



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

TRABAJO DE TITULACIÓN

Caracterización de genes de virulencia asociados con adherencia, invasión en cepas de *Campylobacter spp*, aislados de reservorios animales.

Autora: Herrera Rojas, Cinthya Nathalia

Directora: Toledo Barrigas, Zorayda Patricia

LOJA – ECUADOR

2021



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2021

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 28 de febrero de 2021

Zorayda Patricia Toledo Barrigas.

Coordinador de la titulación de Bioquímica y Farmacia.

Ciudad.-

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado: **Caracterización de genes de virulencia asociados con adherencia, invasión en cepas de *Campylobacter spp*, aislados de reservorios animales**, realizado por Cinthya Nathalia Herrera Rojas, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo. Así mismo, doy fe que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado por la herramienta antiplagio institucional.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Firma.....

Zorayda Patricia Toledo Barrigas

C.I: 1104214752

Declaración de autoría y cesión de derechos

“Yo, Cinthya Nathalia Herrera Rojas, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

- Ser autor(a) del Trabajo de Titulación denominado: Caracterización de genes de virulencia asociados con adherencia, invasión en cepas de *Campylobacter spp*, aislados de reservorios animales, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Marco teórico de *Campylobacter spp*, enfermedades relacionadas con Campylobacteriosis, mecanismos de patogenia y factores de virulencia, Capítulo 2. Metodología del trabajo de investigación, Capítulo 3. Resultados, discusión y recomendaciones, siendo Zorayda Patricia Toledo Barrigas, director (a) del presente trabajo; y, en tal virtud, eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.
- Que mi obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.
- Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada al Sistema Nacional de Información

de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Autor: Cinthya Nathalia Herrera Rojas

C.I.: 0605472257

Dedicatoria

El presente trabajo de titulación está dedicado a mis padres por todo el apoyo brindado para poder cumplir con las metas que me he propuesto.

Agradecimiento

Me gustaría agradecer a mis padres por siempre estar conmigo, por apoyarme durante todo el proceso para obtener mi título, a mi familia, por motivarme cada día a esforzarme más, a mis amigos por el apoyo, por los buenos momentos, por la motivación. Gracias.

A mi amiga Jennifer, por el apoyo incondicional durante toda la carrera y por la maravillosa amistad brindada.

A mi directora del trabajo de titulación, Mgtr. Zorayda Toledo B., por el apoyo brindado, y por ser un pilar fundamental para poder terminar todo este proceso.

A los docentes de la titulación que día a día compartieron sus conocimientos, para poder llegar a este punto.

Mis más sinceros agradecimientos.

Índice De Contenidos

Carátula	I
Aprobación del director del Trabajo de Titulación.....	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria.....	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de Ilustraciones	IX
Índice de tablas.....	X
Resumen	11
Abstract.....	12
Introducción	13
Capítulo uno	15
Marco Teórico.....	15
1.1 Campylobacteriosis.....	15
1.2 <i>Campylobacter spp.</i>	16
1.2.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	17
1.2.2 <i>Campylobacter coli</i>	17
1.3 Principales fuentes de transmisión e infección.....	18
1.3.1 Aves de corral.....	18
1.3.2 Animales domésticos.....	19
1.3.3 Cerdos y vacas.....	20
1.3.4 Alimentos y agua contaminada	20
1.4 Enfermedades asociadas a <i>Campylobacter</i>	21
1.4.1 Gastroenteritis	21
1.4.2 Bacteriemia.....	21
1.4.3 Meningitis	22
1.4.4 Síndrome de Reiter.....	22
1.4.5 Síndrome de Guillain – Barre.....	22
1.5 Patogenia	23
1.5.1 Flagelos.....	25

1.5.2	<i>Adhesión e Invasión</i>	26
1.5.3	<i>Citotoxinas de distención</i>	28
1.6	Patogenia en animales	30
1.7	Diagnóstico de <i>Campylobacter spp.</i>	32
1.7.1	<i>Aislamiento e Identificación Bioquímica</i>	32
1.7.2	<i>Identificación molecular</i>	34
1.8	Epidemiología.....	34
1.8.1	<i>Epidemiología en Ecuador</i>	35
1.8.2	<i>Epidemiología mundial</i>	36
	Capítulo dos.....	37
	Metodología.....	37
2.1	Cepas bacterianas.....	37
2.2	Amplificación de genes de adherencia e invasión mediante PCR.....	37
2.3	Análisis estadístico	39
	Capítulo tres	41
	Resultados y discusión	41
	Conclusiones	53
	Recomendaciones	54
	Referencias	55
	Apéndices.....	65
	Apéndice 1: Protocolo de amplificación de <i>Campylobacter</i> mediante Gotaq® Flexi DNA Polymerase.....	65
	Apéndice 2: Protocolo de amplificación de <i>Campylobacter</i> por Platinum Multiplex PCR Master Mix	68
	Apéndice 3: Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa.....	70

Índice de Ilustraciones

Figura 1. Mecanismo de patogenia de <i>Campylobacter</i>	24
Figura 2. Mecanismo de <i>Campylobacter jejuni</i> en el daño epitelial en el intestino.....	29
Figura 3 Características moleculares y celulares de la respuesta inmune innata a <i>Campylobacter jejuni</i> en humanos y pollos.....	31
Figura 4 Resultados generales de la prevalencia obtenida en los genes asociados con adherencia e invasión en las muestras analizadas.	41
Figura 5 Porcentaje de cepas positivas a los genes de virulencia analizados en cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aisladas de materia fecal de perros.	44
Figura 6 Porcentaje de cepas positivas a los genes de virulencia analizados en cepas de <i>C. jejuni</i> aisladas de materia fecal de aves de corral.	46
Figura 7 Porcentaje de cepas positivas a los genes de virulencia analizados en cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aisladas de vísceras (hígados).	48
Figura 8 Imagen representativa del gel de agarosa donde se muestran los genes de virulencia investigados para <i>Campylobacter spp</i>	42

Índice de tablas

Tabla 1. Especies y subespecies de <i>Campylobacter</i> y su principal reservorio animal.....	18
Tabla 2 Características primarias para identificación de <i>Campylobacter</i>	33
Tabla 3 Resultados de pruebas bioquímicas para especies de <i>Campylobacter</i> termotolerantes	33
Tabla 4 Cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aisladas de materia fecal y vísceras de reservorios animales	37
Tabla 5 Secuencias de cebadores para la determinación de genes asociados a adherencia, colonización e invasión celular en <i>Campylobacter</i>	38
Tabla 6 Condiciones de ciclación en la amplificación de los genes <i>cadF</i> y <i>racR</i> , utilizando GoTaq® Flexi DNA Polymerase.....	39
Tabla 7 Condiciones de ciclación en la amplificación de los genes <i>virB11</i> , <i>pldA</i> , <i>dnjaJ</i> , <i>ciaB</i> , utilizando Platinum Multiplex PCR Master Mix.	39
Tabla 8 Comparación de las correlaciones de Pearson para genes de virulencia detectados en especies de <i>Campylobacter</i> a partir de materia fecal de aves, perros y vísceras.....	50

Resumen

Campylobacter es una bacteria zoonótica de transmisión alimentaria causante de gastroenteritis, con predominio de las especies *C. jejuni* y *C. coli*, las cuales utilizan como principales reservorios: todas las aves de corral, perros, gatos, ganado bovino, ovino, suino y roedores, la presencia de *Campylobacter* puede ser como comensal o como patógeno, causando cuadros clínicos debido a la expresión de factores de virulencia, los cuales se presentan como: la capacidad de la bacteria para adherirse y colonizar, donde se han identificado los genes *cadF*, *racR* y *dnaJ*, y los genes *virB11*, *ciaB* y *pldA*, relacionados con la invasión celular; se determinó su presencia mediante PCR, analizando 29 cepas de *Campylobacter spp*, de diferentes reservorios animales (n= 9 gallinas, n= 7 perros, n=13 hígados), obteniendo los siguientes resultados de expresión para, *cadF* (100%), *dnjaJ* (93,10%), *pldA* (82,75%), *racR* (79,31%), *virB11* (62,06%), *ciaB* (55,17%), logrando determinar una alta prevalencia en los genes que intervienen en los mecanismos de virulencia, información importante para la realización posterior de otros estudios que permitan obtener más datos sobre esta enfermedad en el Ecuador.

Palabras clave: *Campylobacter*, PCR, factores de virulencia.

Abstract

Campylobacter is a foodborne zoonotic bacterium that causes gastroenteritis, with predominance of *C. jejuni* and *C. coli* species. coli, which use as main reservoirs: all poultry, dogs, cats, cattle, sheep, swine and rodents, the presence of *Campylobacter* can be as commensal or pathogen, causing clinical manifestations due to the expression of virulence factors, which are presented as: the ability of the bacterium to adhere and colonize, where the genes *cadF*, *racR* and *dnaJ*, and the genes *virB11*, *ciaB* and *pldA*, related to cell invasion, have been identified; their presence was determined by PCR, analyzing 29 *Campylobacter* spp. isolates from different animal reservoirs (n= 9 hens, n= 7 dogs, n=13 livers), obtaining the following expression results for, *cadF* (100%), *dnjaJ* (93.10%), *pldA* (82.75%), *racR* (79.31%), *virB11* (62.06%), *ciaB* (55.17%), determining a high prevalence for genes involved in virulence mechanisms, important information for further studies to obtain more data on this disease in Ecuador.

Key words: *Campylobacter*, PCR, virulence factors.

Introducción

Las enfermedades de transmisión alimentaria o ETA, son un conjunto de enfermedades que se producen por el consumo de alimentos, incluida el agua, los cuales pueden estar contaminados por diversos agentes como: bacterias, químicos o parásitos. La contaminación se puede producir a lo largo de la cadena alimentaria, directamente desde su lugar de origen o en la manipulación de productos ya elaborados. Es importante establecer medidas adecuadas de control y prevención de estas enfermedades, minimizando el daño producido a la comunidad (Espinosa et al., 2014).

Las enfermedades bacterianas de origen animal, más comúnmente están relacionadas con agentes etiológicos como *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, *Listeria spp*, o la familia *Enterobacteriaceae*, las cuales presentan un riesgo para la salud tanto en países avanzados, como los que se encuentran en vías de desarrollo (Chlebicz & Śliżewska, 2018).

La campilobacteriosis es una infección causada por el género *Campylobacter*, las especies que más se presentan en los seres humanos con enfermedades gastrointestinales son *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, son bacilos Gram negativos, pequeños, con forma de espiral, por la presencia de flagelos son altamente móviles. Esta enfermedad es una de las principales causas de enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria en el mundo (Solís, 2011).

Campylobacter, es una bacteria con un crecimiento lento, puede tardar hasta 96 horas, se observa diferencias en la velocidad de crecimiento dependiendo de la especie. Son microorganismos sensibles al oxígeno y radicales libres, por lo que se consideran bacterias microaerofílicas (Silva et al., 2011).

La infección en humanos se asocia al consumo de productos contaminados, mismos que pueden proceder de diversas fuentes: leche cruda, productos del cerdo, contaminación

cruzada con agua, vegetales, frutas, y el consumo de productos avícolas, el cual es categorizado como el principal factor de riesgo para la infección (Mata, 2014).

Algunos de los mecanismos de virulencia que se han relacionado con el desarrollo de la patogenicidad son: la capacidad de la bacteria para adherirse y colonizar, donde se han identificado los genes *cadF*, *racR* y *dnaJ*, y los genes *VirB11*, *ciaB* y *pldA*, relacionados con la invasión celular (Quetz et al., 2012).

Mediante PCR o reacción en cadena de la polimerasa, se pudo determinar la presencia de dichos genes o factores de virulencia que intervienen en mecanismos tanto de adherencia como de invasión de *Campylobacter spp.*, en los diferentes hospedadores, ya sea como comensal o patógeno, se realizó la estandarización de las diferentes temperaturas de anillamiento, específicas de cada gen, para lograr identificar su prevalencia.

Determinar la presencia de estos factores de virulencia, sugiere la necesidad de implementar un mejor diagnóstico y vigilancia de los distintos segmentos de la cadena avícola, de la calidad de los productos y subproductos, además durante el proceso evitar cualquier tipo de contaminación cruzada, también se ve la necesidad de mejorar los cuidados para animales de compañía, para de esta manera prevenir la contaminación dentro del hogar.

Capítulo uno

Marco Teórico

1.1 Campylobacteriosis

La campylobacteriosis es una enfermedad zoonótica, causante de gastroenteritis en los humanos, se reporta la mayor tasa de incidencia entre las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). El agente causal es una bacteria del género *Campylobacter*, más del 90% de las infecciones son ocasionadas por *Campylobacter jejuni* y entre 5 a 10% a *Campylobacter coli* (Lucas L. et al., 2013).

La campylobacteriosis humana generalmente se desarrolla en un período de 1 a 5 días, después de haber tenido contacto con la bacteria, se caracteriza por diarrea acuosa, a veces con sangre, fiebre, calambres abdominales y vómitos, síntomas que suelen durar entre 5 a 7 días. Es una enfermedad autolimitada y a menudo no se requiere medicación antimicrobiana, exceptuando en casos graves o pacientes con un sistema inmunológico comprometido, la infección se origina en el yeyuno e íleon, al realizar el análisis de heces en pacientes con *Campylobacter*, se detecta la presencia de sangre y leucocitos, demostrando su capacidad invasiva (Hernández et al., 2013; Skarp et al., 2016).

La importancia de la campylobacteriosis se debe a: su alta incidencia, requiere una dosis baja para infectar y la duración, además puede producir en ocasiones enfermedades asociadas las cuales pueden ser neuropatías periféricas como síndrome de Guillain-Barré, síndrome Miller Fisher y enfermedades funcionales del intestino como síndrome de intestino irritable (Poma, 2014).

Campylobacter, se encuentra como reservorio en el intestino de animales domésticos, principalmente las aves de corral, sin embargo, los rumiantes, incluidos los bovinos, porcinos, ovinos y caprinos, también actúan como reservorio de *Campylobacter*, debido a esto se puede

encontrar esta bacteria en alimentos destinados para el consumo humano, se transmite por vía oral, a través de alimentos, agua, y también por contacto con animales infectados (Chlebicz & Śliżewska, 2018; Mardones & López, 2017).

1.2 *Campylobacter* spp.

Campylobacter es una bacteria gram negativa, incluido en el orden *Campylobacterales*, familia *Campylobacteraceae*, género *Campylobacter*. Son bacterias de pequeño tamaño aproximadamente 0,2-0,8 μm de grosor y 0,5-5 μm de longitud. Por lo general son oxidasas positivas, a excepción de *C. gracilis* (Silva et al., 2011).

Campylobacter tiene forma de "S" o alas de gaviota, muestran movimiento rápido y característico en forma de "sacacorchos" debido a la presencia de un flagelo polar, ya sea en uno o ambos extremos. Existen algunas cepas que son inmóviles de la especie *C. gracilis* y *C. hominis* o con flagelos múltiples como algunas cepas de *C. showae* (Epps et al., 2013; Lastovica et al., 2014; Pérez, 2014).

En el género de *Campylobacter*, se puede dar la aparición de formas cocoides en aquellos cultivos viejos y en las denominadas formas viables no cultivables (VBNC). Estas formas aparecen cuando la bacteria está sometida a condiciones de estrés, tales como concentraciones altas de oxígeno, temperaturas extremas o falta de nutrientes (Pérez, 2014).

En la actualidad existen 25 especies y 11 subespecies dentro del género *Campylobacter*. Las especies más destacables dentro del género son: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. concisus*, *C. ureolyticus* o *C. fetus* (Man, 2011).

Estas bacterias son microaerófilas, por lo que crecen en condiciones de 5% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno, la mayor parte de especies pertenecientes a este género crecen a una temperatura de 37°C, a excepción de las especies termorresistentes *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, las cuales pueden crecer a 42°C. No fermentan ni

oxidan carbohidratos, obteniendo su energía a partir de aminoácidos o intermediarios del ciclo de ácidos tricarboxílicos (Silva et al., 2011).

El crecimiento de *Campylobacter* en medios de cultivos sólidos suplementados con sangre, se puede observar la presencia de colonias pequeñas, grisáceas, no producen hemólisis, bordes lisos, con un diámetro de 1 a 2 mm en forma de círculo y que tienden a seguir la línea de la estría (Lastovica et al., 2014).

1.2.1 *Campylobacter jejuni*

C. jejuni es una varilla curva pequeña, gramnegativa y es la principal causante de enfermedad diarreica, es una bacteria zoonótica, debido a que es un comensal en animales de alimentación, principalmente de las aves de corral, las cuales constituyen el reservorio principal para la contaminación al ser humano (Iovine, 2013).

Las colonias de *C. jejuni* pueden ser de dos tipos, colonias planas, grisáceas, bordes irregulares, con tendencia a seguir la línea de estría sobre el agar, o colonias redondas, convexas, lisas y brillantes, y un centro más oscuro (N. Narváez, 2017).

C. jejuni es una de las especies más importantes, la cual comprende dos subespecies: *C. jejuni subsp. jejuni* y *C. jejuni subsp. doylei*. La subespecie *jejuni* simplemente es referida como *C. jejuni*, la misma ha sido aislada con mayor frecuencia en pacientes con gastroenteritis. Además, está involucrada en otras enfermedades, tales como bacteremia, meningitis, aborto y enfermedades autoinmunes (Hernández et al., 2013).

1.2.2 *Campylobacter coli*

C. coli, es un bacilo pequeño, tienen una forma que varía de espiral, varilla o bien se puede presentar como alas de gaviotas, son bacterias microaerófilas, es una especie termotolerante ya que puede desarrollarse a una temperatura de 42°C (Mardones & López, 2017; Pérez, 2014).

Las colonias se presentan redondas de 1 a 2 mm de diámetro, convexas, brillantes y lisas, tienden a seguir la línea de estría en el agar, por lo general son cepas no hemolíticas (N. Narváez, 2017).

El cuadro clínico presentado por *C. coli*, es similar al de *C. jejuni*, diarrea acuosa, a veces con sangre, fiebre, calambres abdominales y vómitos, además que pueden conllevar a enfermedades asociadas (Skarp et al., 2016).

1.3 Principales fuentes de transmisión e infección.

Campylobacter suele encontrarse como comensal en el tracto gastrointestinal de animales salvajes, domésticos y así como también puede presentarse en el agua, los principales reservorios son: ganado bovino, ovino, suino, roedores, todas las aves de corral, perros y gatos, sin embargo, los reservorios varían con la especie, *C. jejuni* se encuentra principalmente en pollos, aunque estas no presentan la enfermedad, conduciendo a éstos a un estado de portador, mientras que *C. coli* frecuentemente es aislada de suinos (Solís, 2011). Los principales reservorios de algunas especies de *Campylobacter spp.*, se muestran en la tabla 3.

Tabla 1.

Especies y subespecies de Campylobacter y su principal reservorio animal.

Especie/ Subespecie	Reservorio principal
<i>Campylobacter jejuni</i> subespecie <i>doylei</i>	Aves y mamíferos
<i>Campylobacter jejuni</i> subespecie <i>jejuni</i>	Humanos, perros y gallinas
<i>Campylobacter coli</i>	Cerdos
<i>Campylobacter lari</i>	Aves marinas (gaviotas)

Nota. Adaptado de Mardones y López (2017)

1.3.1 Aves de corral

El principal reservorio de *Campylobacter spp.*, son las aves de corral, el consumo de carne de pollo y sus subproductos se ha indicado como responsable principal de

campilobacteriosis en la población humana, sobre todo en pacientes con el sistema inmunológico comprometido, niños y ancianos (Cervantes & Cravioto, 2007; Silva et al., 2011).

En las aves de corral, *C. jejuni* no produce el cuadro clínico que se observa en los humanos, el patógeno coloniza las aves en números altos hasta 10^{10} UFC por gramo de intestino colonizado, se localiza en las criptas del intestino delgado, se encuentra en la capa de moco cerca de las células epiteliales, la presencia del mucus intestinal de las aves disminuye en parte la invasión en células humanas, lo cual podría explicar la naturaleza asintomática en las aves (Young, Davis, et al., 2007).

Campylobacter se desarrolla en la mucosa del intestino grueso de las aves, ya que hay una concentración baja de oxígeno, temperatura corporal de 42°C, además de la presencia de otras bacterias como *Clostridium spp.*, la cual puede favorecer la proliferación de *C. jejuni* y *C. coli* por ser especies proteo y sacarolíticas, originando fuentes nutritivas para *Campylobacter*, así como una atmósfera rica en hidrógeno producto de su metabolismo fermentativo (Lee & Newell, 2006).

1.3.2 Animales domésticos

Los perros y gatos, pueden también considerarse como una fuente de infección humana, en muchos casos estos pueden portar asintóticamente *Campylobacter spp.* termófilas, con una prevalencia de alrededor del 40%, en un estudio realizado en Alemania, se ha demostrado la prevalencia de *Campylobacter spp.*, en un 15,3% en perros y del 11,3 % en gatos. *C. upsaliensis* y *C. helveticus* son las especies que predominan en estos animales, *C. jejuni* también suele estar presente, la cría de perros y gatos permite la transmisión de *Campylobacter spp* a los humanos (Gölz et al., 2014).

1.3.3 Cerdos y vacas

El tracto intestinal de un cerdo puede estar colonizado por especies del género *Campylobacter spp*, las cuales son comensales en este animal, siendo *C. coli* la más frecuente (Denis et al., 2008).

Se ha observado la presencia de *Campylobacter spp* termófilos en especies como cerdos y rumiantes, la carga bacteriana presente en las heces de estos animales es inferior a la presente en las aves (alrededor de 10^2 UFC/g). Además, se ha encontrado *C. lari* en heces de cerdos domésticos (2,22%), cerdos salvajes (20%), jabalí (26,98%) (Ugarte, 2015).

1.3.4 Alimentos y agua contaminada

En los alimentos principalmente se da una contaminación fecal por *Campylobacter spp.*, durante el proceso de faenamiento y evisceración de los animales; entre un 50- 80% de todos los casos de campylobacteriosis demuestran que el pollo y sus subproductos son la fuente principal de infección para los humanos, debido a la manipulación de la carne cruda de pollo, falta de cocción, contaminación cruzada y poca higiene al momento de la preparación (Poma, 2014).

La presencia de *Campylobacter* en el agua se debe a la contaminación fecal por aves, animales, así como la presencia de desechos derivados de la agricultura (Whiley et al., 2013).

Campylobacter spp, se aisló de varias fuentes de agua, se mostró la prevalencia de especies termófilas hasta en un 45% en lagos y ríos, las vías fluviales se pueden considerar como una ruta de migración para *Campylobacter*, debido a que puede sobrevivir un corto período en agua salada, algunos crustáceos pueden llegar a contaminarse del patógeno, especialmente *C. lari*, la causa de esta contaminación son las aves marinas, en particular las gaviotas, las cuales son el reservorio principal de *C. lari* (Gölz et al., 2014).

1.4 Enfermedades asociadas a *Campylobacter*.

1.4.1 Gastroenteritis

Los síntomas más comunes de una gastroenteritis son: diarrea, la cual puede ser sanguinolenta, náuseas, dolor abdominal y fiebre, tras el periodo de incubación de dos a cinco días ocurre la aparición de los síntomas, los cuales se presentan con un rango máximo entre uno y diez días. Sin embargo, esta infección puede cursar de manera asintomática, pero autolimitada en el tiempo (P. González, 2018).

Se ha observado que en alrededor de 50% de los pacientes que presentan diarrea, es precedida por un período febril, malestar, mialgia, dolor abdominal, la fiebre puede llegar hasta los 40°C, en ocasiones se puede presentar un período prodrómico, con cefalea, mialgia, fiebre, por lo general entre 12 o 24 h., antes de que inicien los síntomas. Un síntoma muy común, en etapas iniciales de infección se presenta en la materia fecal la cual es acuosa, a medida que se da el progreso de la enfermedad, esta se torna sanguinolenta con tenesmo (Cervantes & Cravioto, 2007).

1.4.2 Bacteriemia

La mayor parte de casos de campylobacteriosis se presenta con una diarrea de corta duración, autolimitada y por lo general no se necesita medicación antimicrobiana, sin embargo, podría requerirse un tratamiento en el caso de pacientes con infección severa, prolongada, individuos de edad avanzada, o en personas con un sistema inmunológico deprimido, debido a que estos son factores que predisponen a la aparición de complicaciones extraintestinales, como una bacteriemia, *C. jejuni* presenta mayor incidencia, confirmando así su alta capacidad invasiva (M. J. González & Alonso, 2013).

1.4.3 Meningitis

La meningitis bacteriana aguda (MBA), es una inflamación de las meninges por bacterias piógenas, la epidemiología de esta enfermedad es variable, y va a depender de ciertos factores de riesgo, como: edad, agente causal y presencia de enfermedades subyacentes (Blamey, 2014).

En humanos se ha determinado que *C. jejuni* y *C. fetus* pueden ocasionar meningitis, debido a que es un patógeno oportunista en los humanos y principalmente causa infecciones sistémicas. Las infecciones tienden a ocurrir en personas con enfermedades debilitantes tales como neoplasias, alcoholismo y enfermedades cardiovasculares (Acha & Szyfres, 2001).

1.4.4 Síndrome de Reiter

El síndrome de Reiter es una espondiloartropatía, se da una inflamación de la membrana sinovial, tendones y fascia, se caracteriza por presentar una triada: artritis reactiva, uveítis o cojuntivitis y uretritis, lo que conlleva a la aparición de otras infecciones de origen gastrointestinal o urogenital (Litardo, 2019).

La infección se produce a nivel de la mucosa intestinal o genital, las bacterias que pueden estar implicadas en este proceso son: *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*, las mismas que son capaces de sobrevivir en el interior de la célula, ya que logran evitar los mecanismos de defensa y migran hacia la articulación, donde producen la inflamación y se adaptan a este medio (Litardo, 2019).

1.4.5 Síndrome de Guillain – Barre.

El síndrome de Guillain Barré (SGB) es una afección autoinmune del sistema nervioso periférico que produce parálisis flácida aguda, se ha determinado que hay una relación entre este síndrome y una infección previa por *C.jejuni* (Cervantes & Cravioto, 2007).

El género de *Campylobacter*, origina una respuesta en el sistema inmune de origen humoral y celular, los antígenos de *Campylobacter* tienen una forma homóloga (en la parte molecular) con los antígenos del tejido neuronal, lo cual desencadena una reacción cruzada con el componente gangliósido de la superficie de los nervios periféricos. En la mayoría de los casos, se origina la respuesta inmune contra el antígeno “blanco” en la superficie de la membrana de la célula de Schwann o mielina, resultando en neuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (85%) o, en otros casos la reacción puede darse contra antígenos contenidos en la membrana del axón, en la forma axonal aguda (15%) (Acosta et al., 2007).

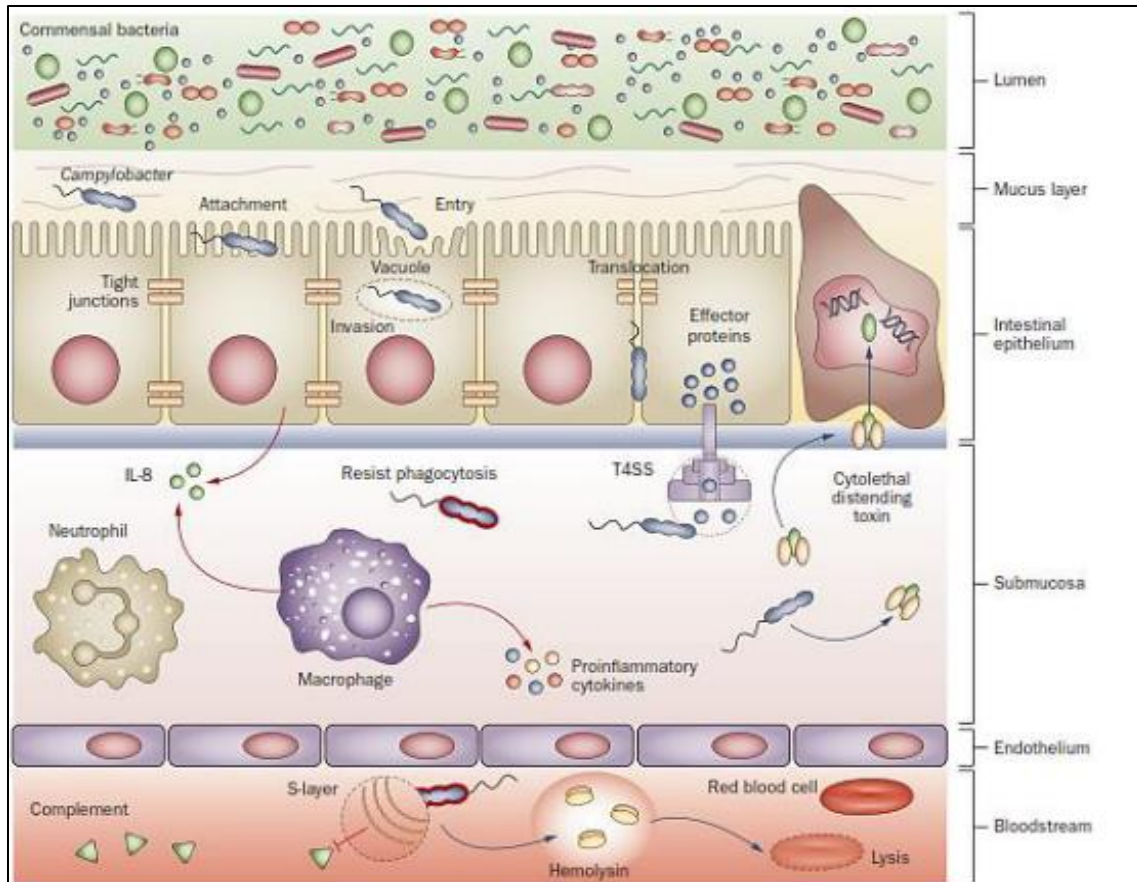
1.5 Patogenia

Los factores de virulencia de *Campylobacter* relacionados con patogenicidad son: la motilidad debido a la presencia de flagelos, la capacidad de adherencia e invasión a la célula y la producción de citotoxinas (Janssen et al., 2008).

El primer contacto de *Campylobacter* con el hospedador, ave, humano u otra especie, por lo general ocurre en la mucosa del intestino, el patógeno se adhiere a la capa de mucus, compartiendo nicho con las diversas bacterias de la microbiota intestinal, mientras más bacterias logren adherirse, mayor será la probabilidad de que entren en contacto con las células del epitelio y por ende logren unirse a ellas, luego de la unión de manera irreversible, se origina una cascada de señales transduccionales en el hospedador, de manera que las células entéricas reorganizan su citoesqueleto, de esta manera el patógeno atraviesa la membrana, dando origen a la invasión, el patógeno puede sobrevivir largos períodos de tiempo en el epitelio hasta que las condiciones ambientales le resulten óptimas para iniciar con la respuesta citotóxica (Martínez, 2009).

Figura 1.

Mecanismo de patogenia de *Campylobacter*.



Nota. *Campylobacter* se adhiere e invade las células epiteliales intestinales (*C. coli*, *C. concisus*, *C. fetus*, *C. rectus* y *C. upsaliensis*). Atraviesan el epitelio intestinal, mediante una ruta transcelular (*C. fetus*) y/o a través de una ruta paracelular, al romper las uniones estrechas asociadas a la barrera (*C. concisus*). Ciertas especies pueden secretar proteínas efectoras en las células del huésped a través del sistema de secreción T4SS (*C. fetus*, *C. coli*). La submucosa media la resistencia a la fagocitosis, y también interfiere en la acción del complemento, al evitar su unión con la superficie celular de la bacteria durante la fase sistémica de la infección. Algunas especies también pueden generar una serie de toxinas, como la toxina de distensión citoletal tripartita (*C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari* y *C. upsaliensis*), la unión de esta toxina a la célula del huésped esta mediada por *CdtA* y *CdtC*, y *CdtB* ingresa al núcleo, dando como resultado la detención del ciclo celular y el daño al DNA. Otras toxinas pueden ser hemolisinas, las cuales pueden lisar los glóbulos rojos (*C. coli* y *C. concisus*)

Adaptado de The clinical importance of emerging *Campylobacter* species, Man, (2011).

1.5.1 Flagelos

Campylobacter se caracteriza por su rapidez y la motilidad mediada por flagelos polares; estas estructuras son esenciales para la patogénesis. Los flagelos están compuestos de una gran proteína, la flagelina, que es codificada por el gen *flaA*, y la flagelina menor codificada por *flaB*, y son altamente homólogas (Cáceres, 2013).

Una vez que *Campylobacter* se encuentra en el huésped, los flagelos son necesarios para la colonización del intestino delgado; logra alcanzar el tracto gastrointestinal, debido a su resistencia al ácido gástrico y a las sales biliares, además contrarresta los movimientos peristálticos del intestino, de esta manera accede y atraviesa la mucosa del epitelio intestinal para que el patógeno pueda trasladarse desde allí al colon (Lastovica et al., 2014; Silva et al., 2011).

El flagelo polar, permite a *Campylobacter spp*, secretar proteínas relacionadas con virulencia, similar al sistema secretor tipo III de otros patógenos. El gen *flaA*, es necesario para que la bacteria pueda invadir las células epiteliales del hospedador, ya que se ha demostrado que la ausencia o mutación del mismo da como resultado una reducción casi total de la motilidad, lo cual no ocurre con el gen *flaB* (Gutiérrez et al., 2015).

La mayor parte de flagelinas bacterianas presentan regiones altamente conservadas, las cuales llegan a constituir patrones moleculares asociados a microorganismos y, activan una respuesta inmunológica innata en el organismo, un receptor tipo Toll (TLR5), reconoce estas regiones y envía señales de activación a las células inmunes, en las estructuras de *Campylobacter*, se ha evidenciado la ausencia de estas regiones, considerándose este como un mecanismo importante de evasión de la respuesta inmune innata (N. Narváez, 2017).

1.5.2 Adhesión e Invasión

Campylobacter se adhiere a las células del epitelio intestinal, dando lugar a la invasión de las mismas, lo cual conlleva a un daño celular y la consecuente pérdida de funcionalidad y diarrea (Lastovica et al., 2014).

El gen *cadF*, participa en la adhesión celular uniéndose a fibronectina. *CadF* actúa de dos formas, por un lado, su papel en la adhesión a la célula hospedera por unión a la fibronectina, la cual está localizada en la superficie de la célula y por otro lado, desencadena diversos procesos de señalización que conducen a la activación de pequeñas GTPasas: Rac1 y Cdc42, mediante estos factores de virulencia, se activa una fosforilación de proteínas, liberando Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, se origina una cascada de señalización provocando la abertura localizada de los filamentos, formando protrusiones y de esta manera se permite el paso mediante endocitosis de *Campylobacter*, en un estudio realizado se demostró la importancia de *cadF* para la colonización, ya que los mutantes de *cadF* no pudieron infectar aves. (Cróinín & Backert, 2012; Hernández et al., 2013; Lapierre A., 2013).

Los genes *racR* y *dnjaJ*, son muy importantes para la colonización *C. jejuni*, ya que se presume están encargados de todas las respuestas a las condiciones del microambiente intestinal, tales como las diferentes temperaturas entre los reservorios animales y los humanos (Quetz et al., 2012).

El gen *racR* potencia la capacidad de invasión intestinal por señales de transducción dependientes de temperatura. El gen *dnjaJ* codifica para proteínas que intervienen en el transporte y en el control del estrés, constituyendo un factor fundamental en la termotolerancia de *C. jejuni*, ya que codifica una proteína de choque térmico y debido a su cercanía con el gen *racR*, parece estar bajo su control transcripcional, una mutación en el gen *dnjaJ*, disminuye severamente la colonización en aves (Bolton, 2015; Hermans et al., 2011).

Los genes *virB11*, codifica un sistema secretor tipo IV, el cual puede contribuir a procesos tales como la colonización bacteriana, así como también la inyección en el citoplasma de las células del hospedador de los factores de virulencia, estudios in vitro han demostrado que mutantes de *virB11* muestran reducida virulencia, con respecto a la adherencia e invasión (Ghorbanalizadgan et al., 2014; Kordinas et al., 2005; Vilches, 2007).

El gen *ciaB*, está implicado en la invasión de *Campylobacter*, se ha demostrado que mutantes de *ciaB*, muestran una reducción significativa en la internalización. La proteína CiaB, se transloca al citoplasma de la célula del hospedador, siendo una verdadera molécula efectora para la invasión de *Campylobacter*, además se demostró que esta proteína requería al menos una de las unidades flagelares para su secreción (Cróinín & Backert, 2012; Quetz et al., 2012).

El gen *pldA*, una fosfolipasa A de membrana externa, la cual tiene actividad hemolítica, teniendo en cuenta que las hemolisinas no son líticas solamente para los eritrocitos, si no también causan daño a fibroblastos, plaquetas, monocitos, granulocitos, células endoteliales y miocárdicas. Samie, Ramalivhana, Igumbor y Obi, demostraron en su estudio un alto número de cepas hemolíticas en la sangre humana, lo cual estaría correlacionado con las características inflamatorias de *Campylobacter*, además que la actividad hemolítica se observó de mayor manera en las muestras humanas que en las de cerdo, además otro estudio, pudo determinar que las hemolisinas tenían actividad máxima en muestras de conejo y mínima en muestras de pollos. Esto podría indicar la diferente susceptibilidad de las especies animales, así como también la mayor afectación a las células humanas, lo cual podría explicar la aparición de un cuadro clínico (Ghorbanalizadgan et al., 2014; Grant et al., 1997; Samie et al., 2007; Trindade et al., 2015)

Además, la invasión se puede dar por la producción de sustancias extracelulares provenientes de la bacteria, invasinas, capaces de afectar los mecanismos de defensa del

hospedador, las cuales están codificadas, principalmente por los genes *ciaB* y *pldA* (Martínez, 2009).

Se ha llegado a determinar que los flagelos pueden llegar a tener una segunda función, adicional a la motilidad, mediante un sistema de secreción de proteínas no flagelares durante la invasión al hospedador (T3SS). Los productos de los genes *flaC* y *ciaB*, son liberados dentro del citoplasma de las células, los cuales intervienen en la colonización e invasión. Una mutación en *ciaB* ha demostrado que reduce significativamente la adherencia y el potencial invasivo (Bolton, 2015).

El gen *wlaN* ha sido relacionado con la expresión de los “mimics” o imitadores de gangliósidos en el síndrome de Guillian Barré (Talukder et al., 2008).

1.5.3 Citotoxinas de distensión.

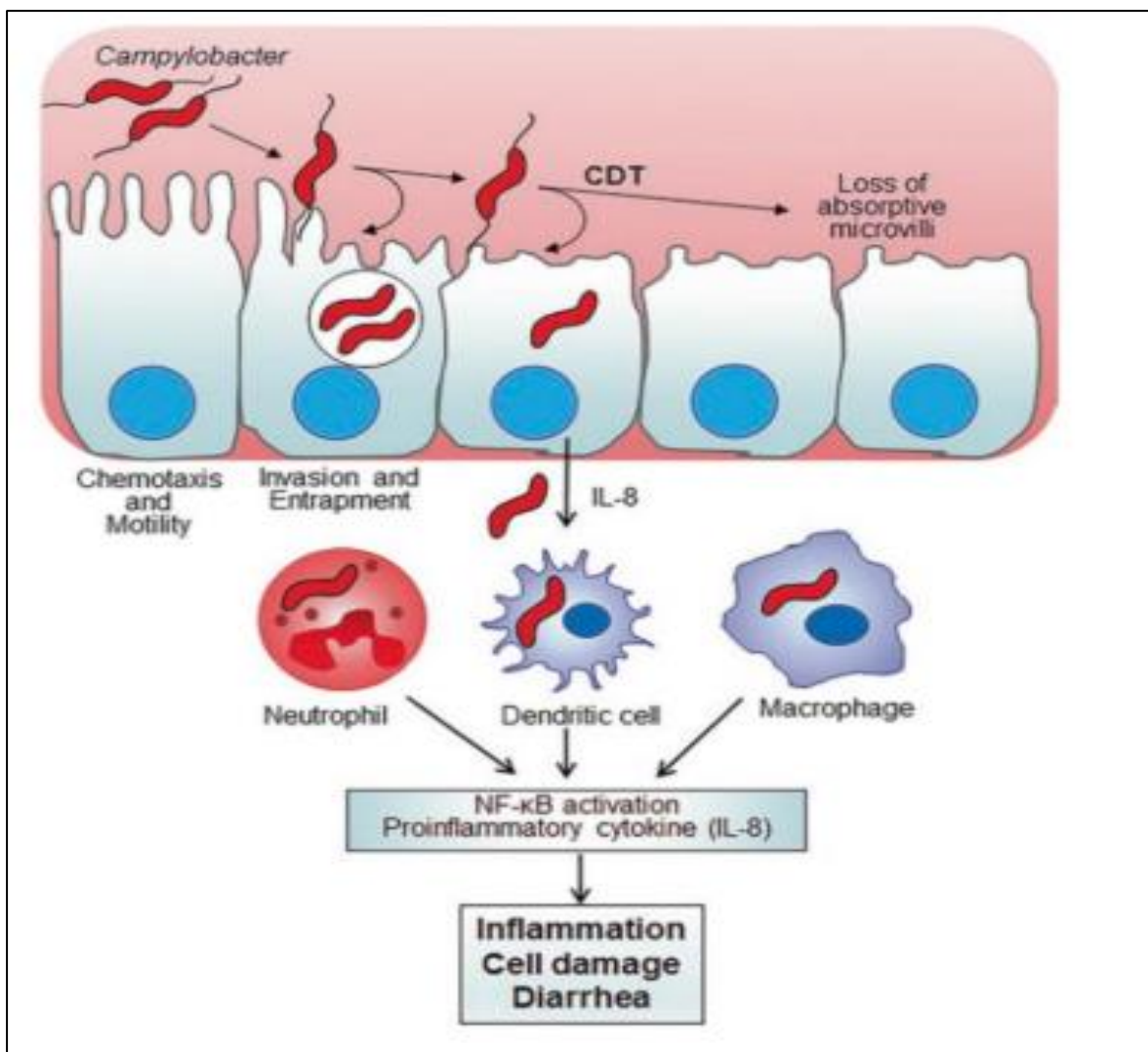
Campylobacter spp., produce una citotoxina de distensión o CDT's, compuesta por subunidades codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. CdtB es la subunidad que tiene efecto, debido a su actividad DNAasa, bloqueando la cinasa CDC2, la cuál es esencial para la transición hacia la fase G2 de la mitosis, ingresa a la célula del huésped y en la superficie celular se une con las proteínas CdtA y CdtC, las cuales son esenciales para la unión de la toxina a la membrana celular y para distribuir los productos de *cdtB*, finalmente rompen el DNA y causando la muerte celular (Bolton, 2015; Ge et al., 2008).

Esta toxina prolonga la persistencia de la enfermedad gastrointestinal, aumentando la inflamación en la mucosa y el daño hepático, los efectos dependen de las señales medioambientales que regulan la expresión de la transcripción y traducción de los genes *cdt*, en el huésped, como es el caso de los humanos que presentan la enfermedad, mientras las mismas cepas en pollos broiler no la producen, la forma en la que *Campylobacter* ocasiona este daño en la mucosa se resume en la figura 2 (Lapierre A., 2013). En la cual se muestran

los primeros pasos para la patogénesis de *Campylobacter*: quimiotaxis y motilidad, a continuación, se adhiere a las células, provocando invasión, y finalmente produce una citotoxina de distención letal (CDT), la cual conlleva a daño celular, inflamación, pérdida de fluidos, reduciendo de manera importante la capacidad de absorción del intestino y ocasiona el síntoma principal: diarrea (Bhunja, 2018; Silva et al., 2011).

Figura 2.

Mecanismo de Campylobacter jejuni en el daño epitelial en el intestino.



Nota. Los primeros pasos para la patogénesis de *Campylobacter* en las células intestinales.

Adaptado de Foodborne Microbial Pathogens, Bhunja, (2018).

1.6 Patogenia en animales

Como anfitrión natural e importante fuente de alimento para los humanos, el pollo es un buen modelo para estudiar los aspectos básicos de la colonización en el hospedador. La respuesta en las aves a una infección por *C. jejuni*, por lo general no conduce a la misma respuesta inflamatoria, ni a la sintomatología que presentan los humanos, el principal sitio de colonización es en las criptas del ciego, allí se encuentra en la capa de mucus, muy cerca de las células del epitelio intestinal (Young, Dirita, et al., 2007).

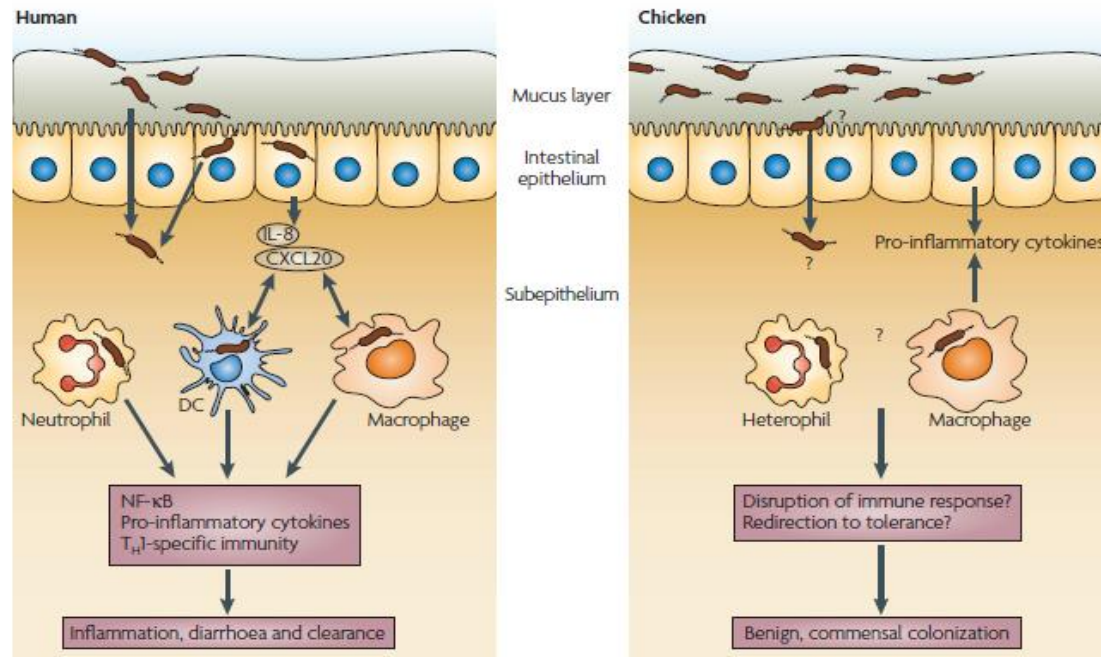
Se ha sugerido que el moco intestinal de pollo puede contribuir en la naturaleza asintomática en las aves, ya que se demostró una leve inhibición de la invasión en células epiteliales humanas, otro rasgo que podría contribuir a la diferencia en la infección en humanos y aves, es la temperatura corporal, la cual en los pollos oscila entre 41 y 45 °C, a diferencia de los 37°C en los humanos, lo que podría ser una señal específica para que se dé la infección (Young, Dirita, et al., 2007).

La respuesta inmune innata del pollo a *C. jejuni*, se ha investigado utilizando células epiteliales y macrófagos de líneas celulares, observando una producción de interleucinas IL-1 β , IL 6 y además también se observó óxido nítrico sintasa en los dos tipos de células utilizados, lo que indica que *C. jejuni* puede estimular una respuesta inmunológica innata en los pollos. Sin embargo, los ligandos del patógeno y los receptores en el huésped que se ven involucrados en este mecanismo son desconocidos (Young, Dirita, et al., 2007).

Además, los polluelos jóvenes pueden estar expuestos a *C. jejuni* en un período en el que se esté desarrollando su sistema inmunológico, así como también anticuerpos maternos que reconocen al patógeno pueden estar presentes en pollos de dos semanas de nacidos, proporcionando así una protección contra la colonización de *C. jejuni*, estos anticuerpos pueden reconocer componentes de la superficie del patógeno (Lacharme-Lora et al., 2017).

Figura 3

Características moleculares y celulares de la respuesta inmune innata a *Campylobacter jejuni* en humanos y pollos.



Nota. *C. jejuni* elude a la capa de mucus en los humanos e interactúa con las células epiteliales del intestino, lo que causa la producción de interleucina (IL-8), el patógeno se une a estas células y se internaliza en ellas. La inducción de IL-8 provoca el reclutamiento de células dendríticas, macrófagos y neutrófilos, los cuáles interactúan con *C. jejuni*, estas interacciones dan como resultado una respuesta proinflamatoria masiva y aumento de citocinas. Por el contrario, *C. jejuni*, reside principalmente en la capa mucosa de los intestinos de pollo, in vitro se ha demostrado que puede estimular la producción de IL-1 β , IL-6 y óxido nítrico sintasa intracelular a partir de células epiteliales y macrófagos, pero la respuesta del huésped, no provoca la diarrea inflamatoria en los pollos, existen factores desconocidos amortiguan la respuesta inmunitaria o la redirigen hacia la tolerancia. Heterófilos y macrófagos también pueden tener un papel en el establecimiento de la colonización de *C. jejuni* en pollos, pero en las células epiteliales la invasión no se informa típicamente. Los signos de interrogación indican áreas que carecen de claridad de interacciones.

Adaptado de *Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis*, Young, (2007).

1.7 Diagnóstico de *Campylobacter spp.*

El diagnóstico clínico de *Campylobacter spp.*, se hace con la demostración de la presencia del microorganismo en un examen directo de las heces. Además, la observación de las muestras mediante microscopía de campo oscuro o de contraste de fases, muestran la movilidad característica de la bacteria y por medio de un frotis teñido por Gram modificado se puede observar su morfología; bacilos gramnegativos, en forma de alas de gaviota (Martiny et al., 2010).

1.7.1 Aislamiento e Identificación Bioquímica

La identificación de las cepas se basa en la tinción de Gram modificada de las colonias que crecieron en medios selectivos, observándose la morfología sinusoide. Los medios de cultivo para la bacteria deben contener sangre o carbón con el fin de eliminar radicales de oxígeno, que debido a la naturaleza microaerofílica de la bacteria resultan tóxicos para su crecimiento, otros medios incluyen: medio de Butzler, medio de Skirrow y medio de Campy BAP, en todos se adicionan antibióticos para restringir el crecimiento de otras bacterias. Los cultivos se deben incubar a una temperatura de 42°C, con una atmósfera microaerofílica y durante un período comprendido entre 48 y 72 horas (Álvarez et al., 2008).

En la determinación de *Campylobacter*, es frecuente utilizar un método de filtración, en el cual se separa *Campylobacter* del resto de la microbiota presente en las heces como coliformes, los cuales quedan retenidos en la membrana, los bacilos delgados y pequeños como *Campylobacter* atraviesan la porosidad y se depositan en el medio sin antibiótico, además de la morfología se pueden presentar otras características que dan indicios de su presencia, como: el crecimiento, motilidad, características que se especifican en la tabla 1 (Chinillach, 2017; I. Narváez, 2015).

La identificación bioquímica se basa en la realización de pruebas como oxidasa, catalasa o hidrólisis de hipurato, esta última se utiliza para diferenciar a la especie *C. jejuni*,

ya que es la única especie hipurato positiva, sin embargo, es una diferenciación bioquímica limitada, puesto que se da la existencia de algunas cepas hipurato negativas, los resultados de estas pruebas para diferentes especies se muestran en la tabla 2 (Malbrán, 2001).

Tabla 2

Características primarias para identificación de Campylobacter.

Pruebas para <i>Campylobacter</i> termófilo	
Morfología:	bacilos curvados
Movilidad:	elevada movilidad característica en forma de sacacorchos
Oxidasa:	+
Crecimiento aeróbico a 41,5°C:	-
Crecimiento microaerofílico a 25°C:	-

Nota. Adaptado de Chinillach (2017).

Tabla 3

Resultados de pruebas bioquímicas para especies de Campylobacter termotolerantes.

	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
	<i>jejuni</i>	<i>doyle</i>			
Hidrólisis de hipurato	+	+	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+
Producción de catalasa	+	+	+	+	-/d
Reducción de nitratos	+	-	+	+	+
Producción de SH ₂	-	-	-/d	-	-

Nota. Adaptado de Malbrán (2001).

1.7.2 Identificación molecular

El diagnóstico molecular se basa en la detección de proteínas y ácidos nucleicos, de esta manera se acorta el tiempo y también el proceso para el diagnóstico y análisis, además, estos son métodos sensibles y específicos (Josefsen et al., 2010).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR múltiple son las más utilizadas, las mismas poseen alta sensibilidad y especificidad al momento de analizar las muestras, la PCR multiplex, tiene una ventaja sobre la PCR convencional, ya que se puede amplificar varios segmentos de DNA diferentes en una sola reacción. Por lo tanto, la PCR multiplex puede detectar y discriminar entre varias especies o cepas bacterianas simultáneamente (Poma, 2014; Toplak et al., 2012).

Para la diferenciación de *Campylobacter* el uso de ensayos moleculares puede ser útil para la detección rápida y específica. Para este propósito se incluye el análisis de varios genes como *fliY*, *cdt*, *asp*, *hipO*, *glyA*, *ceuE*, *cadF*. El gen *asp* codifica una enzima aspartocinasa, el cual es bastante específico para *C. coli*, el gen *hipO* produce hipuricasa, una enzima hipurato específica para la especie *C. jejuni*, el gen *cadF* codifica una proteína de unión a fibronectina que media la unión del microorganismo a las células, este se ha descrito como un gen conservado y específico de género (Shams et al., 2017).

1.8 Epidemiología

La campilobacteriosis humana se ha establecido como la causa más importante de gastroenteritis a nivel mundial, tanto en países en desarrollo como en los países desarrollados, las infecciones por *Campylobacter spp.*, suelen ser leves, pero tienden a causar complicaciones en niños, ancianos y personas con el sistema inmunológico comprometido, los serotipos más detectados en enfermedades humanas son *C. jejuni* y *C. coli* (Chinillach, 2017).

1.8.1 Epidemiología en Ecuador

En un estudio realizado en el 2012, en las Clínicas Veterinarias de la Ciudad de Loja y el Hospital Docente Veterinario de la UNL, se recogieron alrededor de 43 muestras de canes, para luego aplicar el método de filtración de membrana de nitro celulosa, se logró un aislamiento de la bacteria, un 65.12% de las muestras dieron positivas al cultivo de *Campylobacter*, y un 34,88 % de las muestras resultaron negativas (Manzanillas, 2012).

En la provincia de Pichincha en el año 2014, se realizó el análisis de contenido cecal de pollos faenados en camales industriales, de las 181 muestras analizadas, 71,8% fueron positivas para *Campylobacter spp*, se realizó PCR múltiple para identificar las especies de *C. jejuni* y *C. coli*, 88 muestras (67,69%) *C. coli*, 23 muestras (17,69%) *C. jejuni*, 18 muestras (13,85%) consistieron en muestras mixtas de *C. coli* y *C. jejuni* y 1 (0,77%) no pudo ser identificada mediante esta PCR (Poma, 2014).

En el año 2014 en un estudio realizado en la provincia de Esmeraldas, en la comunidad de Borbón y en Guamaní en la ciudad de Quito; en la zona urbana de una muestra de 200 personas, se observó que 11 individuos presentaban *C. jejuni* (5,5%) y 5 individuos *C. coli* (2,5%), y en la comunidad rural de Borbón la presencia fue baja, ya que hubo un caso para *C. jejuni* y *C.coli* (G. Vasco et al., 2014).

En la comunidad semirural de Otón – Yaruqui, en la ciudad de Quito se tomaron muestras de varios animales los cuales eran pollos, ganado, patos, ovejas, cuyes, conejos, caballos, perros y gatos, así como también se recolectaron muestras de los habitantes de la comunidad. En los resultados de las 82 muestras analizadas de animales, se observó la prevalencia de *C. jejuni* con un 30,7% junto con otros agentes enteropatógenos. La presentación de *Campylobacter spp*. en canes fue de un 30% en una muestra de 12 animales (K. Vasco et al., 2016).

En un estudio realizado en la ciudad de Loja, se analizaron 253 muestras fecales obtenidas de niños entre 7 – 9 años de edad, que consultaron por un cuadro de diarrea en dos hospitales de la ciudad. De las 253 muestras analizadas, 16 (6,3%) tuvieron un coprocultivo positivo para *Campylobacter*. Las especies aisladas fueron *C. jejuni* en 13 casos (5,1%) y *C. coli* en 3 (1,2%) (Simaluiza et al., 2018).

1.8.2 Epidemiología mundial

En Estados Unidos, en el año de 2013 se estimó una incidencia de *Campylobacter* por cada 100.00 habitantes de un 13,82%. En países como China y Japón, se identificó *Campylobacter spp.*, en aves broiler, así como el otros países de Asia como Tailandia y Malasia, en animales como patos y aves silvestres (Poma, 2014).

Algunos países de la Unión Europea proporcionaron información sobre la presencia de *Campylobacter spp.* en parvadas de pollos de engorde, lotes de sacrificio o animales individuales. La prevalencia en parvadas fue alta en Eslovenia 63,4% y 83,6% en Hungría. En lotes de sacrificio la prevalencia oscilo del 1,6% en Finlandia a 62,1% en España. En Alemania la prevalencia fue de 9,2% de pollos de engorde (EFSA & ECDC, 2015).

La gastroenteritis producida por *C. jejuni* y *C. coli* ha sido reportada en varios países, como Chile (14.1%), Ecuador (23%), Paraguay (18.4%), Uruguay (14.3%), Venezuela (13%) y Perú (23 – 41.3%) (Fernández, 2011).

Capítulo dos

Metodología

2.1 Cepas bacterianas

Se analizó el DNA de 29 cepas de *Campylobacter* (24 pertenecientes a *C. jejuni* y 5 a *C. coli*), las cuales fueron aisladas a partir de muestras de materia fecal y vísceras de reservorios animales (Hígados). El DNA previamente fue extraído mediante el protocolo para gram negativos de Wizard® Genomic DNA Purification Kit, y almacenado a – 80 °C en el laboratorio de Microbiología de Investigación de la Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja. Se empleó como control positivo las cepas *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 y *Campylobacter jejuni* ATCC 29428.

Tabla 4

Cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de materia fecal y vísceras de reservorios animales

Fuente	Número de muestras	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Perros	7	4	3
Gallinas	9	9	-
Hígados	13	11	2

2.2 Amplificación de genes de adherencia e invasión mediante PCR.

Se llevó a cabo mediante PCR simple utilizando GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) para los cebadores (*cadF* y *racR*), que se muestran en la Tabla 5 en una reacción de 25 µl que comprende: 0.1 µl GoTaq Flexi DNA polimerasa, 5 µl 5x Green GoTaq Buffer, 0.5 µl de cada cebador, 4 µl de MgCl₂, 0,5 µl de dNTPs, 1,5 µl de ADN.

Para los cebadores *virB11*, *ciaB*, *pldA*, *dnjaJ* (Tabla 5) se utilizó Platinum Multiplex PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) con un volumen final de 15 μ l que comprende: 7,5 μ l de Platinum Multiplex PCR Master Mix, 0,5 μ l de cada cebador, 1,8 μ l de GC Enhancer y 3 μ l de ADN.

La amplificación se realizó en termociclador Applied Biosystems, modelo: Proflex PCR Systems, siguiendo con las condiciones descritas en las tablas 6 y 7.

Tabla 5

Secuencias de cebadores para la determinación de genes asociados a adherencia, colonización e invasión celular en Campylobacter spp.

Gen	Secuencia 5' - 3'	Peso (pb)	Temperatura de Anillamiento (°C)	Referencias
<i>cadF</i>	F- TGG AAG GTA ATT TAG ATA TG R- CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC	400	45°C	
<i>racR</i>	F- GAT GAT CCT GAC TTT G R- TCT CCT ATT TTT ACC C	584	45°C	
<i>dnjaJ</i>	F- AAG GCT TTG GCT CAT C R- CTT TTT GTT CAT CGT T	720	38°C	
<i>virB11</i>	F- TCT TGT GAG TTG CCT TAC CCC TTT T R- CCT GCG TGT CCT GTG TTA TTT ACC C	494	53°C	Cáceres, 2013)
<i>ciaB</i>	F- TTT TTA TCA GTC CTT A R- TTT CGG TAT CAT TAG C	986	42°C	
<i>pldA</i>	F- AGG CTT ATG CGT TTT T R- TAT AGG GCT TTC TCC A	913	41°C	

Tabla 6

Condiciones de ciclación en la amplificación de los genes *cadF* y *racR*, utilizando GoTaq® Flexi DNA Polymerase.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	95°C	6 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	
Anillamiento	45°C	30 segundos	30
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

Tabla 7

Condiciones de ciclación en la amplificación de los genes *virB11*, *pldA*, *dnjaJ*, *ciaB*, utilizando Platinum Multiplex PCR Master Mix.

Etapa	Gen	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación		95°C	2 minutos	1
Desnaturalización		95°C	30 segundos	
	<i>virB11</i>	53°C	30 segundos	35
	<i>pldA</i>	41°C	1 minuto	30
Anillamiento	<i>dnjaJ</i>	38°C	1 minuto	35
	<i>ciaB</i>	42°C	1 minuto	30
Extensión		72°C	1 minuto	
Extensión final		72°C	10 minutos	1

Finalmente, el producto de la PCR, se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen™) al 1,5%, con las siguientes condiciones de corrida: 120 V, 45 minutos; usando un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) (Apéndice 3). Su visualización se realizó en un Transiluminador UV Enduro™ GDSTOUCH Labnet.

2.3 Análisis estadístico

Los genes de virulencia detectados en *C. jejuni* y *C. coli*, fueron analizados mediante IBM SPSS Statistics (versión 23). El coeficiente de correlación de Pearson tiene el objetivo

de indicar cuán asociadas se encuentran dos variables entre sí, en este caso, se utilizó este método para poder determinar si la presencia de un gen de virulencia estaba relacionada con la presencia del otro, se ajustaron los valores de presencia o ausencia (1 = presente; 0 = ausente) de un gen de virulencia y también las dos especies de *Campylobacter* estudiadas a este método estadístico. Las estadísticas se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad fue menor a 0.05 ($p < 0.05$).

Capítulo tres

Resultados y discusión

Campylobacter, se encuentra como reservorio en el intestino de ciertos animales, principalmente en aves de corral, vacas, cerdos, así como también se puede encontrar en animales de compañía tales como perros y gatos; esta bacteria puede ocasionar infección gastrointestinal en humanos, debido a la ingestión de alimentos contaminados: carnes crudas, insuficientemente cocidas, por contaminación cruzada entre alimentos listos para el consumo con platos, tenedores o superficies, así como también por el contacto con animales que están infectados, lo que generalmente ocurre con las especies de compañía, lo cual deriva a la importancia del análisis de la presencia de *Campylobacter* en los reservorios animales que pueden predisponer a una infección a la comunidad.

De las 29 muestras de DNA de *Campylobacter spp*, extraídos a partir de materia fecal y vísceras (hígados) de reservorios animales, se determinó la expresión de los siguientes genes *cadF* (100%), *dnjaJ* (93,10%), *pldA* (82,75%), *racR* (79,31%), *virB11* (62,06%), *ciaB* (55,17%), datos que se muestran en la figura 4 y 5.

Figura 4

Porcentaje de expresión de genes asociados con adherencia e invasión en cepas de *Campylobacter* spp aislado de materia fecal y vísceras de reservorios animales.

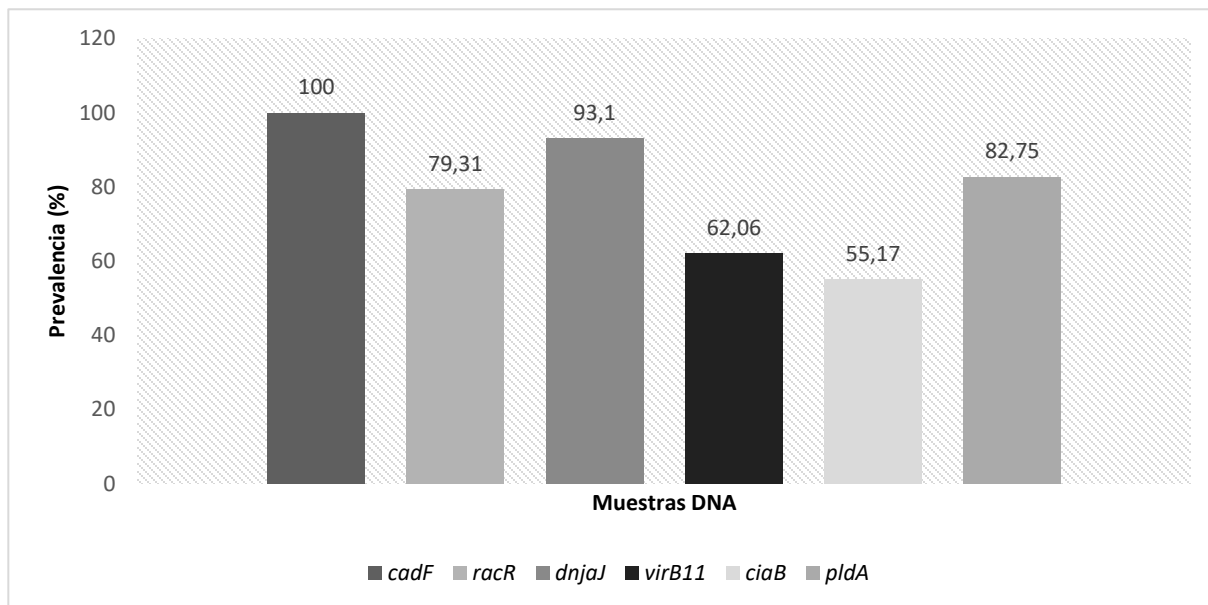
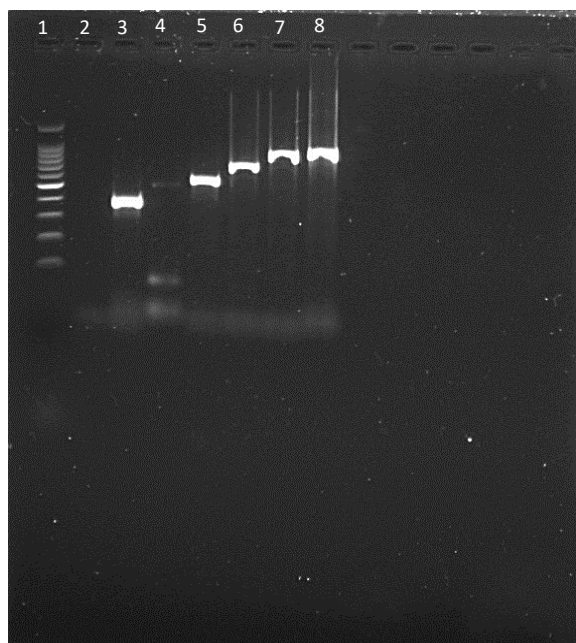


Figura 5

Imagen representativa del gel de agarosa donde se muestran los genes de virulencia investigados para *Campylobacter* spp.



Nota. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de la PCR para la amplificación de los genes de virulencia **Carril 1:** Marcador de peso molecular

de 100 bp (Promega). **Carril 2:** Blanco. **Carril 3:** Gen *cadF* (400 pb). **Carril 4:** Gen *virB11* (494 pb), **Carril 5:** Gen *racR* (584 pb), **Carril 6:** Gen *dnjaJ* (720 pb). **Carril 7:** Gen *pldA* (913 pb), **Carril 8:** Gen *ciaB* (986 pb).

De las 29 muestras, 7 fueron aisladas de materia fecal de perros, n=4 son *C. jejuni*, en las cuáles se pueden identificar los siguientes genes de adherencia, *cadF* y *dnjaJ* (100%), *racR* (75%), e invasión, *ciaB* y *pldA* (100%) y *virB11* (50%). Mientras que 3 muestras son *C. coli*, mismas que presentaron los siguientes resultados de expresión en los genes de adherencia, *cadF* y *dnjaJ* (100%), *racR* (33,33%), e invasión, *virB11* (66,66%), y ausencia de *ciaB* y *pldA* (Figura 6), mostrando semejanza con un estudio realizado en Corea por Cho (2014), donde se analizó 50 muestras fecales de perros, 41 pertenecientes a *C. jejuni* y 9 a *C. coli*, reportando altas tasas de prevalencia en los diversos genes, *cadF* y *dnjaJ* con un 100% en ambas especies, *racR*, sólo se presentó en *C. jejuni* con un 73,2%, al igual que *pldA* (78%) y *ciaB* (73,2%), contrastando con los resultados obtenidos por Aslantaş (2019), en la provincia de Hatay en Turquía obtuvo los siguientes resultados al analizar muestras de hisopado rectal de perros y gatos; *cadF* 93.6%, *racR* 57.4%, *dnaJ* 53.2%, *virB11* 2.1%, *ciaB* 12.8%, and *pldA* 44.7%, en donde se evidenció la presencia de todos los genes relacionados con la invasión.

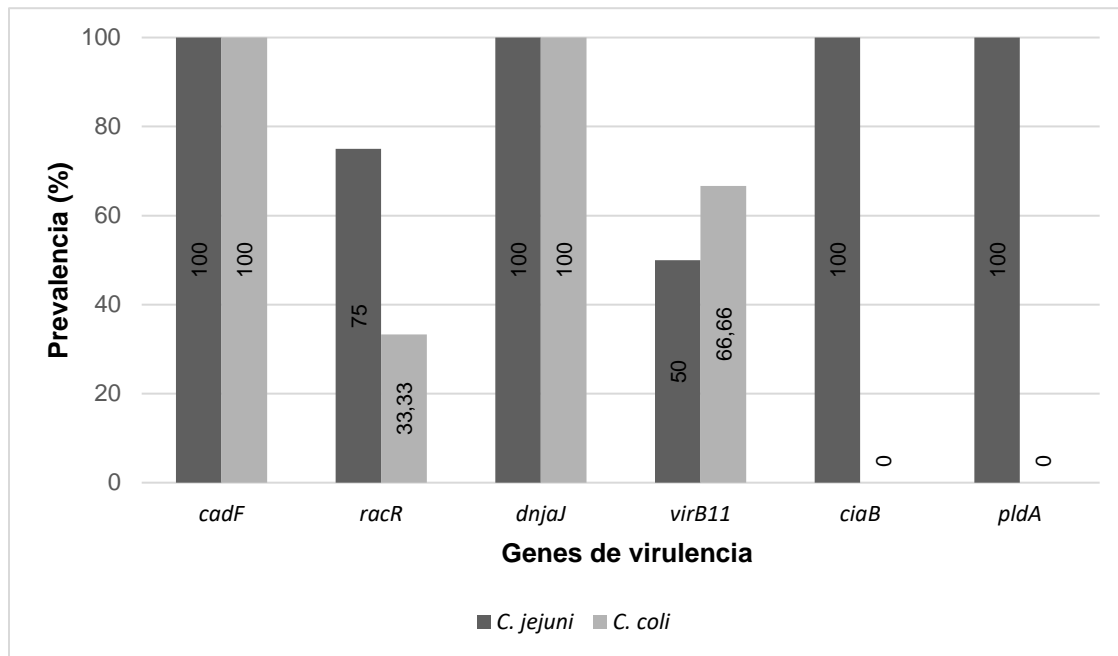
En base a los resultados de los diferentes estudios, concuerdan en la expresión mayor al 50% de todos los genes implicados en la adherencia a las células por parte de *Campylobacter*, factor indispensable para que pueda asegurar su supervivencia, utilizando a este animal de compañía como reservorio, contrastando con los genes relacionados con la invasión, los cuales en ciertos casos se encontraron ausentes, resultados que podrían correlacionarse con su naturaleza asintomática, en la mayoría de los casos.

De acuerdo con Cho (2014) y Manzanillas (2012), la diferencia entre los resultados va a depender de factores externos tales como las condiciones en las que se encontraban los reservorios analizados, debido a que los escenarios tanto de alimentación, vivienda e higiene van a variar en función del lugar de origen, también en ciertos casos depende de la especie, la edad, entre otros.

La presencia o ausencia de un gen implicado en adherencia o invasión, puede depender de factores tales como la expresión variable, así como también de la funcionalidad dentro del huésped, en nuestro estudio, no se expresaron *ciaB* y *pldA* en *C.coli*, genes relacionados con el potencial invasivo, y en específico *pldA*, según Samie (2007), está implicado en la afectación a las células hospedadoras, dando como resultado la aparición de un cuadro clínico, como es el caso de un reservorio, en ciertas ocasiones puede llegar a presentarse como patógeno o como comensal, lo cual podría explicar la presencia o ausencia de estos genes, respectivamente; otro caso que pudiese explicar esto son las recombinaciones que pueden tener los genes, dando origen a mutaciones y por ende truncando la expresión y función de la proteína, donde las cepas de alta virulencia tendrán de igual manera genes específicos de alta virulencia y en contraste estos estarán ausentes en cepas avirulentas.(Soto, 2006; Velge & Roche, 2010).

Figura 6

Porcentaje de genes asociados de virulencia analizados en cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de materia fecal de perros.



En las 9 cepas de *C. jejuni* provenientes de materia fecal de aves de corral, expresaron los genes de adherencia, *cadF* (100%), *racR* y *dnjaJ* (88,88%), e invasión, *pldA* (100%), *virB11* (77,77%), *ciaB* (55,55%) (Figura 7). En un estudio realizado por Mata (2014), analizó muestras provenientes de pavos, donde encontró una prevalencia en las especies más comunes de: *cadF* (73,84%), *racR* (41,48%), *ciaB* (24,02%), *pldA* (30,04%), por otro lado, en un análisis realizado por Chansiripornchai (2009), en cepas aisladas de pollo tailandés, de la especie de *C. jejuni*, mostró alta prevalencia del gen *dnjaJ*, ya que se mostró en 49 de las 50 muestras analizadas (98%), *cadF* (74%), *ciaB* (40%), *pldA* (30%); de manera similar, Cáceres (2013), en un total de 40 muestras aisladas de heces de aves, obtuvo como resultados para genes que codifican mecanismos de adhesión: 98,1% para *cadF*, 87,1% en *racR*, 74,45% para *dnjaJ*, genes de codifican mecanismos de invasión 48,6% para *ciaB*, 14,55% en *pldA*, 3,85 para el gen *virB11*.

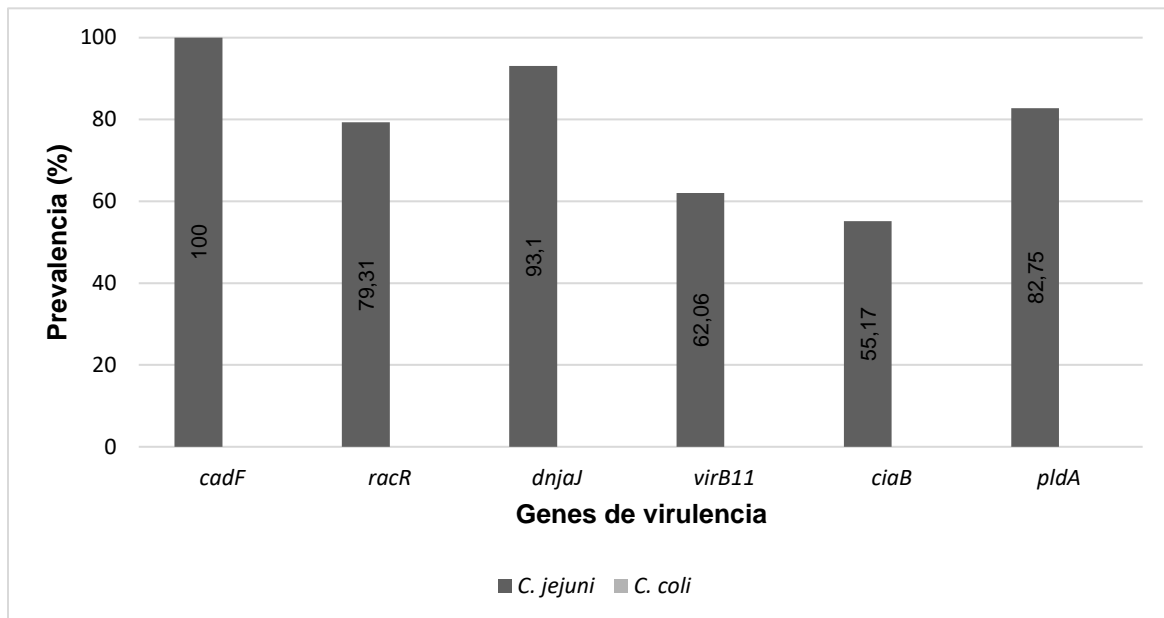
En este caso, *C. jejuni*, fue la única especie encontrada en las muestras de aves, por lo general esta suele ser la especie predominante en estos reservorios, aunque también puede atribuirse la ausencia de *C. coli*, al número limitado de muestras analizadas.

Los genes de adherencia, en todos los estudios analizados, reportaron alta prevalencia, debido a su importancia en la colonización en aves, por ese motivo se puede explicar que se encuentre en grandes cantidades en las criptas del intestino delgado, sumando a eso el excelente microambiente que encuentra allí *Campylobacter* para su desarrollo, en los genes de invasión los resultados obtenidos muestran una prevalencia relativamente alta de estos genes, teniendo relación con los resultados de los estudios realizados por Mata (2014) y Chansiripornchai (2009), sin embargo, se pueden observar cierta disparidad entre: los resultados obtenidos con Cáceres (2013), presentando frecuencias bajas para los genes de invasión, lo cual podría explicarse por incluir el análisis de *C. coli*, especie que en ocasiones no presentan ciertos genes de invasión por factores tales como expresividad, recombinación, mutaciones, también por la diferencia de la cantidad de muestras, y por la virulencia de las cepas.

Las aves de corral suelen ser el principal reservorio de *Campylobacter*, principalmente *C.jejuni*, en ese contexto se puede explicar la presencia de todos los genes relacionados con adherencia e invasión, siendo sus productos y subproductos la fuente principal de transmisión a los humanos como agente patógeno.

Figura 7

Porcentaje de genes de virulencia analizados en cepas de *C. jejuni* aisladas de materia fecal de aves de corral.



En las 13 muestras de hígado analizadas, 11 pertenecen a *C. jejuni*, expresando en los genes de adherencia: *cadF* y *racR* (100%), *dnjaJ* (90,91%), e invasión, *pldA* (81,81%), *ciaB* (63,63%) y *virB11* (45,45%), Mientras que 3 muestras corresponden a *C. coli*, las cuales a su vez expresaron los siguientes resultados en los genes de adherencia, *cadF* y *dnjaJ* (100%), *racR* (0%), e invasión, *virB11* y *pldA* (100%), *ciaB* (0%) (Figura 8).

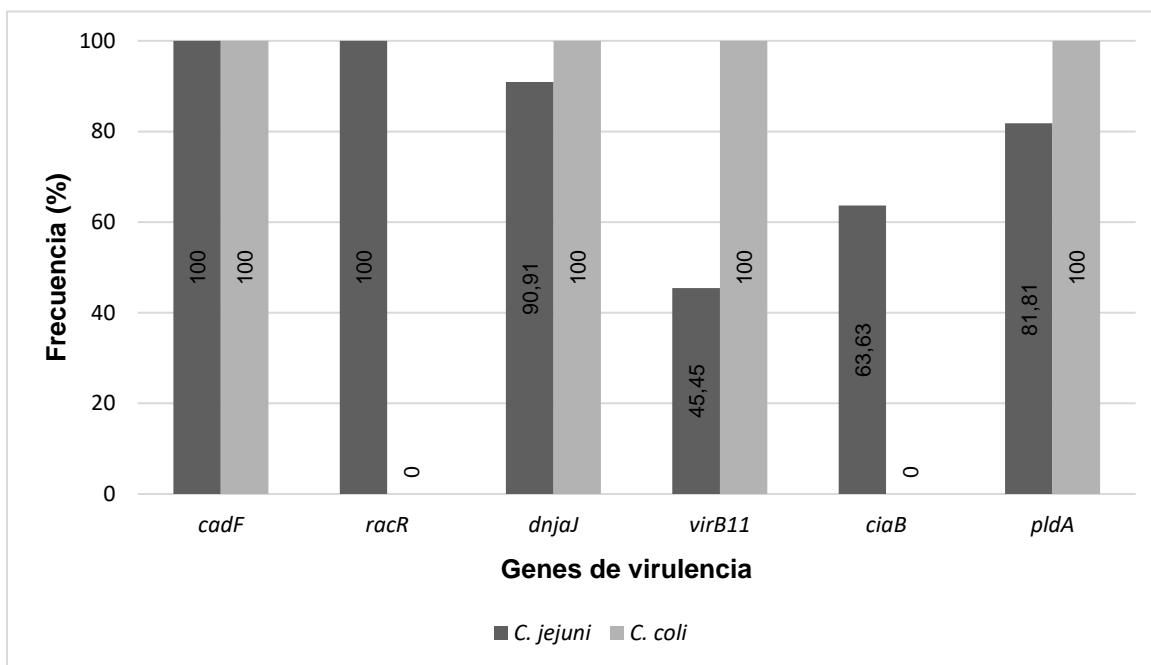
Existe muy poca información con respecto al análisis de factores de virulencia en vísceras animales, como es el caso de los hígados, en los cuáles los estudios se limitan a determinar la presencia o ausencia de *Campylobacter*, la contaminación en este caso puede deberse a la posibilidad de una infección extraintestinal, debido a la capacidad invasiva de la bacteria, o en la mayoría de los casos por contaminación cruzada en el proceso de faenamiento y evisceración por materia fecal proveniente del tracto digestivo.

Debido a que la contaminación por lo general se da en el proceso de evisceración, se puede extrapolar los resultados con un estudio realizado por Cáceres (2013), donde se

analizó 35 muestras de *C. jejuni* aisladas en carne de ave, la frecuencia para genes de adherencia y colonización fue: *racR* (68,6%), *dnaJ* (54,3%), *cadF* (65,7%) e invasión *ciaB* (37,1%). En *C. coli* se analizaron 5 muestras, la prevalencia para genes de adherencia y colonización, *racR* (40%), *dnjaJ* (60%), y *cadF* (80%) y en genes que codifican mecanismos de invasión, *pldA* (60%), *ciaB* (80%) y *virB11* (20%). Tanto en la investigación realizada por Cáceres (2013), como en nuestro estudio, se evidenció la expresión de todos los genes asociados con adherencia e invasión en las vísceras animales (hígados), además en base a los resultados se puede establecer una relación adicional con los estudios realizados en materia fecal, mismos que en efecto muestran la presencia de todos los genes, lo cual lleva a la deducción que ambos productos pudieron exponerse a contaminación fecal en la cadena de producción avícola.

Figura 8

Porcentaje de cepas positivas a los genes de virulencia analizados en cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de vísceras (hígados).



El presente estudio reveló la importancia de los factores de virulencia en *Campylobacter*, *cadF*, *racR*, *dnjaJ*, juegan un papel muy importante en la adherencia y colonización, los cuales se expresaron con mayor frecuencia en las muestras analizadas tanto de perros, gallinas e hígados; el gen *cadF*, encargado de la expresión de adherencia mediante la unión a la fibronectina, fue el factor predominante, debido a que estuvo presente en un 100% en las muestras analizadas y ha demostrado ser vital para la colonización, ya que en estudios realizados se demostró que mutaciones del mismo ocasionan que *Campylobacter* no pueda infectar aves, *dnjaJ* y *racR*, intervienen en los procesos de adaptación al microambiente intestinal, factores muy importantes dentro de la supervivencia de *Campylobacter*, ya que se ha demostrado que mutaciones en estos genes disminuyen severamente la colonización en aves; por otro lado, la importancia de los genes implicados en la invasión como *virB11*, *ciaB*, *pldA*, radica en que estos son los encargados de producir internalización, además de poder afectar los mecanismos de defensa del hospedador, aumentando así el potencial invasivo, mutaciones en estos genes han demostrado reducir significativamente la invasión de *Campylobacter* en las células intestinales; en estos genes se observó una expresión considerable, mayor al 50%, lo que podría deducirse como cepas bastante invasivas para las células intestinales, aunque también podría atribuirse al no tener un número considerable de muestras para poder obtener otras estimaciones, en otros análisis realizados, la prevalencia no fue tan alta para estos genes, lo cual podría correlacionarse con el hecho de que la invasión según Silva (2011) suele causar daño celular en el intestino, ocasionando sintomatología, como es el caso de reservorios, por lo general no suelen presentar cuadro clínico, lo cual podría explicar dichos resultados.

Además, cabe destacar un dato muy importante como es el predominio en la expresión de los genes implicados tanto en adherencia como invasión en la especie *C. jejuni*, información que explica perfectamente la mayor prevalencia de esta especie en las muestras

de materia fecal y vísceras, ya que implicaría que son cepas con mayor capacidad de adherencia, colonización e invasión de enterocitos, logrando así adaptarse fácilmente en el reservorio ejerciendo su acción como comensal o patógeno, ocasionando en el último caso un cuadro clínico, lo contrario que podría ocurrir con las cepas que no expresan todos los genes, causando pacientes asintomáticos, o que presenten la enfermedad de manera leve.

El análisis estadístico utilizando la correlación de Pearson (tabla 8), demostró importantes correlaciones positivas entre algunos genes de virulencia. En el caso del gen *racR*, se pudo observar una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con *dnjaJ* implicado con el proceso de adherencia y colonización, lo cual podría estar explicado por el hecho de que ambos genes según Quetz (2012), se encuentran relacionados con las señales para el control de estrés y adaptación de *Campylobacter* a la temperatura del hospedador, así como también se correlaciona con *ciaB*, gen implicado con la invasión, el cual según Bolton (2015), estaría además implicado en procesos de colonización. Sin embargo, para el resto de genes no se observó una correlación estadísticamente significativa entre sí, ni tampoco asociados con la especie ($p > 0.05$).

Tabla 8

Comparación de las correlaciones de Pearson para genes de virulencia detectados en especies de Campylobacter a partir de materia fecal de aves, perros y vísceras.

		Gen-cadF	Gen-dnjaJ	Gen-racR	Gen-virB11	Gen-ciaB	Gen-pldA	Especies de Campylobacter	humanos y animales
		(adherencia -colonización)			(invasión)				
Gen-cadF (adherencia - colonización)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29
Gen-dnjaJ (adherencia- colonización)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	. ^b 29	1 29	,521** 29	-,052 29	,341 29	-,204 29	,347 29	. ^b 29
Gen-racR (adherencia- colonización)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	. ^b 29	,521** 29	1 29	-,228 29	,468* 29	-,173 29	-,155 29	. ^b 29
Gen-virB11 (invasión)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	. ^b 29	-,052 29	-,228 29	1 29	-,016 29	,025 29	,286 29	. ^b 29
Gen-ciaB (invasión)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	. ^b 29	,341 29	,468* 29	-,016 29	1 29	-,012 29	-,139 29	. ^b 29
Gen-pldA (invasión)	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	. ^b 29	-,204 29	-,173 29	,025 29	-,012 29	1 29	-,008 29	. ^b 29
Especies de Campylobac ter	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	. ^b 29	,347 29	-,155 29	,286 29	-,139 29	-,008 29	1 29	. ^b 29
humanos y animales	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29	. ^b 29

Nota. **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

a. humanos y animales = animales y vísceras

b. No se puede calcular porque, como mínimo, una de las variables es constante.

Conocer cuáles son los mecanismos de virulencia de *Campylobacter spp*, puede ayudar a entender el cómo se produce la enfermedad tanto en humanos, como en animales en ciertas ocasiones, el determinar el potencial patogénico de esta bacteria nos permitirá implementar medidas para disminuir la campylobacteriosis en la comunidad, haciendo hincapié en los protocolos de higiene en el hogar para evitar la contaminación de animales de compañía, así como también una correcta cocción de los alimentos, lavado de manos, frutas y vegetales, también aplicar mayor control en la cadena de producción avícola, mantención de la cadena de frío, factores que pueden predisponer a una contaminación; aplicando correctamente estas medidas se pueden contribuir a que los cuadros de una gastroenteritis por *Campylobacter* sean más escasos dentro de la comunidad.

Conclusiones

De las 29 cepas de *Campylobacter*, aisladas desde materia fecal de aves de corral, perros y vísceras (hígados), los resultados indican alta prevalencia de los factores de virulencia, tanto en los genes implicados en mecanismos de adherencia como invasión. Las cepas de *C.jejuni*, mostraron mayor expresión de todos los genes antes mencionados, ocasionando a su vez cepas más capaces para adaptarse y sobrevivir, mostrando como consecuencia, una alta prevalencia de esta especie, lo cual es similar a la epidemiología mostrada en diversos lugares del Ecuador, datos que brindan información vital en el control y vigilancia de estos patógenos en nuestro medio, y además sentando precedentes para futuras investigaciones.

Recomendaciones

- Identificar cuáles son los principales reservorios de *Campylobacter spp*, sobre todo las especies termófilas que son las más comunes, para de esa manera poder reconocer los potenciales focos de infección, ya sea en animales de compañía, carne de pollo, bovinos u otras especies.
- Se podrían realizar estudios complementarios en la industrialización de diferentes tipos de carnes para poder determinar la presencia de *C. jejuni* y *C. coli*, para de esta manera evaluar el riesgo en la salud pública.
- Implementar medidas más rigurosas en cuanto a la higiene en la cadena de producción de carnes, para evitar contaminación cruzada en productos y subproductos.
- Proporcionar a los animales de compañía un buen cuidado, ya que en algunos casos podrían ser una fuente de contaminación de manera especial a los niños.

Referencias

- Acha, P., & Szyfres, B. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. In R. Shelton (Ed.), *Bacteriosis y Micosis* (3a edición, Vol. 1, Issue 580). Organización Panamericana de la Salud.
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/Acha-Zoonosis-Spa.pdf>
- Acosta, M., Cañizá, M. J., Romano, M., & Araujo, E. (2007). Síndrome de Guillain Barre. *Revista de Posgrado de La Vía Cátedra de Medicina*, 168, 15–18.
https://med.unne.edu.ar/revistas/revista168/3_168.pdf
- Álvarez, M., Buesa, J., Castillo, J., & Vila, J. (2008). *Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales* (E. Cercenado & R. Cantón (eds.)).
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>
- Aslantaş, Ö. (2019). Isolation and molecular characterization of thermophilic *Campylobacter* spp. in dogs and cats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25(3), 341–348.
<https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20952>
- Bhunja, A. (2018). Foodborne Microbial Pathogens. In Springer (Ed.), *Food Science Text Series* (2nd ed., Issue 0). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1>
- Blamey, R. (2014). Meningitis bacteriana aguda. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 534–540. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(14\)70067-7](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(14)70067-7)
- Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, 48, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017>
- Cáceres, P. (2013). Determinación de genes asociados a virulencia en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde pollos broilers, alimentos derivados de aves y de

pacientes humanos. [Universidad de Chile]. In *Anales de la Universidad de Chile* (Vol. 0, Issues 97–98). <https://doi.org/10.5354/0717-8883.1955.11040>

Calderón, E. (2006). *Determinación de Campylobacter sp en la carne, vísceras, y heces, de pollos de engorde de un rastro artesanal en la ciudad Capital de Guatemala* [Título de pregrado]. Universidad de San Carlos de Guatemala. [http://www.repositorio.usac.edu.gt/4128/1/Tesis Med Vet Ericka María Calderón Suárez.pdf](http://www.repositorio.usac.edu.gt/4128/1/Tesis%20Med%20Vet%20Ericka%20María%20Calderón%20Suárez.pdf)

Cervantes, E., & Cravioto, A. (2007). Campylobacter y enfermedades asociadas. *Revista Facultad Medicina UNAM*, 50(1), 31–35. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2007/un071j.pdf>

Chansiripornchai, N., & Sasipreeyajan, J. (2009). PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilities of adhesion to and invasion of INT-407 cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(6), 839–844. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.839>

Chinillach, M. (2017). *Prevalencia de Salmonella spp. y Campylobacter spp. a lo largo de la cadena de sacrificio de porcino en mataderos de la Comunidad Valenciana* [Universidad Cardenal Herrera - CEU]. <http://hdl.handle.net/10637/8579>

Chlebicz, A., & Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>

Cho, H. H., Kim, S. H., Min, W., Ku, B. K., Kim, J. H., & Kim, Y. H. (2014). Characterization of antimicrobial resistance and application of RFLP for epidemiological monitoring of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from dogs and humans in Korea. *Korean Journal of Veterinary Research*, 54(2), 91–99. <https://doi.org/10.14405/kjvr.2014.54.2.91>

- Cróinín, T. Ó., & Backert, S. (2012). Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni* : trigger or zipper mechanism? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(March), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00025>
- Denis, M., Chidaine, B., Laisney, M. J., Kempf, I., Rivoal, K., Mégraud, F., & Fravallo, P. (2008). Comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry, pig and *Campylobacter* human infections in Brittany, France. *Pathologie Biologie*, 57(1), 23–29.
<https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.04.007>
- EFSA, & ECDC. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. In *EFSA Journal* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- Epps, S. V. R., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips, T. D., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2013). Foodborne *Campylobacter*: Infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6292–6304.
<https://doi.org/10.3390/ijerph10126292>
- Espinosa, L., Varela, C., Martínez, E. V., & Cano, R. (2014). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2008-2011 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal*, 22(11), 130–136. <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/889/1070>
- Fernández, H. (2011). *Campylobacter* y campylobacteriosis: una mirada desde América del Sur. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(1), 121–148.
- Ge, Z., Schauer, D. B., & Fox, J. G. (2008). Microreview In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cellular Microbiology*, 10(June), 1599–1607.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01173.x>
- Ghorbanalizadgan, M., Bakhshi, B., Lili, A. K., Najar-peerayeh, S., & Nikmanesh, B. (2014). A

- Molecular Survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Virulence and Diversity. *Iranian Biomedical Journal*, 18(3), 158–164. <https://doi.org/10.6091/ibj.1359.2014>
- Gölz, G., Rosner, B., Hofreuter, D., Josenhans, C., Kreienbrock, L., Löwenstein, A., Schielke, A., Stark, K., Suerbaum, S., Wieler, L. H., & Alter, T. (2014). Relevance of *Campylobacter* to public health-The need for a One Health approach. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.015>
- González, M. J., & Alonso, M. (2013). Incidencia y sensibilidad de *Campylobacter jejuni* en pacientes pediátricos: Implicación en bacteriemia. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 26(2), 92–96.
- González, P. (2018). *Epidemiología descriptiva de la gastroenteritis por Campylobacter en Castellón* [Universitat Jaume I]. http://repositori.uji.es/xmlui/bitstream/handle/10234/176559/TFG_2018_GonzalezLopezPaula.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Grant, K. A., Belandia, I. U., Dekker, N., Richardson, P. T., & Park, S. F. (1997). Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infection and Immunity*, 65(4), 1172–1180. <https://doi.org/10.1128/iai.65.4.1172-1180.1997>
- Gutiérrez, V. R., Osorio, L. G., & García, N. V. (2015). *Campylobacter* spp . in poultry products and its impact in public health. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 203–213. <http://www.scielo.org.co/pdf/cmvez/v10n2/v10n2a12.pdf>
- Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., & Pasmans, F. (2011). Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*, 42(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-82>

- Hernández, C., Arreola, M. G., & Castro, G. (2013). Campylobacter jejuni: ¿una bacteria olvidada? Situación en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(2), 77–84. http://www.amimc.org.mx/revista/2013/33_2/campylobacter.pdf
- Iovine, N. (2013). Resistance mechanisms in Campylobacter jejuni. *Virulence*, 4(3), 230–240. <https://doi.org/10.4161/viru.23753>
- Janssen, R., Krogfelt, K. A., Cawthraw, S. A., Pelt, W. Van, Wagenaar, J. A., & Owen, R. J. (2008). Host-Pathogen Interactions in Campylobacter Infections: the Host Perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 505–518. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-07>
- Josefsen, M. H., Löfström, C., Hansen, T. B., Christensen, L. S., Olsen, J. E., & Hoorfar, J. (2010). Rapid quantification of viable Campylobacter bacteria on chicken carcasses, using real-time pcr and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5097–5104. <https://doi.org/10.1128/AEM.00411-10>
- Lacharme-Lora, L., Chaloner, G., Gilroy, R., Humphrey, S., Gibbs, K., Jopson, S., Wright, E., Reid, W., Ketley, J., Humphrey, T., Williams, N., Rushton, S., & Wigley, P. (2017). B lymphocytes play a limited role in clearance of Campylobacter jejuni from the chicken intestinal tract. *Scientific Reports*, 7(November 2016), 2–11. <https://doi.org/10.1038/srep45090>
- Lapierre A., L. (2013). Factores de virulencia asociados a especies zoonóticas de Campylobacter spp. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 28(1), 25–31. <https://doi.org/10.5354/0716-260x.2013.27866>
- Lastovica, A., On, S., & Zhang, L. (2014). The prokaryotes: Deltaproteobacteria and epsilonproteobacteria. In *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria* (Vol. 9783642390, pp. 1–30). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9>

- Lee, M. D., & Newell, D. G. (2006). *Campylobacter* in Poultry: Filling an Ecological Niche. *Avian Diseases*, 50(1), 1–9. <https://doi.org/10.1637/7474-111605r.1>
- Litardo, V. (2019). *Síndrome de Reiter* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/12269>
- Lucas L., J., Vilca, M., & Ramos, D. (2013). Presencia de *Campylobacter* spp. en canales y ciegos de pollos de engorde en Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 24(3), 346–352. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i3.2583>
- Malbrán, C. (2001). Manuel de Procedimientos de *Campylobacter*. In *Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas*.
- Man, S. M. (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8(12), 669–685. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.191>
- Manzanillas, A. (2012). *Determinación de la presencia de Campylobacter spp. en perros con sintomatología clínica de diarrea en las clínicas veterinarias de la ciudad de Loja y el Hospital Docente Veterinario de la UNL*. Universidad Nacional de Loja.
- Mardones, G. P., & López, J. M. (2017). Implicancias de *Campylobacter* spp. como patógeno alimentario. *Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 33(1), 73–83.
- Martínez, M. (2009). *Estudio de diferentes estrategias encaminadas a la disminución de la incidencia de Campylobacter spp. en la cadena alimentaria*. [Universidad Autónoma de Madrid]. [https://digital.csic.es/bitstream/10261/101564/1/incidencia de Campylobacter.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/101564/1/incidencia%20de%20Campylobacter.pdf)
- Martiny, D., Dediste, A., Debruyne, L., Vlaes, L., Haddou, N. B., Vandamme, P., & Vandenberg, O. (2010). Accuracy of the API Campy system, the Vitek 2 Neisseria – Haemophilus card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the

identification of *Campylobacter* and related organisms. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), 1001–1006. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03328.x>

Mata, M. (2014). *Resistencia a antimicrobianos y caracterización de factores de virulencia de cepas de Campylobacter spp. aisladas de pavos*. [Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/145134/Resistencia-a-antimicrobianos-y-caracterizacion-de-factores-de-virulencia-de-cepas-de-Campylobacter-spp-aisladas-de-pavos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Narváez, I. (2015). *Prevalencia de las especies termotolerantes de Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. coli, C. lari y C. upsaliensis) en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros, durante el período Septiembre - Diciembre 2014*. [Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/13189>

Narváez, N. (2017). *Análisis de polimorfismos del gen flaA en cepas de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli mediante la técnica RFLP* [Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/21637>

Pérez, D. (2014). Estudio de las poblaciones de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas en etapas iniciales de la producción de pollo de engorde en España: relaciones con cepas de origen clínico. In *Universidad Complutense de Madrid*. Universidad Complutense de Madrid.

Poma, V. (2014). *Aislamiento y Tipificación molecular de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli en contenido cecal de pollos faenados en camales industriales en la provincia de Pichincha*. [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6610/1/T-UCE-0014-008.pdf>

Quetz, J. da S., Lima, I. F. N., Havt, A., Prata, M. M. G., Cavalcante, P. A., Medeiros, P. H. Q. S., Cid, D. A. C., Moraes, M. L., Rey, L. C., Soares, A. M., Mota, R. M. S., Weigl, B. H., Guerrant,

- R. L., & Lima, A. A. M. (2012). Campylobacter jejuni infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 61(4), 507–513. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.040600-0>
- Samie, A., Ramalivhana, J., Igumbor, E. O., & Obi, C. L. (2007). Prevalence, haemolytic and haemagglutination activities and antibiotic susceptibility profiles of Campylobacter spp. isolated from human diarrhoeal stools in Vhembe District, South Africa. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 25(4), 406–413. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v25i4.619>
- Shams, S., Ghorbanalizadgan, M., Mahmmodi, S. H., & Piccirillo, A. (2017). Evaluation of a Multiplex PCR Assay for the Identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Infect Epidemiol Med*, 3(1), 6–8. <https://doi.org/10.18869/modares.iem.3.1.6>
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., & Teixeira, P. (2011). Campylobacter spp. As a foodborne pathogen: A review. *Frontiers in Microbiology*, 2(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>
- Simaluiza, R., Toledo, Z., & Fernández, H. (2018). Prevalencia y caracterización del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli en niños con diarrea de la ciudad de Loja, Ecuador. *Revista Chilena de Infectología*, 35(2), 213–215. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000200213>
- Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L., & Rautelin, H. I. K. (2016). Campylobacteriosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.019>
- Solís, L. (2011). *Prevalencia y Suceptibilidad a antimicrobianos de Campylobacter jejuni y C. coli aislados de alimentos mediante el desarrollo de un método rápido*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Soto, S. M. (2006). Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(8), 479–480. <https://doi.org/10.1157/13092461>
- Talukder, K. A., Aslam, M., Islam, Z., Azmi, I. J., Dutta, D. K., Hossain, S., Nur-e-kamal, A., Nair, G. B., Cravioto, A., Sack, D. A., & Endtz, H. P. (2008). Prevalence of Virulence Genes and Cytolethal Distending Toxin Production in *Campylobacter jejuni* Isolates from Diarrheal Patients in Bangladesh □. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1485–1488. <https://doi.org/10.1128/JCM.01912-07>
- Toplak, N., Kovač, M., Piskernik, S., Možina, S. S., & Jeršek, B. (2012). Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 112(4), 752–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05235.x>
- Trindade, M. M., Perdoncini, G., Sierra-Arguello, Y. M., Lovato, M., Borsoi, A., & Nascimento, V. P. (2015). Detecção dos genes codificantes da toxina CDT, e pesquisa de fatores que influenciam na produção de hemolisinas em amostras de *Campylobacter jejuni* de origem avícola. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 35(8), 709–715. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2015000800002>
- Ugarte, M. (2015). *Detección y caracterización de Campylobacter procedentes de animales, alimentos y agua residual*. Universidad Complutense de Madrid.
- Vasco, G., Trueba, G., Atherton, R., Calvopiña, M., Cevallos, W., Andrade, T., Eguiguren, M., & Eisenberg, J. N. S. (2014). Identifying etiological agents causing diarrhea in low income Ecuadorian communities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3), 563–569. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0744>
- Vasco, K., Graham, J. P., & Trueba, G. (2016). Detection of zoonotic enteropathogens in children

and domestic animals in a semirural community in Ecuador. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4218–4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.00795-16>

Velge, P., & Roche, S. M. (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence. *Review Future Microbiology*, 48(5), 1799–1821. <https://doi.org/10.2217/FMB.10.134>

Whiley, H., Akker, B. Van Den, Giglio, S., & Bentham, R. (2013). The Role of Environmental Reservoirs in Human Campylobacteriosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 5886–5907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10115886>

Young, K. T., Davis, L. M., & DiRita, V. J. (2007). Campylobacter jejuni: Molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 5(9), 665–679. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1718>

Young, K. T., Dirita, V., & Davis, L. (2007). Campylobacter jejuni: Molecular biology and pathogenesis. *Natural Reviews Microbiology*, 5, 665–679. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1718>

Apéndices

Apéndice 1: Protocolo de amplificación de *Campylobacter* mediante Gotaq® Flexi DNA Polymerase.

REACTIVOS

Buffer

dNTPs

MgCl₂

Taq Polimerasa

Agua destilada desionizada estéril

Cebadores

MATERIALES Y EQUIPOS

Tubos eppendorf estériles

Tubos de PCR estériles

Vórtex

Microcentrífuga

Termociclador

Puntas y micropipetas

PROCEDIMIENTO

1. Esterilizar el área de trabajo y preparar todos los reactivos, muestras y materiales a utilizar, descongelar tanto reactivos como muestras.
2. En un tubo eppendorf, realizar el master mix, con las cantidades establecidas para la PCR, a excepción del DNA.

Componentes	Cantidades
Buffer	5 μ l
MgCl ₂	4 μ l
dNTPs	0.5 μ l
Primer	0.5 μ l
Taq	0.1 μ l
DNA	1.5 μ l
Volumen final de reacción	25 μ l

NOTA. La *Taq Polimerasa*, se debe agregar al final del master mix y hasta entonces debe mantenerse en congelación.

- Homogenizar el mix y luego se coloca en la centrifuga por unos segundos para juntar las gotas esparcidas en el tubo.
- Dependiendo de la cantidad de DNA a colocar en el tubo para PCR, tomar alícuotas del mix; en este caso, teniendo un volumen final de 25 μ l, con cantidad de 1,5 μ l de DNA, las alícuotas correspondientes a cada tubo serán de 23,5 μ l, posteriormente se adiciona a cada tubo el volumen de DNA ya mencionado.

NOTA: Es importante trabajar con un blanco, es decir una alícuota de mix sin DNA, para asegurar que la reacción esté libre de contaminantes, un control positivo, en el cual se coloca el DNA de una cepa que se conoce posee los genes a amplificar y control negativo.

- Condiciones para el termociclador:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	95°C	6 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	30
Anillamiento	Específico para cada gen		
Extensión	72°C	30 segundos	30
Extensión final	72°C	5 minutos	1

6. Una vez finalizado el proceso de amplificación en el termociclador, las muestras se procederán a correr en una electroforesis, o caso contrario, deben ser almacenadas a 4°C hasta que vayan a utilizarse.

Apéndice 2: Protocolo de amplificación de *Campylobacter* por Platinum Multiplex

PCR Master Mix

REACTIVOS

Platinum Multiplex PCR Master Mix

Agua destilada desionizada estéril

Cebadores

Colorante TrackIt™ Cyan/Orange Loading Buffer

MATERIALES Y EQUIPOS

Tubos eppendorf estériles

Tubos de PCR estériles

Vórtex

Microcentrífuga

Termociclador

Puntas y micropipetas

PROCEDIMIENTO

1. Esterilizar el área de trabajo y preparar todos los reactivos, muestras y materiales a utilizar, descongelar tanto reactivos como muestras.
2. En un tubo eppendorf, realizar el master mix, con las cantidades establecidas para la PCR, a excepción del DNA.

Componentes	Cantidades
Platinum Multiplex PCR Master Mix	7.5 µl
GC Enhancer	1.8 µl
Primer	0,5 µl
DNA	3 µl
Volumen final de reacción	15 µl

3. Homogenizar el mix y luego se coloca en la centrifuga por unos segundos para juntar las gotas esparcidas en el tubo.
4. Dependiendo de la cantidad de DNA a colocar en el tubo para PCR, tomar alícuotas del mix; en este caso, teniendo un volumen final de 15 μ l, con cantidad de 3 μ l de DNA, las alícuotas correspondientes a cada tubo serán de 12 μ l, posteriormente se adiciona a cada tubo el volumen de DNA ya mencionado.

NOTA: Es importante trabajar con un blanco, es decir una alícuota de mix sin DNA, para asegurar que la reacción esté libre de contaminantes, un control positivo, en el cual se coloca el DNA de una cepa que se conoce posee los genes a amplificar y control negativo.

5. Condiciones para el termociclador:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	95°C	2 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	
Anillamiento	Específico para cada gen		
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

6. Una vez finalizado el proceso de amplificación en el termociclador, las muestras se procederán a correr en una electroforesis, o caso contrario, deben ser almacenadas a 4°C hasta que vayan a utilizarse.

Apéndice 3: Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa

REACTIVOS

Agarosa Ultrapura

Buffer TBE 1X (para gel y para correr)

Gel RED 3X en agua

Marcador de peso molecular

MATERIALES Y EQUIPOS

Micropipeta 1-10ul y puntas

Matraz Erlenmeyer 250ml

Espátula

Probeta de 50 ml

Balanza analítica

Contenedor del gel y peine

Plato calefactor

Cubeta de electroforesis y fuente de poder

Transiluminador UV

PROCEDIMIENTO

1. Mezclar en una probeta, 29,94 ml de TBE 1x y 14,91 ml de Gel Red, homogenizar, colocar en un Matraz Erlenmeyer de 250ml, y luego adicionar la agarosa, para calcular la cantidad de la misma, se realiza un cálculo explicado a continuación.

Electroforesis en Gel de Agarosa 0.5% vol. 45ml

1.5 g

100 ml

x

45 ml

= 0.675 g de agarosa

NOTA. Al momento de realizar la mezcla de TBE 1x y el gel red en la probeta, apagar la luz, ya que el gel red es una sustancia fotosensible.

2. Colocar el matraz en el plato calefactor e ir homogenizando suavemente hasta que llegue al punto de ebullición, retirar del calor y posteriormente verter la solución en el contenedor de gel, colocar el peine.
3. Una vez que el gel este solidificado, retirar el peine, colocarlo en la cubeta para electroforesis y verter el buffer de corrida (TBE 1X), de modo que queden cubiertos los pocillos del gel.
4. Cagar los pocillos con los productos de la PCR, el blanco, controles y el marcador de peso molecular.

NOTA. En el caso de que los productos para la PCR sean incoloros, es necesario añadir un colorante para poder observar el recorrido de los genes.

5. Programar las condiciones de corrida en la fuente de poder: 120 V, 45 min, 300 mA.
6. Una vez finalizada la electroforesis, con la ayuda de un transiluminador UV visualizar el gel y hacer un registro fotográfico de las bandas obtenidas.