevas especies de *Campylobacter* fueron descritas: *C. laridis* (Benjamin et al., 1983), *C. nitrofigilis* (McClung et al., 1983), *C. hyointestinalis* (Gebhart et al., 1985), *C. pyloridis* (Marshall et al., 1984), *C. cryaerophila* (Neill et al., 1985), *C. cinaedi* (Totten et al., 1985), *C. fennelliae* (Totten et al., 1985), *C. mustelae* (Fox et al., 1989) y *C. upsaliensis* (Sandstedt & Ursing, 1991). Además, una nueva subespecie de *C. jejuni* incapaz de reducir los nitratos a nitritos, *C. jejuni* subsp. *doylei*, fue propuesta por Steele & Owen (1988). También fueron incluidas en el género *Campylobacter*, las especies *C. curvus* y *C. rectus* (Vandamme et al., 1991), descritas previamente como pertenecientes al género *Wolinella*. Algunas de estas especies fueron posteriormente transferidas a otros géneros.

En 1989, el análisis del ARN ribosómico (ARNr) y estudios ultraestructurales, dieron como resultado suficientes diferencias para el establecimiento de un nuevo género llamado *Helicobacter*, transfiriéndose las especies *C. pylori* (anteriormente nombrada *C. pyloridis*) y *C. mustelae* al mismo (Goodwin et al. 1989). Otras dos especies aisladas de hombres homosexuales con enteritis, y previamente adscritas al género *Campylobacter* fueron también incluidas en este nuevo género, como *H. cinaedi* y *H. fennelliae* (Vandamme et al., 1991). En la última década se han aislado otras muchas especies del tubo digestivo de un gran número de mamíferos, incluido el hombre, hasta completar las 23 especies que actualmente constituyen el género *Helicobacter*.

El género *Arcobacter* fue propuesto por Vandamme et al. (1991) basándose en estudios comparativos de la subunidad 16S del ARNr para designar a un tipo de campylobacters aerotolerantes aislados por primera vez por Laanbroek et al. en 1977. En este género se incluyeron *A. nitrofigilis* (anteriormente clasificada como *C. nitrofigilis* por McClung et al. en 1983) y *A. cryaerophilus*, (*C. cryaerophila* según Neill et al. en 1985). Más tarde, se incluyó también la especie *A. butzleri* (aislada de hombres y animales) previamente clasificada en 1991 como *C. butzleri* por Kiehlbauch et al., y la especie *A. skirrowii* (Vandamme et al., 1992) procedente de animales. Además, basándose en los caracteres fenotípicos y genotípicos que *Campylobacter* y *Arcobacter* tenían en común y que a su vez los separaba de otros géneros, propusieron la creación de una nueva familia que los agrupase, la familia *Campylobacteraceae* (Vandamme & De Ley, 1991).

Se han descrito nuevas especies y subespecies pertenecientes a esta familia desde su creación, como *C. helveticus* (Stanley et al., 1992), *C. showae* (Etoh et al., 1993), *C. hyoilei* (Alderton et al., 1995), *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* (On et al., 1995), *C. lanienae* (Logan et al., 2000) y *C. hominis* (Lawson et al., 2001). También se ha incluido *Bacteroides gracilis* como *C. gracilis* (Vandamme et al., 1995). La última especie propuesta ha sido *C. insulaenigrae*, para designar a una nueva especie de *Campylobacter* aislada de mamíferos marinos (Foster et al., 2004).

Según la última clasificación descrita en la 2ª ed. del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2005) el género *Campylobacter*, junto con *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Thiovulum* se agrupan formando la familia *Campylobacteraceae* (Vandamme & De Ley, 1991), que junto con la familia *Helicobacteraceae* (Vandamme, 2000), en la que se incluyen *Helicobacter*, y *Wollinella*, conforman el orden *Campylobacterales* de las e-Proteobacterias (Trust et al., 1994).

Campylobacter está compuesto actualmente por 17 especies: *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus* (con las subespecies *C. fetus* subsp. *fetus* y *C. fetus* subsp. *venerealis*), *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis* (con las subespecies *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* y *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*), *C. jejuni* (con las subespecies *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei*), *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* (con las subespecies *C. sputorum* subsp. *sputorum* y *C. sputorum* subsp. *bubulus*), *C. upsaliensis* y *C. insulaenigrae*. La especie tipo es *C. fetus* subsp. *fetus* (Bergey's on line, Garrity et al., 2004). Las especies patógenas más comúnmente aisladas (por orden de frecuencia) son *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus*.

Tabla 1

***Campylobacter*: situación taxonómica**

Dominio	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Epsilonproteobacteria</i>
Orden	<i>Campylobacterales</i>
Familia I.	<i>Campylobacteraceae</i>
Género I.	<i>Campylobacter</i>
Género II.	<i>Arcobacter</i>
Género III.	<i>Sulfurospirillum</i>
Género IV.	<i>Thiovulum</i>
Familia II.	<i>Helicobacteraceae</i>
Género I.	<i>Helicobacter</i>
Género II.	<i>Wollinella</i>

Tabla 2

Especies de *Campylobacter* y hospedadores

Nombre	Hospedador	Referencia
<i>C. coli</i>	Cerdos	Doyle, 1948 Véron & Chatelain, 1973
<i>C. concisus</i>	Hombre	Tanner et al., 1981
<i>C. curvus</i>	Hombre	Tanner et al., 1984 Vandamme et al., 1991
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Ganado, ovejas	Smith & Taylor, 1919 Véron & Chatelain, 197
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Ganado	Florent, 1959 Véron & Chatelain, 1973
<i>C. gracilis</i>	Hombre	Tanner et al., 1981 Vandamme et al., 1995
<i>C. helveticus</i>	Perros, gatos	Stanley et al., 1992
<i>C. hominis</i>	Hombre	Lawson et al., 2001
<i>C. hyointestinalis</i>	Cerdos, ganado,	Gebhart et al., 1985

subsp. <i>hyointestinalis</i>	hamsters	
<i>C. hyointestinalis</i>	Cerdos, aves	On et al., 1995
subsp. <i>lawsonii</i>		
<i>C. insulaenigrae</i>	Mamíferos marinos	Foster et al., 2004
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Hombre	Steele & Owen, 1988
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Aves, hombre	Jones, 1931
		Véron & Chatelain, 1973
<i>C. lanienae</i>	Hombre	Logan et al., 2000
<i>C. lari</i>	Gatos, perros, pollos, monos	Benjamin et al., 1983
<i>C. mucosalis</i>	Cerdos	Lawson et al., 1981
		Roop et al., 1985
<i>C. rectus</i>	Hombre	Tanner et al., 1981
		Vandamme et al., 1991
<i>C. showae</i>	Hombre	Etoh et al., 1993
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i>	Carneros	Florent, 1953
		Véron & Chatelain, 1973
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	Hombre, ganado, cerdos, ovejas	Prévot, 1940
		Véron & Chatelain, 1973
<i>C. upsaliensis</i>	Gatos, perros, patos, monos	Sandstedt & Ursing, 1991

3. Características generales

El género *Campylobacter* está formado por pequeños bacilos Gram-negativos, no formadores de esporas, de forma curvada o helicoidal, con un tamaño que puede variar entre 0,2-0,5 μm de anchura por 0,5-5 μm de longitud. Algunas células pueden adoptar formas esféricas, cocoides o alargadas en situaciones de carencia o estrés, como por ejemplo en cultivos viejos o expuestos a condiciones ambientales adversas, como oxígeno atmosférico (Alonso et al., 2002). Se ha sugerido que podrían tratarse de formas viables pero no cultivables (VNC) del organismo, aunque existe una gran controversia respecto a este tema, particularmente en aquello que se refiere a su virulencia. Según Thomas et al. (1999a), la virulencia de estas formas VNC debe considerarse equivalente a la de las formas cultivables, pero con un riesgo añadido, ya que no pueden ser detectadas por métodos de cultivo convencionales.

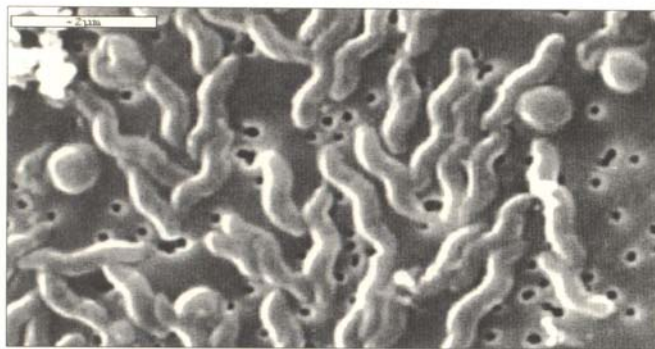


Figura 2. Morfología (espiral y cocoides) de *Campylobacter* observada mediante microscopía electrónica 15000X.

En general, son muy móviles, con un característico y rápido movimiento en forma de sacacorchos debido a la presencia de un flagelo polar no envainado en uno o en ambos extremos de la célula. Sin embargo, *C. showae* tiene un haz unipolar de flagelos, y *C. gracilis* no es móvil y carece de flagelo. Tanto *C. jejuni* como *C. coli* pueden carecer de movilidad en algunos casos, especialmente tras varios subcultivos.

Las especies de *Campylobacter* son microaerófilas, aunque su tolerancia al oxígeno puede variar, incluso entre cepas de la misma especie. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Las especies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis* son capaces de crecer a 42°C, pero no a 25°C, constituyendo el denominado grupo termotolerante.

Campylobacter jejuni tiene un cromosoma de 1.641 kilobases (kb), relativamente pequeño comparado con otros enteropatógenos como *Escherichia coli* que tiene 4.500 kb, y se calcula que el número de genes está limitado a unos 1.600, frente a los 5.000 que posee *Salmonella*. Ciertas cepas contienen plásmidos y bacteriófagos.

Tienen un metabolismo típicamente respiratorio. Utilizan como fuente de carbono algunos aminoácidos y compuestos intermedios del ciclo del ácido tricarboxílico. Reducen el nitrato (a excepción de *C. jejuni* subsp. *doylei*) pero no el hipurato (exceptuando *C. jejuni*), y son incapaces de fermentar u oxidar carbohidratos. Reducen el fumarato a succinato, son rojo de metilo y Voges-Proskauer negativas, no producen indol (a excepción de *C. gracilis*). La gran mayoría de las especies son catalasa y oxidasa (exceptuando *C. gracilis*) positivas, y ureasa negativas. Generalmente no son hemolíticos, aunque *C. jejuni* y *C. coli* pueden serlo cuando son incubados a 42°C. Tienen un bajo contenido en bases G+C de 28-46 mol%. En la tabla 3 se recogen algunas de las propiedades bioquímicas más importantes de las especies de este género.



Figura 3. Célula de *Campylobacter*. Microscopía electrónica 15.000X.

Tabla 3
**Características bioquímicas de las especies
del género *Campylobacter***

Especies	Catalasa	Nitratos	Ureasa	Hidrólisis indoxil acetato	Cto. 25/42°C
<i>C. coli</i>	+	+	-	+	-/+
<i>C. concisus</i>	-	V	-	-	-/V
<i>C. curvus</i>	-	+	-	V	-/V
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	+	-	-	+/V
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	V	+	-	-	+/-
<i>C. gracilis</i>	V	V	-	V	-/V
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	+	-/+
<i>C. hominis</i>	-	ND	-	-	ND
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	+	+	-	-	V/+
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	+	+	+	-	-/+
<i>C. insulaenigrae</i>	+	+	ND	-	-/ND
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	V	-	-	+	-/-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	+	+	-	+	-/+
<i>C. lanienae</i>	+	+	-	-	-/+
<i>C. lari</i>	+	+	V	-	-/+
<i>C. mucosalis</i>	-	+	-	-	-/+
<i>C. rectus</i>	V	+	-	+	-/V
<i>C. showae</i>	+	+	-	V	-/V
<i>C. sputorum</i>	V	+	V	-	-/+
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	-	+	-/V

+ , reacción positiva; - , reacción negativa; V, variable dependiendo de la cepa;
ND, no determinado; AN, Ac. Nalidíxico; C, Cefalotina

Tabla 3
**Características bioquímicas de las especies
del género *Campylobacter***

Especies	Cto. 1% glicina	H ₂ S/TSI	Cto. 4% NaCl	Hidrólisis hipurato	Resistencia	
					AN	C
<i>C. coli</i>	+	V	-	-	-	+
<i>C. concisus</i>	V	-	-	-	V	-
<i>C. curvus</i>	+	V	-	V	+	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	-	-	-	+	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	-	-	-	-	V	-
<i>C. gracilis</i>	+	-	-	-	V	-
<i>C. helveticus</i>	V	-	-	-	-	-
<i>C. hominis</i>	ND	-	ND	-	-	ND
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	+	+	-	-	+	V
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	V	+	-	-	+	-
<i>C. insulaenigrae</i>	-	ND	ND	-	ND	ND
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	+	-	-	+	-	-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	+	-	-	+	-	+
<i>C. lanienae</i>	-	-	ND	-	+	+
<i>C. lari</i>	+	-	-	-	V	+
<i>C. mucosalis</i>	V	+	-	-	V	-
<i>C. rectus</i>	+	-	-	-	V	-
<i>C. showae</i>	V	V	-	-	-	-
<i>C. sputorum</i>	+	+	V	-	V	-
<i>C. upsaliensis</i>	+	-	-	-	-	V

+, reacción positiva; -, reacción negativa; V, variable dependiendo de la cepa;
ND, no determinado; AN, Ac. Nalidíxico; C, Cefalotina

4. Campylobacter en la cadena alimentaria

Las infecciones por *Campylobacter* son zoonosis, en las que una gran variedad de animales actúan como reservorios, pudiendo localizarse las bacterias en sus órganos reproductivos, tracto intestinal o en la cavidad oral. El ser humano adquiere la infección por *C. jejuni* y *C. coli* tras consumir alimentos, leche o agua contaminada.

Las aves de corral son la principal fuente de contagio en el hombre, siendo responsables de más de la mitad de las infecciones en los países desarrollados. Las bacterias se encuentran en el contenido intestinal de las aves, siendo la contaminación prácticamente universal. *C. jejuni* infecta a las aves recién nacidas bien a partir de las aves adultas o a través del agua y los piensos. Durante el sacrificio se contaminan las canales, de manera que, más del 90% de los pollos de venta al público congelados están contaminados con estos microorganismos, siendo *C. jejuni* la especie más frecuentemente aislada.

Recientemente se ha comprobado que la inclusión de ácido caprílico como suplemento en la dieta de los pollos tiene una gran eficacia terapéutica puesto que reduce las poblaciones de campylobacters en las aves infectadas. El ácido caprílico está considerado por la FDA (Food and Drug Administration) como un aditivo natural (se encuentra en la leche y en aceite de coco) y seguro (Solis et al. 2007).

También es habitual encontrar *Campylobacter* en otros alimentos como la carne de cerdo, aunque en este caso es *C. coli* la especie predominante, mientras que *C. jejuni* es un comensal intestinal del cerdo. En las canales de carnes rojas se aíslan en menor cantidad que en las aves de corral, sin embargo, pueden llegar a determinados alimentos derivados como hamburguesas y bistecs de carne de vacuno cruda, aunque el nivel de contaminación es muy bajo, inferior a un microorganismo por cm².

El agua, tanto de arroyos, ríos como marina, es también un hábitat habitual de estas especies, debido sobre todo a la contaminación fecal por parte de animales (Waage et al., 1999). Las posibles infecciones provocadas por *Campylobacter* están relacionadas con el consumo de agua superficial no clorada y agua de depósitos con contaminación fecal (Hernández, 1993). Los brotes son poco frecuentes, pero cuando ocurren son muchos los afectados. A su vez, el agua constituye una fuente de infección para los animales.

El consumo de leche cruda de cabra o de vaca es un vehículo importante de infección humana por *C. jejuni* (Riordan et al., 1993), sin embargo, con un proceso adecuado de pasteurización los brotes epidémicos son raros, ya que la leche pasteurizada es un producto microbiológicamente seguro. La presencia de *C. jejuni* en leche es debida a una mastitis del animal o a la contaminación fecal durante el ordeño.

Los vegetales y las frutas pueden albergar también estos microorganismos por contacto con aves salvajes o aguas contaminadas. En alimentos de origen marino como moluscos bivalvos (mejillones y ostras) también se ha detectado la presencia de *C. jejuni*. Este hecho indica la presencia de las especies termotolerantes en aguas marinas debido sobre todo a la contaminación proveniente de gaviotas (Jones, 2001).

La sensibilidad de estos microorganismos a bajas actividades de agua hace que no representen un problema en alimentos con elevada concentración de solutos. De la misma forma, su sensibilidad a medios ácidos, convierte a alimentos como el queso o el yogur en productos raramente contaminados.

Supervivencia de Campylobacter en alimentos y aguas

Los campylobacters son muy sensibles al calor y no sobreviven a los tratamientos habituales de pasteurización. Su valor D o tiempo de reducción decimal a 63,5°C es de apenas unos pocos segundos. En leche el tiempo de reducción decimal a 55°C es de un minuto. En carne, a 60°C, se obtiene ese mismo valor D de un minuto. A 60°C durante 10 min en carne cocinada se logra una reducción total partiendo de una concentración inicial de 10⁶ ufc/g de carne mientras que a 50-53°C se ha detectado la recuperación de células viables de *Campylobacter*. Se observa también que la resistencia al calor depende del pH del medio en el que se hallan las células sometidas a calentamiento. Es máxima en valores próximos a 7 y disminuye a medida que el pH se aleja de la neutralidad.

La supervivencia a temperaturas de refrigeración para *C. jejuni* se ha calculado en varias semanas a 4°C en una superficie húmeda como la carne de pollo, pero tiende a morir rápidamente a temperatura ambiente. *C. jejuni* sobrevive durante periodos más largos a 37°C que a 4°C o 42°C. *C. coli* parece ser la especie del género más resistente a efectos lesivos causados por exposición a bajas temperaturas o a condiciones ambientales adversas.

Las condiciones de congelación (temperatura y tiempo de permanencia) influyen negativamente en la tasa de inactivación de *C. jejuni*, detectándose una reducción de 1-3 log₁₀ en alimentos cárnicos almacenados a -15°C o -20°C. Sin embargo, la supervivencia a -20°C es posible, y células de *Campylobacter* pueden ser recuperadas de muestras de pollo congeladas después de tres meses de almacenamiento, aunque a niveles mucho más bajos que los correspondientes a productos frescos.

Durante el almacenamiento en leche descremada y en carne de vacuno bajo congelación, a temperaturas de -15°C a -70°C, la muerte de *C. jejuni*, al principio relativamente rápida, suele ir seguida de un ritmo de muerte mucho más lento. La disminución inicial del recuento de viables es 10 veces mayor. La primera disminución tiene lugar en un día de congelación. En la carne, la supervivencia es mayor que en la leche descremada.

La capacidad de *C. jejuni* de sobrevivir a la refrigeración y a la congelación es obviamente importante para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública. Además, existe una clara variabilidad genotípica y fenotípica dentro de este género, lo cual explica que la capacidad de adaptación fisiológica de este patógeno difiera entre cepas. Al mismo tiempo, todavía no se conocen los mecanismos por los que se observan estas diferencias de tolerancia al frío. Parece que no hay una correlación entre la pérdida de viabilidad y el cambio morfológico. Las células pueden permanecer sustancialmente viables más tiempo de lo que pueden estar cultivables.

Campylobacter es sensible al NaCl y el grado de tolerancia al mismo depende de la temperatura de incubación. Es mejor tolerado a altas temperaturas de crecimiento, siendo la concentración óptima de sal para el crecimiento de *Campylobacter* del 0,5%. A concentraciones de 1% se incrementa considerablemente la tasa de muerte y un 2% resulta bactericida.

Campylobacter es sensible a la desecación, especialmente a temperatura ambiente. Las células no sobreviven durante mucho tiempo en ambientes secos. La desecación de los tejidos superficiales que tiene lugar durante la refrigeración por aire de las canales de cerdo, de vacuno y de ovino es importante para reducir la carga de *Campylobacter* en las carnes que se obtienen de estas canales. Su incidencia en las canales de carne roja antes de la refrigeración, es mayor que después de la misma.

C. jejuni es muy sensible al ácido láctico, por lo que se ha propuesto el rociado con ácido láctico al 2% de los animales sacrificados en mataderos para eliminar todas las células en un plazo de 24 h a 4°C. El orégano, la salvia o el clavo al 0,05%, inhiben su crecimiento. El ácido ascórbico también inhibe el crecimiento de estos microorganismos a concentraciones de 0,05%, resultando bactericida al 0,1%. Su toxicidad para *C. jejuni* es debida a los productos de su oxidación, de modo especial al ácido dehidroascórbico. El bisulfito sódico favorece la supervivencia de *C. jejuni* en leche y otros alimentos, al protegerlo frente a los efectos dañinos del oxígeno y sus derivados.

La lactoperoxidasa de la leche causa la muerte de *C. jejuni* rápidamente. La muerte rápida de *C. jejuni* en clara de huevo se debe principalmente a la presencia de conalbúmina y, en parte, a la presencia de lisozima en el elevado pH de este producto.

Las células se inactivan con facilidad tanto por la radiación UV como por la radiación gamma. Es más sensible que *E. coli* a la radiación UV y más sensible que *Salmonella* a la radiación gamma. La sensibilidad a las radiaciones varía según el alimento en el que se encuentre *C. jejuni*.

Si bien la presencia de oxígeno aumenta el ritmo de muerte de los *Campylobacter* en caldo de cultivo y en leche, la fase gaseosa tiene escaso efecto sobre la supervivencia de los organismos en la superficie de las carnes. *C. jejuni* también puede crecer en la superficie de algunos alimentos a pesar de su envasado inicial en aire, el material de envasado puede restringir el intercambio gaseoso y la actividad metabólica puede dar como resultado una atmósfera gaseosa diferente a la del ambiente.

Campylobacter es sensible al cloro libre, aunque la monocloramina tiene un mayor efecto bactericida. A pesar de esta sensibilidad al cloro libre existente en el agua, con frecuencia se encuentran células de este organismo en las carnes de las aves de corral después de su enfriamiento en agua clorada. Presuntamente, algunos organismos están protegidos frente al cloro en los tejidos de la superficie.

En general, dependiendo de la cepa de la que se trate, del número inicial de células, del tipo de alimento, y de las condiciones ambientales, principalmente de la temperatura de almacenamiento, Campylobacter puede sobrevivir en los alimentos durante periodos de tiempo más o menos largos.

La supervivencia en aguas está supeditada a la cantidad de microbiota acompañante y al efecto citotóxico de los rayos ultravioleta (Hudson et al., 1999). En el caso de las aguas residuales, los tratamientos primarios provocan una disminución de aproximadamente una unidad logarítmica y los secundarios una reducción del 80-90% de campylobacters (Jones, 2001).

El agua de bebida debidamente clorada no contiene células de *C. jejuni* viables. En cuanto al uso de agua clorada en mataderos para inactivar células de este microorganismo, parece que su uso puede reducir en parte, pero no totalmente, la población de Campylobacter en canales de pollo.

5. Incidencia y vehículos de transmisión

El género Campylobacter incluía inicialmente una serie de especies que eran causa frecuente de enfermedades en animales. Sin embargo, desde que en el año 1947 se aisló en sangre humana *C. fetus*, el número de especies asociadas a infecciones humanas ha ido aumentando progresivamente.

En relación con la gastroenteritis o infección intestinal ocasionada fundamentalmente por *C. jejuni*, es difícil de determinar su verdadera incidencia, ya que los casos registrados por los laboratorios clínicos suponen un porcentaje muy pequeño respecto al número total de infecciones. Esto es debido en parte a que muchos laboratorios no emplean de forma rutinaria los métodos para el aislamiento de estas bacterias, y en parte a que en muchas ocasiones los enfermos no llegan a consultar al médico y los síntomas desaparecen por sí solos sin tratamiento (Hernández, 1993).

Aunque la enfermedad no es de declaración obligatoria, se ha calculado que ocurren anualmente 500.000 infecciones en el Reino Unido y más de 2 millones de casos en EE.UU. Esto supone unas tasas de incidencia anual de aproximadamente 54-58 casos por 100.000 habitantes, tasas muy superiores a las de Salmonella (38/100.000) o Shigella (9/100.000). Según FoodNet, la red de seguimiento de enfermedades transmitidas por alimentos, durante el periodo 1996-2006, en los EE.UU. se está produciendo una disminución de la incidencia de la infección en torno a un 10% anual, y obtendríamos unos valores próximos a los 20-25 casos por 100.000 habitantes (Ailes et al., 2007).

El número de infecciones por Campylobacter puede ser incluso mayor, ya que se cree que *C. upsaliensis* es responsable de alrededor del 10% de las infecciones por Campylobacter, y esta especie no se aislaría con las técnicas que se emplean habitualmente; se inhibe con los antibióticos usados en los medios de aislamiento de otros miembros del género Campylobacter.

En nuestro país, ha sido en los últimos años cuando el número de casos declarados de gastroenteritis por campylobacters prácticamente se ha duplicado. Campylobacter ha pasado a ser junto con Salmonella el patógeno entérico más frecuente en los países industrializados. Así, durante 2006, según datos recogidos en el Boletín Epidemiológico Semanal (BES), se declararon en España 5.781 casos de gastroenteritis por Campylobacter (85% de los cuales fueron debidos a *C. jejuni*), frente a los 4.979 producidos por Salmonella.

La OMS estima que aproximadamente el 1% de la población se infecta cada año. Entre los factores que pueden haber influido en el incremento espectacular del número de casos declarados destacan las nuevas técnicas de diagnóstico, el reciente y popular hábito entre los jóvenes de comer en establecimientos rápidos o alimentarse con comida preparada, y el gran consumo de alimentos derivados del pollo.

Según un estudio económico realizado en el Reino Unido en el que no solamente se tuvieron en cuenta los gastos directos de diagnóstico, tratamiento y hospitalización, sino también costes indirectos como el absentismo laboral o la repercusión I+D+I, se calcula que la campylobacteriosis tiene un coste anual de aproximadamente 300 euros por paciente. Teniendo en cuenta que la incidencia real de la enfermedad es del 1% de la población, en nuestro país ello supondría un total de 400.000 casos anuales con un coste de unos 120 millones de euros. Estamos pues ante una enfermedad con un elevado coste económico, no solamente para el paciente sino también para la sociedad.

Según un estudio realizado en Dinamarca y presentado el pasado mes de septiembre en Rotterdam en el transcurso de la Reunión Internacional sobre Campylobacter, Helicobacter y organismos relacionados, los pacientes de Campylobacter tienen 2.3 veces más riesgo de morir que la población danesa general. En cifras absolutas, por cada 1.000 casos confirmados de campylobacteriosis se producen 5.4 muertes (Molbak, 2007).

Las infecciones por Campylobacter son muy frecuentes en países con recursos sanitarios escasos y se implican como causa de diarrea del viajero. En países industrializados la enteritis debida a estos microorganismos afecta a personas de todas las edades, aunque tiene una distribución bimodal con picos de incidencia en niños por debajo de 4 años y en adultos jóvenes (15-24 años) (Tenkate & Stafford, 2001). Es más frecuente en el sexo masculino que en el femenino (1.7/1).

En los países en desarrollo, la tasa de infección por Campylobacter en niños es bastante superior a la de los países industrializados, al igual que la tasa de mortalidad. Pero de igual modo, la exposición a Campylobacter durante la edad temprana en estos países parece crear inmunidad contra la enfermedad (Friedman et al., 2000). La enfermedad sintomática ocurre en los niños pequeños, mientras que el estado de portador crónico asintomático se observa en los adultos.

Los individuos inmunocomprometidos, como los infectados con el VIH y los enfermos de hipogammaglobulinemia, son más susceptibles de adquirir campylobacteriosis, que suele evolucionar a bacteriemias por la dificultad que entraña su tratamiento (Friedman et al., 2000).

Por lo que respecta a las variaciones anuales, el número de casos es mayor en verano que en invierno, debido al aumento del consumo de alimentos poco cocinados en barbacoas y a la ingestión de aguas no tratadas (Thomas et al., 1999b), pero ocurre a lo largo de todo el año. En general, los periodos con un mayor índice de aislamiento son el final del verano y comienzo del otoño (Barros-Velázquez et al., 1999).

Las infecciones humanas por *C. fetus* son relativamente raras, y se describen menos de 250 casos anualmente. En la mayor parte de los casos los afectados son ancianos inmunodeprimidos. En ganado, *C. fetus* subsp. *venerealis* supone un problema muy importante en los países donde todavía hoy la inseminación artificial (IA) no se emplea de manera habitual, ya que se transmite venéreamente y es agente causante de infertilidad en ganado bovino. La IA reduce, pero no previene completamente, la infección. En el Reino Unido, donde la IA es habitual, las infecciones por Campylobacter representan un porcentaje importante de las causas de infertilidad y fetopatología en este tipo de ganado. En cuanto a *C. fetus* subsp. *fetus*, se desconoce la verdadera incidencia de la enfermedad en ganado bovino, pero constituye la tercera causa más común de aborto en ovejas en el Reino Unido, lo que supone unas cuantiosas pérdidas económicas. La infección parece ser transmitida a través de las heces. También pueden existir otros reservorios no ovinos de esta bacteria en algunos animales, por ejemplo en las aves.

Las rutas y fuentes de transmisión no están del todo claras. Los organismos son ubicuos en el ambiente, y pueden ser aislados de muchos animales domésticos y aves, así como de aguas superficiales, el suelo, etc. Sin embargo, la transmisión directa desde los animales es infrecuente para el público en general, teniendo mayor riesgo de infección las personas que están en contacto con animales o sus productos (granjeros, personal de mataderos y plantas de procesamiento de aves).

Es más importante la transmisión indirecta a través del agua y los alimentos, entre los que destaca la carne de pollo. Muchas de las aves están contaminadas asintómicamente con *C. jejuni* y *C. coli*. La infección es normalmente detectable cuando tienen entre 2 y 3 semanas de vida, pero una vez detectado, el 100% de los animales resulta infectado en menos de 72 h. Las fuentes de infección de estas aves son desconocidas, aunque pueden ser recuperadas del oviducto, la transmisión vertical no se considera como una de las más importantes. Probablemente, muchas son infectadas por organismos del ambiente externo que les rodea.

También puede darse la transmisión feco-oral de una persona a otra, pero es poco habitual que esta enfermedad se transmita por los manipuladores de alimentos. Aunque rara vez ocurre, los recién nacidos pueden adquirir la bacteria a través de su madre durante el parto (Skirrow & Blaser, 2000).

Mediante el empleo de técnicas genotípicas modernas, fundamentalmente la ribotipificación y el análisis RAPD amplificando regiones anónimas del ADN con iniciadores arbitrarios, se está investigando y esclareciendo poco a poco las fuentes de infección y las rutas de transmisión en los animales y el hombre, aunque todavía queda mucho por dilucidar (Wassenaar & Newell, 2000).

La gran mayoría de las infecciones ocasionadas por *C. jejuni* y *C. coli* son esporádicas, afectando como mucho a 2-3 personas, generalmente pertenecientes a una misma unidad familiar, y se producen por el consumo de piezas de pollo alteradas o insuficientemente cocinadas, y por contaminaciones cruzadas entre piezas crudas del pollo u otras ya cocinadas y otros alimentos (Skirrow & Blaser, 1992). Esta contaminación cruzada puede ocurrir de varios modos, de manera que un almacenamiento contiguo, el empleo de tablas de cortar o utensilios para ambos alimentos sin desinfectar entre ambas actividades, o las simples manos del manipulador pueden constituirse en vehículos o modos de transmisión.

No suelen ser frecuentes los brotes epidémicos, apenas el 2% del total de brotes ocasionados, y tampoco suelen afectar a un número elevado de personas, excepto cuando el alimento implicado es la leche cruda o el agua sin tratar.

De especial relevancia en la bibliografía destacan, además de aquél primer brote causado en 1938 por la leche sin pasteurizar, otro brote producido también por consumo de leche cruda en Inglaterra que afectó a 3.500 personas, y varios ocurridos en EE.UU. y ocasionados por la ingesta de agua contaminada provocando 5.000 enfermos.

Según los últimos datos publicados por el Boletín Epidemiológico Semanal, en el año 2003 se produjeron en España cuatro brotes ocasionados por *C. jejuni*, dos en restaurantes y otros dos en escuelas. Se desconoce el alimento implicado en uno de ellos, pero los otros tres fueron relacionados con lácteos, carne y pescado.

Por el contrario, las infecciones por *C. upsaliensis* y *C. helveticus* se contraen fundamentalmente por el contacto con perros y gatos domésticos (portadores sanos o mascotas con diarrea). La verdadera incidencia de la enfermedad causada por *C. fetus* subsp. *fetus* en humanos se desconoce, sin embargo, se cree que la infección está relacionada con el consumo de carne ternera o cordero contaminada fecalmente.

Actualmente es relativamente sencillo detectar la existencia de brotes y distinguir relaciones clonales entre las cepas mediante el empleo de técnicas genotípicas, principalmente la ribotipificación, la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) y el análisis RAPD (Wassenaar & Newell, 2000)

6. Patogenia e inmunidad

Los esfuerzos realizados para definir el papel de los factores de virulencia específicos en la enfermedad por *Campylobacter* se han visto frustrados por la carencia de un modelo animal para estudiar la enfermedad. *C. jejuni* es la especie mejor estudiada. Aunque en esta especie se han detectado adhesinas, enzimas citotóxicas y enterotoxinas, su papel específico en la enfermedad sigue estando mal definido. Está claro que la probabilidad de enfermar está influida por la dosis infecciosa. Los microorganismos mueren cuando se exponen a los jugos gástricos, por lo que las situaciones que disminuyen o neutralizan la secreción de ácidos

favorecen la enfermedad. El estado inmunológico del paciente afecta también a la gravedad del cuadro. Las personas de una población con tasas altas de endemidad desarrollan concentraciones detectables de anticuerpos séricos y secretores específicos y padecen una enfermedad de menor gravedad. Los pacientes aquejados de hipogammaglobulemia tienen una forma grave y prolongada de enfermedad por *C. jejuni*.

La enfermedad gastrointestinal por *C. jejuni* se caracteriza por la aparición de una lesión histológica en la superficie mucosa del yeyuno, íleon y colon. Esta superficie mucosa aparece ulcerada, edematosa y hemorrágica, con abscesos en las criptas de las glándulas epiteliales e infiltración de la lámina propia por neutrófilos, células mononucleares y eosinófilos. El proceso inflamatorio es compatible con la invasión del tejido intestinal por los microorganismos. Sin embargo, no se ha podido establecer el papel preciso de las toxinas citopáticas, las enterotoxinas y la actividad endotóxica que se han detectado en las cepas de *C. jejuni*. Por ejemplo, las cepas que carecen de actividad enterotóxica continúan conservando toda su capacidad de virulencia. Se ha descrito una adhesina que interviene en la unión de los microorganismos a la capa mucosa; sin embargo, las cepas carentes de adhesina, al igual que las inmóviles, son avirulentas.

Los campylobacters, además de la flagelina (componente proteico filamentoso del flagelo) y como típicas bacterias Gram negativas, también poseen antígenos somáticos en el lipopolisacárido de la capa externa de su pared celular. En base a ello, se han descrito dos esquemas de serotipificación, el de Penner (HS) en base a los antígenos polisacáridos O termolábiles, y el de Lior (HL) basado en complejos antígenos flagelares termolábiles.

Ciertos serotipos HS de *C. jejuni*, principalmente el O:19 y O:41, están relacionados con graves enfermedades neurológicas postinfecciosas tales como el Síndrome de Guillain-Barré. Se cree que la patogenia de esta enfermedad tiene relación con la reactividad cruzada existente entre los oligosacáridos de *Campylobacter* y los glucoesfingolípidos que están presentes en la superficie de los tejidos neurales. Por tanto, los anticuerpos dirigidos frente a las cepas específicas de *Campylobacter* pueden dañar los tejidos neurales del sistema nervioso periférico. Recientemente, se ha comprobado que el serogrupo O:19 constituye un grupo genéticamente homogéneo y distinto de otras cepas de *C. jejuni*.

Las técnicas genéticas también han demostrado que ciertos grupos o tipos analizados mediante PFGE tienen hospedadores específicos, y que determinados grupos o perfiles definidos en base al antígeno flagelar están asociados o bien al hombre o bien al pollo (Wassenaar & Newell, 2000). En un futuro no muy lejano se podrá esclarecer los serotipos o genotipos potencialmente más peligrosos para el hombre y los animales.

Mientras que *C. jejuni* y *C. coli* rara vez originan bacteriemia, *C. fetus* tiene tendencia a diseminarse desde el aparato digestivo hasta el torrente sanguíneo o focos distantes. Los estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que *C. fetus* es resistente al efecto bactericida del suero mediado por el complemento y por los anticuerpos, mientras que *C. jejuni* y la mayoría de las especies de *Campylobacter* mueren rápidamente. *C. fetus* está recubierto de una proteína de tipo capsular (proteína S) que evita el efecto bactericida del suero mediado por el complemento (inhibición de la unión de C3b a las bacterias). *C. fetus* pierde su virulencia cuando se elimina esta capa proteica.

En general, aunque los factores de virulencia en *Campylobacter* no han sido descritos claramente, sí se han propuesto una serie de mecanismos para explicar la infección causada por este microorganismo:

— La morfología y movilidad de *Campylobacter* juegan un papel importante para desplazarse a través de la pared intestinal (van Vliet & Ketley, 2001), ya que para que *Campylobacter* induzca problemas gastrointestinales tiene que ser capaz de colonizar el intestino.

— El flagelo y más concretamente su subunidad, la flagelina, son los factores de virulencia mejor caracterizados (Grant et al., 1993). Se ha demostrado que células en las que el gen que codifica para la flagelina ha sido manipulado, son incapaces de colonizar el epitelio, por lo que ha quedado definida su importancia para la colonización. Actualmente se está tratando de desarrollar vacunas en ratón utilizando las proteínas del flagelo (Lee et al., 1999).

— La quimiotaxis, capacidad para detectar y desplazarse en función de gradientes químicos, es esencial para la colonización del intestino (Takata et al. 1992). En modelos

animales, *C. jejuni* es atraído por mucinas, L-serina y L-fucosa, mientras que es repelido por las sales biliares (Hugdahl et al. 1988).

— Una vez ha cruzado la pared tiene que adherirse a las células epiteliales del hospedador e invadirlas, lo cual provoca daño en las mucosas e inflamación. Se han propuesto muchos factores como posibles adhesinas de *Campylobacter*, pero todos los estudios parecen indicar que realmente son el flagelo y otros lipopolisacáridos de membrana los que propician la adhesión (Penn, 2001). Se ha especulado sobre la producción de fimbrias, pero en el genoma de la cepa tipo de *C. jejuni* no se ha encontrado claramente ningún gen candidato (Doig et al. 1996). A continuación tiene que introducirse dentro de la célula. Aunque el mecanismo invasivo no se conoce perfectamente, parece que depende de la síntesis de proteínas específicas.

— Otro mecanismo de virulencia propuesto ha sido la producción de toxinas. La actividad citotóxica es probablemente el resultado de una o varias citotoxinas. En una revisión llevada a cabo por Wassenaar (1997) se han reconocido al menos seis clases de toxinas diferentes.

— También se ha estudiado la capacidad de *C. jejuni* para adquirir hierro a través de fuentes exógenas, ya que el hierro facilita la colonización del intestino, siendo su limitación un sistema inespecífico de defensa del hospedador. No parece producir sus propios sideróforos, sin embargo es capaz de utilizar sideróforos de otras bacterias y usarlos como transportadores de hierro (Galindo et al., 2001). La bacteria requiere de 10^{-6} a 10^{-7} M de Fe^{2+} para sobrevivir.

— Como parte del proceso de colonización, *Campylobacter* debe ser capaz de expresar factores que le protejan de los ambientes adversos que encuentre en el huésped (Purdy & Park 1994). El enzima superóxido dismutasa (SOD) protege a *Campylobacter* de la muerte intracelular que pueden provocar los sistemas oxidativos durante la invasión epitelial convirtiendo los superóxidos en peróxidos de hidrógeno (Purdy et al., 1999). Para defenderse de la presencia de peróxidos esta bacteria cuenta con una catalasa (KatA) que convierte los peróxidos en agua y oxígeno, y una alquil peróxido reductasa (TsaA) que reduce los alquil hidroperóxidos a alcoholes. La respuesta al estrés (choque) térmico está regulada por la inducción de la expresión de unas proteínas (HSPs – Heat Shock Proteins) que actúan como termorreguladores (chaperonas) (Thies et.al. 1999).

7. Manifestaciones clínicas

En la actualidad, se reconocen como patógenas la mayoría de especies de *Campylobacter* (Tabla 4), destacando *C. jejuni* y *C. coli* como responsables de infecciones humanas (van Vliet & Ketley, 2001). Las enfermedades producidas por *Campylobacter* son principalmente la gastroenteritis y la septicemia. El período de incubación es generalmente de 2 a 5 días, aunque puede llegar a ser de hasta 10 días.

Tabla 4
Especies de *Campylobacter* implicadas en patología humana

Especies	Patología más frecuente
<i>C. coli</i>	Diarrea
<i>C. fetus</i>	Bacteriemia
<i>C. hyointestinalis</i>	Diarrea
<i>C. jejuni</i>	Diarrea
<i>C. lari</i>	Diarrea
<i>C. sputorum</i>	Abscesos pulmonares
<i>C. upsaliensis</i>	Diarrea

Las infecciones gastrointestinales por *C. jejuni*, *C. coli* y *C. upsaliensis* cursan generalmente como una enteritis aguda con diarrea, malestar general, fiebre y dolor abdominal, aunque las consecuencias clínicas de la infección son variables, dependiendo del sistema inmunitario del huésped. El principal síntoma de la infección en humanos es una enterocolitis aguda, indistinguible de otras gastroenteritis agudas. Los pacientes afectados pueden tener 10 o más deposiciones al día durante el periodo de máxima actividad de la enfermedad, y las heces pueden ser acuosas o viscosas con exudado inflamatorio, a veces incluso sanguinolentas en el examen macroscópico. No son frecuentes los vómitos.

La duración de la diarrea es variable, aunque normalmente suele ser inferior a una semana, sin embargo el enfermo puede continuar eliminando bacterias a través de las heces durante periodos prolongados de tiempo. La enfermedad suele ser autolimitada después de unos pocos días, si bien los síntomas pueden prolongarse a lo largo de 2-3 semanas. En ocasiones, el espectro de manifestaciones clínicas engloba un fuerte dolor abdominal, que puede llegar a ser de tal magnitud (especialmente en sujetos jóvenes) que puede simular un cuadro de apendicitis o peritonitis.

La dosis infectiva (DI) puede variar considerablemente, aunque entre 500 y 800 células suelen ser suficientes para causar la enfermedad (Skirrow & Blaser, 2000). Estos valores pueden diferir según el tipo de vehículo con el que se ingieran los microorganismos. Si se ingieren con pequeñas cantidades de agua después de la comida, las dosis mínimas pueden ser muy pequeñas, entre 1-10 células. Sin embargo, si el vehículo de transmisión son los alimentos, las DI son más elevadas. Los productos alimentarios que neutralizan los ácidos gástricos (p. ej., la leche) reducen de forma importante la dosis infecciosa necesaria para el establecimiento de la infección.

La progresión de la bacteria a la sangre puede formar parte de la patogénesis de la infección en las etapas tempranas del cuadro, pudiendo originar ocasionalmente cuadros de bacteriemia (1,5 casos por 1.000 infecciones intestinales debidas a *C. jejuni* y *C. coli*). Se la asocia también con el síndrome de Reiter que cursa con uretritis, artritis y conjuntivitis.

Aunque no es habitual (alrededor de una de cada 1.000 infecciones diagnosticadas), en ocasiones pueden aparecer complicaciones graves como el síndrome de Guillain-Barré, principal causa de parálisis neuromuscular. Es una alteración autoinmunitaria del sistema nervioso periférico que se caracteriza por un proceso de pérdida de fuerza simétrica a lo largo de un periodo de varios días, mientras que la recuperación necesita semanas o meses. Este síndrome se ha relacionado con algunos serotipos específicos, especialmente el O:19 en EE.UU. y en el Japón (Kuroki et al., 1993) y el O:41 en Sudáfrica (Lastovica et al., 1997). En Europa, la correlación con determinados serotipos es menos clara (Endtz et al., 2000).

C. fetus es una bacteria muy frecuente en infecciones de animales, sobre todo ovejas y vacas. A diferencia de *C. jejuni*, los cuadros entéricos en el hombre por este microorganismo son mucho más raros, aunque *C. fetus* subsp. *fetus* también puede causar infecciones muy severas. *C. fetus* es responsable de producir infecciones sistémicas como bacteriemia, tromboflebitis séptica, artritis, aborto séptico y meningitis. Casi siempre tiene carácter oportunista, afectando principalmente a personas de edad avanzada y pacientes debilitados, como los que presentan hepatopatías, diabetes, mellitus, alcoholismo crónico o neoplasias. En la forma de presentación más frecuente de *C. fetus*, el paciente experimenta inicialmente gastroenteritis que es seguida por septicemia con diseminación a múltiples órganos.

En ganado bovino *C. fetus* subsp. *venerealis* es el agente causal de campylobacteriosis venérea. El organismo coloniza asintóticamente la cripta epitelial del pene y prepucio de los toros. La infección es transmitida a las vacas durante el coito, infectando las glándulas uterinas. El resultado puede ser la infertilidad, aunque en ocasiones se produce el aborto, generalmente suele ocurrir entre el 5º y el 6º mes de embarazo. La respuesta inmune elimina la infección pero la bacteria puede permanecer en la vagina durante años, y como consecuencia, un nuevo toro puede infectarse. *C. fetus* subsp. *fetus* también se ha aislado del intestino bovino, y si la bacteriemia sigue a la ingestión de *C. fetus* subsp. *fetus* durante los tres últimos meses del embarazo, suele producirse el aborto, sin embargo, el organismo no se transmite venéreamente.

8. Tratamiento, prevención y control

La gastroenteritis por *Campylobacter* es típicamente una infección autolimitada que se trata mediante la reposición de los líquidos y de los electrolitos que se han perdido. El tratamiento antibiótico se puede usar en los pacientes con infecciones graves o con septicemia. *Campylobacter* es sensible a una amplia variedad de antibióticos, como los macrólidos (eritromicina, azitromicina, claritromicina, etc.), las tetraciclinas, los aminoglucósidos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, clindamicina, amoxicilina/ácido clavulánico e imipenem. La mayor parte de las cepas es resistente a las penicilinas, las cefalosporinas y las sulfamidas. La eritromicina es el antibiótico de elección para el tratamiento de la enteritis, y las tetraciclinas o las quinolonas se administran como fármacos de segunda elección. La resistencia a las fluoroquinolonas ha aumentado considerablemente, llegando a alcanzar cifras de hasta un 40% de cepas resistentes, por lo que estos fármacos pueden ser menos eficaces. Como consecuencia, desde el año 2005 está prohibido en EE.UU. la administración de ciprofloxacino a los pollos (Medalla et al., 2007). Según un estudio realizado en 8 países de la Unión Europea sobre susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *C. jejuni* en animales en el periodo 2002-2003, se comprobó que España es el país donde un mayor porcentaje (85%) de cepas de *C. jejuni* presentan resistencia al ciprofloxacino (Simjee et al., 2007).

En los niños pequeños se ha utilizado amoxicilina/ácido clavulánico en lugar de las tetraciclinas, que están contraindicadas. Las infecciones sistémicas se tratan con aminoglucósidos, cloramfenicol o imipenem.

La exposición a *Campylobacter* entérico se previene con la preparación correcta de los alimentos (fundamentalmente de las aves de corral), evitando los productos lácteos sin pasteurizar, y con la mejora de las medidas preventivas para evitar la contaminación de los depósitos de agua. Es improbable que se pueda llegar a eliminar el estado de portador de *Campylobacter* en los reservorios animales, como las gallinas y los pavos, por lo que persiste el riesgo de infecciones a partir de ellos.

Recientemente, se está trabajando en el desarrollo de un método de control de esta bacteria patógena, presente sobre todo en productos avícolas. Una de las principales motivaciones de la investigación responde a la importancia de la lucha de patógenos en el primer eslabón de la producción ganadera, en este caso en las granjas avícolas. Y es que según datos recientes de las principales autoridades de Seguridad Alimentaria de la UE y de EE.UU. la incidencia de infecciones por *Campylobacter* sigue siendo alta, y crece la preocupación además porque el patógeno también ha empezado a demostrar resistencias a determinados antibióticos comunes, entre los que se encuentran las fluoroquinolonas como se ha comentado anteriormente. Según un informe de la EFSA (European Food Safety Authority) presentado a principios de 2007 sobre las resistencias a antibióticos procedentes de animales de granja y alimentos de origen animal, el 80% de las bacterias testadas fueron resistentes a antibióticos usados para tratar enfermedades en humanos.

El trabajo consiste en utilizar virus que atacan y destruyen la bacteria de forma específica, sin efectos en otras bacterias u organismos y sin necesidad de usar antibióticos. La investigación ha empezado centrándose en identificar determinados virus bacteriófagos específicos, que infectan sólo a bacterias, para eliminar *Campylobacter* de las aves de corral. Estos primeros resultados, podrían ayudar a reducir de forma significativa la posible contaminación y el riesgo alimentario. Los expertos han aislado primero varios bacteriófagos capaces de infectar y eliminar la bacteria *C. jejuni* de las heces de las aves. Además, han utilizado estos mismos bacteriófagos para tratar a los animales ya infectados.

Las medidas de control de la campylobacteriosis deben ser de tipo general dirigidas a reducir la presencia de estas bacterias en alimentos de origen animal, implantando sistemas de APPCC, bloqueando las rutas de transmisión desde los animales al hombre o inactivándolas antes de que lleguen al supermercado. Es importante cocinar correctamente los alimentos de origen animal, no comer carne cruda, ni consumir leche sin pasteurizar, así como evitar la contaminación cruzada, factor este último de enorme importancia en la cadena epidemiológica. Los respectivos gobiernos, a través de los medios de comunicación, deberían contribuir a la educación sanitaria del público en general, y específicamente en el manejo del pollo y otras carnes en la cocina.

9. Diagnóstico de laboratorio

Debido a la escasa resistencia de estas bacterias a condiciones ambientales hostiles, la tasa de aislamiento está muy influenciada por la técnica empleada, la naturaleza de la muestra, el número de microorganismos presentes en la misma y el estado fisiológico en que se encuentren.

a) Microscopia

El género *Campylobacter* se compone de microorganismos delgados que no pueden observarse con facilidad cuando se tiñen las muestras. Las células, con sus característicos movimientos rápidos, se pueden detectar en un microscopio de campo oscuro o de contraste de fase en muestras recogidas en fresco; sin embargo, estos exámenes no se suelen efectuar. Los microorganismos presentes en las muestras en cultivo aparecen como bacilos pequeños y curvos que se disponen de manera aislada o en parejas con los extremos juntos (de manera semejante a las alas de una gaviota o con forma de S).

b) Cultivo

Cuando se sospecha que el número de microorganismos presentes en la muestra es muy bajo, se debe incluir un paso previo de concentración de las células, mediante métodos de filtración. En ocasiones, y con el fin de recuperar las bacterias que pudieran encontrarse en condiciones subletales a causa del procesado de la muestra, tales como refrigeración o congelación, esta debe ser sometida a un preenriquecimiento en caldo nutritivo no selectivo durante un periodo corto de tiempo (2-4 h) a 37°C en condiciones de aerobiosis (Humphrey, 1989).

Tras esta etapa previa de incubación se realiza un enriquecimiento en caldo selectivo que se incuba durante 48 h a 42°C bajo una atmósfera con 5% de oxígeno, 10% de CO₂ y 85% de nitrógeno. En las últimas décadas se han descrito numerosos medios de enriquecimiento. Entre los medios de enriquecimiento más utilizados destacan el caldo Preston (Bolton & Robertson, 1982) y caldo CCD modificado (CCDm) (Hutchinson & Bolton, 1984). El caldo Preston puede resultar beneficioso en muestras donde es posible encontrar varias especies de *Campylobacter* (Madden et al., 2000). Sin embargo, con este medio se consiguen menos aislamientos que con el caldo CCDm pero es más selectivo frente a la biota acompañante. Recientemente, se ha descrito un nuevo caldo de enriquecimiento sin sangre (BFEB), que da buenos resultados en el aislamiento de *C. jejuni* tras incubación en aerobiosis a 42°C (Tran, 1998).

Los medios selectivos se basan en la combinación de antibióticos (especialmente cefoperazona, cicloheximida, trimetoprim y vancomicina) para inhibir el crecimiento de la microbiota acompañante. Sin embargo, existen algunas cepas de *Campylobacter* sensibles a ciertos antibióticos y no se ha descrito todavía ninguna combinación capaz de permitir el aislamiento de todas las especies (Tenover & Fenell, 1991). El uso de determinados antibióticos selectivos y elevadas temperaturas de incubación puede inhibir el crecimiento de especies más sensibles y menos comunes de *Campylobacter*, como pueden ser *C. hyointestinalis*, *C. upsaliensis* o *C. mucosalis*. Además, muchas de estas especies son de crecimiento lento y requieren periodos de incubación más largos para su aislamiento. Puesto que los campylobacters son sensibles al peróxido de hidrógeno y a los aniones superóxido que se producen en los medios, se suelen también incluir también sangre de oveja o caballo, y un suplemento de crecimiento, formado por sulfato ferroso, metabisulfito sódico y piruvato sódico, con el fin de neutralizar estos productos tóxicos y aumentar la aerotolerancia de los organismos.

Tras la fase de enriquecimiento se realiza una siembra en medios sólidos selectivos. Desde que Skirrow (1977) describió el primer agar selectivo y hasta la actualidad, son muchos los medios descritos con los que se estudia la capacidad de recuperar campylobacters a partir de muestras fecales, alimentos o aguas, tanto directamente (sin enriquecer) como tras un enriquecimiento en medio líquido. El agar base puede ser agar sangre nº 2, agar Brucella, agar Columbia o agar base para *Campylobacter*, suplementados con un 5-7% de sangre desfibrinada de oveja o caballo y el suplemento antibiótico correspondiente. Entre los numerosos medios descritos en bibliografía, los más utilizados son el agar Butzler (Lauwers et al., 1978), el agar Blaser-Wang (Blaser et al., 1980) y el agar Preston (Bolton & Robertson, 1982). Otro medio muy utilizado es el agar CCDA modificado (CCDA_m) (Hutchinson & Bolton, 1984), que no lleva sangre y como suplemento antibiótico lleva cefoperazona. Recientemente, la casa comercial Biomérieux ha desarrollado un nuevo medio de cultivo (CampyFood ID) listo para usar que permite la fácil detección de *Campylobacter* en productos alimenticios y muestras medioambientales. Este medio contiene una combinación específica de un indicador de color y antibióticos que hace que las colonias que se forman sobre el agar transparente adquieran un color rojo-naranja, con lo que es muy fácil distinguirlas.

También se ha usado su pequeño tamaño (0,2-0,5 µm de diámetro) para recuperar las bacterias por filtración de las heces. Estos microorganismos pasan a través de filtros de 0,45 µm, mientras que otras bacterias quedan retenidas. Este método se ha empleado también para demostrar que *C. upsaliensis* producía gastroenteritis en el ser humano y enfermedad en perros y gatos domésticos. Sin embargo, la filtración de las muestras de heces es un procedimiento engorroso que no se utiliza en la mayoría de los laboratorios clínicos.

Aunque las normativas vigentes rara vez exigen las pruebas sobre campylobacters, las empresas agroalimentarias tienen la responsabilidad de adoptar las medidas de seguridad necesarias para garantizar la seguridad de los alimentos que producen. La Dirección Europea para la Seguridad Alimentaria recomienda utilizar un plan de vigilancia para reducir el riesgo relativo a la infección por campylobacters. De hecho, en el año 1995 se aprobó la norma internacional ISO 10272:1995 para el aislamiento e identificación de las especies termotolerantes del género *Campylobacter* en muestras ambientales. Esta norma, que ha sido

recientemente modificada (ISO 10272-1:2006), se basa en un enriquecimiento previo de las muestras en caldo Bolton a 37°C de 4-6 h en condiciones de microaerofilia y posteriormente a 41.5°C durante un período de tiempo de 44 + 4 h, seguido de la siembra en dos medios de cultivo diferentes, agar mCCD y en otro medio selectivo (agar Preston, agar Skirrow, o agar

Karmali). Las placas se incuban en microaerofilia a 41.5°C durante un período de tiempo de 44 + 4 h. Posteriormente, se seleccionan las colonias sospechosas de cada medio para su identificación. Se siembran en agar Columbia suplementado con sangre desfibrinada de oveja estéril y se incuban de 24 a 48 h a 41.5°C. Finalmente, a partir de los cultivos puros se realizan tinciones Gram y pruebas de crecimiento microaerófilo a 25°C, crecimiento aeróbico a 41.5°C, y presencia de la enzima oxidasa. Adicionalmente, y con la finalidad de diferenciar entre las cuatro especies termotolerantes (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) la norma recomienda realizar las siguientes pruebas: catalasa, sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotinas, hidrólisis del hipurato y del indoxil acetato (Tabla 5).

Tabla 5
Características de las especies termotolerantes de *Campylobacter*

Pruebas	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Catalasa	+	+	+	- o débil
Ácido nalidíxico	S	S	R/S	S
Cefalotinas	R	R	R	S
Hidrólisis hipurato	+	-	-	-
Indoxil acetato	+	+	-	+

c) Identificación bioquímica

La identificación preliminar de las cepas se basa en el crecimiento en unas condiciones seleccionadas y en su característica morfología microscópica. La identificación definitiva a nivel de especie se realiza habitualmente mediante métodos fenotípicos aunque suele ser problemática puesto que, dada su aparente inercia bioquímica, existe un número limitado de características que discriminen adecuadamente entre las distintas especies. Según estudios realizados, la reproducibilidad de determinadas pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de estos microorganismos, es cuestionable y depende de factores como el medio base utilizado, la concentración del inóculo o la metodología empleada (On, 1996). Las pruebas bioquímicas recomendadas para la diferenciación de especies de *Campylobacter* son:

- Detección de la actividad catalasa. Se cuestiona la validez de esta prueba al aparecer referencias acerca de la existencia de cepas de *C. jejuni* (descrito como catalasa positivo) débilmente positivas o negativas (Hernández et al., 1991).
- Reducción de nitratos.
- Producción de ADNasa.
- Producción de H₂S.
- Hidrólisis del hipurato. Esta prueba se ha utilizado como rasgo diferencial de las cepas de *C. jejuni* (hipurato positivas) y *C. coli* (hipurato negativas) cuestionándose la validez de esta prueba al existir referencias acerca de la aparición de cepas de *C. jejuni* hipurato negativas (Engvall et al., 2002).
- Hidrólisis del indoxil acetato. Esta prueba se utiliza en la actualidad para diferenciar *C. coli* de *Helicobacter pullorum*, que son indoxil acetato positiva e indoxil acetato negativa, respectivamente.
- Hidrólisis de la caseína, lecitina, tirosina, y producción de pigmento a partir de la tirosina. Pruebas de crecimiento a distintas temperaturas 4°C, 15°C, 25°C, 30°C, 37°C y 42°C.
- Susceptibilidad a antibióticos. El método empleado puede ser el de difusión en disco o en agar.
- Pruebas de tolerancia a distintos agentes: glicina, NaCl (1,5%), clorhidrato de trimetilamina-n-óxido (TMAO), fumarato. Crecimiento en medio con safranina, bilis al 1,5% y 2,0%, cristal violeta 0,00005%, fuchsina básica 0,005%, cloruro de sodio 0,05%, desoxicolato sódico 0,1%.
- Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis. Esta es una de las pruebas más importantes a la hora de diferenciar los dos géneros de la familia *Campylobacteraceae* ya que las especies del género *Arcobacter* se agruparon debido a su aerotolerancia, mientras que las especies del género *Campylobacter* son microaerófilas, tolerando concentraciones de oxígeno de 5 a 10% y de anhídrido carbónico de 1 a 10%. La tolerancia al oxígeno puede variar de unas especies a otras e incluso de unas cepas a otras, apareciendo una adaptación de estos microorganismos a un metabolismo aerobio tras permanecer en placas de agar sangre en presencia de aire durante periodos prolongados (Jones et al., 1993).
- También se ha desarrollado un sistema comercial para la identificación de *Campylobacter* a nivel de especie llamado API-Campy (Biomérieux), sistema que utiliza 21 pruebas distintas y distingue 18 grupos taxonómicos. Este sistema presenta ciertos problemas para la identificación de ciertas cepas de *Campylobacter*, y además en el caso de *Arcobacter*, el sistema sólo identifica la especie *A. cryaerophilus*.

En general, la identificación de estos microorganismos mediante pruebas bioquímicas es muy complicada. Algunas cepas presentan propiedades anómalas, como es el caso de cepas de *C. jejuni* hipurato negativas. Además, ciertas pruebas dan resultados inconsistentes para algunas especies, por ejemplo la producción de H₂S en el medio TSI para *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. concisus*, *C. hyointestinalis* y *C. sputorum*. Algunas de sus características pueden variar en función de la edad del cultivo y de las condiciones en que se realiza la prueba. Además, los resultados no son siempre evaluados objetivamente, ya que en ocasiones los resultados de las muestras desconocidas se comparan mediante la utilización de tablas con los de especies conocidas (On, 1996). Sin embargo, son métodos baratos y de fácil manejo, y continúan siendo los más utilizados para su identificación.

d) Identificación serológica

La detección con anticuerpos se usa en la mayoría de los casos como prueba confirmatoria de la presencia de *Campylobacter* en muestras clínicas o de alimentos. El inmunoensayo requiere el cultivo previo de la bacteria para poder aislar los antígenos específicos. Los antígenos serán testados en un reactivo que contendrá los anticuerpos monoclonales específicos de *Campylobacter* inmovilizados en látex y la aparición de un precipitado indicará la presencia del complejo antígeno-anticuerpo.

Existe una gran variedad de sistemas comercializados basados en esta técnica: Campyslide system (BBL) que detecta *Campylobacter* a nivel de género, Meritec-Campy system (Meridian Diagnostics) detecta *C. coli*, *C. jejuni* y *C. lari*, el sistema Microscreen method (Mercia Diagnostics) parece ser el más sensible, detectando hasta 10 veces menor número de campylobacters.

El inmunoensayo sobre filtros de membrana hidrofóbicos además de permitir la detección de *Campylobacter* con anticuerpos monoclonales y policlonales, permite el recuento de los mismos sobre la membrana (Wang et al., 2000).

El uso de anticuerpos marcados con colorantes fluorocromáticos facilita la detección de *Campylobacter* en muestras ambientales, tales como las aguas y las biopelículas (Buswell et al., 1998).

A pesar de la rapidez de esta técnica, en la mayoría de casos existe la posibilidad de reacciones cruzadas y de falsos positivos. En un estudio de 11 sistemas comerciales de ELISA y uno de aglutinación de látex, se encontró una sensibilidad del 85% para todos y una especificidad del 79% (Dunn et al., 1997).

e) Identificación genética

La elección de un medio apropiado, los requerimientos gaseosos, el tiempo necesario para su crecimiento y la pérdida de cultivabilidad debido a las condiciones de estrés, son los principales problemas derivados de la utilización de los métodos culturales para la detección de campylobacters. Para evitar las limitaciones de la detección de patógenos por métodos tradicionales, varias técnicas han incorporado el análisis de los ácidos nucleicos de las células bacterianas. En la última década, estas técnicas moleculares, tales como la hibridación "in situ", las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la secuenciación, han revolucionado todos los campos de la Microbiología, aplicándose como métodos de diagnóstico más rápidos y específicos para la detección de bacterias.

Hibridación in situ (FISH)

Esta técnica, basada en la hibridación directa de la bacteria con una sonda complementaria de una región del 16S o 23S ARN ribosómico, es una excelente herramienta para la detección, ya que cada individuo posee un número elevado de copias de moléculas de ARN ribosómico a la que se puede unir la sonda, produciendo una amplificación de la señal. Este método presenta las ventajas sobre otros, tales como la hibridación de ADN y la detección con anticuerpos, de no necesitar el cultivo previo de la bacteria, ni la extracción de los ácidos nucleicos y no es habitual la hibridación inespecífica con otras bacterias presentes en la muestra, dando como resultado falsos positivos (On, 1996). Además, no parece que existan sustancias inhibitoras que dificulten la hibridación. Mediante la técnica FISH podemos obtener información que no nos ofrecen otros métodos, como son la morfología, el número y la distribución espacial de la bacteria en el medio en el que se encuentra.

Recientemente esta técnica ha sido validada junto con otras también basadas en la utilización de fluorocromos, para determinar la viabilidad bacteriana, ya que el contenido en ribosomas de una bacteria parece que está directamente relacionado con la misma (Nilsson et al., 2002).

La mayor limitación del método es la sensibilidad, en función de la propia sonda y de la matriz donde estemos hibridando, ya que en muchos casos matrices complejas hacen necesario un tratamiento previo de la muestra. El medio utilizado para el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla parece que ejercen una importante influencia en la intensidad de la señal. La accesibilidad de la sonda al ARNr es distinta según la molécula de ARN de la que se trate (23S o 16S) y la zona del mismo de la que sea complementaria, lo que hay que tener en cuenta para el diseño de la sonda (Fuchs et al., 2001). En estos últimos años se han desarrollado numerosos métodos para solucionar este problema, incrementando la señal hasta 20 veces mediante una reacción enzimática de amplificación (Schönhuber et al., 1997), aunque parece que las sondas marcadas mediante este sistema presentan mayores problemas de penetración en la célula.

Esta técnica FISH con sondas ARNr ha sido empleada en nuestro laboratorio para la detección e identificación de *Arcobacter*, *Campylobacter* y *Helicobacter pylori* a partir de muestras de agua y fangos, demostrando ser un método muy sensible, rápido y con un enorme potencial. No detecta la presencia de células no viables, con lo cual es insensible a falsos resultados positivos. (Moreno et al. 2003a,b). Puede, por tanto, constituir una alternativa rápida a los métodos culturales para detectar células de *Campylobacter* directamente en las aves (Moreno et al., 2002).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se han descrito varios métodos basados en la PCR para la detección e identificación de *Campylobacter* (González et al., 2006a). La mayoría se basan en la amplificación de un fragmento o del gen completo de la flagelina o los genes ribosómicos. Se ha utilizado tanto para la detección en alimentos (Moreno et al., 2001), en aguas (Diergaardt et al., 2004) y en muestras clínicas (Sinha et al., 2004).

En la industria alimentaria todavía no se utiliza la PCR como una técnica de rutina, debido sobre todo al coste económico, pero cada vez hay más estudios que la reafirman como la técnica del futuro de la Microbiología de Alimentos. Sin embargo, la matriz de los alimentos puede contener sustancias inhibitorias, con un efecto importante en la actividad de la Taq polimerasa (Hernández et al., 1995a), como son la hemoglobina, la urea, compuestos fenólicos, grasas o iones Ca²⁺. Además, los niveles de contaminación bacteriana en alimentos suele ser más bajos que en muestras clínicas (Giesendorf et al., 1993), por lo que las muestras deben enriquecerse en un paso previo a la extracción de ADN antes del análisis por PCR (Moreno et al., 2001).

En los últimos años se han descrito nuevas técnicas basadas en modificaciones de la PCR convencional, así como otras en las que se combina con otras técnicas, como la hibridación o la inmunocaptura. La PCR anidada ha sido empleada para detectar *C. jejuni* y *C. coli* en muestras ambientales (Wang et al., 2002). La PCR múltiple se ha utilizado para diferenciar entre *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, y *C. fetus* subsp. *fetus* (Wang et al., 2002). En nuestro laboratorio la hemos aplicado para la detección de especies de *Campylobacter* en muestras de pollo (González et al., 2006b). También se ha descrito un método en el que se combina la inmunocaptura con la PCR. Docherty et al. (1996) utilizaron esta técnica para la detección de un número inferior a 25 u.f.c./g de *Campylobacter* en muestras de leche o carne de ave en menos de 30 h. Otra técnica diseñada por Lamoureux et al. (1997) se basa en la inmovilización de un fragmento amplificado del 23S ARNr a una placa con micropocillos y la posterior hibridación con una sonda de ADN específica, marcada con fluorocromos.

Recientemente el proceso de PCR se ha automatizado, permitiendo además la cuantificación de los productos de amplificación en tiempo real. Esta nueva técnica conocida como "PCR a tiempo real" (Real-Time PCR) no requiere el análisis posterior de la muestra, evitando contaminaciones y minimizando el tiempo de análisis de las muestras (Nogva et al., 2000). La técnica ha sido utilizada por Lund et al. (2004) para detectar especies termotolerantes de *Campylobacter* en heces de pollo en menos de 4 h.

10. Sistemas de tipificación

El objetivo de los estudios de tipificación es averiguar si dos o más cepas tienen el mismo origen, es decir, si están clonalmente relacionadas. Esto supone una herramienta epidemiológica muy valiosa, especialmente para poder determinar las rutas y fuentes de transmisión de infecciones humanas, identificar y controlar, tanto temporal como geográficamente, cepas concretas con importantes características fenotípicas, ó desarrollar estrategias para controlar estos organismos dentro de la cadena alimentaria.

Es complicado determinar con exactitud la ruta epidemiológica de las cepas de *Campylobacter* que causan infecciones en humanos, fundamentalmente porque es una bacteria ubicua del ambiente, son esporádicos los casos de infecciones que provoca, y bastante raros los brotes.

Existen numerosos métodos de tipificación, tanto fenotípicos como genotípicos, aplicables a *Campylobacter*, aunque lo más recomendable en estudios epidemiológicos es utilizar una combinación de ellos (Patton et al., 1991).

Entre los fenotípicos destacan la bio-, sero- y fagotipificación. Se ha estudiado la utilidad de estos tres sistemas para la caracterización subespecífica de cepas termotolerantes de *Campylobacter* aisladas de hígado de cerdo (Moore & Madden, 2003). También se ha desarrollado una técnica que combina la serotipificación con la fagotipificación (Frost et al., 1999). Este método ha sido utilizado para tipificar cepas humanas de *Campylobacter* en el Reino Unido (Newell et al., 2000). Recientemente, el análisis de serotipos y fagotipos han sido incluidos, junto con sistemas genotípicos, en estudios comparativos de métodos de tipificación para *C. jejuni* y *C. coli* (Hopkins et al., 2004).

En el otro extremo están los métodos genotípicos, que por lo general presentan mayores niveles de discriminación (Petersen & On, 2000), pero que en algunos casos carecen de la estandarización necesaria, por lo que los resultados obtenidos por un laboratorio no pueden ser fácilmente comparados con los de otro, lo que dificulta su utilidad en investigación

epidemiológica. Para solucionar este problema, se está trabajando en un proyecto a nivel europeo, y actualmente existe una red de trabajo denominada CAMPYNET (“A network for the standardisation and harmonisation of molecular typing methods for campylobacters”, <http://www.svs.dk/campynet>), cuyo principal objetivo es la estandarización y armonización de los métodos genotípicos para el estudio epidemiológico de *Campylobacter*. Entre los múltiples métodos de genotipificación, CAMPYNET recomienda para *Campylobacter*, el análisis de polimorfismos del gen *flaA* (PCR-RFLP), y los análisis PFGE y AFLP. Actualmente, este grupo está trabajando en la estandarización de la ribotipificación y la técnica RAPD.

Dada las estrechas relaciones fenotípicas y genotípicas de los diversos grupos de cepas de *Campylobacter*, CAMPYNET está preparando un set estándar de 100 cepas de *C. jejuni* y *C. coli* que estará disponible internacionalmente para poder así comparar y homologar los estudios epidemiológicos.

Al igual que en otras bacterias, también en *Campylobacter* se ha detectado inestabilidad genética, concretamente en los genotipos de la flagelina. Esto puede ser debido a cuatro posibles mecanismos: (i) recombinaciones dentro de los genes de la flagelina duplicados, (ii) adquisición de ADN extracelular mediante transformación, (iii) recombinación de ADN programada, y (iv) recombinación aleatoria a escala genómica. En general, el subcultivo, la congelación o el almacenamiento de las cepas no afecta al genotipo (Wassenaar & Newell, 2000).

Métodos fenotípicos

Biotipificación

A lo largo de los años se han propuesto muchos esquemas de biotipificación basados en un número determinado de pruebas bioquímicas. Así, Charlier et al. (1974) clasificaron varias especies de *Campylobacter* con 10 pruebas bioquímicas, mientras que Skirrow y Benjamin (1980) introdujeron un esquema para distinguir *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* que incluía las siguientes pruebas: crecimiento a 25°C, sensibilidad al ácido nalidíxico, hidrólisis del hipurato y producción de sulfhídrico en un medio con hierro. Este esquema es habitualmente empleado para el trabajo rutinario (Wareing et al., 2002).

Otro de los métodos más utilizados por su sencillez y rapidez es el esquema de Lior (1984), que se basa en la combinación de las siguientes pruebas: hidrólisis del hipurato, producción de H₂S e hidrólisis del ADN. Estas pruebas diferencian entre *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, determinando cuatro biotipos de *C. jejuni*, dos de *C. coli* y dos de *C. lari*.

Penner (1988) propuso un esquema con movilidad, oxidasa, crecimiento a 37°C, catalasa, ureasa, producción de sulfhídrico, reducción de nitratos, hidrólisis del hipurato, del indoxil acetato, susceptibilidad al ácido nalidíxico y a la cefalotina e hidrólisis de ADN. Tenover y Fennell (1991) recomendaban las pruebas de tolerancia a distintos agentes: tolerancia a un 1% de glicina, tolerancia al NaCl, crecimiento en condiciones anaeróbicas en presencia de clorhidrato de trimetilamina-n-óxido (TMAO) y crecimiento anaeróbico en presencia de fumarato. Goossens y Butzler (1992) recomendaron las pruebas siguientes: detección de la citocromo-oxidasa, detección de la actividad catalasa, reducción de nitratos, producción de H₂S, hidrólisis del hipurato, hidrólisis del indoxil-acetato y crecimiento a 25°C y a 42°C. Otro esquema fue el propuesto por Burnens y Nicolet (1993) con tres pruebas bioquímicas (actividad arilsulfatasa y pirazinamidasa, y susceptibilidad a la polimixina B) para diferenciar entre cepas de *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Helicobacter*.

Posteriormente, On y Holmes (1995) diseñaron un esquema computerizado que incluía el análisis de 67 caracteres fenotípicos de *Campylobacter*, *Helicobacter* y otros géneros relacionados taxonómicamente. Este esquema resultó ser una valiosa herramienta para la identificación a nivel de especie y subespecie en la mayoría de las cepas estudiadas. Sin embargo, para poder aplicarlo de forma rutinaria, además de realizar un número elevado de pruebas, es necesario disponer de la base de datos y de la experiencia suficiente para realizar el análisis numérico de los resultados y la interpretación de los mismos (On, 1996).

Serotipificación

En la década de los 80 se aceptaron dos esquemas para la serotipificación de campylobacters, que podían ser usados de forma separada o conjuntamente (Penner, 1988).

El esquema de Penner (Penner & Hennessy, 1980) se basa en la utilización de antígenos solubles y termoestables (HS), que posteriormente se confirmó que eran los antígenos somáticos O, en una prueba de hemoaglutinación pasiva. Utilizando este sistema encontraron 60 serotipos diferentes, 42 entre cepas de *C. jejuni* y 18 de *C. coli*. Se ha demostrado que el determinante de la especificidad de este esquema es el lipopolisacárido de la pared bacteriana (Preston & Penner, 1987).

Por el contrario, el esquema de Lior (Lior et al., 1982) detecta variaciones en los antígenos termolábiles (HL) mediante una prueba de aglutinación en portaobjetos. Estos autores diferenciaron 108 serotipos: 63 de cepas de *C. jejuni*, 37 de *C. coli* y 8 de *C. lari*. Es un sistema de identificación fácil y rápido, con la ventaja de poder caracterizar la mayoría de las cepas, aunque pueden aparecer reacciones cruzadas. La naturaleza molecular del serodeterminante en esquemas de tipificación termolábiles no se ha determinado.

El esquema de Penner es el más extendido y ha sido usado como base de un nuevo sistema desarrollado en el Reino Unido (Frost et al., 1998) en el que se detectan los antígenos O por aglutinación directa de las células. Los principales problemas de estas técnicas, como son la falta de reproducibilidad debido a las variaciones en los eritrocitos (Owen & Gibson, 1995) y las reacciones inespecíficas, han sido subsanados en este sistema por medio de la aglutinación directa y la incubación a 50°C, respectivamente. El resultado de este esquema es la identificación de 47 serotipos de *C. jejuni* y 15 de *C. coli*, aunque ciertos estudios indican que más de un 40% de cepas aisladas de aves del Reino Unido no son tipificables por este método (Newell et al., 2000). Esta falta de reactividad serológica es esperable si tenemos en cuenta que estos patrones fueron definidos en base a las cepas de campylobacters que existían a principios de los años 80 en el área de Canadá, sin embargo a lo largo de estos años ha existido un flujo constante de nuevos tipos y especies.

En general, el análisis de los serotipos es una técnica útil en estudios epidemiológicos de campylobacters, aunque en ocasiones carece de suficiente poder discriminatorio y muchas cepas no pueden ser serotipificadas. La mayoría de los métodos genotípicos tienen un porcentaje de

tipificación muy superior a la de la caracterización serológica. En general, las cepas de un mismo serotipo no son siempre similares genéticamente, así la mayoría de los serotipos de *C. jejuni* y *C. coli* engloban cepas de genotipos muy heterogéneos, además de existir grupos de cepas pertenecientes a diferentes serotipos que están genéticamente relacionadas.

Fagotipificación

Este sistema estudia la actividad lítica de ciertos bacteriófagos sobre los campylobacters. Un fagotipo se define como dos o más aislamientos no relacionados epidemiológicamente que dan el mismo patrón de reacción con el fago a infecciones causadas por *Campylobacter*. En muchos casos se emplea como una extensión de la serotipificación, debido a la gran cantidad de cepas pertenecientes al mismo serotipo y otras muchas que no pueden ser tipificadas y, en consecuencia, asignadas a un serotipo en concreto.

Se han descrito tres sistemas de fagotipificación para *Campylobacter* (Grajewski et al., 1985; Salama et al., 1990; Khakhria & Lior, 1992). Actualmente, el sistema propuesto por Salama se utiliza junto con la serotipificación para el análisis epidemiológico de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas en Inglaterra y Gales (Frost et al., 1999). Hasta el momento han sido reconocidos un total de 76 fagotipos.

Frost et al. (1998) identificaron 57 fagotipos distintos entre 2.407 aislamientos de *C. jejuni* y cerca del 60% de las cepas fueron asignadas a los 10 fagotipos más comunes, siendo un 15% el porcentaje de cepas incapaces de ser tipificadas. Un estudio reciente en el Reino Unido ha mostrado que los fagotipos más comunes asociados a la infección son el PG52, PG121 y PG55 (Wareing et al., 2002).

Resistotipificación

El estudio de los perfiles de susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos ha sido también utilizado para fines taxonómicos (Ribeiro et al., 1996). Los métodos que se utilizan para evaluar la resistencia de estos agentes son: (I) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en agar Müeller Hinton; (II) Difusión en agar con un medio selectivo. Actualmente, el aumento de aislamientos de cepas de *Campylobacter* resistentes a un gran número de agentes microbianos, junto con el intercambio conjugacional de la resistencia contra otros como la tetraciclina o kanamicina, ha reducido la validez taxonómica de estos estudios.

La susceptibilidad al ácido nalidíxico ha sido considerada normalmente como una prueba importante para distinguir entre las especies tradicionalmente sensibles, *C. jejuni* y *C. coli*, frente a la especie resistente *C. lari*. Como resultado, la diferenciación de las cepas resistentes de *C. coli* con respecto a *C. lari* necesitaba de la introducción de pruebas adicionales, como la susceptibilidad a las sales de trifeniltetrazolio (resistencia adquirida). Además, la resistencia adquirida de *Campylobacter* a las fluoroquinolonas, que depende de una mutación puntual en el gen *GyrA*, ha aumentado considerablemente en la presente década (Barrós-Velazquez et al., 1999).

Tipificación por lectinas

Las lectinas son proteínas vegetales que se unen específicamente a carbohidratos y que por tanto, pueden usarse en pruebas de aglutinación. No se han encontrado correlaciones de los patrones de lectinas con los serotipos de Penner (O'Sullivan et al., 1990). Se han obtenido diferentes tipos por lectinas en cepas con el mismo serotipo Penner o Lior, pero algunos tipos de lectinas son compartidos por distintas especies por lo que el grado de discriminación entre especies es cuestionable (O'Sullivan et al., 1990).

La ventaja de la tipificación por lectinas es que necesita cantidades mínimas de reactivo y no precisa equipamiento especial, y aunque no se ha encontrado aplicabilidad en la identificación de especies (On, 1996), algunos opinan que es un sistema estable y reproducible para el estudio de *Campylobacter* (Aabenhus et al., 2002).

Caracterización de proteínas

La composición proteínica de un microorganismo refleja la organización genética del mismo, por tanto, el análisis de los distintos perfiles de proteínas se pueden utilizar como sistema de identificación o tipificación. Este sistema constituye una herramienta útil aunque compleja debido a que requieren reactivos y equipo especializado. La separación de esta mezcla de proteínas en un gel de poliacrilamida en electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) origina un perfil proteico complejo que puede considerarse como una huella o “fingerprint” de la cepa estudiada. Para poder efectuar una comparación objetiva de un gran número de perfiles se necesita crear una base de datos y un programa informático.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas totales se utilizó por primera vez por los investigadores Morris y Park (1973) en estudios de taxonomía de *Campylobacter*. Posteriormente se han usado otros grupos de proteínas como las solubles en fenol, las solubles en agua o las proteínas de la membrana externa. Las proteínas solubles en fenol han sido utilizadas para diferenciar el género *Arcobacter* del género *Campylobacter* mientras que las proteínas solubles en agua se han utilizado para diferenciar entre los *campylobacters* termotolerantes, *C. coli*, *C. jejuni* y *C. lari*. Estos dos tipos de proteínas solubles tienen una aplicabilidad limitada para la identificación de *campylobacters*. Las proteínas de la membrana externa son las más empleadas en la identificación (On, 1996). En la actualidad se utilizan preferentemente las proteínas totales, ya que reflejan una parte más amplia del genoma bacteriano, separándose de las células por sonicación o por tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS) (Vandamme et al., 1991). También pueden analizarse las peptidoglucano hidrolasas (PG-hidrolasas), enzimas endógenas de la pared celular bacteriana, como las autolisinas, muy conservativas a nivel de especie.

La técnica de análisis de polimorfismos enzimáticos (MEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis) se basa en el análisis de la distancia de migración electroforética de enzimas constitutivos, presentes en la mayoría de las bacterias. La movilidad de los enzimas varía debido a las diferentes cargas aparecidas en estas moléculas por la sustitución de aminoácidos en la secuencia polipeptídica, así pues, se relaciona directamente con cambios en el ADN que codifica el polipéptido (Selander et al., 1986). De este modo se puede estimar el grado de relación genética entre diferentes cepas. En el género *Campylobacter* se demuestra la existencia de un grado considerable de heterogeneidad genética dentro de cada especie (Aeschbacher & Piffaretti, 1989). Patton et al. (1991) destacan la técnica de MEE como uno de los métodos más sensibles, capaz de distinguir entre cepas con idéntico serotipo.

Métodos genotípicos

PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

Se basa en la amplificación específica del gen que codifica para el 16S o 23S ARNr y la digestión del fragmento amplificado mediante uno o varios enzimas de restricción. Recientemente se ha utilizado la restricción de un fragmento de los genes 16S y 23S ARNr para diferenciar entre aislamientos de *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Helicobacter* (González et al., 2007). Esta técnica también ha sido utilizada por Moreno et al. (2002) en un estudio de tipificación de *campylobacters* termotolerantes. Además, se ha propuesto el locus de la flagelina, concretamente el gen *flaA*, que tiene dos regiones altamente conservadas que lo flanquean (C1 y C2) y una región interna variable (VI). La digestión de este gen ha sido utilizada para analizar la diversidad entre cepas de *C. jejuni* aisladas de casos de enteritis humana (Owen et al., 1993), así como para estudiar la diversidad entre cepas de *C. coli* y *C. jejuni* aisladas de cerdos (Moore et al., 2002). También ha demostrado ser una técnica muy útil para la tipificación de cepas de *C. lari*, *C. helveticus* y *C. jejuni* subsp. *doylei* ((Wassenaar & Newell, 2000).

La selección de la enzima adecuada es muy importante, ya que la discriminación de la técnica dependerá en gran medida de ello. DdeI parece ser la enzima que ofrece mejor discriminación, al menos con las cepas de procedencia animal. Para aumentar el nivel de discriminación es aconsejable la combinación de las endonucleasas DdeI y HinfI (Wassenaar & Newell, 2000).

Su poder discriminatorio no llega a ser tan alto como el de otras técnicas, tales como PFGE y AFLP (Nielsen et al., 2000), pero se considera una técnica rápida, sencilla, que no requiere de reactivos y equipamiento excesivamente caros. Además, puede realizarse sin necesidad de cultivar la bacteria y por tanto, resulta muy útil para caracterizar bacterias no cultivables como es el caso de campylobacters y helicobacters no cultivables (Hurtado & Owen, 1997). Estas características hacen que sea una técnica de subtipificación muy aceptada (Moore et al., 2002).

Como ya se indicó anteriormente, su desventaja más significativa está relacionada con la inestabilidad genética de los genes de la flagelina (recombinación intragenómica, transformación natural), lo cual prácticamente la inhabilita para estudios epidemiológicos globales o durante largos periodos de tiempo, a menos que se combine con otro método genotípico o fenotípico, el cual probablemente identificará estos intercambios de ADN.

Ribotipificación

Se fundamenta en la digestión total del ADN con un enzima de restricción y la posterior hibridación del mismo, una vez transferido a membrana (Southern blot), con una sonda de ARNr marcada.

Aunque mediante esta técnica un porcentaje elevadísimo de células pueden ser tipificadas, el hecho de que la mayoría de las especies de *Campylobacter* posean tres copias de los genes ribosómicos hace que su poder discriminatorio esté limitado, no pudiendo diferenciar cepas a nivel de subespecies. En general, el análisis de los ribotipos es útil para la caracterización de cepas difíciles de analizar fenotípicamente, y en nuestro laboratorio la hemos empleado satisfactoriamente para la subtipificación, al menos hasta un cierto grado, de numerosas cepas de diversas procedencias y de brotes ocasionados. (Hernandez et al. 1991a, 1991b, 1996; Owen and Hernández, 1993).

La mayoría de los científicos utilizan sondas obtenidas por PCR a partir de ADN de *Campylobacter* que son específicas para al ARNr 16S. Otros investigadores emplean en cambio, una sonda cADN 16S+23S de *Escherichia coli*, la cual tiene mayor poder discriminatorio que la específica para el ARNr 16S. Las endonucleasas más empleadas, solas o en combinaciones, son PstI, HaeIII, HindIII, y PvuII (Wassenaar & Newell, 2000).

El escaso poder discriminatorio de la ribotipificación y su complejidad técnica lo convierte en un método poco práctico para trabajos rutinarios. Pero tiene también ventajas, la primera es que las membranas pueden ser rehibridadas con sondas de otras regiones hipervariables del cromosoma y aumentar así el nivel de discriminación; la segunda es que se ha conseguido automatizar, evitando así la laboriosidad técnica e incrementando su reproducibilidad.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Esta técnica se basa en el uso de iniciadores de pocos pares de bases que no guardan homología conocida con la secuencia del ADN que van a amplificar. La reacción se va a llevar a cabo a menor temperatura de unión y los iniciadores se van a unir aleatoriamente a regiones de ADN, generando perfiles diferentes en función de su secuencia (Wassenaar & Newell, 2000).

La tipificación por RAPD ha sido aplicada con éxito en el estudio de aislamientos humanos de cepas de *C. jejuni* serogrupos O1 y O2 de Penner (Fayos et al., 1993; Mazurier et al., 1992). Madden et al. (1996) resaltaron el significativo polimorfismo de los perfiles obtenidos en cepas de *Campylobacter* pertenecientes al mismo serotipo, y la utilidad de esta técnica para tipificar cepas que no pudieron ser serotipificadas. Con esta técnica, Hernández et al. (1996) encontraron menor discriminación que con la ribotipificación y Madden et al. (1999) obtuvieron mayor discriminación que con la técnica PCR-RFLP.

Este método presenta dos ventajas principales frente al método PCR-RFLP ya que no necesita un conocimiento previo de la secuencia genómica a estudiar y utiliza pequeñas cantidades de ADN frente a mayores cantidades requeridas para RFLP. Pero su mayor problema es la falta de reproducibilidad y estandarización. Además, el proceso de amplificación es extremadamente sensible a ligeras variaciones en la temperatura de unión, lo que puede dar lugar a una variación en el patrón de bandas, y ser causa de la interpretación subjetiva de los datos (Olive & Bean, 1999). Analizando los patrones a través de un sistema computerizado,

se puede mejorar la consistencia de la técnica y la comparación de los datos (Hernández et al., 1995b). Además, ligeras diferencias entre los perfiles RAPD de cepas aisladas de pollo y epidemiológicamente relacionadas han sido atribuidas a la inestabilidad genética de las cepas (Aarts et al., 1995).

Una técnica muy similar a RAPD, que se basa en la amplificación de secuencias intergenéticas altamente repetitivas en el genoma bacteriano, es el ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). En algunos casos se han combinado estos iniciadores con los de los RAPD para la subtipificación de especies de *Campylobacter* (Iriarte & Owen, 1996), aunque la reproducibilidad de la técnica RADP-ERIC es de momento bastante baja (Wassenaar & Newell, 2000).

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

El análisis mediante AFLP consiste en un proceso de digestión completa del ADN cromosómico con dos enzimas de restricción (una de baja frecuencia de corte y otra de alta), posterior ligado de adaptadores a los fragmentos obtenidos, seguido de una fase de amplificación específica de algunos de los fragmentos de restricción generados. Los iniciadores se van a unir a las regiones que contengan los sitios específicos de corte de las enzimas más un adaptador de secuencia conocida. Estos iniciadores normalmente están marcados con radioactividad o con fluorocromos, y la visualización se realiza por separación electroforética en geles de poliacrilamida. Esta técnica ha sido recientemente utilizada para la caracterización de cepas de *C. jejuni* (Siemer et al., 2004) y de *C. lari* (Duim et al., 2004).

Una variante de esta técnica mucho más sencilla es la desarrollada por Gibson et al. (1998), que utiliza una sola enzima, los iniciadores no están marcados y los geles son de agarosa. Este método ha sido utilizado con éxito para identificar cepas de *H. pylori* (Gibson et al., 1998), *H. pullorum* (Gibson et al., 1999), *Arcobacter* (On et al., 2004) y *Campylobacter* (Moreno et al., 2002).

Este método analiza el genoma bacteriano total, lo que conlleva un elevado poder discriminatorio, y no requiere un conocimiento previo de la secuencia genómica de las muestras, lo cual permite tipificar cepas que no estén secuenciadas. Además, se trata de una técnica muy reproducible, siempre y cuando las condiciones de digestión, ligado y amplificación de las muestras no varíen. Sin embargo, es laboriosa y muy sensible a la calidad del ADN empleado, pudiendo aparecer fragmentos de restricción diferentes derivados de una digestión parcial en caso de encontrarse el ADN en mal estado (Gibson et al., 1998). Se ha observado que esta técnica es insensible a la inestabilidad genética de los genes de la flagelina (Duim et al., 1999).

Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

La técnica PFGE (Pulsed Field Gel Electroforesis) consiste en la separación mediante electroforesis en campo pulsado de fragmentos de ADN cromosómico de elevado peso molecular obtenidos por digestión con enzimas de restricción.

La principal diferencia con respecto a otras técnicas es que las células procedentes del cultivo en caldo o de un medio sólido, se combinan con agarosa y se vierten en unos moldes, quedando embebidas en la agarosa. De este modo se impide que se produzca ningún daño en los ácidos nucleicos, que se van a extraer in situ en el bloque al lisar las células. Posteriormente, se procede a la digestión del ADN dentro del bloque con la enzima adecuada. Por último, los fragmentos de ADN son separados mediante un método especial de electroforesis. Se realiza en un equipo que aplica de forma alterna campos eléctricos en direcciones diferentes. Estos cambios de dirección imponen a las moléculas de ADN unas etapas de reorientación más o menos largas dependiendo de su tamaño; las moléculas más pequeñas se orientan más rápidamente que las grandes.

En un principio fue utilizada para determinar el tamaño del genoma de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. fetus*, y para construir el mapa genético de una cepa de *C. jejuni* (Chang & Taylor, 1990). En la actualidad, es considerada como una de las herramientas más poderosas para la epidemiología molecular microbiana (Nielsen et al., 2000). Varios trabajos confirman la validez

de este método para la caracterización de especies de *Campylobacter* en estudios epidemiológicos. Así Lorentz et al. (1998) realizaron la subtipificación de cepas de *C. jejuni* aisladas de humanos, animales y aguas. En el caso de *C. upsaliensis*, a pesar de la elevada heterogeneidad entre los miembros de la especie, se han podido relacionar perfiles generados por PGFE con un serogrupo determinado (Bourke et al., 1996). Recientemente ha sido aplicada en el análisis de cepas de *C. jejuni* aisladas de aves y humanos (Broman et al., 2004).

Las ventajas de esta técnica son obvias, ya que se puede estudiar todo el material genómico de la cepa. En general, tiene un elevado poder discriminatorio, que puede incrementarse con el uso combinado de más de una enzima (Wassenar & Newell, 2000), aunque presenta algunos inconvenientes. La preparación de los bloques de agarosa es larga y tediosa, en algunos casos las muestras de ADN pueden ser degradadas a causa de las ADNasas, las enzimas comúnmente empleadas no son válidas en todos los casos, se requieren equipos especializados de elevado coste, y además la interpretación de los resultados puede ser bastante difícil debido a la inestabilidad genética de estas bacterias (de Boer et al., 2000). A pesar de la fiabilidad de la técnica, algunos autores han encontrado procesos espontáneos en el genoma que han causado cambios en los perfiles resultantes del PFGE de *C. jejuni* y *C. coli* (Wassenaar et al., 1998). En cualquier caso, parece que las ventajas de la técnica superan a las desventajas, resulta más discriminatoria que la ribotipificación (Gibson et al., 1995) y que la caracterización mediante el gen de la flagelina (Lorentz et al., 1998), y sólo la técnica AFLP parece igualarla en capacidad discriminatoria (Kokotovic & On, 1999).

Secuenciación de nucleótidos

La creciente disponibilidad de tecnologías automatizadas de secuenciación automática de ADN ha conducido al desarrollo de nuevos métodos moleculares de subtipificación basados en la secuenciación de uno o más genes diana. La principal ventaja de estas técnicas es que una secuencia de ADN es un dato objetivo, las variaciones experimentales son mínimas, lo cual facilita las comparaciones directas entre laboratorios.

MLST (Multi Locus Sequence Typing) es una técnica que emplea la comparación de secuencias de fragmentos de ADN de genes seleccionados para la caracterización de organismos haploides. Las variaciones en los diferentes locus permiten la identificación de grupos de microorganismos idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales). Esta técnica se basa en la misma filosofía que el análisis de isoenzimas o MLEE (Multi Locus Enzyme Electrophoresis), que consiste en el análisis de la movilidad electroforética de un número concreto (generalmente entre 15 y 20) de enzimas metabólicas en geles de poliacrilamida. Las variaciones observadas en estas movilidades se corresponden con variaciones en el locus o gen codificante de cada enzima. Por lo tanto, cada variante se define como “variante alélica” y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico que a su vez define el tipo electroforético. Esta técnica permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables, sin embargo, está basado en la generación de patrones de bandas en geles, con los inconvenientes que ello conlleva. Así pues, las actuales facilidades de acceso a la secuenciación de ADN permitieron el desarrollo de MLST manteniendo los principios del MLEE. El MLST permite identificar todas las variaciones, no sólo aquellas que produzcan un cambio en la movilidad electroforética del enzima codificante.

Dingle y colaboradores (2001) desarrollaron un protocolo MLST para la caracterización de cepas de *C. jejuni* basado en la secuenciación de siete genes. En este esquema, a cada uno de los alelos se le asigna un número por comparación de la secuencia amplificada y secuenciada con una base de datos centralizada; a continuación, se genera un perfil alélico que será la combinación de los siete alelos ya asignados. La caracterización de 194 aislamientos este método demostró que *C. jejuni* es una bacteria que posee una gran diversidad genética y constituye una población débilmente relacionada clonalmente; esta conclusión fue posteriormente corroborada con un segundo estudio en el que se trabajó con 814 aislados

(Dingle et al., 2002). La estructura de este tipo de poblaciones se considera que consiste en complejos clones o linajes en los cuales los aislamientos son considerados como derivados de un antecesor común. Los tipos de *C. jejuni* pudieron ser agrupados en linajes clonales que fueron definidos como grupos de dos o más aislamientos que compartían alelos idénticos en cuatro o más genes.

Los datos obtenidos de la secuenciación son fácilmente comparables entre laboratorios y permiten su almacenamiento electrónico y distribución. Además, esta técnica puede reducir la necesidad de transportar bacterias vivas, ya que la secuenciación de nucleótidos de los productos de PCR puede conseguirse a partir de células muertas, ADN purificado, o material clínico. Se ha desarrollado una base de datos a nivel mundial (<http://mlst.zoo.ox.ac.uk>) para el almacenamiento e intercambio de datos y protocolos que funciona como nexo común para todos los posibles participantes, pudiendo realizarse todo el proceso de consultas y análisis así como enviar las propias cepas para inclusión en las bases, con conexión posible desde cualquier lugar del mundo.

La secuenciación de una pequeña región del gen *flaA* (*flaA*-SVR) también ha mostrado ser una técnica muy útil para tipificar *Campylobacter* (Meinersmann et al., 1997). Debido al pequeño tamaño del fragmento (321 pb), la determinación de la secuencia es rápida y sencilla. La comparación de secuencias de este pequeño fragmento del gen *flaA* es casi tan discriminatorio como la comparación de secuencias del gen completo, y puede presentar mayor capacidad discriminatoria que otras técnicas como la serotipificación o el análisis PCR-RFLP del gen *flaA* (Meinersmann et al., 2005). Esta técnica ha sido utilizada para estudiar poblaciones de *Campylobacter* dentro de la industria avícola, en la diferenciación entre aislamientos ambientales y de animales. Además, puede proporcionar un nivel de discriminación adecuado para el estudio de brotes epidémicos de enteritis ocasionadas por *C. jejuni*. Sin embargo, puede no ser adecuado para estudios epidemiológicos longitudinales, ya que este gen puede sufrir recombinaciones genéticas, lo que dificulta su utilidad como método de subtipificación

11. Conclusiones

Exactamente tres décadas han transcurrido desde que Martin Skirrow desarrollara en 1977 su medio de cultivo selectivo para campylobacters. Desde entonces, el progreso obtenido en el conocimiento de estas bacterias ha sido considerable. Hemos pasado de conocer cuatro a 17 especies de *Campylobacter*; se han descrito nuevos géneros, especialmente *Helicobacter*; y las relaciones filogenéticas entre las especies están perfectamente definidas. Actualmente *C. jejuni* es reconocido como la principal causa mundial de enfermedad entérica por consumo de alimentos, para lo cual han sido claves las técnicas moleculares que se han ido desarrollando desde entonces.

En estos momentos, existe la necesidad de desarrollar metodologías validadas para el diagnóstico rápido y seguro de microorganismos patógenos en alimentos. Las técnicas moleculares son de especial interés en la detección e identificación de microorganismos muy sensibles a las condiciones ambientales, o de difícil cultivo. Nuestro objetivo fundamental es, por tanto, contribuir a la Seguridad Alimentaria, estableciendo una red multidisciplinar para el desarrollo y validación de nuevas metodologías rápidas y seguras basadas en la biología molecular que permitan el control en muestras alimentarias de matriz compleja y en aguas destinadas al consumo, no solamente de *Campylobacter*, sino también de otras bacterias patógenas para las que hasta el momento no se dispone de métodos normalizados, bien porque son emergentes, bien porque no existen todavía estudios exhaustivos sobre las mismas.

Para ello, se deben desarrollar y estandarizar técnicas moleculares basadas en la PCR, o hibridación in situ (FISH) y se deben optimizar los métodos moleculares más apropiados para la detección de marcadores genéticos que puedan resultar de interés para el seguimiento epidemiológico de los microorganismos en los alimentos: viabilidad celular, genes relacionados con la patogénesis y/o virulencia, etc., y generar bases de datos con todos los resultados obtenidos, que faciliten la evaluación cuantitativa del riesgo asociado a la contaminación microbiológica de alimentos y la realización de posteriores estudios metodológicos o epidemiológicos.

No sería equitativo que terminara este discurso de recepción sin hacer extensivos mis agradecimientos a las muchas personas de las que soy deudor en mi carrera profesional. Como es de rigor en las ciencias biomédicas, los méritos docentes y de investigación que haya podido alcanzar los debo compartir con mis compañeros de Microbiología de la Universidad Politécnica de Valencia, lugar donde ha transcurrido la mayor parte de mi vida profesional. Mención especial para el Dr. Robert J. Owen, quién, hace ya casi 20 años, me acogió en su laboratorio de Campylobacter en Londres y desde entonces hemos mantenido una intensa y fructífera colaboración, además de una afectuosa amistad. Finalmente quiero expresar mi reconocimiento y gratitud a todos los integrantes de nuestro grupo de investigación en el Centro Avanzado de Microbiología de Alimentos, en especial a las Dras. Yolanda Moreno y Ana González, ambas Premio Extraordinario de Doctorado de la Universidad Politécnica de Valencia, y a los profesores M^a Antonia Ferrús y Manuel Hernández.

No quisiera olvidar a las muchas personas que pasaron por nuestros laboratorios y que contribuyeron, en menor o mayor medida, al desarrollo curricular del grupo de investigación. A todos ellos, les agradezco su esfuerzo y dedicación.

Finalizo transcribiendo literalmente el último párrafo del discurso de recepción que, hace casi 40 años, pronunció en esta misma casa el Ilmo. Sr. Académico D. Enrique Hernández Giménez: Si nos ha tocado vivir en una época donde el avance tecnológico es arrollador, con nuestro esfuerzo debemos contribuir a que la técnica llegue a suministrar a la Humanidad los alimentos más seguros, nutritivos y abundantes en la historia del hombre.

He dicho.

12. Bibliografia

- Aabenhus, R., Hynes, S.O., Permin, H., Moran, A.P. & Andersen, L.P. (2002). Lectin typing of *Campylobacter concisus*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 715-717.
- Aarts, H.J.M., Van Lith, L.A.J.T. & Jacobs-Reitsma, W.F. (1995). Discrepancy between Penner serotyping and polymerase chain reaction fingerprinting of *Campylobacter* isolated from poultry and other animal sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 371-374.
- Aeschbacher, M. & Piffaretti, J. (1989). Population genetics of human and animal enteric *Campylobacter* strains. *Infect. Immun* 57: 1.432-1.437.
- Ailes, E., Demma, L., Hurd, S., Hatch, J., Jones, T., Vugia, D., Cronquist, A., Tobin, M., Larson, K., Laine, E., Edge, K., Zansky, S. & Scallan, E. (2007). Trends in incidence of *Campylobacter* in the United States, FoodNet, 1996-2006. *Zoonoses and Public Health*, 54, Supp. 1: 41.
- Alderton, M.R., Korolik V., Coloe, P.J., Dewhirst, F.E. & Paster, B.J. (1995). *Campylobacter hyoilei* sp. nov., associated with porcine proliferative enteritis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 61-66.
- Alonso, J.L., Mascellaro, S., Moreno, Y., Ferrús, M.A. & Hernández, J. (2002). Double-staining method for differentiation of morphological changes and membrane integrity of *Campylobacter coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5.151-5.154.
- Barros-Velázquez, J., Jiménez, A. & Villa, T.G. (1999). Isolation and typing methods for the epidemiologic investigation of thermotolerant campylobacters. *Int. Microbiol.* 2: 217-226.
- Benjamin, J., Leaper, S. Owen, R.J. & Skirrow, M.B. (1983). Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Curr. Microbiol.* 8: 231-238.
- Blaser, M.J., Hardesty, H.L., Powers, B. & Chang, W.L. (1980). Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* in biological milieus. *J. Clin. Microbiol.* 11: 309-313.
- Bolton, F.J. & Robertson, L. (1982). A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Clin. Pathol.* 35: 462-467.
- Bourke, B., Sherman, P.M., Woodward, D., Lior, H. & Chan, V.L. (1996). Pulsed-field gel electrophoresis indicates genotypic heterogeneity among *Campylobacter upsaliensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 143: 57-61.
- Broman, T., Waldenström, J., Dahlgren, D., Carlsson, I., Eliasson, I. & Olsen, B. (2004). Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans. *J. Appl. Microbiol.* 96: 834-843.
- Burnens, A.P. & Nicolet, J. (1993). Three supplementary diagnostic tests for *Campylobacter* species and related organisms. *J. Clin. Microbiol.* 31: 708-710.
- Buswell, C.M., Herlihy, Y.M., Lawrence, L.M., Mcguiggan, T.M., Marsh, P.D., Keevil, C.W. & Leach, S.A. (1998). Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 733-741.
- Butzler, J.P. & Skirrow, W.B. (1979). *Campylobacter enteritis*. *Clin. Gastroenterol.* 8: 737-765.
- Chang, N. & Taylor, D.E. (1990). Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter* species and to construct a SalI map of *Campylobacter jejuni* UA580. *J. Bacteriol.* 172: 5.211-5.217.
- Charlier, G., Dekeyser, P., Florent, A., Strobbe, R. & Deley, J. (1974). DNA base composition and biochemical characters of *Campylobacter* strains. *Antonie van Leeuwenhoek.* 40: 145-151.
- De Boer, P., Duim, B., Rigter, A., Van der Plas, J., Jacobs-Reitsma, W.F. & Wagenaar, J.A. (2000). Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1.940-1.946.
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P. & Sternon, J. (1972). Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.* 125: 390-392.
- Diergaardt, S.M., Venter, S.N., Spreeth, A., Theron, J. & Brozel, V.S. (2004). The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. *Water Res.* 38: 2.589-2.595.

- Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R.A., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., Bootsma, H.J., Willems, R.J.L., Urwin, R.J. & Maiden, M.C. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 14-23.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Ure, R., Wagenaar, J.A., Duim, B., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wareing, D.R.A. & Maiden, M.C.J. (2002). Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: A basis for epidemiologic investigation. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 949-955.
- Docherty, L., Adams, M.R., Patel P. & McFadden, J. (1996). The magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for the detection of *Campylobacter* in milk and poultry. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 288-292.
- Doig, P., Yao, R.J., Burr, D.H., Guerry, P. & Trust, T.J. (1996). An environmentally regulated pilus-like appendage involved in *Campylobacter* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 20: 885-894.
- Doyle, L.P. (1944). A vibrio associated with swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.* 5: 3-5.
- Duim, B., Wassenaar, T.M., Rigter, A. & Wagenaar, J.A. (1999). High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2.369-2.375.
- Duim, B., Wagenaar, J.A., Dijkstra, J.R., Goris, J., Endtz, H.P. & Vandamme, P.A. (2004). Identification of distinct *Campylobacter lari* genogroups by amplified fragment length polymorphism and protein electrophoretic profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 18-24.
- Dunn, B.E., Cohen, H. & Blaser, M. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 720-741.
- Endtz, H.P., Ang, C.W., van Den Braak, N., Duim, B., Rigter, A., Price, L.J., Woodward, D.L., Rodgers, F.G., Johnson, W.M., Wagenaar, J.A., Jacobs, B.C., Verbrugh, H.A. & van Belkum, A. (2000). Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes. *Clin. Microbiol.* 38: 2.297-2.301.
- Engvall, E.O., Brandstrom, B., Gunnarsson, A., Morner, T., Wahlstrom, H. & Fermér, C. (2002). Validation of a polymerase chain reaction/restriction enzyme analysis method for species identification of thermophilic campylobacters isolated from domestic and wild animals. *J. Appl. Microbiol.* 92: 47-54.
- Escherich, T. (1886). Beiträge zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Über das Vorkommen van Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgängen der Säuglinge. *Münch. Med. Wochenschr.* 33: 815-817, 833-835.
- Etoh, Y., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Yamamoto, A. & Goto, N. (1993). *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 631-639.
- Fayos, A., Owen, R.J., Hernández, J., Jones, J. & Lastovica, A. (1993). Molecular subtyping by genome and plasmid analysis of *Campylobacter jejuni* serogroups 01 and 02 (Penner) from sporadic and outbreak cases of human diarrhoea. *Epidemiology and Infection* 111: 415-427.
- Florent, A. (1959). Les deux vibrioses génitales: la vibriose due à *Vibrio fetus venerealis* et la vibriose d'origine intestinale due à *V. fetus intestinalis*. *Meded. Veeartsenijsch. Rijksuniv. Gent.* 3: 1-60.
- Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A.G., Lawson, P.A., Thorne, P., Byrer, D.E., Ross, H.M., Xerry, J., Thompson, P.M. & Collins, M.D. (2004). *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2.369-2.373.
- Fox, J.G., Chilvers, T., Goodwin, C.S., Taylor, N.S., Edmonds, P., Sly, L.I. & Brenner, D.J. (1989). *Campylobacter mustelae*, a new species resulting from the elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* to species status. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 301-303.
- Friedman, C.R., Neimann, J., Wegener, H.C. & Tauxe, R.V. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p. 121-138. In I. Nachamkin and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter* 2nd Edition. ASM. Press, Washington, D. C.
- Frost, J.A., Kramer, J.M. & Gillanders, S.A. (1999). Phage typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and its use as an adjunct to serotyping. *Epidemiol. Infect.* 123: 47-55.
- Fuchs, B.M., Syutsubo, K., Ludwing, W. & Amann, R. (2001). In situ accesibility of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 961-968.

- Galindo, M.A., Day, W.A., Rápale, B.H. & Joens, L.A. (2001). Cloning and characterization of *Campylobacter jejuni* iron uptake operon. *Curr. Microbiol.* 42: 139-143.
- Garrity, G.M., Bell, J. & Lilburn, T.G. (ed.). (2004). In *Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition*. Springer-Verlag, New York. <http://bergeysoutline.com>.
- Gebhart, C.J., Edmonds, P., Ward, G.E., Kurtz, H.J. & Brenner, D.J. (1985). *Campylobacter hyointestinalis* sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J. Clin. Microbiol.* 21: 715-720.
- Gibson, J.R., Fitzgerald, C. & Owen, R.J. (1995). Comparison of PFGE, ribotyping and phage-typing in the epidemiologic analysis of *Campylobacter jejuni* serotype HS2 infections. *Epidemiol. Infect.* 115: 215-225.
- Gibson, J.R., Slater, E., Xerry, J., Tompkins, D.S. & Owen, R.J. (1998). Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2.580-2.585.
- Gibson, J.R., Ferrús, M.A., Woodward, D., Xerry, J. & Owen, R.J. (1999). Genetic diversity in *Helicobacter pullorum* from human and poultry sources identified by an amplified fragment length polymorphism technique and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.* 87: 602-610.
- Giesendorf, B.A.J., Van Belkum, A., Koeken, A., Stegeman, H., Henkens, M.H.C., van der Plas, J., Goossens, H. Niesters, H.G.M. & Quint, W.G.V. (1993). Development of species-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. lari* by polymerase chain reaction fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1.541-1.546.
- González, A., Moreno, Y., González, R., Hernández, J. & Ferrús, M.A.. (2006a). Development of a simple and rapid method based on PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis to differentiate *Helicobacter*, *Campylobacter* and *Arcobacter* species. *Current Microbiology* 53: 416-421.
- González, A., Cervera, R., Ferrús, M.A. & Hernández, J. (2006b). Direct identification of *Campylobacter* species in poultry samples by Multiplex PCR. In: *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology*. Wiley-VCH, Weinheim. ISBN 3-527-31611-6, pp. 291-295.
- González, A., Ferrús, M.A., González, R. & Hernández, J. (2007). Molecular fingerprinting of *Campylobacter* and *Arcobacter* isolated from chicken and water. *International Microbiology* 10: 85-90.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., Mcconnell, W. & Harper, W.E.S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 397-405.
- Goossens, H. & Butzler, JP. (1992). Isolation and identification of *Campylobacter* spp. En: Nachamkin, I., Blaser, M.J. & Tompkins, L.S. (Eds.). *Campylobacter jejuni*. Current status and future trends. American Society for Microbiology, Wasington DC. pp. 93-109.
- Grajewski, B.A., Kusek, J.W. & Helfan, H.M. (1985). Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* 22: 13-18.
- Grant, C.C., Konkel, M.E., Cieplak, W.Jr. & Tompkins L.S. (1993). Role of flagella in adherence, internalisation and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect. Immun.* 61: 1764-1771.
- Hernández, J., Owen, R.J., Costas, M. & Lastovica, A. (1991a). DNA-DNA hybridization and analysis of restriction endonuclease and rRNA gene patterns of atypical (catalase-weak/negative) *Campylobacter jejuni* from paediatric blood and faecal cultures. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 71-80.
- Hernández, J., Owen, R.J., & Fayos, A.. (1991b). Biotypes and DNA ribopatterns of thermophilic *campylobacters* from faeces and seawater in Eastern Spain. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 207-211.
- Hernández, J. 1993. Incidence and control of *Campylobacter* in foods. *Microbiología (SEM)*. 9: 57-65.
- Hernández, J., Alonso, J.L., Fayos, A., Amorós, I. & Owen, R.J. (1995a). Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *Campylobacter jejuni* in estuarine surface waters. *FEMS Microbiol. Lett.* 127: 201-206.

- Hernández, J., Fayos, A., Ferrús, M.A. & Owen, R.J. (1995b). Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from human faeces, seawater and poultry products. *Res. Microbiol.* 146: 685-696.
- Hernández, J., Fayos, A., Alonso, J.L. & Owen, R.J. (1996). Ribotypes and AP-PCR fingerprints of thermophilic campylobacters from marine recreational waters. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 157-164.
- Hopkins, K.L., Desai, M., Frost, J.A., Stanley, J. & Logan, J.M. (2004). Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 42: 229-235.
- Hudson, J.A., Nicol, C., Wright, J., Whyte, R. & Hasell, S.K. (1999). Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, raw chicken, milk and water. *J. Appl. Microbiol.* 87: 115-124.
- Hugdahl, M.B., Beery, J.T., & Doyle, M.P. (1988). Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 56: 1560-1566.
- Humphrey, T.J. (1989). An appraisal of the efficacy of preenrichment for the isolation of *Campylobacter jejuni* from water and food. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 119-126.
- Hurtado, A. & Owen, R.J. (1997). A rapid identification scheme for *Helicobacter pylori* and other species of *Helicobacter* based on 23S rRNA gene polymorphisms. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 222-231.
- Hutchinson, D.N. & Bolton, F.J. (1984). Improved blood-free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J. Clin. Pathol.* 37: 956-957.
- Iriarte, P. & Owen, R.J. (1996). PCR-RFLP analysis of the large subunit (23S) ribosomal RNA genes of *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 163-166.
- Jones, F.S., Orcutt, M. & Little, R.B. (1931). Vibrios (*Vibrio jejuni* n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J. Experim. Med.* 553: 853-863.
- Jones, D.M., Sutcliffe, E.M., Rios, R., Fox, A.J. & Curry, A. (1993). *Campylobacter jejuni* adapts to aerobic metabolism in the environment. *J. Med. Microbiol.* 38: 145-150.
- Jones, K. (2001). *Campylobacters* in water, sewage and environment. *J. Appl. Microbiol.* 90: 68S-79S.
- Khakhria, R. & Lior, H. (1992). Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiol. Infect.* 108: 403-414.
- Kiehlbauch, J.A., Brenner, D.J., Nicholson, M.A., Baker, C.N., Patton, C.M., Steigerwalt, A.G. & Wachsmuth, I.K. (1991). *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J. Clin. Microbiol.* 29: 376-385.
- King, E.O. (1957). Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. *J. Infect. Dis.* 101: 119-128.
- Kist, M. (1985). The historical background to campylobacter infection: new aspects, p. 23-27. In: A.D. Pearson, M.B. Skirrow, H. Lior, and B. Rowe (ed.), *Campylobacter III*. Public Health Laboratory Service, London, UK.
- Kokotovic, B. & On, S. L.W. (1999). High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 77-84.
- Krieg, N.R. (1984). Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid Gram-negative bacteria, p. 71-72. In: N.R. Krieg and H.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th Edition, vol 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Kuroki, S., Saida, T. & Nukina, M. (1993). *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barré syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain N-acetylglucosamine residues. *Ann. Neurol.* 33: 243-247.
- Laanbroek, H.J., Kingma, W. & Veldkamp, H. (1977). Isolation of an aspartate-fermenting, free-living *Campylobacter* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 1: 99-102.
- Lamoureux, M., Fliss, I., Blais, B.W., Messier, S., Holley, R.A. & Simard, R.E. (1997). Microtrite plate hybridization system for detection of thermophilic *Campylobacter* ribosomal RNA. *J. Appl. Microbiol.* 82: 259-266.
- Lastovica, A.J., Goddard, E.A. & Argent, A.C. (1997). Guillain-Barré syndrome in South Africa associated with *Campylobacter jejuni* O:41 strains. *J. Infect. Dis.* 176: S139-S143.

- Lauwers, S., De Boeck, M. & Butzler, J.P. (1978). *Campylobacter enteritis* in Brussels. *Lancet*. 1: 604-605.
- Lawson, A.J., On, S.L., Logan, J.M. & Stanley, J. (2001). *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 651-660.
- Lee, L.H., Burg, E., Bagar, S., Bourgeois, A.L., Burr, D.H., Ewing, C.P., Trust, T.J. & Guerry, P. (1999). Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 67: 5.799-5.805.
- Levy, A.J. (1946). A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. *Yale J. Biol. Med.* 18: 243-247.
- Lior, H. (1984). New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lariidis*. *J. Clin. Microbiol.* 20: 636-640.
- Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Laroche, L.J. & Gill, P. (1982). Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin. Microbiol.* 15: 761-768.
- Logan, J.M.J., Burnens, A.P., Linton, D., Lawson, A.J. & Stanley, J. (2000). *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 865-872.
- Lorentz, E., Lastovica, A. & Owen, R.J. (1998). Subtyping of *Campylobacter jejuni* Penner serotypes 9, 38 and 63 from human infections, animals and water pulsed-field gel electrophoresis of flagellin gene analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 179-182.
- Lund, M., Nordentoft, S., Pedersen, K. & Madsen, M. (2004). Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5.125-5.132.
- Madden, R.H., Moran, L. & Scates, P. (1996). Sub-typing of animal and human *Campylobacter* spp. using RAPD. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 167-170.
- Madden, R.H., Moran, L. & Scates, P. (1999). Frequency of occurrence of *Campylobacter* spp. in red meats and poultry in northern Ireland and their subsequent subtyping using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and the random amplified polymorphic DNA method. *J. Appl. Microbiol.* 84: 703-708.
- Madden, R.H., Moran, L. & Scates, P. (2000). Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract. *J. Microbiol. Meth.* 42: 115-119.
- Marshall, B.J., Royce, H., Annear, D.I., Goodwin, C.S., Pearman, J.W., Warren, J.R. & Armstrong, J.A. (1984). Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbiol. Lett.* 25: 83-88.
- Mazurier, S., Van De Giessen, A., Heuvelman, K. & Wernars, K. (1992). RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett Appl Microbiol.* 14: 260-262.
- McClung, C.R., Patriquin, D.G. & Davis, R.E. (1983). *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 605-612.
- McFadyean, J. & Stockman, S. (1913). Report of the Departmental Committee Appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to enquire into Epizootic Abortion. Appendix to Part II. Abortion in sheep, p. 1-64. His Majesty's Stationery Office, London, UK.
- Medalla, F., Whichard, J.M., Smith, J., Stuart, A., Joyce, K., Hoekstra, R.M. & Barzilay, E.J. (2007). Ciprofloxacin and erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in the United States, NARMS, 1997-2004. *Zoonoses and Public Health*, 54, Supp. 1: 45.
- Meinersmann, R.J., Hesel, L.O., Fields, P.I. & Hiatt, K.L. (1997). Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by fla gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2.810-2.814.
- Meinersmann, R.J., Phillips, R.W., Hiatt, K.L. & Fedorka-Cray, P. (2005). Differentiation of *Campylobacter* populations as demonstrated by flagellin short variable region sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6.368-6.374.
- Molbak, K. (2007). The epidemiology of *Campylobacter*: lessons learnt from Denmark. *Zoonoses and Public Health*, 54, Supp. 1: 1-2.
- Moore, J.E., Lanser, J., Heuzenroeder, M., Ratcliff, R.M., Millar, B.C. & Madden, R.H. (2002). Molecular diversity of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* isolated from pigs at slaughter by flaA-RFLP analysis and ribotyping. *J. Vet. Med. B-Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49: 388-393.

- Moore, J.E. & Madden, R.H. (2003). Comparison of eight phenotypic methods for subspecies characterization of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from pig liver. *J. Food Prot.* 66: 1.079-1.084.
- Moreno, Y., Hernández, M., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Botella, S., Montes, R. & Hernández, J. (2001). Direct detection of thermotolerant campylobacters in chicken products by PCR and in situ hybridization. *Res. Microbiol.* 152: 577-582.
- Moreno, Y., Ferrús, M.A., Vanoostende, A., Hernández, M., Montes, R. & Hernández, J. (2002). Comparison of 23S polymerase chain reaction and amplified fragment length polymorphism techniques as typing systems for thermophilic campylobacters. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 97-103.
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J.L., Ferrús, M.A., Hernández, M. & Hernández, J. (2003a). Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1.181-1.186.
- Moreno, Y., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Jiménez, A. & Hernández, J. (2003b). Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Res.* 37: 2.251-2.256.
- Morris, J.A. & Park, R.W.A. (1973). A comparison using gel electrophoresis of cell proteins of campylobacters (vibrios) associated with infertility, abortion and swine dysentery. *J. Gen. Microbiol.* 78: 165-178.
- Neill, S.D., Campbell, J.N., O'Brien, J.J., Weatherup, S.T.C. & Ellis, W.A. (1985). Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 342-356.
- Newell, D.G., Frost, J.A., Duim, B., Wagenaar, J.A., Madden, R.H., van der Plas, J. & On, S.L.W. (2000). New developments in the subtyping of *Campylobacter* species, p. 27-44. In: I. Nachamkin and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, D. C.
- Nielsen, E.M., Engberg, J., Fusing, V., Petersen, L., Brogren, C.H. & On, S.L.W. (2000). Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3.800-3.810.
- Nilsson, H.O., Blom, J., Al-Soud, W.A., Ljungh, A., Andersen, L.P. & Wadström, T. (2002). Effect of cold starvation, acid stress, and nutrient on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 11-19.
- Nogva, H.K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A. & Lillehaug, D. (2000). Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and pasteurised whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4.166-4.271.
- O'Sullivan, N., Benjamin, J. & Skirrow, M.B. 1990. Lectin typing of *Campylobacter* isolates. *J. Clin. Pathol.* 43: 957-960.
- Olive, D.M. & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. Minireview. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1.661-1.669.
- On, S.L.W. & Holmes, B. (1995). Classification and identification of *Campylobacters*, *Helicobacters* and allied taxa by numerical analysis of phenotypic tests. *Syst. Appl. Microbiol.* 18: 374-390.
- On, S.L.W., Bloch, B., Holmes, B., Hoste, B. & Vandamme, P. (1995). *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 767-774.
- On, S. L. W. (1996). Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters* and Related Organisms. *Clin. Microbiol.* 9: 405-422.
- On, S.L.W., Atabay, H.I., Amisu, K.O., Coker, A.O. & Harrington, C.S. (2004). Genotyping and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 347-352.
- Owen, R.J. & Gibson, J.R. (1995). Update on epidemiological typing of *Campylobacter*. *PHLS Microbiol. Digest.* 12: 2-6.
- Owen, R.J. & Hernández, J. (1993). Ribotyping and arbitrary primer PCR fingerprinting of *Campylobacters*. In: *New techniques in food and beverage microbiology*, Edited by R.G. Kroll, A. Gilmour and M. Sussman, Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 31, Blackwell Sci. Publ., Oxford. pp 265-285.

- Patton, C.M., Wachsmuth, I.K., Evins, G.M., Kiehlbauch, J.A., Plikaytis, B.D., Troup, N., Tompkins, L. & Lior, H. (1991). Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated *Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.* 29: 680-688.
- Penn, C.W. (2001). Surface components of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *J. Appl. Microbiol.* 90: 25-35.
- Penner, J.L. 1988. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin. Microbiol.* 1: 157-172.
- Penner, J.L. & Hennessy, J.N. (1980). Passive haemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* 12: 732-737.
- Petersen, L. & On, S.L.W. (2000). Efficacy of flagellin typing for epidemiological studies of *Campylobacter jejuni* in poultry by comparison with macrorestriction profiling. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 14-19.
- Plastringe, W.N., Williams, L.F. & Petrie, D. (1947). Vibrionic abortion in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 8: 178-183.
- Preston, M.A. & Penner, J.L. (1987). Structural and antigenic properties of lipopolysaccharides from serotype reference strains of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 55: 1.806-1.812.
- Purdy, D. & Park, S.F. (1994). Cloning, nucleotide sequence and characterization of a gene encoding superoxide dismutase from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microbiology.* 140: 1.203-1.208.
- Purdy, D., Cawthraw, S., Dickinson, J.H., Newell D.G. & Park, S.F. (1999). Generation of a superoxide dismutase (SOD)-defeciente mutant of *Campylobacter coli*: evidence for their significance of SOD in *Campylobacter* survival and colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2.540-2.546.
- Ribeiro, C.D., Thomas, M.T., Krembey, D., Magee, J.T. & North, Z. (1996). Resistotyping of campylobacters: Fulfilling a need. *Epidemiol. Infect.* 116: 169-175.
- Riordan, T., Humphrey, T.J. & Fowles, A. (1993). A point source outbreak of *Campylobacter* infection related to bird-pecked milk. *Epidemiol. Infect.* 110: 261-265.
- Roop, R.M., Smibert, R.M., Johnson, J.L. & Krieg, N.R. (1985). *Campylobacter mucosalis* comb. nov.: emended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 189+192.
- Salama, S.M., Bolton, F. J. & Hutchinson, D.N. (1990). Application of a new phagotyping scheme to *Campylobacters* isolated during outbreaks. *Epidemiol. Infect.* 104: 405-411.
- Sandstedt, K. & Ursing, J. (1991). Description of the *Campylobacter upsaliensis* sp. nov. previously known as the CNW group. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 39-45.
- Schönhuber, W., Fucks, B., Juretschko, S. & Amann, R. (1997). Improved sensitivity of whole cell hybridisation by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3.268-3.273.
- Sebald, M. & Véron, M. (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Annals du Institute Pasteur*, 105: 897-910.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M. & Whittam, T.S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 873-884.
- Siemer, B.L., Harrington, C.S., Nielsen, E.M., Borck, B., Nielsen, N.L., Engberg, J. & On, S.L.W. (2004). Genetic relatedness among *Campylobacter jejuni* serotyped isolates of diverse origin as determined by numerical analysis of amplified fragment length polymorphism (AFLP) profiles. *J. Appl. Microbiol.* 96: 795-802.
- Sinha, S., Prasad, K.N., Pradhan, S., Jain, D. & Jha, S. (2004). Detection of preceding *Campylobacter jejuni* infection by polymerase chain reaction in patients with Guillain-Barre syndrome. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98: 342-346.
- Skirrow, M.B. (1977). *Campylobacter* enteritis: A "new" disease. *Br. Med. J.* 2: 9-11.
- Skirrow, M.B. & Benjamin, J. (1980). Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.* 33: 1122.
- Skirrow, M.B. & Blaser, M.J. (1992). Clinical and epidemiologic considerations, p. 3-8. In: I. Nachamkin, M.J. Blaser and L.S. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. ASM Press, Washington, D. C.

- Skirrow, M.B. & Blaser, M.J. (2000). Clinical aspects of *Campylobacter* infections, p. 69-88. In: I. Nachamkin and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, D. C.
- Simjee, S. and EASSA Study Group. (2007). European antimicrobial susceptibility surveillance in animals (EASSA) preliminary results (2002-2003): *Campylobacter jejuni* and *C.coli* from healthy cattle, pigs, and chickens from 8 EU countries. *Zoonoses and Public Health*, 54, Supp. 1:48-49.
- Smith, T. & Taylor, M.S. (1919). Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J. Exp. Med.* 30: 299-311.
- Solis de los Santos, F., Donoghue, A.M., Venkitanarayanan, K., Dirian, M.L., Metcalf, J., Reyes-Herrera, I., Aguiar, V.F., Blore, P.J., & Donoghue, D.J. (2007). Caprylic acid as a dietary supplement has therapeutic efficacy against enteric *Campylobacter jejuni* in chickens. *Zoonoses and Public Health*, 54, Supp. 1:13.
- Stanley, J., Burnens, A.P., Linton, D., On, S.L.W., Costas, M. & Owen, R.J. (1992). *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization and cloning of a species-specific DNA probe. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2.293-2.303.
- Steele, T.W. & Owen, R.J. (1988). *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov., a subspecies of nitrate-negative campylobacters isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 316-318.
- Takata, T., Fujimoto, S., & Amako, K. (1992). Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infect. Immun.* 60: 3.596-3.600.
- Tanner, A.C.R., Badger, S., Lai, C.H., Listgarten, M.A., Visconti, R.A. & Socransky, S.S. (1981). *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* comb. nov., and description of *Bacteroides gracillis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31: 432-445.
- Tanner, A.C.R., Listgarten, M.A. & Ebersole, J.L. (1984). *Wolinella curva* sp. nov. *Vibrio succinogenes* of human origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 275-282.
- Tenkate, T.D. & Stafford, R.J. (2001). Risk factors for *Campylobacter* infection in infants and young children: a matched case-control study. *Epidemiol Infect.* 127: 399-404.
- Tenover, F.C. & Fennell, C.L. (1991). The genus *Campylobacter* and *Helicobacter*, p. 3.488-3.511. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes* 2nd Edition. Springer-Verlag, New York.
- Thies, F.L., Karch, H., Hartung, H.P. & Giegerich, G. (1999). Cloning and expression of the *dnaK* gene of *Campylobacter jejuni* and antigenicity of heat shock protein 70. *Infect. Immun.* 67: 1.194-1.200.
- Thomas, C., Gibson, H. & Hill, D.J. (1999a). *Campylobacter* epidemiology: an aquatic perspective. *J. Appl. Microbiol.*, Symposium Supplement, 85: 168S-177S.
- Thomas, C., Hill, D.J. & Mabey, M. (1999b). Evaluation of the effect of temperature and nutrients on survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. *J. Appl. Microbiol.* 86: 1.024-1.032.
- Totten, P.A., Fenell, C.L., Tenover, F.C., Wezenberg, J.M., Perine, P.L., Stamm, W.E. & Holmes, K.K. (1985). *Campylobacter cinaedi* sp. nov., and *Campylobacter fennelliae* sp. nov.: two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J. Infect. Dis.* 151: 131-139.
- Tran, T.T. (1998). A blood-free enrichment medium for growing *Campylobacter* spp. under aerobic conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 145-148.
- Trust, T.J., Logan, S.M., Gustafson, C.E., Romaniuk, P.J., Kim, N.W., Chan, V.L., Ragan, M.A., Guerry, P. & Gutell, R.R. (1994). Phylogenetic and molecular characterization of a 23S rRNA gene positions the genus *Campylobacter* in the epsilon subdivision of the Proteobacteria and shows that the presence of transcribed spacers is common in *Campylobacter* spp. *J. Bacteriol.* 176: 4.597-4.609.
- Van Vliet, A.H. & Ketley, J.M. (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *J. Appl. Microbiol.* 30: 45S-56S.

- Vandamme, P. & De Ley, J. (1991). Proposal for a new family, Campylobacteraceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 451-455.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. & De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 88-103.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijk, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J.P., Lior, H. & Lauwers, S. (1992). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2.335-2.337.
- Vandamme, P., Daneshvar, M.I., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Kersters, K., Goossens, H. & Moss, C.W. 1.995. Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 145-152.
- Vandamme, P. (2000). Taxonomy of the family Campylobacteraceae, p. 3-26. In: I. Nachamkin and M.J. Blaser (ed.), *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, DC.
- Véron, M. & Chatelain, R. (1973). Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 122-134.
- Vinzent, R., Dumas, J. & Picard, N. (1947). Septicémie grave au cours de la grossesse due à un vibrión: avortement consécutif. *Bulletin Académic National of Medicine.* 131: 90-92.
- Waage, A.S., Vardund, T., Lund, V. & Kapperud, G. (1999). Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1.636-1.643.
- Wang, H., Boyle, E. & Farber, J. (2000). Rapid and specific enzyme immunoassay on hydrophobic grid membrane filter for detection and enumeration of thermophilic *Campylobacter* spp. from milk and chicken rinses. *J. Food Prot.* 63: 489-494.
- Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L. & Rodgers, F.G. (2002). Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4.744-4.747.
- Wareing, D.R.A., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wright, P.A. & Greenway, D.L.A. (2002). Phenotypic diversity of *Campylobacter* isolates from sporadic cases of human enteritis in the UK. *J. Appl. Microbiol.* 92: 502-509.
- Wassenaar, T.M. (1997). Toxin production by *Campylobacter*. *Clin. Microbiol.* 10: 466-476.
- Wassenaar, T.M., Geilhausen, B. & Newell, D.G. (1998). Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1.816-1.821.
- Wassenaar, T.M. & Newell, D.G. (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1-9.

DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO

Ilmo. Sr D. Enrique Hernández Giménez

EXCMO. SR. PRESIDENTE DE LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA,
EXCMAS. AUTORIDADES,
EXCMOS. E ILMOS. SRS. ACADÉMICOS,
SEÑORAS Y SEÑORES:

CUANDO EN EL SIGLO XVII Anthony van Leeuwenhoek, descubridor del microscopio, vió a través de aquel montaje rústico de lentes, lo que él llamó “animáculos”, estaba muy lejos de ni siquiera atisbar la importancia que el mundo microscópico, tiene para la vida sobre la Tierra.

No hay ninguna duda de que Leeuwenhoek fue el primero que vio y describió las bacterias. Los dibujos publicados en 1675, que todavía se conservan, son de tal claridad que es fácil reconocer bacilos, estreptococos, estafilococos, y otras formas típicas a nuestros ojos.

Hoy consideramos que hecho tan trascendental tuvo poco impacto en la ciencia y en la sociedad, quizá debido a la dificultad de difusión de noticias en la época. Hasta el momento que son descubiertas aquellas pequeñas “criaturas vivas” la Microbiología fue una mera suposición con la cual se especularon teorías, algunas de ellas absurdas, para explicar fenómenos naturales.

Diversos pensadores y filósofos avanzaron la hipótesis de que las enfermedades contagiosas podían deberse al desarrollo de diminutos organismos vivos. Sospecha que no pudo ser confirmada porque su visión no era posible.

Cicerón ya discutió la posibilidad de que algunas fiebres estuvieran provocadas por la multiplicación de pequeños animales. También existía la creencia de que determinadas enfermedades, especialmente las epidemias, eran causadas por los “miasmas” transportados por el aire. En el Renacimiento, Fracastorius, escribió acerca del *Contagium vivum*, a través del cual, algunos alimentos podían ser origen de ciertas enfermedades intestinales.

Después del descubrimiento del microscopio, y durante un periodo de casi doscientos años, la observación de microorganismos no pasó de ser un mero entretenimiento, en que lo observado son curiosidades científicas con morfología variada, encontradas en lugares diversos, pero sin significado biológico alguno. En este periodo no hay una relación directa entre los microorganismos observados y sus actividades biológicas. Parte de este tiempo ocupa la controversia de la generación espontánea, que algunos filósofos y científicos consideraron como verdadera, y que llegó a finales del siglo XVII a aberraciones tales como establecer fórmulas matemáticas para producir por generación espontánea ratones partiendo de granos de cereales.

Fue Reding en 1697, quien mostró de forma inequívoca que las larvas no se producían de forma espontánea a partir de la carne podrida, tal como afirmaba la creencia general en aquel tiempo, sino que aparecían únicamente si las moscas adultas habían depositado previamente sus huevos. E igualmente se demuestra que caldos sometidos a ebullición sellados, y preservados del contacto con el aire, permanecían en buen estado.

La era que se considera como el inicio de la Microbiología como ciencia empieza con Louis Pasteur y su estudio de las fermentaciones, es la era del cultivo de los microorganismos.

Se parte de la hipótesis, de que cada tipo de fermentación se debe al crecimiento y metabolismo de un microorganismo específico en estado puro, no contaminado. En esta misma creencia esta al mismo tiempo Robert Koch dedicado al estudio de las bacterias patógenas.

Pasteur y Koch, entre ambos pusieron las bases del cultivo de microorganismos puros, que hicieron avanzar rápidamente a la microbiología como ciencia.

Gracias al impulso de estos dos grandes científicos, entre 1880 y 1900 se aíslan casi todos los microorganismos causantes de graves enfermedades. Las levaduras de fermentaciones, los implicados en la fijación del nitrógeno, la fertilidad del suelo, y muchos productores de enfermedades de animales y plantas. Se demuestra que la producción de pan, vino, cerveza, vinagre, queso, yogur, etc. está presidida por organismos.

Paralelamente se desarrollan las bases de la inmunidad, y el desarrollo de las vacunas, hasta culminar con el estudio llevado a cabo por el genial Pasteur, que guiado por su olfato

investigador llega a producir una vacuna contra la rabia, sin haber aislado el virus, ni tener idea de la naturaleza del organismo causante.

También en este tiempo tiene lugar la divulgación de la Microbiología, se puede decir que la Microbiología sale a la calle. Los descubrimientos de Pasteur son trasladados rápidamente al público y se crean apasionadas controversias públicas sobre los mismos. Koch llega a ofrecer el conocimiento de sus trabajos sobre la tuberculosis y el cólera, a cuantos quisieran visitar los domingos su laboratorio.

Coincidiendo con el mejor conocimiento de la actividad fisiológica de los microorganismos, nace la Bacteriología Higiénica, que sienta las bases de la moderna quimioterapia, que se inicia con el “salvarsán” para el tratamiento de la sífilis; y que tiene un hito excepcional con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928. Con ello se inicia la llamada era de los antibióticos como potentes armas terapéuticas para curar enfermedades.

Los descubrimientos de los ácidos nucleicos por Severo Ochoa y Arthur Kornberg nos introducen en el conocimiento de las bases genéticas de los microorganismos, que ayudados de técnicas de Biología Molecular como la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (1988), nos proporcionan métodos para conocer y diferenciar genéticamente microorganismos aparentemente iguales, seleccionando y manipulando genes con actividades diferentes. Hoy la ingeniería genética ha conseguido importantes logros como por ejemplo: la producción de insulina por un *E. coli* con genes modificados.

Dentro del árbol de la Microbiología, a lo largo del tiempo han ido apareciendo ramas especializadas. Una de ellas es la Microbiología de Alimentos, que dio lugar a disposiciones tan importantes como la de 1921, que obligaba a los conserveros a esterilizar alimentos con baremos basados en la resistencia térmica del *Clostridium botulinum*; o la disposición de 1933 llamada, la ley de las Centrales Lecheras, que obliga a pasteurizar la leche en las condiciones necesarias que inactivan el bacilo tuberculoso.

Los grandes avances del siglo XX habían hecho creer que todas las enfermedades bacterianas y sus microorganismos ya eran conocidos. Sin embargo, en los últimos veinticinco años se descubren microorganismos, que hoy llamamos emergentes, causantes de importantes enfermedades. Ejemplo de ello son: *Legionella*, *Listeria*, *Helicobacter* y *Campylobacter*.

En 1976 se descubre la enfermedad respiratoria conocida como enfermedad de los legionarios, que está producida por una bacteria que hoy denominamos *Legionella pneumophila*.

En 1982 se descubre, por Robin Warren y Barry Marshall, recientemente les dieron el Premio Nobel, que diversas patologías digestivas como úlcera péptica y el cáncer gástrico están producidas por una bacteria conocida como *Helicobacter pylori*.

Casi al mismo tiempo, y con el descubrimiento de que hay bacterias que viven en el interior del cuerpo humano con tensiones muy bajas de oxígeno, se pone de manifiesto la gran importancia del *Listeria* y *Campylobacter*, como productores de infecciones transmitidas por alimentos.

En 1992, mueren en Francia más de setenta personas por comer alimentos contaminados con *Listeria monocitogenes*. A su vez con el estudio de las peculiares condiciones de cultivo del *Campylobacter*, se llega a la conclusión de que muchas enfermedades intestinales son originadas por este microorganismo.

El estudio de *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Arcobacter*, la clasificación de sus especies, y la presencia en alimentos es el tema preferente de los trabajos de investigación del nuevo académico. Al darle la bienvenida en nombre de la Real Academia, los lazos familiares no nublan mi mente para expresar con ecuanimidad y realismo los méritos que en él concurren.

Natural de Requena, alumno del Colegio de San José de los Padres Jesuitas, estudia la licenciatura de Farmacia en Granada, de donde regresa en 1974 para incorporarse a la recién creada Facultad de Farmacia de Valencia.

La actividad investigadora del Dr. Hernández comienza con la realización de su tesis doctoral. En ella, desarrolla una metodología basada en técnicas serológicas para la detección de una enfermedad que atacaba especialmente los árboles frutales de la Comunidad Valenciana, la denominada “marchitez bacteriana de los cítricos”, causada por una especie del género *Pseudomonas*.

Una vez finalizada su tesis doctoral, el Dr. Hernández da un giro radical a su actividad científica y se introduce en el campo de la seguridad alimentaria y las bacterias patógenas transmisibles por alimentos, tales como: *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* o *Listeria*

monocytogenes.

El primer contacto con *Campylobacter* lo tuvo en 1982, en el transcurso de una reunión científica sobre Microbiología de Alimentos, cuando durante una conversación con el Profesor Mossel, insigne científico holandés, este le transmite sus inquietudes y preocupaciones sobre esta bacteria, de la cual apenas se tenían conocimientos en esos momentos.

A la vuelta a su laboratorio, el Dr. Hernández empieza a trabajar con este patógeno y desarrolla diversas tecnologías que permiten su detección directamente en alimentos. Es destacable una investigación que hizo sobre su incidencia en carne de pollo, recogida directamente en diversas tiendas y supermercados de la ciudad de Valencia, donde en algunos casos, lo consiguió aislar en el 100% de las muestras analizadas.

En 1988, el Dr. Hernández junto con M^a Luisa, su esposa, y sus tres hijos, becado por la División de Asuntos Científicos de la OTAN, se traslada a la Unidad de *Campylobacter* del Servicio Central de Salud Pública de Londres, para trabajar bajo la dirección del Dr. Robert J. Owen, experto en *Campylobacter* y científico de reconocido prestigio internacional.

Durante el año que permaneció en estos laboratorios, el Dr. Hernández aprendió las técnicas más novedosas, en aquel momento incipientes, de detección de bacterias patógenas mediante técnicas moleculares, fundamentalmente la hibridación DNA-DNA, el análisis de polimorfismos mediante digestión del DNA con endonucleasas de restricción (ribotipado), la detección de plásmidos; y otros métodos de tipificado, tanto fenotípicos como genotípicos o moleculares.

Algunos de los resultados más interesantes logrados en sus trabajos fue la demostración de la enorme variabilidad genética que existe entre cepas de *Campylobacter upsaliensis*, procedentes de sangre y heces de pacientes de diferentes países, las cuales a su vez también contenían plásmidos variados.

Mediante hibridación DNA-DNA, demostró la existencia de cepas atípicas de *Campylobacter* que eran catalasa negativa, aisladas en la sangre y cultivos fecales de niños.

Fue también en Inglaterra donde, por primera vez, utilizó un equipo de PCR recientemente adquirido por la Institución, y publicó la metodología de la AP-PCER (con iniciadores aleatorios) para el tipificado epidemiológico de *Campylobacter*. Posiblemente fue el primer científico español en publicar un trabajo con PCR.

De vuelta a su laboratorio de la Universidad Politécnica, el Dr. Hernández y su grupo de investigación empezaron a emplear en *Campylobacter* esta tecnología recién adquirida, en aquellos momentos totalmente innovadora y puntera. Pero también aplicó estas técnicas a otras bacterias de interés para otros grupos de investigación de nuestra comunidad, enseñando a diversos profesores de medicina, ciencias biológicas, e Instituto de Agroquímica.

En los siguientes años se han ido desarrollando nuevos métodos de tipificado, que el Dr. Hernández ha ido aplicando al estudio epidemiológico de la campylobacterias, incluidos los géneros *Arcobacter* y *Helicobacter*. Entre estos nuevos métodos se encuentran el AFLP, y distintas variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con estos métodos ha desarrollado una tecnología rápida y sencilla para la identificación y diferenciación de especies de los géneros antes citados, basada en la amplificación de fragmentos de los genes 16S o 23S rRNA, su posterior corte con diversas endonucleasas de restricción y análisis final de los polimorfismos generados.

También han detectado la presencia de *Helicobacter pylori* en vegetales (lechugas y tomates) artificialmente contaminados.

Otro hallazgo destacable es la puesta a punto de una técnica de epifluorescencia utilizando dos fluorocromos diferentes, que permite la distinción entre células de *Campylobacter* y *Helicobacter pylori* viables o no viables, es decir potencialmente patógenas o no. Finalmente y mediante la implantación de la técnica de Hibridación "in situ" con colorantes fluorescentes FISH ha detectado mutaciones en el gen 23S del rRNA de *Helicobacter pylori*, que le confiere resistencia a la claritromicina.

En estos momentos, cuando se sospecha, pero no está perfectamente esclarecida la transmisión de *Helicobacter pylori* al hombre a través del agua y los alimentos. El grupo de investigación del Dr. Hernández ha sido capaz de detectar su presencia en aguas superficiales y residuales, lo que confirma que el agua puede ser vehículo transmisor de estas bacterias patógenas al hombre.

Hasta el momento su investigación ha quedado recogida en la publicación de:

90 artículos, la mayoría en revistas extranjeras; un centenar de ponencias y comunicaciones

a congresos; 13 libros. Como investigador principal ha dirigido 14 proyectos subvencionados. Su libro, Sistemática Bacteriana, hoy agotado, tuvo un éxito extraordinario entre los microbiólogos taxónomos.

Como consecuencia de su labor investigadora tiene reconocidos por la Agencia Nacional de Evaluación, cuatro sexenios, lo que demuestra la calidad de sus aportaciones científicas.

En el medio universitario ha pasado por todos los escalones docentes: becario, ayudante de prácticas, profesor del CEU San Pablo, profesor interino contratado, profesor titular por oposición, y en 1997, por oposiciones, Catedrático de Microbiología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Ha impartido numerosos cursos de doctorado y cursos dirigidos a profesionales de la Industria de Alimentos. Ha dirigido 6 tesis doctorales, 24 trabajos de fin de carrera, y un gran número de tesis de licenciatura.

El Dr. Hernández, que es Diplomado en Sanidad, es representante español en la “International Comisión on Microbiological Specifications for Foods”, que vela sobre todo por los métodos de análisis de Alimentos. Fue directivo de la Sociedad Española de Microbiología durante dos legislaturas, miembro de numerosas sociedades científicas internacionales. Ha impartido cursos de especialización en microbiología de alimentos en numerosas universidades extranjeras.

La entrada de un nuevo Académico siempre es motivo de alegría para la Academia. El valor científico y humano del que cada Académico es portador, resulta enriquecedor para la misma. En este caso, la llegada del Prof. Javier Hernández Haba, estoy seguro de que es así, y que no defraudará lo que de él se espera. Bienvenido a la Academia.

He dicho.