



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

## **ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Análisis de polimorfismos del gen *flaA* en cepas de *Campylobacter jejuni* y  
*Campylobacter coli* mediante la técnica RFLP**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**AUTORA:** Narváez Román, Nicole Alejandra

**DIRECTORA:** Simaluiza Masabanda, Rosa Janneth, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2018



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-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>*

2018

## APROBACIÓN DEL DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgr.

Rosa Janneth Simaluiza Masabanda

**DONCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **Análisis de polimorfismos del gen *flaA* en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* mediante la técnica RFLP**, realizado por **Nicole Alejandra Narváez Román**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, enero del 2018

f) \_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo **Nicole Alejandra Narváez Román**, declaro ser autor(a) del presente Trabajo de Titulación: Análisis de polimorfismos del gen *flaA* en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* mediante la técnica RFLP, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Janneth Simaluiza Masabanda director(a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo de carácter investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “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”.

f. \_\_\_\_\_

Autora: Nicole Alejandra Narváez Román

Cédula: **0704692649**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico a mis padres, quienes supieron guiarme y motivarme para continuar con mis estudios y cumplir todas las metas que me propuse.

Nicole N.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mis padres la confianza, el apoyo y la dedicación que pusieron en mí para darme un regalo que no tiene precio, mi educación. A toda mi familia, con la cual siempre conté.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por acogerme a lo largo de este proceso de formación profesional y personal.

A mi directora de trabajo de titulación, la Mgtr. Janneth Simaluiza quien fue un importante apoyo en la culminación de este trabajo. También especial mención al Doctor Heriberto Fernández por compartir su conocimiento sobre este interesante tema y a la Mgtr. Zorayda Toledo por abrirme las puertas en el mundo de la microbiología y permitirme formar parte de este bonito proyecto.

Al grupo de trabajo de microbiología y amigos de laboratorio, particularmente a Jimmy por toda la ayuda y paciencia durante este tiempo.

Nicole N.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA .....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR(A) DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
CAPÍTULO I .....	5
MARCO TEÓRICO .....	5
<b>1.1. Taxonomía de la Familia <i>Campylobacteraceae</i></b> .....	6
1.1.1. Género <i>Campylobacter</i> .....	7
1.1.1.1. <i>Campylobacter jejuni</i> .....	9
1.1.1.2. <i>Campylobacter coli</i> .....	10
<b>1.2. Campilobacteriosis</b> .....	11
1.2.1. Síndrome de Guillain – Barre (SGB) .....	12
1.2.2. Artritis reactiva (AR) .....	12
1.2.3. Meningitis .....	13
1.2.4. Bacteremia .....	13
1.2.5. Enfermedad intestinal inflamatoria .....	13
<b>1.3. Patogenia</b> .....	14
1.3.1. Flagelo .....	14
1.3.2. Toxina Citoletal de Distensión (CDT) .....	15
1.3.3. Capa superficial .....	15
1.3.4. Formación de Biopelículas .....	15
<b>1.4. Diagnóstico clínico</b> .....	17
1.4.1. Metodologías de aislamiento .....	17
1.4.2. Metodologías de identificación bioquímica .....	18
1.4.3. Metodologías de identificación molecular .....	18
<b>1.5. Epidemiología</b> .....	19
1.5.1. Principales fuentes de infección y transmisión .....	20
1.5.2. Aves de corral .....	21

1.5.3.	Cerdos.....	22
1.5.4.	Animales domésticos.....	22
1.5.5.	Alimentos y agua contaminada.....	22
<b>1.6.</b>	<b>Tratamiento y Resistencia a antimicrobianos en <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i></b> .....	<b>23</b>
1.6.1.	Resistencia a Fluoroquinolonas.....	24
1.6.2.	Mecanismos moleculares de resistencia a quinolonas (fluoroquinolonas).....	24
<b>1.7.</b>	<b>Aplicación de la técnica de RFLP en el estudio de la campilobacteriosis</b> .....	<b>26</b>
1.7.1.	Tipificación de cepas de <i>Campylobacter</i> por RFLP-PCR del gen <i>flaA</i> .....	27
1.7.2.	Otras Técnicas de tipificación en el estudio de <i>Campylobacter</i> spp.....	28
1.7.3.	Técnica de PFGE ( <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ).....	28
1.7.4.	Técnica de SVR ( <i>Short Variable Region</i> ).....	29
1.7.5.	Técnica de MLST ( <i>Multilocus Sequence Typing</i> ).....	29
<b>CAPÍTULO II</b>	.....	<b>30</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	.....	<b>30</b>
2.1.	Cepas bacterianas.....	31
2.2.	Extracción del ADN.....	31
2.3.	Amplificación del gen <i>flaA</i> mediante PCR.....	31
2.4.	Digestión con enzimas de restricción (RFLP).....	32
2.5.	Comparación de los patrones genéticos.....	32
<b>CAPÍTULO III</b>	.....	<b>33</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	.....	<b>33</b>
3.1.	Patrones genéticos obtenidos.....	34
3.2.	Discusión.....	40
<b>CONCLUSIONES</b>	.....	<b>47</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	.....	<b>48</b>
<b>REFERENCIAS</b>	.....	<b>49</b>
<b>ANEXOS</b>	.....	<b>58</b>
<b>ANEXO 1:</b>	Protocolo de Extracción de ADN Genómico de Bacterias Gram negativas ....	59
<b>ANEXO 2:</b>	Protocolo de Amplificación del gen <i>flaA</i> mediante PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	61
<b>ANEXO 3:</b>	Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa – PCR.....	63
<b>ANEXO 4:</b>	Protocolo de Tipificación del gen <i>flaA</i> de <i>Campylobacter</i> por RFLP ( <i>Fragment Length Polymorphism Analysis</i> ).....	65
<b>ANEXO 5:</b>	Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa – RFLP.....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Cepas de *Campylobacter* de estudio.

**Tabla 2.** Condiciones para la amplificación del gen *flaA*.

**Tabla 3.** Patrones genéticos de las muestras estudiadas.

**Tabla 4.** Patrones genéticos según las especies de estudio.

**Tabla 5.** Cepas de *C. jejuni* y *C. coli* con el mismo patrón de bandas aisladas de distintas fuentes.

**Tabla 6.** Adquisición de resistencia a FQ en cepas de *C. jejuni* y *C. coli*.

**Tabla 7.** Reportes de la prevalencia de *Campylobacter* y datos de resistencia a fluoroquinolonas.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Imágenes de los diferentes estados morfológicos de *Campylobacter* spp.
- Figura 2.** Mecanismo de patogénesis de *Campylobacter* spp.
- Figura 3.** Protocolo de pruebas bioquímicas para el aislamiento de *Campylobacter* spp.
- Figura 4.** Mecanismos de resistencia a quinolonas.
- Figura 5.** PCR – RFLP – *flaA*.
- Figura 6.** Dendrograma de cepas de *C. jejuni* de origen humano y de reservorios animales.
- Figura 7.** Dendrograma de cepas de *C. coli* de origen humano y de reservorios animales.

## RESUMEN

La campilobacteriosis es una enfermedad que afecta al tracto gastrointestinal, ocasionada generalmente por *C. jejuni* y *C. coli*. Se analizaron 116 cepas de *Campylobacter* (87 *C. jejuni* y 29 *C. coli*) procedentes de heces de humanos y reservorios animales (vacas, cerdos, perros y gallinas). Las cepas se subtipificaron por PCR – RFLP del gen *flaA*; la digestión con la enzima de restricción *Ddel* generó 56 patrones genéticos diferentes. El número de patrones identificados fueron: humanos (22), vacas (11), cerdos (4), perros (7) y gallinas (19). Se observaron patrones idénticos entre cepas procedentes de los reservorios animales y humanos, así como diferentes perfiles de susceptibilidad a fluoroquinolonas en cepas con iguales patrones genéticos. Estos resultados sugieren que existe una diversidad de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* importante, cuya transmisión es dinámica hacia el ser humano a partir de los reservorios animales estudiados, además de la diseminación de cepas que han adquirido resistencia a fluoroquinolonas. Las fuentes y vías de transmisión de *Campylobacter* son poco conocidas en Ecuador, planteándose determinar si existe una posible relación epidemiológica entre las cepas de estudio.

**Palabras clave:** *Campylobacter*, RFLP, fluoroquinolonas, vías de transmisión.

## ABSTRACT

Campylobacteriosis is a disease that affects to the gastrointestinal tract, caused generally by *C. jejuni* and *C. coli*. 116 strains of *Campylobacter* (87 *C. jejuni* and 29 *C. coli*) from feces of humans and from animal reservoirs (cows, pigs, dogs and chickens) were analyzed. The strains were subtyped by PCR – RFLP of *flaA* gene; digestion with the restriction enzyme *DdeI* resulted in 56 different genetic patterns. The number of identified patterns were: humans (22), cows (11), pigs (4), dogs (7) and chickens (19). Identical patterns were observed between strains from animal reservoirs and humans, as well as different susceptibility profiles to fluoroquinolones in strains with the same genetic patterns. These results suggest that exist an important diversity of strains of *C. jejuni* and *C. coli*, whose transmission is dynamic towards the human from animal reservoirs studied, as well as the dissemination of strains that have acquired resistance to fluoroquinolones. The sources and transmission pathways of *Campylobacter* are little known in Ecuador, considering determining if there is a possible epidemiological relationship between the studied strains.

**Key words:** *Campylobacter*, RFLP, fluoroquinolones, transmission pathways.

## INTRODUCCIÓN

La campilobacteriosis es una infección intestinal ocasionada por especies del género *Campylobacter*, de las cuales *C. jejuni* y *C. coli* son los agentes productores de la enfermedad más frecuentemente aislados, con reportes de tasas de incidencia de un 90% y 10% respectivamente en países de todo el mundo (Gillespie *et al.*, 2002). No obstante, también se ha evidenciado que *C. coli* puede llegar a ser más prevalente en países Latinoamericanos (25%) que en países industrializados (5 – 10%), quizás por el hecho de que exista una población portadora sana significativa, la cual constituye un riesgo para la transmisión de estas especies, siendo la población infantil la de mayor riesgo de adquirir la enfermedad (Fernández, 2011; Havelaar *et al.*, 2009).

La gastroenteritis producida por estas bacterias se manifiesta generalmente de forma leve, cursando con una diarrea, dolor abdominal y malestar general que no se extienden por más de una semana. En casos más severos, los síntomas pueden manifestarse de manera abrupta, a menudo con dolor abdominal intenso seguido de una diarrea profusa que puede contener moco y/o sangre, fiebre, náuseas, vómito, dolor de cabeza, mialgia y rigidez. La enteritis inflamatoria que se origina puede afectar el colon y el recto evidenciándose sangre en las heces, lo que indica la progresión de la infección hacia estos lugares (Blaser & Engberg, 2008; Allos & Lastovica, 2011).

*Campylobacter* inicia su proceso de colonización en el intestino delgado, la motilidad que le confiere el flagelo le permite trasladarse y colonizar otras zonas como el colon (Black *et al.*, 1988); la invasión celular ocurre con mayor facilidad mediante la producción de citotoxinas capaces de inducir apoptosis; también se ha observado que presenta mecanismos implicados en la evasión de la respuesta inmune (van Deun *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2001).

Pese a que la alta prevalencia de estos patógenos ha sido demostrada en muchos estudios, el reporte de brotes de campilobacteriosis es bajo en relación a otros enteropatógenos con frecuencias de aislamiento similares o incluso inferiores. Esto puede explicarse debido a que en muchos de los casos el individuo afectado pasa por el proceso infeccioso de manera casi asintomática, o con sintomatología leve por lo que no acuden a un centro de salud, además, muchos casos de campilobacteriosis son atribuidos a otros agentes etiológicos. Es por ello, que se estima que entre un 3 – 5% de las campilobacteriosis llegan a ser reconocidos como brotes, en relación con porcentajes mayores de otros patógenos entéricos como *Salmonella* sp. (Ethelberg, Olsen, Gerner & Molbak, 2004).

La campilobacteriosis ocasionada por *C. jejuni* o por *C. coli*, puede ser adquirida mediante la ingesta de alimentos contaminados, especialmente alimentos cárnicos, el agua contaminada con estas bacterias actúa como un vehículo importante en su transmisión; el contacto directo

con animales portadores de las mismas los cuales expulsan las bacterias en sus heces, ya sean animales silvestres o de compañía son un importante factor de riesgo (Lastovica, 2006).

En las infecciones por *Campylobacter* spp. suelen darse diarreas autolimitadas que en la mayoría de los casos no es necesario aplicar un tratamiento farmacológico, sin embargo si son requeridos cuando la infección afecta a individuos inmunosuprimidos, se presenten cuadros clínicos más graves y/o persistentes, o se den infecciones por *Campylobacter* a nivel extraintestinal (Allos, 2001). Los antibióticos de elección en el tratamiento de la campilobacteriosis son los macrólidos en primera línea y las fluoroquinolonas como segunda opción. No obstante, las tasas de resistencia a estos antimicrobianos van en aumento, lo que complica el tratamiento empírico de esta enfermedad (Luangtongkum *et al.*, 2009; Aarestrup & Engberg, 2001).

En los últimos años se ha realizado un gran avance en los procesos de estandarización de metodologías tanto de aislamiento como de identificación de *Campylobacter* a partir de muestras clínicas, sin embargo, debido a las características intrínsecas del mismo género es necesario continuar con esta labor. En su reconocimiento se emplea el estudio macroscópico de las colonias y microscópico de la morfología bacteriana y características de tinción. Para su aislamiento suelen ser necesarios medios de cultivo selectivos, y a partir de las colonias sospechosas se les puede realizar pruebas bioquímicas para una identificación presuntiva por sus características fenotípicas, finalmente la identificación y trabajo con técnicas moleculares permite obtener datos de gran interés (Lastovica, 2006; Vandamme *et al.*, 2005).

El análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) se emplea como un marcador molecular en el análisis genético de muchos microorganismos. Se basa en la amplificación de un gen mediante el uso de la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), para luego mediante el uso de enzimas de restricción, obtener fragmentos de distintas longitudes. La tipificación del gen de la flagelina (*flaA*) ha demostrado ser de gran utilidad en investigaciones epidemiológicas llevadas a cabo con *C. jejuni* y *C. coli* (Wassenaar & Newell, 2000). La diferencia de tamaños de los fragmentos obtenidos viene dada por la variabilidad en la distribución de los lugares de restricción presentes en el gen *flaA* de las distintas cepas en estudio, obteniéndose un patrón de bandas característico de cada cepa (Harrington, Moran, Ridley, Newell & Madden, 2003).

Es así, que el objetivo de este trabajo es estudiar la diversidad genética mediante la técnica de subtipificación RFLP del gen *flaA* a partir de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* procedentes de muestras de humanos y de diferentes reservorios animales en la ciudad de Loja, con el fin de establecer una posible relación epidemiológica.

**CAPÍTULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Taxonomía de la Familia *Campylobacteraceae*

Puede decirse que la primera descripción más acertada sobre especies del género *Campylobacter* fue realizada en 1906 por McFadyean y Stockman, quienes describieron bacterias con una morfología curva que podían aislarse con frecuencia a partir de fetos abortados de ganado ovino (Butzler, 2004).

En 1919, Smith y Taylor encontraron un microorganismo que ocasionaba abortos en bovinos y relacionaron esta bacteria al bacilo curvo de McFadyean y Stockman, dándole el nombre de *Vibrio fetus* (Smith, 1919). En 1931, se aislaron de heces de terneros, bacilos curvos y microaerófilos comprobándose que existía una relación causal entre la presencia de estas bacterias y la diarrea que presentaban los animales. Sin embargo, debido a pequeñas diferencias morfológicas se descartó que fuera *V. fetus* y se le otorgó el nombre de *V. jejuni* (Jones, Orcutt & Little, 1931). Más tarde, Doyle (1948) aisló a partir del intestino de cerdo con disentería bacterias similares a las descritas anteriormente y propuso denominarla *V. coli* (Doyle, 1948).

Sebald y Veron (1963), observaron en sus estudios que estas bacterias curvas (*V. fetus* y *V. bubulus*) llamadas hasta ese momento vibrios, presentaban a nivel de ADN genómico una menor composición en bases G+C, ausencia de metabolismo de carácter fermentativo y un crecimiento bajo condiciones de microaerofilia. Estas características las hacía bacterias notablemente diferentes a otras especies del género *Vibrio*, lo que permitió reclasificarlas en un nuevo género conocido (hasta la actualidad) como *Campylobacter* (Sebald & Veron, 1963).

En 1973, Veron y Chatelain instauraron las bases del actual sistema de clasificación y propusieron los nombres *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter sputorum* y *Campylobacter fetus* (Veron & Chatelain, 1973). Mediante el empleo de pruebas bioquímicas y serológicas, así como el estudio del contenido de G+C en el ADN bacteriano, otras especies microaerófilas reconocidas como vibrios fueron reclasificadas como *Campylobacter* spp. (Veron & Chatelain, 1973), y con los años se sumaron nuevas especies y subespecies descritas.

En la siguiente década la agrupación de *Campylobacter* a otros géneros se realizó basándose en similitudes morfológicas o fisiológicas, pero aún no se habían establecido relaciones filogenéticas, lo que dio paso a continuas reclasificaciones de las especies (Krieg, 1984).

Carl Woese (1987) dio a conocer el término “cronómetro molecular” un concepto que hacía referencia al estudio comparativo de genes ampliamente distribuidos entre diversos organismos, pero funcionalmente conservados (destacándose la subunidad 16S del ARNr

bacteriano) pero que varían gradualmente a través del tiempo para adaptarse a los cambios del ambiente. Es así que en 1989, el estudio del ARNr combinado con rasgos fenotípicos particulares permitió nuevas reclasificaciones, un claro ejemplo es la aparición del género *Helicobacter*, al cual algunas especies como *C. pylori* o *C. mustelae* fueron renombradas y transferidas a éste nuevo género (Goodwin *et al.*, 1989).

Entrada la década de los 90, Vandamme y De Ley (1991) propusieron el género *Arcobacter*, empleando el concepto descrito con anterioridad. Fueron incluidas especies que habían sido clasificadas como *Campylobacter* (*A. nitrofigilis*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. butzleri*). Ambos géneros presentaban muchas características fenotípicas y genotípicas muy similares, lo que a su vez los hacía diferentes de otros géneros dando lugar a su agrupación en una nueva familia llamada *Campylobacteraceae* (Vandamme & De Ley, 1991).

En la actualidad se reconoce que la familia *Campylobacteraceae* comprende un grupo muy diverso de especies patógenas, comensales y de gran distribución en la naturaleza, la cual está conformada principalmente por 4 géneros: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Candidatus* (Lastovica, On & Zhang, 2014).

#### **1.1.1. Género *Campylobacter*.**

El género *Campylobacter* está constituido por bacilos finos gramnegativos, curvos o con tendencia a adoptar forma helicoidal (aunque algunas especies, como *C. showae* son bacilos más rectos), no son formadores de esporas ni productores de pigmentos. Es común observar al microscopio cadenas cortas de estos bacilos formando una “S” o también denominadas “alas de gaviota” (Vandamme, Dewhirst, Paster & On, 2005).

Miden de 0.5 – 5.0 µm de largo y de 0.2 – 0.8 µm de ancho, son bacterias muy móviles (a excepción de *C. gracilis* y *C. hominis* los cuales carecen de flagelo) cuyo movimiento típico es en “sacacorchos” gracias a un flagelo en posición polar localizado en uno o ambos extremos (*C. showae* tiene un haz unipolar de varios flagelos) (Vandamme & De Ley, 1991; Lawson, On, Logan & Stanley, 2001).

La gran mayoría de las especies son microaerófilas, es decir, para poder sobrevivir requieren cantidades de O<sub>2</sub> menores a las que están presentes en el aire (concentraciones óptimas del 5 – 10% y de CO<sub>2</sub> de 3 – 5%), esta dependencia de cantidades reducidas de O<sub>2</sub> se debe a que es requerido por la enzima ribonucleótido reductasa para la síntesis de ADN (Sellars, Hall & Kelly, 2002). No obstante, también se pueden encontrar especies anaerobias localizadas en la cavidad oral como *C. showae*, *C. gracilis*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. mucosalis*, *C. sputorum* y ciertas cepas de *C. hyointestinalis*, algunas de estas especies también

requieren una atmósfera enriquecida en hidrógeno para su óptimo desarrollo (Lee & Newell, 2006; Vandamme & De Ley, 1991).

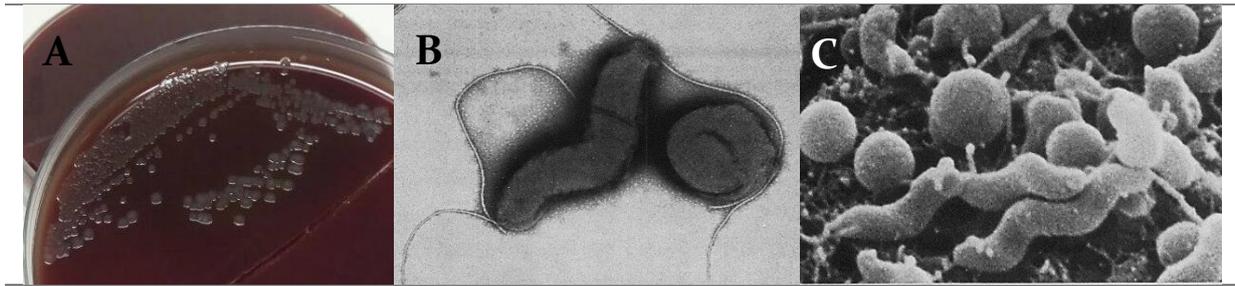
Dependiendo de la especie de *Campylobacter* los niveles de O<sub>2</sub> presentes afectaran a su crecimiento. Sin embargo, por lo general niveles mayores al 15% son tóxicos debido a la formación y acumulación de radicales libres de oxígeno y peróxidos. Es así que estas bacterias son muy susceptibles al estrés oxidativo, lo que dificulta y encarece su aislamiento en comparación con otros patógenos como *E. coli* o *Salmonella sp.* (Lee & Newell, 2006).

La síntesis de distintas reductasas (particularmente de tipo periplásmico) les confiere la capacidad de emplear diferentes aceptores finales de electrones además del oxígeno, como son los nitratos, nitritos, sulfatos, fumarato, dimetil sulfóxido, etc. (Pittman *et al.*, 2007; Sellars *et al.*, 2002). Contribuyendo a la respiración celular y además a la detoxificación de algunas formas reactivas (oxígeno, nitrógeno) (Pittman *et al.*, 2007). Por otra parte, la mayoría de las especies de *Campylobacter* tienen actividad oxidasa (a excepción de *C. gracilis*), la actividad catalasa es débil, pero contribuye a disminuir el daño oxidativo (Lee & Newell, 2006; Vandamme *et al.*, 2005).

En cuanto a su metabolismo, éstas no fermentan carbohidratos, debido a la ausencia de la enzima fosfofructoquinasa, pero sí tienen otras enzimas que participan en la oxidación de la glucosa y en la vía de las pentosas fosfato. Siendo su fuente de energía los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y esencialmente los aminoácidos (serina, aspartato, glutamato, prolina) (Fouts *et al.*, 2005; Velayudhan & Kelly, 2002; Stahl *et al.*, 2011).

*Campylobacter* se desarrolla a temperaturas que oscilan entre los 26 – 42°C, siendo su temperatura óptima la de 37°C para la mayoría de las especies. Para especies consideradas termotolerantes como *C. jejuni* y *C. coli*, su temperatura óptima es de 42°C. Su crecimiento en medios de cultivo sólidos suplementados con sangre se evidencia mediante la formación de colonias pequeñas de color grisáceo, no hemolíticas, con bordes lisos, circulares de 1 – 2 mm de diámetro y que tienden a seguir e invadir la línea de estría (Lastovica *et al.*, 2014).

Por otro lado, también es propio de este género el cambio de formas bacilares a cocoides (también llamadas formas viables no cultivables (FVNC)) este cambio ocurre en cultivos viejos, o como respuesta a condiciones de estrés como es la exposición a concentraciones de oxígeno atmosférico, temperaturas extremas o ante la ausencia de nutrientes (figura 1). El *Campylobacter* en estado cocoide presenta un metabolismo respiratorio y se consideran formas infectivas, pero que no es posible ser cultivada en los medios de cultivo disponibles (Cappelier, Minet, Magras, Colwell & Federighi, 1999).



**Figura 1. Imágenes de los diferentes estados morfológicos de *Campylobacter* spp.** A) Desarrollo típico de las colonias de *Campylobacter* en Agar Sangre (Autor). B) Micrografía electrónica de transmisión de *C. jejuni*, se muestra a la izquierda la forma curva típica flagelada y a la derecha la forma cocoide igualmente flagelada. C) Micrografía electrónica de *C. coli* a partir del centro de una colonia.

**Fuente:** Ng, Sherburne, Taylor & Stiles, 1985.

**Elaboración:** Autor.

En el género *Campylobacter* se han descrito 26 especies, 2 especies provisionales y 9 subespecies, gracias a nuevos estudios la reclasificación de algunas especies continua, ejemplo de ello es la reclasificación de *Bacteroides ureolyticus* como *C. ureolyticus* (Vandamme, Debruyne, De Brandt & Falsen, 2010; Kaakoush, Castaño, Mitchell & Man, 2015).

#### 1.1.1.1. *Campylobacter jejuni*.

*Je.ju'ni*. M. L. gen. neut. n. *jejuni* de yeyuno.

*C. jejuni* es una de las especies del género considerada como termotolerante debido a su capacidad para desarrollarse a una temperatura de 42°C (inhibiéndose su crecimiento a temperaturas inferiores a los 25°C). Son pequeños bacilos gramnegativos con morfología curva, miden de 0.2 – 0.8 µm de ancho y 0.5 – 5.0 µm de largo. Gracias a la presencia de un flagelo polar en uno o ambos extremos puede desplazarse con movimiento típico “en sacacorchos”, considerándose un importante factor de virulencia necesario para la colonización del tracto intestinal (Fields & Swerdlow, 1999; Song *et al.*, 2004). *C. jejuni* tiene un genoma relativamente pequeño aproximadamente de 1.6 – 1.7 Mpb de ADN rico en A+T, la proporción de G+C oscila alrededor de 28 – 33 mol% (Vandamme, 2000; Vandamme *et al.*, 2005).

*C. jejuni* puede dar lugar a dos tipos de colonias, colonias que pueden ser planas, de color grisáceo y traslucido, con un borde irregular y tendencia a seguir e invadir la línea de estría sobre el agar sangre. Otro tipo de colonias, pueden observarse como pequeñas colonias redondas de 1 – 2 mm de diámetro, convexas, lisas y brillantes, con un borde traslucido y un centro más oscuro y opaco (Arimi, Park & Fricker, 1990).

Presenta las características mencionadas en el apartado anterior, diferenciándose del resto de especies por tener la capacidad de hidrolizar el hipurato (Vandamme, 2000). El gen que codifica la enzima hipuricasa solo lo manifiesta *C. jejuni*, no obstante algunas cepas son negativas para la prueba de hidrólisis del hipurato, lo que imposibilita la distinción entre *C. jejuni* y *C. coli* si solo se realizan pruebas bioquímicas (Rautelin, Jusufovic & Hanninen, 1999; Fields & Swerdlow, 1999).

Dentro de la especie *C. jejuni* se reconocen dos subespecies, una de ellas es *C. jejuni* subsp. *jejuni* y la segunda es *C. jejuni* subsp. *doylei*. Es posible diferenciarlas fenotípicamente mediante un test de reducción de nitratos (subsp. *doylei* no reduce nitratos) y de susceptibilidad a la cefalotina (la subespecie *doylei* es sensible). Otras características destacables es la ausencia de actividad enzimática  $\gamma$ -glutamil transferasa y L-arginina aril amidasa y por lo general la subespecie *doylei* presenta una reacción débil de catalasa (Vandamme *et al.*, 2010; Vandamme, 2000).

#### 1.1.1.2. ***Campylobacter coli***.

*Co'li*. Gr. n. colon; M. L. gen. n. *coli* de colon.

*C. coli* es muy similar a *C. jejuni*, también es otra de las especies del género considerada como termotolerante por su desarrollo a 42°C, es un bacilo pequeño, curvo que mide de 0.2 – 0.3  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.5 – 5.0  $\mu\text{m}$  de largo, que pasa a su forma cocoide rápidamente cuando se expone a condiciones de estrés o cuando su tiempo de vida es prolongado (Ng *et al.*, 1985). De igual manera forma colonias de aspecto grisáceo, redondas de 1 a 2 mm de diámetro, convexas, brillantes y lisas, dependiendo de las características del agar sangre, éstas pueden también mostrarse planas, que siguen la línea de estría, por lo general son cepas no hemolíticas y presentan un contenido en G+C de 31 – 35 mol% (Vandamme *et al.*, 2005).

Aproximadamente un 75% de las cepas de *C. coli* muestran resistencia a 100U/L de 5-fluorouracilo y en comparación con *C. jejuni*, es común que se encuentre con mayor frecuencia cepas de *C. coli* resistentes a la eritromicina (Tenover, Williams, Gordon, Nolan & Plorde, 1985). Tanto *C. jejuni* como *C. coli* internalizan plásmidos, sin embargo, se ha observado que la presencia de plásmidos conjugativos responsables de originar resistencia a tetraciclina, kanamicina y al cloranfenicol son más frecuentemente encontrados en cepas de *C. coli* (Taylor & Courvalin, 1988).

Como ya se mencionó con anterioridad, la diferenciación entre *C. jejuni* y *C. coli* es complicada sin pruebas moleculares de alta especificidad. No obstante, para minimizar los costos se puede emplear la prueba de hidrólisis del hipurato ya mencionada, para la cual *C.*

*coli* es negativa (siempre debe tenerse en cuenta la posibilidad de tener cepas de *C. jejuni* que no hidrolizan el hipurato) (Rautelin *et al.*, 1999).

En cuanto a la patogenia, *C. coli* es agente causal de diarrea, septicemia y ocasionalmente se han reportado casos de aborto en humanos. Esta especie está muy bien adaptada al tracto entérico del ganado porcino, por lo que también se han descrito casos de diarrea y/o enteritis proliferativa en cerdos (Vandamme *et al.*, 2005).

## **1.2. Campilobacteriosis**

La infección ocasionada por especies del género *Campylobacter* es conocida como campilobacteriosis. Diversas investigaciones han reconocido que de éstas, las especies productoras de gastroenteritis en el ser humano más frecuentemente aisladas son *C. jejuni*, con una incidencia de entre un 80 – 95% y *C. coli* con una incidencia del 5 – 10% (Gillespie *et al.*, 2002).

La gastroenteritis producida por especies termotolerantes se caracteriza generalmente por una sintomatología leve, la cual cursa con una diarrea leve, dolor abdominal y malestar general. En casos más severos, los síntomas pueden manifestarse de manera abrupta, a menudo con dolor abdominal intenso seguido de una diarrea profusa que puede contener moco y/o sangre (hasta 10 deposiciones diarias), fiebre, náuseas, vómito, dolor de cabeza, mialgia y rigidez. La enteritis inflamatoria que se origina puede afectar el colon y el recto evidenciándose sangre en las heces que indica la progresión de la infección hacia estos lugares (Blaser & Engberg, 2008; Allos & Lastovica, 2011).

El periodo de incubación puede ir de 1 a 7 días, apareciendo los primeros síntomas comúnmente a los 2 – 4 días post infección. Tanto el periodo de incubación como el proceso patológico pueden verse influenciados por la dosis infectiva, así como por el estado inmunológico del individuo y de la virulencia de la cepa (Blaser & Engberg, 2008). Es posible a partir del quinto día desde que empezó el proceso infeccioso detectar anticuerpos séricos dirigidos contra los antígenos de *Campylobacter*, con un pico máximo a las 2 – 4 semanas y disminuyendo a lo largo de varios meses, indicando que al 4 – 5 día el paciente empieza a mejorar, pero aún es capaz de excretar *Campylobacter* en sus heces hasta por 69 días (Black, Levine, Clements, Hughes & Blaser, 1988).

En zonas tropicales es común que especies de *Campylobacter* infecten a niños menores de 5 años, los cuales pueden manifestar hasta 8 episodios al año. Sin embargo, es importante mencionar que la mayoría de ocasiones los procesos infecciosos son inadvertidos por ser asintomáticos. Por otra parte, en zonas templadas la enfermedad se manifiesta como una gastroenteritis aguda la cual no se distingue del cuadro clínico originado por *Salmonella* spp.

o *Shigella* spp. (Black *et al.*, 1998; Blaser & Engberg, 2008). La frecuencia de casos reportados en países desarrollados es más elevada que en países en vías de desarrollo, ocupando el primer lugar entre las gastroenteritis de origen bacteriano (Kirkpatrick & Tribble, 2011; Strachan & Forbes, 2010), las cuales a pesar de no ser consideradas como graves o de riesgo para el paciente, si suponen una morbilidad a considerar y un coste económico importante (Silva *et al.*, 2011).

El registro de brotes de campilobacteriosis es muy infrecuente, esto se debe a que las personas afectadas que pasan por el proceso infeccioso de manera asintomática, o con sintomatología leve no acuden a un centro de salud. Por otro lado, si las condiciones de la muestra no son las adecuadas en su toma, transporte, almacenamiento y procesamiento, será muy difícil concluir que la causa es *Campylobacter*, estimándose que entre un 3 – 5% de las campilobacteriosis son brotes, pasando desapercibida en relación con porcentajes mayores de otros patógenos entéricos como *Salmonella* (Ethelberg, Olsen, Gerner & Molbak, 2004).

#### **1.2.1. Síndrome de Guillain – Barre (SGB).**

El SGB es una enfermedad neurológica caracterizada por una parálisis simétrica progresiva de los miembros, con o sin hiperreflexia, que puede afectar a los músculos nerviosos respiratorios y craneales, lo que incluso puede resultar en la muerte (Van Doorn, Ruts & Jacobs, 2008). El SGB es considerado como una enfermedad post-infecciosa, uno de los agentes que desencadenan esta enfermedad es *C. jejuni* (Baker *et al.*, 2012, Jackson *et al.*, 2014; Poropatich, Walker & Black, 2010). Esto se debe a una reactividad cruzada entre los anticuerpos del huésped producidos en respuesta a la detección del lipooligosacárido (LOS) presente en *C. jejuni*, este LOS es muy similar estructuralmente a moléculas (gangliósidos como el GM1) presentes en las membranas axonales de los nervios motores por lo que el sistema inmunológico no es capaz de discriminar entre las estructuras propias y las bacterianas, por ello ataca a ambas ocasionando la desmielinización de los axones y de ahí que se de el SGB como tal (Steinberg & Lee, 2010).

#### **1.2.2. Artritis reactiva (AR).**

La AR se manifiesta con mayor frecuencia en adultos de 30 a 40 años y se puede desarrollar luego de una infección gastrointestinal o del tracto genitourinario. Las articulaciones como las rodillas y los tobillos, así como el sistema gastrointestinal y el genitourinario pueden verse afectados. Los síntomas suelen aparecer pasado 1 mes desde el inicio del proceso infeccioso y desaparecer al cabo de un año, aunque no siempre es así (Pope, Krizova, Garg, Thiessen & Ouimet, 2007). Se ha asociado la infección por *Campylobacter* con el progreso hacia esta enfermedad; varios estudios han reportado que individuos tras presentar síntomas

gastrointestinales desarrollaron AR por haber comido alimentos contaminados con *Campylobacter* (Bremell, Bjelle & Svedhem, 1991). Por otro lado, Pope y col. (2007), también asociaron *Campylobacter* con una incidencia de AR del 1 – 5%. En otro estudio se reportó que el 2,86% de los pacientes infectados con *Campylobacter* desarrollaron AR, siendo las especies principalmente aisladas *C. jejuni* y *C. coli* (Keithlin, Sargeant, Thomas & Fazil, 2014).

### **1.2.3. Meningitis.**

En los seres humanos se ha documentado que *C. jejuni* y *C. fetus* subsp. *fetus* pueden ser responsables de originar una meningitis. Sin embargo, es poco frecuente una meningitis por estas bacterias, la cual se puede dar cuando la salud y el sistema inmunológico del paciente están muy comprometidos (Tsoni, Papadopoulou, Michailidou & Kavaliotis, 2013; Drona, García, Navas & de Rafael, 1998).

### **1.2.4. Bacteremia.**

*C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* son las especies de *Campylobacter* que se relacionan con mayor frecuencia a casos de bacteremia en seres humanos. El riesgo de bacteremia se incrementa cuando los pacientes son de edad avanzada y/o están inmunocomprometidos por alguna otra enfermedad de base, como por ejemplo cirrosis hepática, neoplasias, hipogammaglobulinemia o SIDA (Blaser & Engberg, 2008). Bajo estas condiciones, se ha encontrado que el 10 – 15% fallecen a los 30 días desde el diagnóstico de la enfermedad (Liao, Chuang, Huang, Lee & Hsueh, 2012).

### **1.2.5. Enfermedad intestinal inflamatoria.**

El tracto gastrointestinal puede atravesar por diversas complicaciones que conducen al padecimiento de un proceso inflamatorio crónico, como lo es la enfermedad de Crohn, ésta se manifiesta por la aparición de lesiones que pueden producirse en cualquier región del tracto gastrointestinal. Otro ejemplo es la colitis ulcerativa, la cual se caracteriza por una intensa inflamación a nivel de la submucosa del colon. La complejidad de estas enfermedades inflamatorias crónicas puede estar ligada a desequilibrios de la respuesta inmune, que a su vez también está vinculada a una alteración de la microbiota gastrointestinal, factores genéticos del individuo y a una afectación del epitelio gastrointestinal por causas ambientales (Man, Kaakoush & Mitchell, 2011; Mukhopadhyaya *et al.*, 2011).

La infección por *C. jejuni* del tracto gastrointestinal ha sido asociada con un incremento en el riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria crónica (Boyanova *et al.*, 2004), diversas investigaciones más recientes también han vinculado y demostrado una clara participación de *C. concisus* como otra especie patógena de este género que está asociada con estas enfermedades (Mukhopadhyaya *et al.*, 2011).

### 1.3. Patogenia

*Campylobacter* inicia su proceso de colonización cuando llega al intestino delgado, para más tarde trasladarse hacia el colon, su sitio diana (Black *et al.*, 1988). Como ya se ha mencionado, la incidencia y prevalencia de especies patógenas de este género es bastante elevada, no obstante se desconocen muchos detalles sobre los mecanismos de patogenicidad a nivel molecular sobre la enfermedad como tal y las complicaciones que trae consigo. Esto se debe a que *Campylobacter* spp. no comparte muchos de los factores de virulencia encontrados en otras especies patógenas (Guerry, 2007).

Pese a la poca información sobre los mecanismos moleculares por los cuales estas bacterias actúan, se conoce que existen factores concretos que han sido ampliamente estudiados y de los cuales cada vez se sabe más (figura 2). Ejemplo de ello es la presencia de un flagelo, éste permite el desplazamiento hacia el sitio diana, así como la colonización del intestino delgado; la producción de citotoxinas que facilitan la invasión; la presencia en la membrana externa de lipooligosacáridos y lipopolisacáridos, implicados en la resistencia al suero, endotoxicidad y adhesión, etc. (van Deun *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2001).

#### 1.3.1. Flagelo.

El flagelo polar de *Campylobacter* le confiere una potencia de desplazamiento tal, que facilita su paso a través de la gruesa mucosa que reviste el tracto intestinal (Ferrero & Lee, 1988), pero también es responsable de inducir quimiotaxis, está involucrado en la secreción de proteínas no flagelares de virulencia, en la autoaglutinación, formación de microcolonias y evasión de la respuesta inmune innata (Guerry, 2007; Poly & Guerry, 2008).

El flagelo de *Campylobacter* está compuesto por dos flagelinas homólogas con un tamaño aproximado de 59kDa (FlaA y FlaB). El gen *flaA* está regulado por el S28, el promotor de flagelina clásico, mientras que el gen *flaB* está regulado por un promotor dependiente S54, el cual también regula los genes del cuerpo basal y de enganche del flagelo (Jagannathan & Penn, 2005; Nuijten, van Asten, Gaastra & van der Zeijst, 1990).

Existe evidencia de que el gen *flaA* es necesario para el proceso invasivo de las células epiteliales hospederas, ya que su ausencia da como resultado una reducción casi total de la motilidad, al contrario de lo que ocurre si se impide la expresión del gen *flaB*, donde no se afecta la estructura normal del flagelo. Además *flaA* también permite la adherencia, colonización del tracto intestinal y evasión de la respuesta inmune (Guerry, 2007).

Por otro lado, se conoce que la gran mayoría de las flagelinas bacterianas presentan regiones altamente conservadas e inmunogénicas, siendo patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) que activan la respuesta inmune innata al estar presentes en el

organismo. El receptor tipo Toll (TLR5 específicamente) reconoce estas regiones MAMPs y envía señales para la activación de células inmunológicas. En la estructura de las flagelinas de *Campylobacter* spp. y de otras bacterias como *H. pylori*, se ha evidenciado la ausencia de estas regiones conservadas, por lo cual los TLR5 del hospedero no pueden reconocer la presencia de las bacterias y muy probablemente es un importante mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata (Smith *et al.*, 2003; Andersen-Nissen *et al.*, 2005).

### **1.3.2. Toxina Citoletal de Distensión (CDT).**

Es una toxina sintetizada por una gran variedad de bacterias gramnegativas, por ello es la toxina que mejor se ha podido caracterizar de las que produce *Campylobacter* spp. y un importante factor de virulencia. La CDT es una holotoxina que está compuesta por 3 subunidades codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, los cuales causan en células eucariotas la detención del ciclo celular en fase G2/M, evitando la entrada en mitosis y eventualmente la muerte celular (Ge, Schauer & Fox, 2008; Ceelen, Decostere, Ducatelle & Haesebrouck, 2006).

La participación de los productos proteicos CdtA y CdtC aún permanece en investigación, sin embargo se piensa que son esenciales para la liberación de CdtB en la célula hospedera, siendo responsables de unir la holotoxina CDT a los receptores de superficie de la membrana celular (Lara-Tejero & Galan, 2001). Una vez se da la unión, la subunidad activa de CdtB, se transloca al núcleo e induce rotura de doble cadena en el ADN del hospedero (Ge *et al.*, 2008).

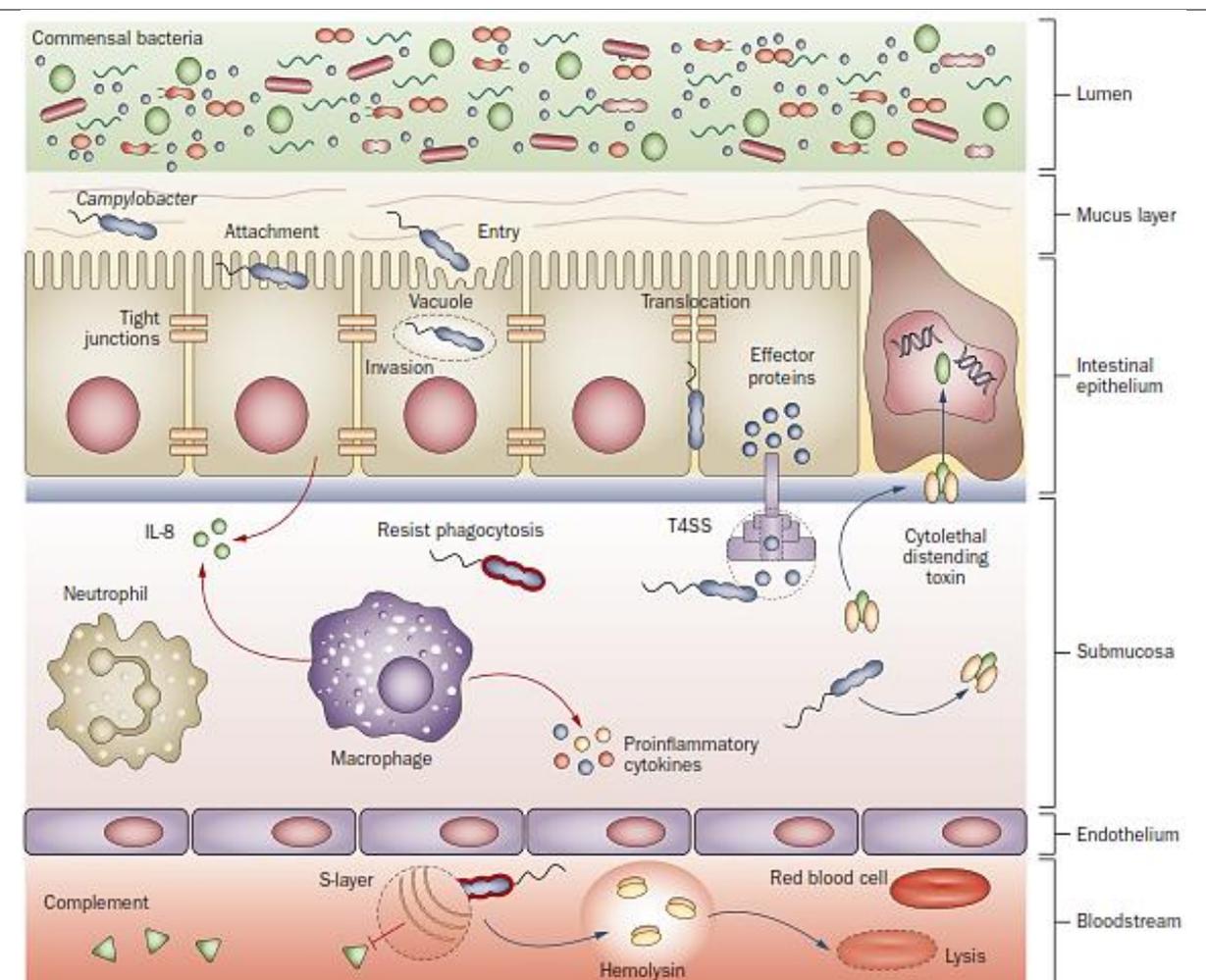
Se ha demostrado que cepas de *C. jejuni* productoras de CDT se adhieren e invaden las células epiteliales más eficazmente que aquellas que no producen la toxina (Jain, Prasad, Sinha & Husain, 2008), facilitando la colonización, inducción de inflamación a nivel del tracto gastrointestinal y además en modelos animales se ha observado una clara resistencia a la eliminación de estas bacterias (Ge *et al.*, 2008).

### **1.3.3. Capa superficial.**

Esta capa superficial es como una red paracristalina que recubre la membrana externa bacteriana y solo dos especies del género *Campylobacter* la presentan, *C. fetus* y *C. rectus*. A esta capa se le atribuyó el nombre de capa – S, cuyas proteínas confieren a estas dos especies la capacidad de evadir la respuesta inmune y resistir en la sangre a diferencia de otras especies. *C. jejuni* y *C. coli*, naturalmente carecen de esta capa y demuestran ser altamente susceptibles a las propiedades bactericidas del suero, así como a la fagocitosis por polimorfonucleares (Blaser, Smith, Repine & Joiner, 1988).

### **1.3.4. Formación de Biopelículas.**

Las biopelículas son agregados microbianos encapsulados en sustancias poliméricas que están ancladas a una superficie. Las microcolonias son a menudo el primer paso en la formación de una biopelícula. Se han observado biopelículas formadas por *C. jejuni* en tejido primario del ileón y en superficies inertes (Haddock *et al.*, 2010; Reeser *et al.*, 2007). Es así que actúa como barrera física que permite a estos patógenos resistir a la acción de sustancias antimicrobianas, así como de las células inmunológicas y sus productos; además de prolongar su supervivencia bajo condiciones ambientales desfavorables y probablemente facilitar su transmisión (Buswell *et al.*, 1998). Por otro lado, varios estudios han indicado que para la formación de estas biopelículas también es necesaria la expresión del flagelo ya mencionado con anterioridad como factor importante de virulencia en especies de *Campylobacter* (Kalmokoff *et al.*, 2006).



**Figura 2. Mecanismo de patogénesis de *Campylobacter* spp.** Durante el proceso de colonización del tracto gastrointestinal, *Campylobacter* emplea su flagelo para movilizarse a través de la capa de mucus que reviste el epitelio intestinal. Luego se produce la adherencia e invasión de las células epiteliales, también pueden translocarse a través del epitelio intestinal por vía transcelular (*C. fetus*) y/o vía paracelular mediante la rotura de uniones estrechas (*C. concisus*). Durante el proceso de invasión *C. jejuni*, puede encapsularse en una vacuola y evitar su inclusión en los lisosomas, alejándolo de la exposición a agentes bactericidas y así prolongar su supervivencia para luego salir por exocitosis

---

(Watson & Galan, 2008). El sistema de secreción tipo IV (T4SS) permite a las bacterias liberar proteínas efectoras en el interior de las células hospederas (Cascales & Christie, 2003; Jani & Cotter, 2010). La síntesis y liberación de diferentes toxinas, como la CDT contribuyen al proceso invasivo e inflamatorio. Las subunidades CdtA y CdtC de la CDT se unen a la superficie de la célula epitelial y la subunidad CdtB activa se dirige al núcleo celular donde detiene el ciclo celular e induce apoptosis por daño en el ADN. Otras toxinas reportadas son hemolisinas que destruyen los eritrocitos (*C. coli* y *C. concisus*). La capa – S media la resistencia a la fagocitosis y a las moléculas del complemento debido a la interferencia en su deposición sobre las bacterias.

**Fuente:** Man, 2011.

**Elaboración:** Autor.

## **1.4. Diagnóstico clínico**

Puede decirse que no existe un método común o estándar que permita el aislamiento de todas las especies de *Campylobacter* a partir de muestras clínicas.

El primer paso en su reconocimiento es sin duda el estudio microscópico de su morfología y características de tinción. Usualmente se emplea la tinción de Gram, reconociéndose al microscopio los bacilos curvos gramnegativos descritos en el apartado 1 de este capítulo.

### **1.4.1. Metodologías de aislamiento.**

En su aislamiento se emplean medios de cultivo selectivos suplementados con sangre o carbón, ya que éstos actúan como secuestradores de radicales libres a los cuales *Campylobacter* es sensible (Lynch, Cagney, McDowell & Duffy, 2010; Goossens, Vlaes, Galand, Van den Borre & Butzler, 1989). En el medio de cultivo se usan diversas mezclas antibióticas para eliminar o disminuir la flora contaminante. No obstante, debido a la variabilidad de susceptibilidad entre las especies de *Campylobacter*, el empleo de antibióticos para su aislamiento no permite el aislamiento de todas ellas. Por otro lado, emplear medios de enriquecimiento mejora sustancialmente las tasas de aislamiento a partir de muestras con bajo número de células de *Campylobacter* (Vandamme *et al.*, 2005).

En las metodologías dependientes del cultivo, las colonias son aisladas y purificadas, a las cuales luego se les puede realizar diversas pruebas bioquímicas para una identificación presuntiva por sus características fenotípicas. Otras pruebas o parámetros útiles en su aislamiento es la temperatura de incubación, recomendándose en muestras clínicas incubar a 37°C ya que a esta temperatura todas las especies de *Campylobacter* spp. patógenas para el ser humano pueden aislarse y mantenerse, y en caso de desear el aislamiento de especies termotolerantes (*C. jejuni* y *C. coli* principalmente) la incubación es a 42°C (Lastovica, 2006; Vandamme *et al.*, 2005). De la misma manera, se toma en cuenta el tiempo de incubación que puede ir desde los 2 a los 4 días; las condiciones atmosféricas para *C. jejuni* y otras especies termotolerantes es de microaerofilia (85% de N<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>), el control de la atmosfera puede ser de gran ayuda en la rápida distinción entre *Arcobacter* y

cepas de *Helicobacter*, muy útil antes de empezar las pruebas bioquímicas (Iwamoto *et al.*, 2015).

Por otra parte, otro método de aislamiento es mediante la filtración de las muestras clínicas a través de filtros de membrana con un poro de tamaño de 0,45 o 0,65 µm colocados sobre la superficie del agar, evitando así usar antibióticos en el medio de cultivo. Pasado el tiempo de filtración, se incuban a 37°C o 42°C, en microaerofilia. Este método ha demostrado tener una alta especificidad, siendo relativamente económico para el aislamiento de especies de *Campylobacter* (Loades, Reiman & Keevil, 2005; Lynch *et al.*, 2010).

#### **1.4.2. Metodologías de identificación bioquímica.**

La identificación presuntiva se basa en el empleo de pruebas bioquímicas para diferenciar especies de *Campylobacter* de otros géneros relacionados y dentro del mismo género. Algunas de las pruebas bioquímicas que se pueden realizar se muestran esquematizadas en la figura 3, la detección de la actividad L-alanina aminopeptidasa (L-ALA) puede ser útil en la diferenciación de especies de *Campylobacter*, *Helicobacter* o *Arcobacter* entre otras bacterias gramnegativas. Siendo por lo general más relevante la diferenciación entre *C. jejuni* y *C. coli* en el campo clínico, el uso de la prueba de hidrólisis del hipurato ya mencionada con anterioridad, complementando con pruebas básicas como la de catalasa y oxidasa, para las cuales la mayoría de *Campylobacter* spp. son positivas; o el test de reducción de nitratos (Lastovica, 2006).

No obstante, los resultados de estas pruebas muchas veces pueden ser inconsistentes debido a la variabilidad de cepas con distintos comportamientos o rasgos bioquímicos, lo que encarece y dificulta en gran medida su correcta identificación.

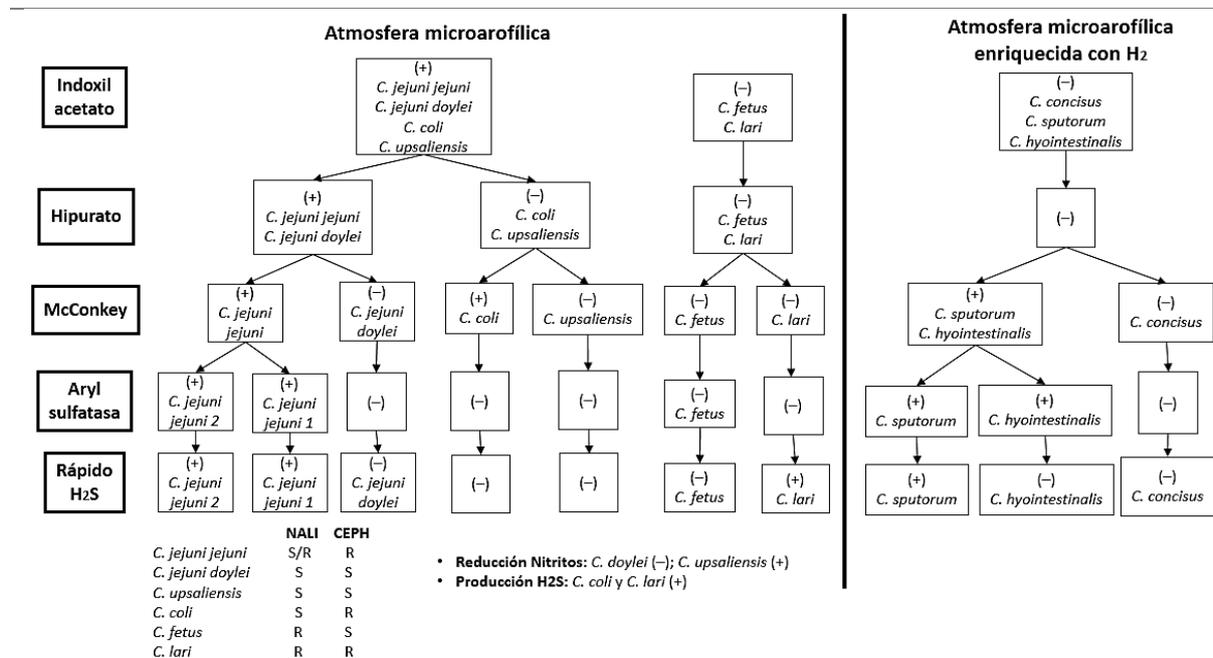
#### **1.4.3. Metodologías de identificación molecular.**

Hoy en día el empleo de metodologías moleculares ha mostrado ser más efectivas y sensibles al momento de confirmar la especie o la presencia de estas bacterias, siendo el proceso más rápido y confiable. El uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite trabajar con el ADN o ARN extraído de las muestras clínicas o a partir de un cultivo puro (Iwamoto *et al.*, 2015).

El gen 16S del ARNr se ha utilizado ampliamente para una rápida detección e identificación de un gran número de bacterias, incluyendo especies de *Campylobacter* (Maher *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a que su grado de discriminación entre especies filogenéticamente muy cercanas es bajo, se suele emplear también el gen 23S del ARNr (contiene secuencias intermedias específicas de cada cepa) y la región espaciadora transcrita interna (ITS) (región

variable en tamaño y composición de secuencia diferenciando mejor las especies) (Man, Kaakoush, Octavia & Mitchell, 2010; Christensen, Jorgensen & Olsen, 1999).

En la detección de *C. jejuni* y *C. coli* también se ha probado con técnicas basadas en inmunoensayos enzimáticos, con una alta sensibilidad y especificidad, incluso mayor que la reportada en la metodología estándar de cultivo en agar (Granato *et al.*, 2010).



**Figura 3. Protocolo de pruebas bioquímicas para el aislamiento de *Campylobacter* spp.** Este procedimiento es empleado luego de una identificación presuntiva basada en la morfología bacteriana y del resultado de la tinción de Gram, así como una prueba negativa para el test de L-ALA, o dependiendo de las condiciones de atmosfera bajo las que se desarrollen. Éstas pruebas bioquímicas pueden tomarse como estándares para el diagnóstico de *Campylobacter* spp. Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos en la actualidad presentan limitaciones importantes debido a la aparición de cepas resistentes. NALI: ácido nalidíxico (30 µg); CEPH: cefalotina (30 µg); S: sensible; R: resistente.

**Fuente:** modificado de Lastovica, 2006.

**Elaboración:** Autor.

### 1.5. Epidemiología

La campilobacteriosis es una enfermedad con alta incidencia a nivel mundial, constituyendo en países desarrollados la primera causa de consulta por gastroenteritis bacteriana (Strachan & Forbes, 2010). Es complicado estimar con exactitud las tasas de mortalidad por campilobacteriosis, en especial en países en vías de desarrollo, siendo más representativos aquellos casos producidos de forma extraintestinal o cuando degeneran hacia cuadros clínicos más graves. Muchos otros factores influyen en el seguimiento epidemiológico de esta enfermedad: adquisición de la enfermedad en el extranjero, procesos asintomáticos o muy leves, asociación del cuadro clínico a otros agentes etiológicos, etc.

De los casos de diarrea en humanos, *C. jejuni* es la especie del género más frecuentemente aislada ya sea en países desarrollados o en vías de desarrollo, mientras que *C. coli* ha demostrado ser más prevalente en países Latinoamericanos (25%) que en países industrializados (5 – 10%), quizás explicado por el hecho de que exista una población portadora sana significativa, la cual a su vez constituye un riesgo para la transmisión de estas especies, viéndose más afectados los niños menores de 5 años (Fernández, 2011; Havelaar *et al.*, 2009).

Cabe señalar que en el año 2012 se registró un incremento del 14% en la incidencia de campilobacteriosis en comparación con el año 2006 – 2008 (Gilliss *et al.*, 2013). *Campylobacter* spp. se ha notificado como el segundo patógeno más frecuente en las gastroenteritis representando un 26.5% de 14.782 casos reportados en los años 2004 – 2009 (Kendall *et al.*, 2012).

En países Latinoamericanos se ha encontrado una alta incidencia de *C. jejuni* y *C. coli*. En el año 2006 – 2007, en México, *C. jejuni* fue el principal responsable de los casos notificados de gastroenteritis aguda en lactantes y preescolares (15.7% de 5.459 casos) (Larrosa, Macías, Sánchez, Cortes & Aguilar, 2010). La gastroenteritis producida por *C. jejuni* y *C. coli* también ha sido reportada en otros países, como en Chile (14.1%), Ecuador (23%), Paraguay (18.4%), Uruguay (14.3%), Venezuela (13%) y Perú (23 – 41.3%) (Fernández, 2011).

En países europeos *Campylobacter* sigue siendo uno de los patógenos bacterianos más comunes productores de gastroenteritis. Por otro lado, diversas investigaciones indican que la participación de especies emergentes de *Campylobacter* en casos de gastroenteritis es más fuerte (Tam *et al.*, 2012).

En países como Australia, la campilobacteriosis es la infección transmitida por alimentos mayormente reportada, incrementándose su prevalencia en un 6% durante el 2010, en comparación con los datos recogidos en el año 2009 (OWG, 2010). Sin embargo, se ha visto que debido a estrategias exitosas de intervención en el sector avícola ha podido controlarse de mejor manera la transmisión de estas bacterias (Sears *et al.*, 2011).

De manera similar a lo que ocurre en países latinoamericanos, en países asiáticos la información epidemiológica es limitada. Entre el 2005 y 2009, en Pekín, fue reportado un 14.9% (142/950) de positividad para la presencia de *Campylobacter* en casos de gastroenteritis, siendo la especie más frecuente *C. jejuni* seguida de *C. coli* (Chen, Sun, Zeng & Yu, 2011).

### **1.5.1. Principales fuentes de infección y transmisión.**

La campilobacteriosis ocasionada por *C. jejuni* o por *C. coli*, puede ser adquirida mediante la ingesta de alimentos y agua contaminada con estas bacterias (contaminación cruzada), por el contacto con animales portadores de las mismas, como son muchos de los animales de granja; alimentos derivados de éstos (carne cruda o poco cocida, huevos, leche cruda, etc.); así como el contacto con animales de compañía. Siendo la principal fuente de contaminación las heces de los animales que pueden contener una elevada carga bacteriana (Lastovica, 2006).

### **1.5.2. Aves de corral.**

Tanto *C. jejuni* como *C. coli* son bacterias comensales en el tracto gastrointestinal de una gran diversidad de aves, no obstante las de mayor relevancia son aquellas que están destinadas al consumo humano. Es así, que la carne de pollo ha sido reconocida como la fuente de infección en el ser humano más representativa, estimándose a nivel mundial, que cerca del 50 – 60% de la carne de pollo para el consumo humano dispensada en mercados estaría contaminada con *Campylobacter* (Strachan & Forbes, 2010).

Esto se debe a que son capaces de desarrollarse con gran eficacia en la mucosa de las criptas del ciego del intestino grueso de las aves de corral, donde la concentración de oxígeno es baja otorgándole una atmosfera microaerófila, además de una temperatura corporal de 42°C, lo que facilita su crecimiento, conjuntamente con la presencia de otras bacterias como *Clostridium* spp., las cuales favorecen la proliferación de *C. jejuni* y *C. coli* por ser especies proteo- y sacarolíticas, dando lugar a fuentes nutritivas que pueden ser aprovechadas por los campylobacter, así como una atmosfera rica en hidrógeno producto de su metabolismo fermentativo (Lee & Newell, 2006).

En el ciego y colon del tracto intestinal del pollo puede albergarse una gran cantidad de células bacterianas, por lo que durante su procesado es posible romper estas zonas y liberar su contenido contaminando la carcasa, otros órganos e incluso alimentos o utensilios de cocina (Berrang, Buhr, Cason & Dickens, 2001). *Campylobacter* es capaz de permanecer en una película líquida adherida sobre la carcasa, además de quedar atrapados en otras zonas como el cuello, lo que favorece su supervivencia y por ende promueve la contaminación cruzada (Chantarapanont, Berrang & Frank, 2003).

La transmisión horizontal de cepas de *Campylobacter* dada por el contacto de los pollos con el medio ambiente es considerada como la fuente más probable, produciéndose rápidamente su dispersión una vez que las aves son colonizadas (Horrocks, Anderson, Nielsbet & Ricke, 2009). Por otro lado, la transmisión vertical, en algunos estudios, ha sido sugerida como posible al encontrar estas bacterias en huevos y en pollos de 1 – 2 días luego de su eclosión,

sin embargo no parece ser representativa como fuente de infección y transmisión de *Campylobacter* spp. (Kazwala, Collins, Hannan & Crinion, 1990; van Giessen *et al.*, 1992).

### **1.5.3. Cerdos.**

El tracto intestinal del cerdo puede encontrarse colonizado por especies del género *Campylobacter* las cuales son comensales habituales en este animal, siendo *C. coli* la más frecuentemente aislada (Denis *et al.*, 2009). Los cerdos son reservorios naturales de estas especies, investigaciones recientes han reportado un 43.3% (208/480) de positividad para *Campylobacter* spp., del cual el 75% correspondieron a cepas de *C. coli* (Schweitzer *et al.*, 2011). En varios estudios se ha señalado que la carne de cerdo está más contaminada que la carne de vaca o de oveja. Sugiriéndose que puede ser debido a una contaminación de las piezas cárnicas durante los procesos de sacrificio y despiece (Nesbakken, Eckner, Hoidal & Rotterud, 2003).

### **1.5.4. Animales domésticos.**

*Campylobacter* spp. ha sido también aislado a partir de las deposiciones de animales de compañía, en especial de perros y gatos, los cuales pueden ser importantes fuentes de infección para el ser humano al no manifestar en muchos casos ningún tipo de síntoma. Comúnmente se ha aislado de perros *C. upsaliensis* y de gatos *C. helveticus*, aunque *C. jejuni* también se encuentra presente en ambos animales ya sea en sujetos asintomáticos, u ocasionándoles diarrea (Carbonero *et al.*, 2012). Se ha llegado a reportar una prevalencia de *Campylobacter* spp. en perros con diarrea en un 97%, que además eran portadores de más de una especie (Goossens *et al.*, 1991).

### **1.5.5. Alimentos y agua contaminada.**

Como ya se mencionó con anterioridad la carne de pollo contaminada con *Campylobacter* es la que con mayor frecuencia se encuentra relacionada con brotes de campilobacteriosis. Sin embargo, existen otros alimentos no cárnicos que también son potenciales fuentes de infección, como lo es la leche de vaca sin pasteurizar. Si bien su consumo en este estado no es frecuente en grandes ciudades, si lo es en zonas rurales. En este alimento puede encontrarse *C. jejuni* debido a la contaminación cruzada con materia fecal del animal durante el proceso de ordeño, o como resultado de un proceso infeccioso de la ubre (Orr *et al.*, 1995).

Investigaciones en las cuales se ha buscado estos patógenos en verduras y frutas han dado como resultado una baja presencia (0.2%), no obstante el riesgo recae en el hecho de que son vehículos por contaminación cruzada con alimentos que si se encuentran contaminados (Verhoeff *et al.*, 2011).

Por otra parte, el consumo de agua no potable ha sido considerado como un importante factor de riesgo en adquisición de la campilobacteriosis, debido a que puede estar contaminada con materia fecal de animales infectados (Jakopanec *et al.*, 2008).

### **1.6. Tratamiento y Resistencia a antimicrobianos en *C. jejuni* y *C. coli***

En las infecciones por *Campylobacter* spp. suelen presentarse diarreas autolimitadas que en la mayoría de los casos no es necesario un tratamiento farmacológico, sin embargo si son requeridos cuando la infección afecta a individuos inmunosuprimidos por alguna otra infección de base, se presenten cuadros clínicos más graves y/o persistentes, o se den infecciones por *Campylobacter* a nivel extraintestinal (Allos, 2001).

Los antibióticos de elección en el tratamiento de la campilobacteriosis son los macrólidos en primera línea (principalmente la eritromicina) y las fluoroquinolonas (se destaca el uso de la ciprofloxacina) como segunda opción. No obstante, las tasas de resistencia a estos antimicrobianos van en aumento, lo que complica el tratamiento empírico de esta enfermedad (Luangtongkum *et al.*, 2009; Aarestrup & Engberg, 2001).

La resistencia a la eritromicina mostrada por cepas de origen humano aún puede considerarse como baja, observándose por lo general una frecuencia de resistencia similar en varios países del mundo (Rivera *et al.*, 2011). Cuando se presentan casos severos de campilobacteriosis, en el tratamiento se emplean aminoglucósidos como la gentamicina (Qin *et al.*, 2012), siendo la frecuencia de resistencia relativamente baja con porcentajes cercanos al 3% (Moore *et al.*, 2006).

En cuanto al uso de  $\beta$ -lactámicos (ampicilina y amoxicilina especialmente), estos son agentes terapéuticos poco empleados en el tratamiento de la campilobacteriosis, por lo que la investigación de las tasas de resistencia de éstos en muchas ocasiones no es tomada como prioritaria por algunas instituciones internacionales como el EUCAST. Pese a esto, se ha observado que cepas de *Campylobacter* spp. presentan cierta resistencia intrínseca a algunos  $\beta$ -lactámicos, mostrando resultados muy variables, que generalmente oscilan entre un 20 – 40% (Guo, Lin, Reynolds & Zhang, 2010).

En el caso de las tetraciclinas, los datos de resistencia por *Campylobacter* spp. son muy variables, ya sea entre países o dentro del mismo país (Chen *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010). Asociándose el aumento de las tasas de resistencia en cepas de *Campylobacter* aisladas de animales de cría para el consumo humano, con el uso intensivo de clortetraciclina y oxitetraciclina en el tratamiento de aves y cerdos (Piddock *et al.*, 2008).

En cuanto a la clínica veterinaria, los antibióticos usualmente empleados para el tratamiento de animales de abasto son: quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos,  $\beta$ -

lactámicos y sulfonamidas (Pérez, 2014). Es así que las fluoroquinolonas son ampliamente empleadas en la clínica veterinaria, su uso es incluso mayor al que se implementa en la medicina humana (Millano *et al.*, 2011). Con lo cual, es de esperar que en especies zoonóticas como *Campylobacter* spp. se reporten altas tasas de resistencia a las fluoroquinolonas (Pérez, 2014).

#### **1.6.1. Resistencia a Fluoroquinolonas.**

El motivo por el cual las fluoroquinolonas han sido sustituidas por los macrólidos como primera línea de acción en el tratamiento de la campilobacteriosis, es debido a las elevadas tasas de resistencia a estos antibióticos por estas especies, consecuencia del extensivo uso de las fluoroquinolonas en la industria avícola/ganadera, y en menor proporción en la medicina humana (Graham, Boland & Silbergeld, 2007).

Cada vez es más frecuente el reporte de investigaciones en las cuales se han aislado cepas de *C. jejuni* resistentes a fluoroquinolonas con frecuencias de entre un 32.4 – 46.6% en países como Chile (River *et al.*, 2011; García, Valenzuela, Rodríguez, León & Fernández, 2009), y datos similares en otros países (Notario *et al.*, 2011).

González, Cordero, García & Figueroa (2013), encontraron un gran número de cepas de *C. jejuni* resistentes a la ciprofloxacina, siendo aquellas de origen humano en un 60% y de pollos broiler en un 58.2%. En el año 2002 – 2006, un estudio mostró un evidente incremento, del 29.7% al 70.4% en las frecuencias de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas expresadas por *Campylobacter* spp. (Chatre *et al.*, 2010). Por otro lado, también se ha demostrado que *C. coli* tiende a ser más resistente a la ciprofloxacina que *C. jejuni* (Thwaites & Frost, 1999).

El abuso de estos antibióticos en la industria avícola y su relación con la aparición de cepas de *Campylobacter* spp. resistentes es evidente con las bajas tasas de resistencia en aves y ganado australiano, donde no se emplean las fluoroquinolonas para su tratamiento, dando como resultado que en muestras humanas tampoco se encuentre una frecuencia de resistencia significativa (Cheng *et al.*, 2012; Obeng *et al.*, 2012).

#### **1.6.2. Mecanismos moleculares de resistencia a quinolonas (fluoroquinolonas).**

Se ha podido evidenciar que los mecanismos genéticos responsables de la resistencia de *Campylobacter* a las fluoroquinolonas es debida a una alta presión selectiva de estos antibióticos (Threlfall, 2004). Las quinolonas actúan inhibiendo la actividad de dos enzimas bacterianas de gran importancia en procesos de modulación del super – enrollamiento requerido para la síntesis del ADN, transcripción y división celular. Una de estas enzimas es la ADN girasa, la cual emplea la energía liberada por la hidrólisis del ATP para introducir super

– enrollamientos negativos en el ADN, lo que es necesario en el proceso de enrollamiento y condensación cromosomal; esta enzima también participa eliminando el estrés torsional generado frente las horquillas de replicación (Aldred, Kerns & Osheroff, 2014; Hooper & Jacoby, 2016).

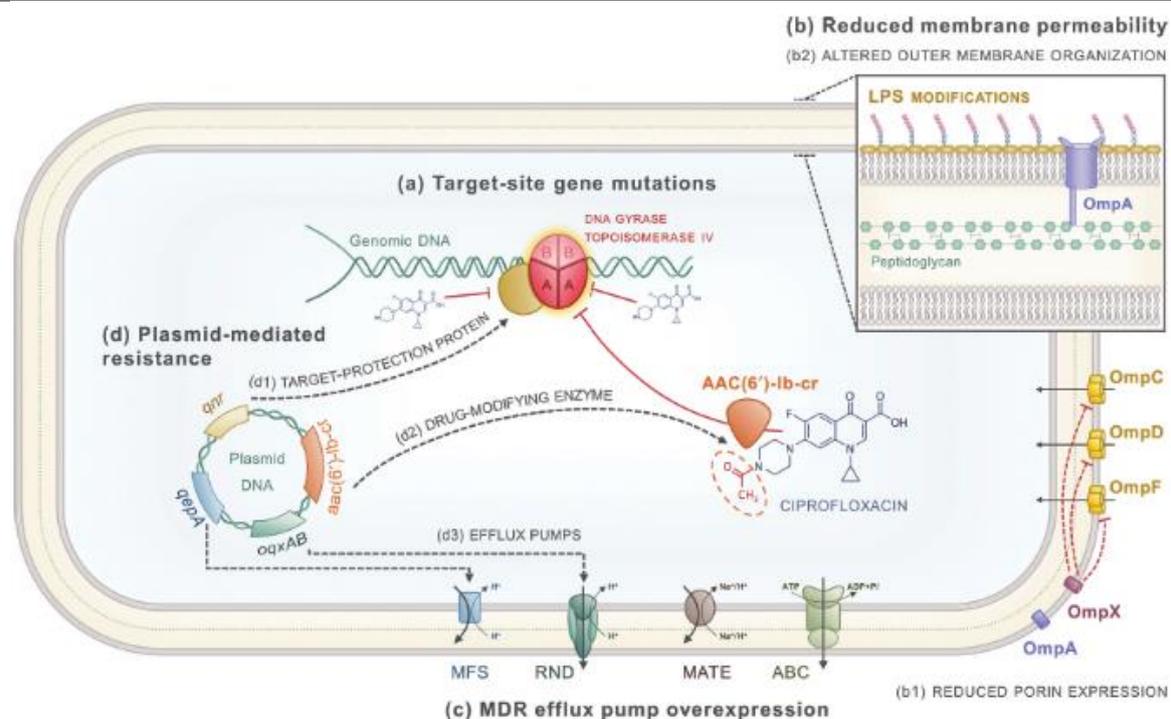
La otra enzima es la topoisomerasa IV, ésta se encarga de mantener la densidad superhelicoidal del cromosoma y alivia el estrés torsional en super – enrollamientos positivos (Hooper & Jacoby, 2016). Ambas enzimas forman puentes covalentes entre los residuos de tirosina del sitio activo y el ADN, dando lugar a un complejo enzima – ADN, conocido como complejo de escisión. Las quinolonas interfieren en este proceso al unirse reversiblemente al complejo de escisión en la interfase enzima – ADN. La acumulación de los complejos con las quinolonas evita que el ADN vuelva a ligarse, deteniéndose el proceso de replicación y por ende la síntesis de ADN (Hooper & Jacoby, 2016). A bajas concentraciones del antibiótico, se consigue un estado de bacteriostasis, que eventualmente termina en muerte celular (Redgrave, Sutton, Webber & Piddock, 2014).

La adquisición de resistencia a las quinolonas (figura 4) se ha asociado con tres mecanismos: mutaciones que modifican las enzimas diana y su afinidad de unión con la droga; mutaciones que reducen la acumulación del antibiótico intracelular por sobreexpresión de bombas de eflujo o disminución de su inclusión en la célula; ganancia de plásmidos con genes que promueven la resistencia por expresión de proteínas protectoras, enzimas modificadoras del antibiótico, etc. (Aldred *et al.*, 2014).

La resistencia de *C. jejuni* y *C. coli* a fluoroquinolonas viene dada principalmente por mutaciones puntuales en las Regiones Determinantes de Resistencia a Quinolonas (QRDRs) de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*. Se ha observado que las mutaciones en el gen *gyrA* y, ocasionalmente en el gen *parC* se dan con mayor frecuencia (Hooper & Jacoby, 2016). La mutación más frecuente en el gen *gyrA* es una sustitución en el aminoácido 86, habiendo un cambio de Treonina por Isoleucina (Thr – 86 – Ile), debido a un cambio de pares de bases (C → T). Observándose que esta mutación confiere una alta resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas al disminuir la sensibilidad de la ADN girasa a estos antibióticos, y por ende se requiere una CMI mayor (Alfredson & Korolik, 2007; Alonso *et al.*, 2004).

La membrana externa que poseen las bacterias gramnegativas representa una barrera adicional para la difusión de los antibióticos, debido a la presencia de lipopolisacáridos (LPS). Mutaciones que afectan a la estructura de los LPS han mostrado ser responsables de generar resistencia a las quinolonas y a otros antibióticos; además la adquisición de otras mutaciones puede resultar en la pérdida de porinas, de su desregulación y/o modificación en su tamaño disminuyendo la difusión intracelular de las quinolonas (Fernández & Hancock, 2012).

También se ha identificado como otro sistema de resistencia a fluoroquinolonas la activación de una bomba de eflujo CmeABC y la sobreexpresión del gen *mfd*, el cual codifica la proteína Mfd implicada en procesos de reparación del ADN durante la transcripción y que sería responsable de aumentar el riesgo de generar espontáneamente mutantes resistentes a fluoroquinolonas (González *et al.*, 2013).



**Figura 4. Mecanismos de resistencia a quinolonas.** A) Mutaciones en la QRDR de los genes *gyr* de la ADN girasa y topoisomerasa IV, generan cambios estructurales en dichas enzimas disminuyendo su afinidad de unión con la quinolona. B) Mutaciones que reducen la permeabilidad de la membrana por: pérdida de la expresión de porinas (b1); modificaciones en la organización de la membrana externa (b2); mutaciones que incrementan la expresión de bombas de eflujo (C) todo ello contribuye a la reducción de las concentraciones citoplasmáticas de quinolona. D) Ganancia de plásmidos con genes que codifican: proteínas protectoras que no permiten la unión del antibiótico a la enzima diana (d1); enzimas modificadoras de quinolonas, por ejemplo acetiltransferasas (d2); expresión de bombas de eflujo (d3).

**Fuente:** Correia, Poeta, Hébraud, Capelo & Igrejas, 2017.

**Elaboración:** Autor.

### 1.7. Aplicación de la técnica de RFLP en el estudio de la campilobacteriosis

La técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) es empleada como un marcador molecular en el análisis genético de muchos microorganismos, incluidas las especies de *Campylobacter*. Puede ser aplicada en:

- Estudios de caracterización/diversidad genotípica de *Campylobacter* spp. en cepas de origen animal, conjuntamente con otro marcador como PFGE (Messens, Herman, De Zutter & Heyndrickx, 2009; Wassenaar & Newell, 2000).

- Estudios en cepas aisladas de casos clínicos humanos, con el fin de establecer una relación entre los perfiles de RFLP-*flaA* y los perfiles obtenidos de cepas de origen animal; comparación con perfiles obtenidos con otras técnicas moleculares; subtipificación de serotipos (Petersen, Nielsen, Engberg, On & Dietz, 2001).
- Estudio de brotes de campilobacteriosis como técnica complementaria a otros marcadores como PFGE (Fitzgerald *et al.*, 2001).

Su uso en el estudio de la campilobacteriosis ha sido promovido debido a que es una técnica rápida, relativamente económica y sencilla, que no requiere de equipos excesivamente costosos y de gran utilidad en la tipificación de un reducido número de muestras. Además, presenta la ventaja de que no es necesario cultivar las bacterias, facilitando aún más el estudio de *Campylobacter* spp. ya que como bien se conoce son bacterias bastante exigentes y que requieren condiciones muy particulares para poder desarrollarse adecuadamente.

#### **1.7.1. Tipificación de cepas de *Campylobacter* por RFLP-PCR del gen *flaA*.**

La tipificación del gen de la flagelina ha demostrado ser de gran utilidad en investigaciones epidemiológicas llevadas a cabo con *C. jejuni* y *C. coli* (Wassenaar & Newell, 2000). El método de tipificación del gen *flaA* propuesto por Nachamkin, Bohachick & Patton (1993) en el cual emplea la enzima *DdeI* ha sido tomado por muchas investigaciones posteriores como referencia (Nachamkin, Ung & Patton, 1996; Ayling *et al.*, 1996).

La técnica de RFLP-*flaA* se basa en la amplificación de este gen mediante el uso de la PCR, obteniéndose un amplicón de 1728 pb del gen *flaA*. A continuación se realiza una digestión del producto de PCR mediante el uso de enzimas de restricción, obteniéndose mediante este proceso fragmentos de distintas longitudes. La diferencia de tamaños de los fragmentos viene dada por la variabilidad en la distribución de los lugares de restricción presentes en el gen *flaA* de las distintas cepas en estudio, por lo que al realizar una electroforesis en gel de agarosa se obtendrá un patrón de bandas característico de cada cepa (Harrington, Moran, Ridley, Newell & Madden, 2003).

El locus de la flagelina (proteína flagelar) está constituido por dos genes en tándem con una homología entre ellos del 95%: *flaA* y *flaB*. El primero es responsable de la codificación de la flagelina, mientras que el segundo, se piensa interviene en procesos de recombinación genética con *flaA*, contribuyendo con la evasión de la respuesta inmune del hospedero. La presencia de zonas altamente conservadas en estos genes es lo que permite que puedan diseñarse cebadores con los cuales puedan amplificarse mediante PCR secuencias de estos genes. Por otro lado, estas zonas conservadas rodean una zona variable, la cual puede ser útil para la diferenciación genética de cepas, mediante el estudio de los patrones

electroforéticos obtenidos tras un proceso de digestión con enzimas de restricción (Nuijten *et al.*, 1990).

En la realización de esta técnica es de gran importancia una adecuada selección de la enzima de restricción, ya que el grado de discriminación de la técnica dependerá de ello. Las enzimas *AluI*, *DdeI*, *HinfI*, *EcoRI* y *PstI* son las que se usan en este tipo de ensayos, ya sea solas o en combinación (Nachamkin *et al.*, 1996). Comúnmente la secuencia amplificada es digerida empleado la enzima de restricción *DdeI*, ya que ha permitido conseguir un buen grado de discriminación, particularmente en cepas de origen animal (Wassenaar & Newell, 2000; Nachamkin *et al.*, 1993; Harrington *et al.*, 2003).

Los patrones de bandas obtenidos mediante esta técnica podrían ser comparados con los resultados de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas, pudiendo observar coincidencias fenotípicas de resistencia compartidos en cepas de origen animal y humano, lo que contribuiría en la identificación de las posibles fuentes de transmisión de estas bacterias (González *et al.*, 2013).

Cabe señalar, que la técnica RFLP-*flaA* presenta una serie de inconvenientes en el estudio de *Campylobacter*, y es que la secuencia del gen *flaA* puede mostrar cierta inestabilidad por recombinación intragenómica, sin llegar a darse cambios en los sitios de restricción, lo que no sería reflejado en el gel de agarosa. Estos cambios naturales en cepas de *Campylobacter* hacen que el uso exclusivo de RFLP-*flaA* no sea la mejor opción para estudios epidemiológicos de grandes poblaciones o por largos periodos de tiempo (Hernández, 2007).

### **1.7.2. Otras Técnicas de tipificación en el estudio de *Campylobacter* spp.**

Las técnicas moleculares han sido extensamente empleadas para la genotipificación de especies de *Campylobacter*, debido a su mayor grado discriminatorio, es relativamente sencilla la estandarización de los procedimientos, son procesos automatizados, lo que los hace más reproducibles, rápidos, rentables y sencillos.

### **1.7.3. Técnica de PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*).**

La electroforesis en gel de campo pulsado o PFGE por sus siglas en inglés, consiste en la migración de fragmentos de ADN a través de un gel de agarosa, debido a un cambio constante del campo eléctrico durante la electroforesis (a diferencia de una electroforesis convencional, el campo eléctrico no es unidireccional). Es así, que las moléculas de ADN tienden a reordenarse con cada pulso para movilizarse en el gel. Con esta técnica es posible separar fragmentos de gran tamaño (hasta 12 millones de pb), empleando como enzimas de restricción la *KpnI*, *SmaI*, *SalI* o la *BamHI* (Herschleb, Ananiev & Schwartz, 2007). Se ha

utilizado para el estudio de brotes de campilobacteriosis; análisis de poblaciones de *Campylobacter* spp. de origen aviar; estudios de transmisión horizontal en granjas avícolas; investigaciones epidemiológicas en cepas de *Campylobacter* de origen humano en la búsqueda de las fuentes de transmisión (Messens *et al.*, 2009).

#### **1.7.4. Técnica de SVR (*Short Variable Region*).**

En el gen *flaA* existe una región de variabilidad de pequeño tamaño, flanqueada por regiones conservadas. De manera similar a RFLP-*flaA*, es posible emplear esas regiones conservadas para amplificarlas. La técnica Región corta variable, ha sido utilizada para la caracterización de cepas de *Campylobacter* procedentes de aves, así como para la comparación de cepas aisladas de pollos, como de humanos, usándose conjuntamente con otras técnicas (Wassenaar *et al.*, 2009).

#### **1.7.5. Técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*).**

La tipificación multilocus de secuencias o MLST, se basa en el análisis de la secuencia de los genes que codifican para enzimas metabólicas, con el fin de determinar la diversidad de secuencias de múltiples loci. Por lo que para cada secuencia diferente dentro de una especie se le es asignado un alelo distinto, es así que los alelos de cada loci constituyen un perfil alélico o lo que es lo mismo, el tipo de secuencia. En el estudio de *C. jejuni* se ha seleccionado por ejemplo el gen *aspa* que codifica a la aspartasa A, el gen *glnA* que codifica para la glutamina sintetasa, entre otros (Dingle *et al.*, 2001).

Esta técnica ha sido empleada en estudios de diversidad de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de pollos, así como de hígados de cerdo (von Altrock, Hamedy, Merle & Waldmann, 2013) y también en la comparación de cepas de *C. jejuni* de origen humano y animal (de Haan, Lampén, Corander, & Hänninen, 2013).

**CAPÍTULO II**  
**METODOLOGÍA**

## 2.1. Cepas bacterianas

En el presente trabajo se estudió un total de 116 cepas de *Campylobacter*, pertenecientes a la colección de microorganismos de la Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), recolectadas durante el año 2016; las cepas fueron aisladas a partir de muestras fecales de niños con o sin diarrea de entre 0 a 12 años y de diferentes reservorios animales (vacas, cerdos, perros y gallinas) (tabla 1). Para su inclusión en el cepario, fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa e hidrólisis del hipurato) y pruebas moleculares (multiplex – PCR), almacenándose a – 80 °C.

**Tabla 1.** Cepas de *Campylobacter* de estudio.

Fuente de la cepa		Nº de cepas	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
		n= 116	n= 87	n= 29
Humanos	Niños	32	21	11
	Vacas	15	11	4
Animales	Cerdos	8	0	8
	Perros	20	17	3
	Gallinas	41	38	3

Fuente: Cepario de la Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica. UTPL.

Elaboración: Autor.

## 2.2. Extracción del ADN

Las cepas fueron descongeladas y sembradas en Agar Sangre enriquecido al 1% con extracto de levadura (BD Bacto™), incubadas a 42°C durante 48 horas bajo condiciones de microaerofilia. A partir del cultivo puro se realizó la extracción del ADN bacteriano mediante el uso del kit de Purificación de ADN Genómico de Wizard® (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante para bacterias gramnegativas (Anexo 1). Se empleó como control positivo una cepa pura de *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, y una cepa pura de *Campylobacter coli* donada por la Universidad Austral de Chile.

## 2.3. Amplificación del gen *flaA* mediante PCR

La PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 25 µl (Anexo 2). Se utilizaron 5 µl del templado; 5X Green GoTaq Flexi Buffer, 10mM dNTPs, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 5U/µl GoTaq Flexi ADNPolimerasa (Promega).

En la amplificación del gen *flaA* se utilizó el primer forward A1 (5 µM) cuya secuencia fue 5' – GGATTTTCGTATTAACACAAATGGTGC – 3' y la secuencia del primer reverse A2 (5 µM) fue 5' – CTGTAGTAATCTTAAACATTTTG – 3' (Invitrogen™), según lo descrito por Nachamkin *et al.*, (1996). Se empleó el termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems), las condiciones

de ciclación se detallan en la tabla 2. El amplicón de ~1700 pb se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen™) al 1%, con las siguientes condiciones de corrida: 120 V, 30 minutos; usándose un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) (Anexo 3). Su visualización se realizó en un Transiluminador UV Enduro™ GDSTOUCH Labnet.

**Tabla 2.** Condiciones para la amplificación del gen *flaA*.

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 segundos	
Anillamiento	53	1 min	35
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

#### **2.4. Digestión con enzimas de restricción (RFLP)**

Para el proceso de digestión se usaron 10 µl de producto de PCR, se utilizó la enzima de restricción *Ddel* 10 U/µl (New England BioLabs), 10X *Ddel* Buffer de carga y agua destilada estéril, las condiciones de incubación fueron a 37 °C por 2 horas (Anexo 4). Los fragmentos generados tras la digestión se detectaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3%, con las siguientes condiciones de corrida: 90 V, 90 minutos, seguido de 120 V, 30 min; usándose un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Su visualización se realizó en un Transiluminador UV Enduro™ GDSTOUCH Labnet y se realizó un registro fotográfico de los patrones obtenidos.

#### **2.5. Comparación de los patrones genéticos**

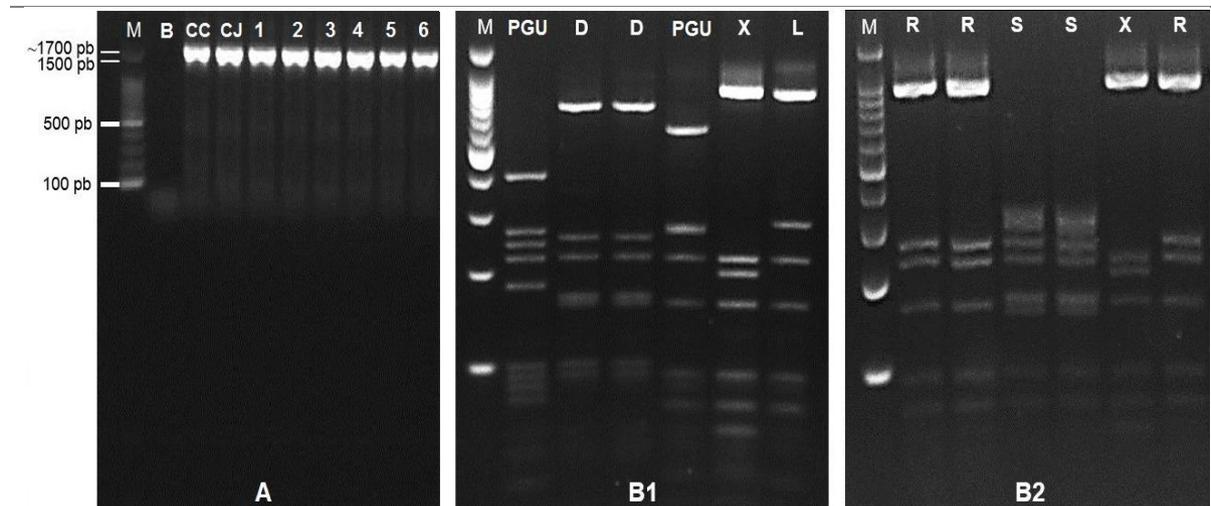
Se realizó la comparación de todos los patrones genéticos obtenidos mediante RFLP empleando el software CLIQS 1D PRO versión 1.1 (TotalLab, UK). Para determinar la medida de coincidencia entre bandas se utilizó el índice Dice (tolerancia 1%); los dendrogramas se obtuvieron empleando el método de Enlace Completo para el agrupamiento de los patrones y determinar la similitud entre ellos. Se consideraron como cepas de un mismo grupo aquellas con patrones similares, aquellas diferencias en una o más bandas bien definidas, se designaron como un nuevo grupo o patrón genético único, según lo descrito por Pérez, López, Simón & Echeita, (2013).

En este estudio se realizó un análisis descriptivo de todas las muestras y la agrupación de los diferentes conjuntos de datos se realizaron en Excel versión 2013 (Microsoft).

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Patrones genéticos obtenidos

De un total de 116 cepas de *Campylobacter*, se generaron mediante PCR – RFLP del gen *flaA* patrones de bandas que comprendieron entre 5 – 14 fragmentos de restricción, con tamaños de 50 a 1300 pb (figura 5).

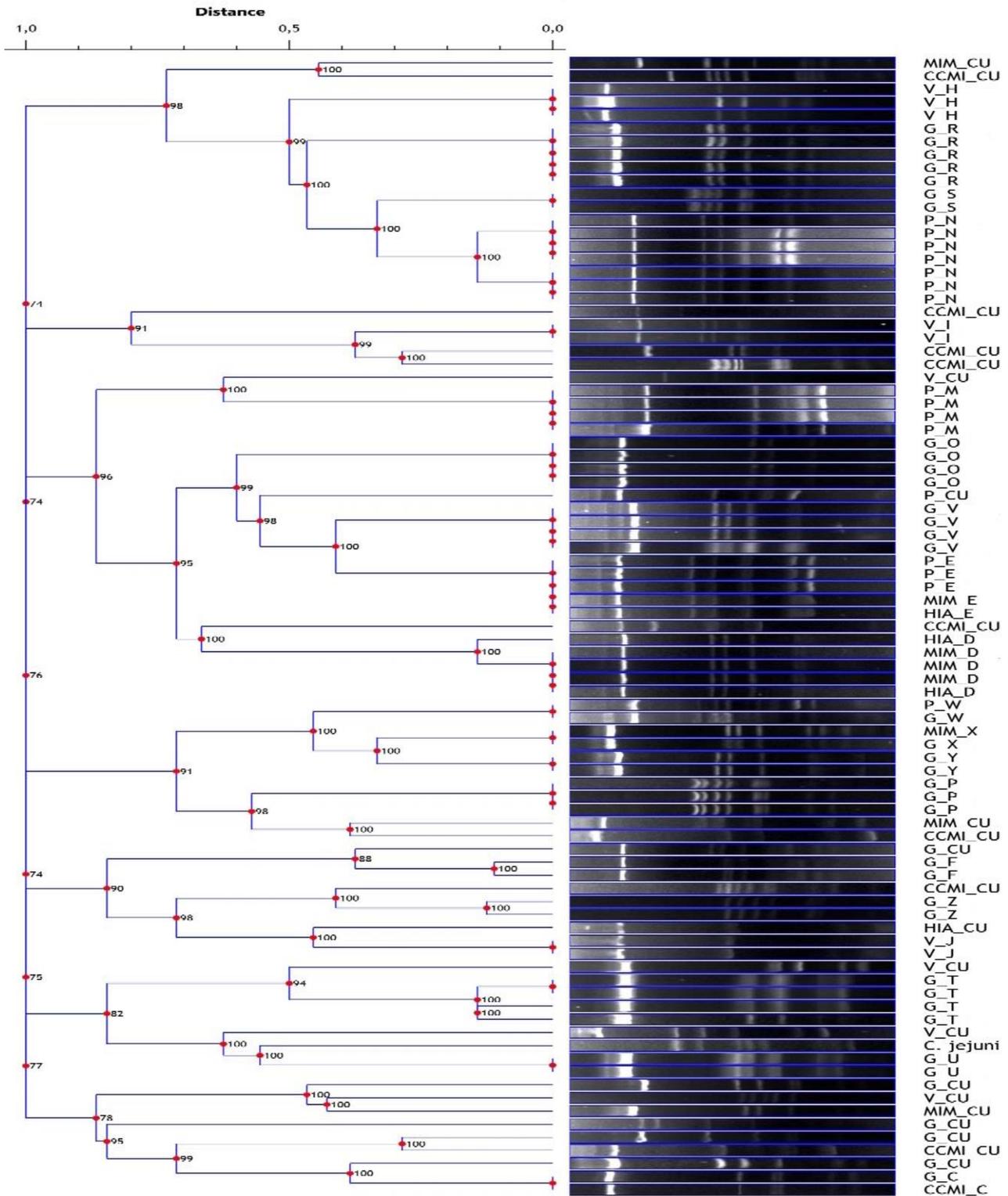


**Figura 5. PCR – RFLP – *flaA*.** A) Amplificación del gen *flaA* mediante PCR en cepas de *C. jejuni* y *C. coli*. Se observa un amplicón de aproximadamente 1700 pb. B: blanco; CC: control positivo de *C. coli*. CJ; control positivo de *C. jejuni*; Carriles (1 – 6): muestras. B) Patrones obtenidos por RFLP – *flaA*, digeridos con la enzima de restricción *Ddel*. Las letras corresponden a los grupos generados por la similitud de los patrones. PGU: patrón genético único; M: marcador de peso molecular de 100pb.

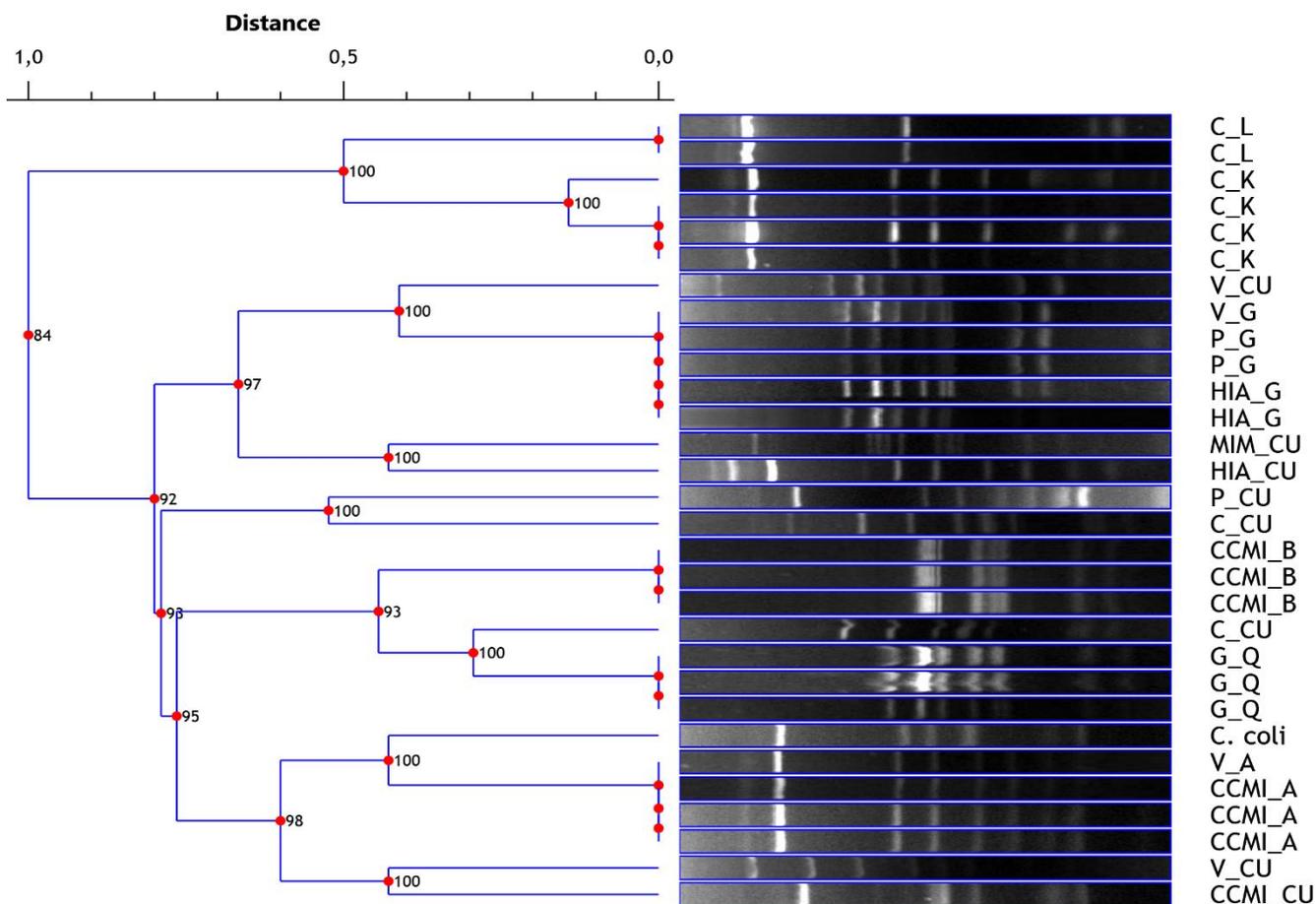
Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Mediante la construcción de dendrogramas con las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* (figura 6 y 7) fue posible evidenciar de mejor manera su agrupación según su patrón genético y su probable relación filogenética.



**Figura 6. Dendrograma de cepas de *C. jejuni* de origen humano y de reservorios animales.** Se muestra la relación entre las cepas de estudio empleando los patrones genéticos obtenidos mediante RFLP-*flaA* (*Ddel*). Dendrograma construido con el método Enlace Completo.  
Fuente: Autor.  
Elaboración: Autor.



**Figura 7. Dendrograma de cepas de *C. coli* de origen humano y de reservorios animales.** Se muestra la relación entre las cepas de estudio empleando los patrones genéticos obtenidos mediante RFLP-*flaA* (*Ddel*). Dendrograma construido con el método Enlace Completo.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Los resultados obtenidos del ensayo de subtipificación del gen *flaA* en cepas de *C. jejuni* y *C. coli* por la técnica RFLP, se muestran en la tabla 3. Se identificaron 56 patrones genéticos diferentes, de los cuales 30 correspondieron a patrones genéticos únicos (PGU) y 26 a los grupos generados por similitud en sus patrones genéticos, adjudicándoles una letra (A – Z) siguiendo la metodología propuesta por Giacoboni, Echeverría & Perfumo, (2005).

**Tabla 3.** Patrones genéticos de las muestras estudiadas.

Fuente de la cepa	Grupos generados		Nº de patrones obtenidos	
	Categoría	Porcentaje (Nº de cepas)	Total n= 56	PGU n= 30
Humanos	A	9.37 % (3/32)	39.28% (22/56)	50% (15/30)
	B	9.37 % (3/32)		
	C	3.12 % (1/32)		
	<b>D</b>	<b>15.63 % (5/32)</b>		
	E	6.25 % (2/32)		
	G	6.25 % (2/32)		
	X	3.12 % (1/32)		
	PGU	46.90% (15/32)		
Vacas	A	6.67% (1/15)	19.64% (11/56)	20% (6/30)
	G	6.67% (1/15)		
	<b>H</b>	<b>20% (3/15)</b>		
	I	13.33% (2/15)		
	J	13.33% (2/15)		
	PGU	40% (6/15)		
Cerdos	<b>K</b>	<b>50% (4/8)</b>	7.14% (4/56)	6.67% (2/30)
	L	25% (2/8)		
	PGU	25% (2/8)		
Perros	E	20% (4/20)	12.50% (7/56)	6.67% (2/30)
	G	10% (2/20)		
	M	20% (4/20)		
	<b>N</b>	<b>35% (7/20)</b>		
	W	5% (1/20)		
	PGU	10% (2/20)		
Gallinas	C	2.44% (1/41)	33.92% (19/56)	16.66% (5/30)
	F	4.88% (2/41)		
	O	9.76% (4/41)		
	P	7.31% (3/41)		
	Q	7.31% (3/41)		
	<b>R</b>	<b>12.19% (5/41)</b>		
	S	4.88% (2/41)		
	T	9.76% (4/41)		
	U	4.88% (2/41)		
	V	9.76% (4/41)		
	W	2.44% (1/41)		
	X	2.44% (1/41)		
	Y	4.88% (2/41)		
	Z	4.88% (2/41)		
	PGU	12.19% (5/41)		

Las cepas que presentaron patrones genéticos similares fueron agrupadas y designadas con letras (A – Z). Las letras resaltadas en negrita muestran el grupo dominante según el número de cepas. Los patrones genéticos únicos (PGU), hace referencia a que se obtuvo un solo patrón genético sin coincidencia con algún otro dentro de este estudio.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

En cepas aisladas de humanos se identificaron 22 patrones distintos, representando el 39.28% del total de patrones obtenidos. Se generó un total de 7 grupos, siendo la cepa más frecuentemente detectada la del grupo D (*C. jejuni*) correspondiendo al 15.63% (5/32), mientras que el 46.90% (15/32) fueron patrones genéticos únicos. Del total de PGU identificados, el 50% (15/30) pertenecían a las cepas procedentes de esta población de estudio.

En cepas aisladas de vacas se identificaron 11 patrones distintos (19.64%), se generaron 5 grupos, de los cuales el más frecuentemente detectado fue el grupo H (*C. jejuni*) correspondiendo al 20% (3/15), mientras que el 40% (6/15) fueron patrones genéticos únicos. Del total de PGU identificados, el 20% (6/30) pertenecían a las cepas procedentes de estos animales. En cepas procedentes de cerdos, se obtuvieron 4 patrones diferentes (7.14%), generándose 2 grupos, siendo el grupo dominante el K (*C. coli*) con el 50% (4/8) y el 25% (2/8) patrones genéticos únicos. Del total de PGU identificados, el 6.67% (2/30) pertenecían a las cepas procedentes de estos animales.

En cepas aisladas a partir de perros, se identificaron 7 patrones diferentes (12.50%), generándose 5 grupos, de los cuales el grupo N (*C. jejuni*) representó el 35% (7/20) y de todos los grupos de estudio, éste contó con el mayor número de cepas. Se obtuvieron solo 2 patrones genéticos únicos (10%) y al igual que en cerdos, del total de PGU identificados, representaron el 6.67% (2/30). Finalmente, en el grupo de cepas procedentes de gallinas se observaron 19 patrones diferentes (33.92%), generándose 13 grupos, de éstos el patrón dominante fue el R (*C. jejuni*) con un 12.19% (5/41), también se obtuvo el mismo porcentaje de patrones genéticos únicos. Del total de PGU identificados, el 16.66% (5/30) pertenecían a las cepas procedentes de gallinas.

De las 87 cepas de *C. jejuni* analizadas, se identificaron 42 patrones genéticos (48.27%), y de las 29 cepas de *C. coli*, se identificaron 14 patrones genéticos (48.27%). En la tabla 4, se muestran los patrones genéticos obtenidos según la especie de estudio. Esta distribución de los datos permite evidenciar que el mayor número de PGU de *C. jejuni* y *C. coli*, correspondió a cepas aisladas de humanos con un 28.57% y 21.42% respectivamente. Por otro lado, de las cepas procedentes de gallinas se obtuvo un mayor número de grupos de *C. jejuni* (30.95%), mientras que de *C. coli*, se obtuvieron más grupos a partir de las cepas aisladas de humanos (21.42%).

**Tabla 4.** Patrones genéticos según las especies de estudio.

Fuente de la cepa (Nº de patrones genéticos)	<i>C. jejuni</i> n= 42		<i>C. coli</i> n= 14	
	Grupos	PGU	Grupos	PGU
Humanos (22)	9.52% (4/42)	28.57% (12/42)	21.42% (3/14)	21.42% (3/14)
Vacas (11)	7.14% (3/42)	9.52% (4/42)	14.28% (2/14)	14.28% (2/14)
Cerdos (4)	0	0	14.28% (2/14)	14.28% (2/14)
Perros (7)	9.52% (4/42)	2.38% (1/42)	7.14% (1/14)	7.14% (1/14)
Gallinas (19)	30.95% (13/42)	11.90% (5/42)	7.14% (1/14)	0

n: número total de patrones genéticos obtenidos de las especies de estudio. PGU: patrones genéticos únicos.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

De estos resultados, la mayoría de los patrones más prevalentes no son compartidos entre las cepas procedentes de humanos y animales, es decir, las mismas cepas se encuentran infectando a individuos que tienden a ocupar un mismo espacio y modo de crianza, como es el caso de animales que se mantienen en grupos, por ejemplo las gallinas. Sin embargo, en 6 de los grupos fue posible detectar cepas con un mismo patrón procedentes de reservorios animales diferentes y también fueron encontradas en muestras procedentes de humanos (tabla 5). Evidenciándose por tanto una transmisión activa de dichas cepas en nuestro medio a partir de sus reservorios naturales los cuales actúan como importantes fuentes de contaminación.

**Tabla 5.** Cepas de *C. jejuni* y *C. coli* con el mismo patrón de bandas aisladas de distintas fuentes.

Fuente de la cepa	Grupo	Especie
Humanos Vacas	A	<i>C. coli</i>
Humanos Gallinas	C, X	<i>C. jejuni</i>
Humanos Perros	E	<i>C. jejuni</i>
Humanos Vacas Perros	G	<i>C. coli</i>
Perros Gallinas	W	<i>C. jejuni</i>

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Como datos complementarios, se emplearon los resultados sobre el perfil de susceptibilidad a las fluoroquinolonas de *C. jejuni* y *C. coli*. y se observó que algunas cepas pertenecientes a un mismo grupo expresaban perfiles de susceptibilidad diferentes (tabla 6). En el grupo A, de las 4 cepas, tres de ellas (2 de humanos y 1 de vaca) mostraron ser resistentes a las fluoroquinolonas; en el grupo E, de las 6 cepas, una cepa aislada de perro fue resistente a estos antibióticos y, del grupo F, una cepa procedente de gallina presentó resistencia.

**Tabla 6.** Adquisición de resistencia a FQ en cepas de *C. jejuni* y *C. coli*.

Fuente de la cepa	Grupo	Susceptibilidad a FQ	Especie
Humanos	A	R	<i>C. coli</i>
		S	
		R	
Vacas		R	
Humanos	E	S	<i>C. jejuni</i>
		S	
		S	
Perros		S	
		R	
Gallinas	F	R	<i>C. jejuni</i>
		S	

Se evidencia la adquisición de resistencia por parte de algunas cepas, al mostrar distintos resistotipos frente a las fluoroquinolonas (FQ). R: resistente; S: sensible.

Fuente: Cepario de la Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica. UTPL; autor.

Elaboración: Autor.

### 3.2. Discusión

En el presente trabajo, la tipificación del gen *flaA* mediante la técnica molecular PCR-RFLP permitió identificar un gran número de patrones genéticos diferentes (56 patrones genéticos), haciendo evidente la alta diversidad de cepas de *Campylobacter* distribuidas en nuestro medio, además se observó que las cepas de ambas especies presentaron la misma diversidad genética. Corcoran, Quinn, Cotter, Whyte & Fanning, (2006) obtuvieron resultados similares con 58 patrones genéticos diferentes de 66 aislamientos de casos de campilobacteriosis en humanos; Pérez, *et al.*, (2013) identificaron 51 patrones diferentes de un total de 352 cepas de *Campylobacter*. En nuestro país, en el estudio realizado por Vinueza, (2017), mostró un total de 64 patrones genéticos diferentes en aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* a partir de pollos broiler de granjas ecuatorianas.

Por otro lado, tal y como se detalla en la tabla 5, algunos de los grupos generados en este estudio muestran cepas aisladas de distintas fuentes con patrones genéticos idénticos, planteando la hipótesis que sugiere una posible transmisión de estas cepas desde los reservorios hacia el ser humano, de manera similar a lo reportado en otros trabajos (Corcoran

*et al.*, 2006; Tsai, Huang, Tsai & Chang, 2006). Es importante mencionar que la transmisión de algunas cepas también parece estar dándose entre los distintos reservorios animales estudiados, incrementando la posible distribución de *Campylobacter* y la potencialidad de que estas bacterias contaminen e infecten nuevos individuos.

En el presente estudio, se observó que en las cepas procedentes de humanos hubo mayor diversidad genética que en las cepas aisladas de los reservorios animales, tanto en número de patrones genéticos (39.28%), como en patrones genéticos únicos (46.90%) identificados. Debido al número de cepas analizadas era de esperar que en cerdos se observara una baja diversidad genética. No obstante, en el caso de gallinas, pese a que en estas aves la prevalencia de *Campylobacter* fue mayor que en el resto de las poblaciones estudiadas, el número de patrones genéticos obtenidos fue menor que en humanos, con el 33.92% del total de patrones identificados. Además, en cuanto a los patrones genéticos únicos, éstos solo representaron el 16.66%.

Es así que, la transmisión de una misma cepa de *Campylobacter* entre varios individuos resulta ser bastante probable cuando se cumplen determinadas condiciones, tales como el contacto directo y/o compartir las mismas fuentes de alimentación, relacionándose directamente con la diversidad genética de cepas a ser encontradas. Ertas, Cetinkaya, Muz & Ongor (2004), también llegaron a esta conclusión al observar en su trabajo que las aves de estudio que permanecieron bajo un mismo ambiente o recinto, así como un mismo manejo, forma de cuidado y crianza, tendían a presentar una baja diversidad genética de cepas de *Campylobacter*.

El estudio de las vías de transmisión de las especies de *Campylobacter* es un trabajo complejo, siendo una de las principales causas la gran distribución de estas bacterias en la naturaleza. En este caso la población humana de estudio fue la infantil, comprendiendo edades de 0 a 12 años. Los niños son uno de los grupos etarios más vulnerables a la adquisición de la enfermedad, son particularmente susceptibles de infectarse por contacto directo con animales domésticos y por un ambiente contaminado (Tamborini *et al.*, 2012; González *et al.*, 2013).

La transmisión de persona a persona por lo general es poco común en el caso de adultos, aunque los brotes de campilobacteriosis de tipo familiar son frecuentes (Zhao *et al.*, 2010). En el caso de niños es más probable que puedan infectarse con mayor facilidad y adquieran la enfermedad por contacto con un ambiente contaminado, especialmente si se habla de grupos de niños que comparten actividades recreacionales donde pueda haber diversos vehículos para la transmisión de las bacterias (tierra, agua, alimentos, juguetes, arena, etc.)

(Doorduyn *et al.*, 2010). En este trabajo los grupos A, B y C correspondieron a cepas aisladas de niños de un centro de cuidado materno infantil de la ciudad de Loja, la correspondencia de los patrones genéticos entre las cepas indica que este lugar puede constituir un importante foco de contaminación y transmisión de estos microorganismos y que es necesario en estas instituciones instaurar medidas de control. Por otro lado, el gran número de cepas con patrones únicos observados en la población infantil de estudio hace evidente que existen múltiples focos de contaminación tanto de *C. jejuni* como de *C. coli* en la ciudad de Loja a los cuales están expuestos.

Diversas investigaciones han considerado como un factor importante las condiciones socio – económicas del núcleo familiar, esto se debe a que se ha evidenciado que las fuentes o vías de transmisión de *Campylobacter* pueden variar significativamente dependiendo de si la población de estudio es rural o urbana. Mughini *et al.*, (2012), concluyen de su estudio que los niños que habitan en zonas urbanas son más susceptibles de adquirir la enfermedad por el consumo de carne de pollo contaminada, siendo por ende estos animales el principal foco de infección por *Campylobacter*; en comparación a aquellos niños que habitan en áreas rurales, quienes con mayor probabilidad, pueden adquirir la campilobacteriosis por el contacto con el ganado bovino, que además muy posiblemente también sean fuente de contaminación del ambiente. La falta de este tipo de información en este trabajo constituye una limitación del estudio.

Todavía se requiere de mayores investigaciones, los datos disponibles en nuestro país sobre estos patógenos son limitados, no obstante, en caso de tomarse medidas en el control y prevención de infecciones por *Campylobacter* en seres humanos sería oportuno formular planes específicos para cada población de estudio (Garrett *et al.*, 2007).

Investigaciones en todo el mundo reconocen que el reservorio por excelencia de especies de *Campylobacter* son las aves de corral, destacándose las gallinas por la gran demanda de su carne para el consumo humano (Strachan & Forbes, 2010). Tsai *et al.*, (2006), similar a los resultados mostrados en este trabajo, también obtuvieron un número de patrones genéticos considerables (47) solo en *C. jejuni*, y manifiestan que, a pesar de que la fuente de infección más importante para el ser humano son los pollos, por los resultados que obtuvieron recalcan que las infecciones por *C. jejuni* también pueden proceder de diversas fuentes.

Resultó interesante evidenciar que la transmisión de *Campylobacter* entre perros fue frecuente en este trabajo, destacándose el grupo N al contener el mayor número de cepas idénticas (7 cepas) de todos los grupos generados en este estudio. Diversos estudios mencionan que convivir con perros portadores asintomáticos de estas bacterias es un factor

de riesgo significativo en la adquisición de la enfermedad, debido a que en sus heces expulsan *Campylobacter*, constituyendo un foco de infección tanto para otros animales como para el ser humano, ya sea por contacto directo con residuos fecales o por contaminación del ambiente (Robinson & Pugh, 2002; Acke *et al.*, 2006). Se puede considerar que los parques públicos son el lugar propicio para adquirir estas bacterias por contaminación de las diferentes áreas con las heces de estos animales, las cuales en muchas ocasiones no son recogidas; las mascotas se infectan al pasear por estos lugares, al consumir agua contaminada, por depredación de aves o roedores infectados, necrofagia y/o coprofagia, es así que pasan a ser portadores de *Campylobacter* y representan en el hogar una fuente de infección importante (Mughini *et al.*, 2012; Tamborini *et al.*, 2012).

Sin duda alguna, la presencia de *Campylobacter* en el intestino de pollos destinados para el consumo humano representa un serio riesgo para la salud pública. A pesar de que las condiciones para el óptimo desarrollo de *Campylobacter* son especiales y son bacterias de crecimiento lento, se ha sobrestimado su capacidad de resistencia y supervivencia en ambientes externos hostiles, lo que plantea la idea de que las formas de resistencia de estas especies, las llamadas FVNC, tienen un rol más importante del que se pensaba en lo que respecta a su dispersión, de ahí las elevadas tasas de prevalencia de estos patógenos (Humphrey, O'Brien & Madsen, 2007).

Reducir los niveles de contaminación por *Campylobacter* en alimentos como las carnes, requiere de la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas, además de Buenas Prácticas de Manufactura en plantas avícolas y mercados (Allos, 2001). La instauración de estrictas medidas higiénicas y puntos críticos de control en industrias alimentarias (así como la educación de la población en general), condiciones que limiten el desarrollo bacteriano (baja humedad, mantenimiento de la cadena de frío, etc.) y/o proveer fuentes de agua descontaminadas, son algunas opciones que resultan eficaces para frenar la diseminación de estos patógenos a partir de sus reservorios (Silva *et al.*, 2011).

Cabe destacar que en muchos países el uso de antibióticos en la industria avícola, ya no es considerado como una buena alternativa debido a las elevadas tasas de resistencia a antibióticos que se ha registrado en especies de *Campylobacter*, especialmente en *C. jejuni* y *C. coli*, haciendo mención a las alarmantes tasas de resistencia a las fluoroquinolonas reportadas en investigaciones de todo el mundo (Smith & Fratamico, 2010; González *et al.*, 2013; EFSA, 2012), pero que además estudios recientes llevados a cabo en Ecuador también han demostrado no únicamente una considerable prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en nuestro medio, sino también índices de resistencia a fluoroquinolonas elevados tanto en cepas aisladas a partir de muestras fecales humanas como de diversos animales (tabla 7).

Los datos reportados señalan que en Ecuador los pollos siguen siendo la fuente de contaminación más importante con porcentajes de prevalencia del género de un 52 a un 72% (Poma, 2014; Nuñez, 2016; Crespo, 2016; Vinueza, 2017); además de mostrar que estos patógenos también se encuentran infectando a otros grupos de animales domésticos muy cercanos al ser humano (Nuñez, 2016; Ordoñez, 2016; Chamba, 2016). Por otra parte, *C. jejuni* es la especie más prevalente en la mayoría de las investigaciones realizadas en Ecuador, a excepción de tres estudios. Poma, (2014) y Vinueza, (2017) en su trabajo la especie más prevalente en aves de corral fue *C. coli* (68 – 69%); de igual manera en el estudio realizado por Nuñez, (2016), los aislamientos de *C. coli* (57%) a partir de perros fue ligeramente superior a los de *C. jejuni* (43%). Son datos interesantes, respaldados desde el punto de vista de que se ha reportado que *C. coli* puede ser más prevalente que otras especies de *Campylobacter* en países Latinoamericanos (Fernández, 2011). Conocer la prevalencia y distribución de estas especies permite identificar de mejor manera sus vías de transmisión.

En cuanto a las tasas de resistencia a fluoroquinolonas en cepas de *C. jejuni* y *C. coli* que se han reportado a nivel nacional, son consideradas alarmantes debido a que en la gran mayoría de los estudios se registraron porcentajes del 100% de resistencia tanto en población infantil como en las diversas poblaciones animales (Obaco, 2016; Cabrera, 2016; Villavicencio, 2017; Crespo, 2016; Ordoñez, 2016; Chamba, 2016).

Es por ello, que en este trabajo se consideró importante el uso del perfil de susceptibilidad a fluoroquinolonas de las cepas analizadas conjuntamente con el patrón genético, aportando con esto datos complementarios de gran interés en el estudio de estas especies patógenas. En la mayoría de los casos estas dos variantes fueron coincidentes, sin embargo se observó en algunos grupos la adquisición de la resistencia y, a pesar de que en este trabajo no se evaluó el mecanismo por el cual fue adquirida, es probable que la presión selectiva por el abuso de estos antibióticos contribuya a la aparición de cepas resistentes a gran velocidad un hecho que ya ha sido comprobado por otros autores (Threlfall, 2004; Pleydell, Rogers, Kwan & French, 2010). No se considera que exista una relación directa entre el perfil de susceptibilidad a fluoroquinolonas y un patrón genético específico en este trabajo debido a que el gen *flaA* no es responsable de generar resistencia a las fluoroquinolonas, por otro lado hubiera sido oportuno trabajar con un resistotipo más completo que permitiera hacer mejores comparaciones. Otras investigaciones tampoco hallaron esta relación y apuntan que los perfiles de susceptibilidad a antibióticos pueden variar en el tiempo limitando su empleo (Wittwer *et al.*, 2005; Cardinale *et al.*, 2006; Pérez, García, Abad & Echeita, 2012).

**Tabla 7.** Reportes de la prevalencia de *Campylobacter* y datos de resistencia a fluoroquinolonas.

Fuente de las cepas	Prevalencia (%)			Resistencia a FQ (%)	Fuente
	Género	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>		
Niños	5 – 13	59 – 92	8 – 41	67 – 100	Cuenca, V., 2015 Narváez, 2015 Cuenca, J., 2015 Obaco, 2016 Cabrera, 2016 Villavicencio, 2017
Pollos	52 – 72	18 – 90	10 – 69	63 – 100	Poma, 2014 Nuñez, 2016 Crespo, 2016 Vinueza, 2017
Perros	10 – 33	43 – 85	15 – 57	15 – 100	Nuñez, 2016 Ordoñez, 2016
Cerdos	27	0	100	100	Chamba, 2016
Vacas	15	73	27	87	Chamba, 2016

Cepas de *Campylobacter* procedentes de muestras fecales de humanos y aislamientos a partir de animales, en distintos periodos y ciudades del Ecuador. FQ: fluoroquinolonas.

Fuente: Cuenca, V. (2015); Narváez, (2015); Cuenca, J., (2015); Obaco, (2016); Cabrera, (2016); Villavicencio, (2017); Poma, (2014); Nuñez, (2016); Crespo, (2016); Vinueza, (2017); Ordoñez, (2016); Chamba, (2016).

Elaboración: Autor.

La dispersión de cepas multiresistentes de *Campylobacter* es un problema de salud pública sobre el cual algunos países ya han instaurado medidas de contención (Pérez *et al.*, 2012). En la industria avícola danesa el uso de las fluoroquinolonas en la cadena de producción de pollos broiler está restringido, por ello se emplea una metodología de segregación llevada a cabo mediante el empleo de pruebas rápidas basadas en técnicas moleculares para la detección de aves positivas para estos patógenos, aquellas que son negativas se certifican como “libres de *Campylobacter*” (Wagenaar, Mevius & Havelaar, 2006; Havelaar *et al.*, 2007).

El uso de técnicas moleculares es cada vez más frecuente y accesible tanto en la industria alimentaria, agrícola, así como en la clínica humana. La subtipificación de las especies termotolerantes más prevalentes del género *Campylobacter* que proceden de distintos orígenes permite obtener información epidemiológica necesaria para la puesta en marcha de protocolos oportunos para el control de su diseminación, contribuyendo a la valoración del riesgo de su transmisión en la población, hace posible además tener un estimado del número de casos de campilobacteriosis en humanos atribuidos a un animal en particular como foco de la infección (Ertas *et al.*, 2004).

Por otro lado, la diseminación dinámica de cepas resistentes a las fluoroquinolonas observada en esta investigación, plantea la necesidad de promover planes de vigilancia y control de estos microorganismos, impulsado por el trabajo colaborativo de las áreas de laboratorio,

clínica humana y veterinaria. Estas medidas permitirían a largo plazo en el Ecuador generar datos epidemiológicos suficientes y completos para una detección más precisa de brotes de campilobacteriosis en el país.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen a afianzar que la campilobacteriosis es un problema de salud pública existente en la ciudad de Loja, estos datos muestran que el ser humano está expuesto a múltiples fuentes de infección, destacándose aquella procedente a partir de los reservorios animales estudiados en el presente trabajo.

## CONCLUSIONES

- Existe una alta diversidad genética entre las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* estudiadas, al observar un total de 56 patrones genéticos diferentes.
- La transmisión de estas bacterias hacia el ser humano a partir de los reservorios naturales es dinámica, con muchas fuentes de contaminación que representan un gran riesgo para la población de adquirir no solo la enfermedad, sino de convertirse en portadores asintomáticos de *Campylobacter*.
- La diseminación de estas bacterias tanto entre personas como entre los animales, incrementa el riesgo de que surjan más cepas resistentes a los antibióticos más empleados en la clínica humana.
- El uso de la técnica PCR-RFLP-*flaA* en el estudio de *Campylobacter* fue de gran utilidad por su sencillez, rapidez en la obtención de los resultados y se considera que es un adecuado marcador molecular en estudios epidemiológicos iniciales, con un aceptable poder de discriminación evidenciado por el número de patrones obtenidos, similares a lo reportado por otros autores.
- Estos datos pueden ser de gran utilidad en la comprensión de la epidemiología de estos patógenos en nuestro medio, con el potencial de ser empleados para futuras investigaciones en la recolección de datos y en la toma de decisiones en el control y vigilancia de estos microorganismos.

## RECOMENDACIONES

- En futuros estudios epidemiológicos trabajar con otras herramientas de apoyo como diferentes técnicas moleculares (PFGE), o el uso conjunto de varias enzimas de restricción.
- Se sugiere a nivel epidemiológico el análisis de otras fuentes y vías de transmisión tales como alimentos de origen animal y en particular fuentes ambientales.
- Se considera importante trabajar con datos que permitan un estudio más detallado del perfil epidemiológico, pudiendo darse mejores comparaciones entre poblaciones de zonas rurales y urbanas.
- Las tasas de resistencia a fluoroquinolonas evidenciadas en nuestro país son alarmantes, el estudio de los mecanismos de resistencia generados por cepas de *Campylobacter* procedentes de nuestro medio, serían los primeros estudios realizados en el Ecuador.

## REFERENCIAS

- Aarestrup, F. & Engberg, J. (2001).** Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet Res* 32: 311-21.
- Acke, E., Whyte, P., Jones, B., McGill, K., Collins, J., et al. (2006).** Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in cats and dogs in two animal shelters in Ireland. *Vet Rec* 158:51-54.
- Aldred, K., Kerns, R. & Osheroff, N. (2014).** Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*. 53: 1565-1574.
- Alfredson, D.A. & Korolik V. (2007).** Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett* 277: 123-32.
- Allos, B.M. & Lastovica, A.J. (2011).** *Campylobacter* infections. In: Guerrant, R.L., Walker, D.H., Weller, P.F. (eds) Tropical infectious diseases, 3rd edn. Elsevier, New York, pp. 145–149.
- Allos, B.M. (2001).** *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 32:1201–1206.
- Alonso, R., Mateo, E., Girbau, C., Churruca, E., Martínez, I. & Fernández, A. (2004).** PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli*. *Antimicrob, Agents Chemother*. 48:4886-4888.
- Andersen-Nissen, E. et al. (2005).** Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 9247–9252.
- Arimi, S.M., Park, R. & Fricker, C.R. (1990).** Study of haemolytic activity of some *Campylobacter* spp. on blood agar plates. *J. Appl. Bacteriol* 69: 384–389.
- Baker, M.G., Kvalsvig, A., Zhang, J., Lake, R., Sears, A. & Wilson. N. (2012).** Declining Guillain-Barre syndrome after campylobacteriosis control, New Zealand, 1988–2010. *Emerg Infect Dis* 18:226–233.
- Berrang, M., Buhr, R.J., Cason, J. & Dickens, J.A. (2001).** Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. *J. Food Prot.* 64: 2063–2066.
- Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P. & Blaser, M.J. (1988).** Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* 157:472–479.
- Blaser, M.J. & Engberg, J. (2008).** Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. In: Nachamkin, I., Szymanski, C.M., Blaser, M.J. (eds) *Campylobacter*, 3rd edn. ASM Press, Washington, DC, pp. 99–121.
- Blaser, M.J., Smith, P.F., Repine, J.E. & Joiner, K.A. (1988).** Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Failure of encapsulated *Campylobacter fetus* to bind C3b explains serum and phagocytosis resistance. *J. Clin. Invest.* 81: 1434–1444.
- Boyanova, L., Gergova, G., Spassova, Z., Koumanova, R., Yaneva, P., Mitov, I., Derejian, S. & Krastev, Z. (2004).** *Campylobacter* infection in 682 Bulgarian patients with acute enterocolitis, inflammatory bowel disease, and other chronic intestinal diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 49:71–74.
- Bremell, T., Bjelle, A. & Svedhem, A. (1991).** Rheumatic symptoms following an outbreak of *Campylobacter* enteritis: a five year follow up. *Ann Rheum Dis* 50:934–938.
- Buswell, C. M. et al. (1998).** Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 733–741.
- Butzler, J.P. (2004).** *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 10: 868-76.
- Cabrera, C. (2016).** Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en niños con y sin diarrea en el Hospital Manuel Ygnacio Monteros, durante el periodo abril a junio del 2016 (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Capelier, J.M., Minet, J., Magras, C., Colwell, R.R. & Federighi, M. (1999).** Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl Environ Microbiol* 65: 5154-7.
- Carbonero, A., Torralbo, A., Borge, C., Garcia, I., Arenas, A. & Perea, A. (2012).** *Campylobacter* spp., *C. jejuni* and *C. upsaliensis* infection-associated factors in healthy and ill dogs from clinics in Cordoba, Spain. Screening tests for antimicrobial susceptibility. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35: 505-12.
- Cardinale, E., Rose, V., Perrier Gros-Claude, J., Tall, F., Rivoal, K., Mead, G. & Salvat, G. (2006).** Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry and humans in Senegal. *J. Appl Microbiol* 100:209–217.

- Cascales, E. & Christie, P.J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 137-149.
- Ceelen, L., Decostere, A., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2006). Cytolethal-distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. *Microbiol. Res.* 161: 109–120.
- Chamba, A. (2016). Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas de ganado porcino y bovino en la provincia de Loja (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Chantarapanont, W., Berrang, M. & Frank, J.F. (2003). Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin. *J. Food Prot.* 66: 2222–2230.
- Chatre, P., Haenni, M., Meunier, D., Botrel, M.A., Calavas, D. & Madec, J. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from cattle between 2002 and 2006 in France. *J Food Prot* 73:825–831.
- Chen, J., Sun, X.T., Zeng, Z. & Yu, Y. (2011). *Campylobacter* enteritis in adult patients with acute diarrhea from 2005 to 2009 in Beijing, China. *Chin Med J (Engl)* 124:1508–1512.
- Chen, X., Naren, G.W., Wu, C.M., Wang, Y., Dai, L., Xia, L.N., Luo, P.J., Zhang, Q. & Shen, J.Z. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet Microbiol* 144: 133-9.
- Cheng, A., Turnidge, J., Collignon, P., Looke, D., Barton, M. & Gottlieb, T. (2012). Control of fluoroquinolone resistance through successful regulation, Australia. *Emerg Infect Dis* 18:1453–1460.
- Christensen, H., Jorgensen, K. & Olsen, J.E. (1999). Differentiation of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* by length and DNA sequence of the 16S-23S rRNA internal spacer region. *Microbiology* 145:99–105.
- Corcoran, D., Quinn, T., Cotter, L., Whyte, P. & Fanning, S. (2006). Antimicrobial resistance profiling and fla-typing of Irish thermophilic *Campylobacter* spp. Of human and poultry origin. *Letters in Applied Microbiology* 43: 560-565.
- Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J.L. & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology*; 66:551–559.
- Crespo, D. (2016). Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas de aves de corral en la provincia de Loja, durante el periodo abril – junio de 2016 (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Cuenca, J. (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 Regional Isidro Ayora, durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014 (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Cuenca, V. (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 del Día, durante el periodo septiembre - diciembre 2014 (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- de Haan, C., Lampén, K., Corander, J. & Hänninen, M. (2013). Multilocus sequence types of environmental *Campylobacter jejuni* isolates and their similarities to those of human, poultry and bovine *C. jejuni* isolates. *Zoonoses Public Health* 60(2):125–133.
- Denis, M., Chidaine, B., Laisney, M.J., Kempf, I., Rivoal, K., Megraud, F. & Fravallo, P. (2009). Comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry, pig and *Campylobacter* human infections in Brittany, France. *Pathol Biol (Paris)* 57: 23-9.
- Dingle, K., Colles, F., Wareing, D., Ure, R., Fox, A., Bolton, F., Bootsma, H., Willems R., Urwin R. & Maiden, M. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 39:14–23.
- Doorduyn, Y., van den Brandhof, W., van Duynhoven, Y., Breukink, B., Wagenaar, J., et al. (2010). Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: a case-control study. *Epidemiol Infect* 138: 1391–1404.
- Doyle, L.P. (1948). The etiology of swine dysentery. *Am J Vet Res* 9:50–51.
- Dronda, F., Garcia, I., Navas, E. & de Rafael, L. (1998). Meningitis in adults due to *Campylobacter fetus* subspecies *fetus*. *Clin Infect Dis* 27: 906–907.
- Ertas, H., Cetinkaya, B., Muz, A. & Ongor, H. (2004). Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *flaA* typing and random amplified polymorphic DNA methods. *International Journal of Food Microbiology* 94: 203-209.
- Ethelberg, S., Olsen, K.E., Gerner, P., & Molbak, K. (2004). Household outbreaks among culture confirmed cases of bacterial gastrointestinal disease. *Am J Epidemiol* 159: 406-12.

- European Food Safety Authority. (2012).** The European Union Summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA J* 10: 2598.
- Fernández, H. (2011).** *Campylobacter* y *Campylobacteriosis*: una Mirada desde América del Sur. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 28: 121-127.
- Fernández, L. & Hancock, R.E. (2012).** Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev*; 25:661–681.
- Ferrero, R.L. & Lee, A. (1988).** Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod shaped bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 134: 53–59.
- Fields, P.I. & Swerdlow, M.D. (1999).** *Campylobacter jejuni*. *Clin Lab Med* 19: 489–504.
- Fitzgerald, C., Hesel, L.O., Nicholson, M.A., Olsen, S.J., Swerdlow, D.L., Flahart, R., Sexton, J. & Fields P.I. (2001).** Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. *J Clin Microbiol* 39: 2386-90.
- Fouts, D.E., Mongodin, E.F., Mandrell, R.E., Miller, W.G., Rasko, D.A., Ravel, J., Brinkac, L.M., DeBoy, R.T., Parker, C.T., Daugherty, S.C. & others. (2005).** Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biol* 3: e15.
- García, P., Valenzuela, N., Rodríguez, V., León, E. & Fernández, H. (2009).** Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. *Rev Chilena Infectol* 26: 511-4.
- Garrett, N., Devane, M.L., Hudson, J., Nicol, C., Ball, A., Klena, J., Scholes, P., Baker, M., Gilpin, B. & Savill, M. (2007).** Statistical comparison of *Campylobacter jejuni* subtypes from human cases and environmental sources. *Journal of Applied Microbiology* 103:2113-2121.
- Ge, Z., Schauer, D.B. & Fox, J.G. (2008).** In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell. Microbiol.* 10: 1599–1607.
- Giacoboni, G., Echeverría, M. & Perfumo, C. (2005).** Aplicación de PCR – RFLP para subtipificar *Campylobacter jejuni*. *Revista Argentina de Microbiología* 37: 81-83.
- Gillespie, I.A., O'Brien, S.J., Frost, J.A., Adak, G.K., Horby, P., Swan, A.V., Painter, M.J. & Neal, K.R. (2002).** A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. *Emerg Infect Dis* 8: 937-42.
- Gilliss, D., Cronquist, A.B., Cartter, M., Tobin-D'Angelo, M., Blythe, D., Smith, K., Lathrop, S., Zansky, S., Cieslak, P.R., Dunn, J., Holt, K.G., Lance, S., Crim, S.M., Henao, O.L., Patrick, M., Griffin, P.M. & Tauxe, R. (2013).** Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food—foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996–2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 62:283–287.
- González, G., Cordero, N., García, P. & Figueroa, G. (2013).** Análisis molecular de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos en aislados de *Campylobacter jejuni* de humanos, bovinos y carne de ave. *Rev Chilena Infectol*; 30(2): 135 – 139.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., Mcconnell, W. & Harper, W. (1989).** Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol* 39: 397-405.
- Goossens, H. et al. (1991).** *Campylobacter upsaliensis* enteritis associated with canine infections. *Lancet* 337: 1486–1487.
- Goossens, H., Vlaes, L., Galand, I., Van den Borre C. & Butzler J.P. (1989).** Semisolid blood-free selective-motility medium for the isolation of campylobacters from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1077–1080.
- Graham, J., Boland, J. & Silbergeld, E. (2007).** Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. *Public Health Rep* 122:79–87.
- Granato, P.A, Chen, L., Holiday, I., Rawling, R.A., Novak, S.M., Quinlan, T. & Musser, K.A. (2010).** Comparison of premier CAMPY enzyme immunoassay (EIA), ProSpecT *Campylobacter* EIA, and ImmunoCard STAT! CAMPY tests with culture for laboratory diagnosis of *Campylobacter* enteric infections. *J Clin Microbiol* 48:4022–4027.
- Guerry, P. (2007).** *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology* 15 (10): 456 – 461.
- Guo, B., Lin, J., Reynolds, D.L. & Zhang, Q. (2010).** Contribution of the multidrug efflux transporter CmeABC to antibiotic resistance in different *Campylobacter* species. *Foodborne Pathog Dis* 7: 77-83.
- Haddock, G. et al. (2010).** *Campylobacter jejuni* 81–176 forms distinct microcolonies on in vitro-infected human small intestinal tissue prior to biofilm formation. *Microbiology* 156: 3079–3084.

- Harrington, C., Moran, L., Ridley, A., Newell, D. & Madden, R. (2003). Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1321-1333.
- Havelaar, A., Mangen, M.J., de Koeijer, A.A., Bogaardt, M., Everes, E.G., Jacobs-Reitsma, W.F., van Pelt, W., Wagenaar, J.A., de Wit, G.A., van der Zee, H., & Nauta, M.J. (2007). Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Anal.* 27:831-844.
- Havelaar, A.H., van Pelt, W., Ang, C.W., Wagenaar, J.A., van Putten, J.P., Gross, U. & Newell, D.G. (2009). Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. *Crit Rev Microbiol* 35:1-22.
- Hernández, J. (diciembre, 2007). Discurso de recepción. *Campylobacter*: líder en patología intestinal infecciosa. Real Academia de Medicina, Valencia (España).
- Herschleb, J., Ananiev, G. & Schwartz, D.C. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* 2: 677-84.
- Hooper, D.C. & Jacoby, G.A. (2016). Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6:a025320.
- Horrocks, S.M., Anderson, R., Nielsbet, D.J. & Ricke, S.C. (2009). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe* 15: 18-25.
- Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 117:237-257.
- Iwamoto, M., Huang, J.Y., Cronquist, A.B., Medus, C., Hurd, S., Zansky, S., Dunn, J., Woron, A.M., Oosmanally, N., Griffin, P.M., Besser, J. & Henao, O.L. (2015). Bacterial enteric infections detected by culture-independent diagnostic tests—FoodNet, United States, 2012-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 64:252-257.
- Jackson, B.R., Zegarra, J.A., Lopez, H., Sejvar, J., Arzate, F., Waterman, S., Nunez, A.S., Lopez, B., Weiss, J., Cruz, R.Q., Murrieta, D.Y., Luna, R., Heiman, K., Vieira, A.R., Fitzgerald, C., Kwan, P., Zarate-Bermudez, M., Talkington, D., Hill, V.R. & Mahon, B. (2014). Binational outbreak of Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter jejuni* infection, Mexico and USA, 2011. *Epidemiol Infect* 142:1089-1099.
- Jagannathan, A., & Penn, C. (2005). "Motility," in *Campylobacter*. Molecular and Cellular Biology, eds J. M. Ketley and M. E. Konkel (Norfolk: Horizon Bioscience), 331-347.
- Jain, D., Prasad, K.N., Sinha, S. & Husain, N. (2008). Differences in the virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *J Med Microbiol* 57:267-272.
- Jakopanec, I., Borgen, K., Vold, L., Lund, H., Forseth, T., Hannula, R., Nygard, K. (2008). A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: the need to focus on distribution system safety. *BMC Infect Dis* 8:128.
- Jani, A.J. & Cotter, P.A. (2010). Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe* 8: 2-6.
- Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E.K., Sherman, P. & Chan, V.L. (2001). JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol* 39: 1225-1236.
- Jones, F.S., Orcutt, M. & Little, R.B. (1931). Vibrios (*Vibrio jejuni*, n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J Exp Med* 53:853-867.
- Kaakoush, N., Castaño, N., Mitchell, H.M. & Man, S.M. (2015). Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev* 28: 687- 720.
- Kalmokoff, M. et al. (2006). Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 188: 4312-4320.
- Kazwala, R., Collins, J., Hannan, R. & Crinion, H. (1990). Factors responsible for the introduction and the spread of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry production. *Vet. Rec.* 121: 305-306.
- Keithlin, J., Sargeant, J., Thomas, M.K. & Fazil, A. (2014). Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. *BMC Public Health* 14:1203.
- Kendall, M., Crim, S., Fullerton, K., Han, P., Cronquist, A., Shiferaw, B., Ingram, L.A., Rounds, J., Mintz, E.D. & Mahon BE. (2012). Travel-associated enteric infections diagnosed after return to the United States, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004-2009. *Clin Infect Dis* 54(5):S480-S487.
- Kirkpatrick, B.D. & Tribble, D.R. (2011). Update on human *Campylobacter jejuni* infections. *Curr Opin Gastroenterol* 27: 1-7.

- Krieg, N.R. (1984).** Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid Gram-negative bacteria, p. 71-72. In: N.R. Krieg and H.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th Edition, vol 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Lara-Tejero, M., & Galan, J. E. (2001).** CdtA, CdtB and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.* 69: 4358–4365.
- Larrosa, A., Macías, R., Sánchez, C.A., Cortes, M. & Aguilar, S. (2010).** Seasonal variation of enteropathogens in infants and preschoolers with acute diarrhea in western Mexico. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51:534–536.
- Lastovica, A. (2006).** Emerging *Campylobacter* spp.: the tip of the iceberg. *Clinical Microbiology Newsletter* 28: 49 – 56.
- Lastovica, A., On, S. & Zhang, L. (2014).** The Family *Campylobacteraceae*. In: E. Rosenberg et al., (eds.), *The prokaryotes-Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria*. Springer-Verlag., Berlin.
- Lawson, A.J., On, S., Logan, J.M. & Stanley, J. (2001).** *Campylobacter hominis* sp. nov. from the human gastrointestinal tract. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:651–660.
- Lee, M. & Newell, D.G. (2006).** *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis* 50: 1-9.
- Liao, C.H., Chuang, C.Y., Huang, Y.T., Lee, P.I. & Hsueh, P.R. (2012).** Bacteremia caused by antimicrobial resistant *Campylobacter* species at a medical center in Taiwan, 1998–2008. *J Infect* 65:392–399.
- Loades, C.J., Reiman, L.E. & Keevil C.W. (2005).** Development of an improved medium for recovery of *Campylobacter* species avoiding common selective antibiotics, abstr. D-198. In Abstr. 105th Gen. Meet. Am. Soc Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C.M. & Zhang, Q. (2009).** Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol* 4:189–200.
- Lynch, O., Cagney, C., McDowell, D. & Duffy, G. (2010).** A method for the growth and recovery of 17 species of *Campylobacter* and its subsequent application to inoculated beef. *J Microbiol Methods* 83:1–7.
- Maher, M., Finnegan, C., Collins, E., Ward, B., Carroll, C. & Cormican, M. (2003).** Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. *J Clin Microbiol* 41:2980–2986.
- Man, S.M. (2011).** The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol* 8: 669 – 685.
- Man, S.M., Kaakoush, N.O. & Mitchell, H.M. (2011).** The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8:152–168.
- Man, S.M., Kaakoush, N.O., Octavia, S. & Mitchell, H. (2010).** The internal transcribed spacer region, a new tool for use in species differentiation and delineation of systematic relationships within the *Campylobacter* genus. *Appl Environ Microbiol* 76:3071–3081.
- Messens, W., Herman, L., De Zutter, L. & Heyndrickx, M. (2009).** Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Vet Microbiol* 138: 120-31.
- Millano, A., Barrientos, M., Gómez, C., Tomova, A., Bushmann, H., Dolz, H., et al. (2011).** Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: Salud pública y salmonicultura en Chile. *Rev Med Chile* 139: 107-18.
- Moore, J., Barton, M., Blair, I., Corcoran, D., Dooley, J., Fanning, S., Kempf, I., Lastovica, A., Lowery, C., Matsuda, M., McDowell, D., McMahon, A., Millar, B., Rao, J.R., Rooney, P.J., Seal, B.S., Snelling, W.J. & Tolba, O. (2006).** The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect* 8:1955–1966.
- Mughini, G., Smid, J., Wagenaar, J., de Boer, A., Havelaar, A., Friesema, I., French, N., Busani, L. & van Pelt, W. (2012).** Risk Factors for Campylobacteriosis of Chicken, Ruminant, and Environmental Origin: A Combined Case-Control and Source Attribution Analysis. *PLoS ONE* 7(8): e42599.
- Mukhopadhyay, I., Thomson, J.M., Hansen, R., Berry, S.H., El-Omar, E.M. & Hold, G.L. (2011).** Detection of *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* species in colonic biopsies from adults with ulcerative colitis. *PLoS One* 6:e21490.
- Nachamkin, I., Bohachick, K. & Patton, C.M. (1993).** Flagellin genotyping of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 1531-1536.
- Nachamkin, I., Ung, H. & Patton, C.M. (1996).** Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 277–281.

- 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 Ygancio Monteros, durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014 (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Nesbakken, T., Eckner, K., Hoidal, H.K. & Rotterud, O. (2003).** Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering and dressing procedures. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 231–240.
- Ng, L.K., Sherburne, R., Taylor, D. & Stiles, M. (1985).** Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *J. Bacteriol.* 164: 338–343.
- Notario, R., Borda, N., Gambandé, T., Bermejo, J., Ponessa, A., Toledo, V. (2011).** Cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes a quinolonas aisladas de humanos, gallinas y pollos. *Medicina* 71: 331-5.
- Nuijten, P.J., van Asten, F., Gaastra, W. & van der Zeijst, B. (1990).** Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. *Journal of Biological Chemistry* 265: 17798–17804.
- Nuñez, A. (2016).** Estudio de prevalencia de especies de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*) en animales de corral y perros en el Sur del Ecuador (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Obaco, E. (2016).** Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en centros de cuidado materno-infantil de la ciudad de Loja (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Obeng, A.S., Rickard, H., Sexton, M., Pang, Y., Peng H. & Barton, M. (2012).** Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. *J Appl Microbiol* 113: 294307.
- Ordoñez, E. (2016).** Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en muestras fecales en caninos de la ciudad de Loja durante el periodo abril – julio 2016 (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Orr, K., Lighfoot, N., Sisson, P., Harkis, B., Tveddle, J., Boyd, P., Carroll, A., Jackson, C., Wareing, D. & Freeman, R. (1995).** Direct milk excretion of *Campylobacter jejuni* in a dairy cow causing cases of human enteritis. *Epidemiol. Infect.* 114: 15–24.
- OzFoodNet Working Group (OWG). (2010).** Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: annual report of the OzFoodNet network, 2009. *Commun Dis Intell Q Rep* 34:396–426.
- 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. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Pérez, D., García, F., Abad, J. & Echeita, M. (2012).** Dynamics of populations of *Campylobacter jejuni* in two grandparent broiler breeder farms: Persistent vs. transient strains. *Veterinary Microbiology* 159:204-211.
- Pérez, D., López, J., Simón, C. & Echeita, M. (2013).** Aplicación del análisis de los polimorfismos de los tamaños de los fragmentos de restricción del gen *flaA* amplificado por reacción en cadena de la polimerasa y resistotipo para identificar potenciales brotes de campilobacteriosis no diagnosticados en España. *Enferm Infec Microbiol Clin.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.07.014>.
- Petersen, L., Nielsen, E.M., Engberg J., On, S.L. & Dietz, H.H. (2001).** Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. *Appl Environ Microbiol* 67: 3115-21.
- Piddock, L.J., Griggs, D., Johnson, M.M., Ricci, V., Elviss, N.C., Williams, L.K., Jorgensen, F., Chisholm, S.A., Lawson, A.J., Swift C. & others. (2008).** Persistence of *Campylobacter* species, strain types, antibiotic resistance and mechanisms of tetracycline resistance in poultry flocks treated with chlortetracycline. *J Antimicrob Chemother* 62: 303-15.
- Pittman, M.S., Elvers, K.T., Lee, L., Jones, M.A., Poole, R.K., Park, S.F. & Kelly, D.J. (2007).** Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress. *Mol Microbiol* 63: 575-590.
- Pleydell, E., Rogers, L., Kwan, E. & French, N. (2010).** Low levels of antibacterial drug resistance expressed by Gram-negative bacteria isolated from poultry carcasses in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 58:229–236.
- Poly, F. & Guerry, P. (2008).** Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24: 27–31.

- 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 (Tesis de Pregrado). Universidad Central del Ecuador, Ecuador.
- Pope, J.E., Krizova, A., Garg, A.X., Thiessen-Philbrook, H. & Ouimet, J.M. (2007).** *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 37:48–55.
- Poropatich, K.O., Walker, C.L. & Black, R.E. (2010).** Quantifying the association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barre Syndrome: a systematic review. *J Health Popul Nutr* 28:545–552.
- Qin, S., Wang, Y., Zhang, Q., Chen, X., Shen, Z., Deng, F., Wu, C., Shen, J. (2012).** Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:5332–5339.
- Rautelin, H., Jusufovic, J. & Hanninen, M.J. (1999).** Identification of hippurate-negative thermophilic *Campylobacters*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 35: 9–12.
- Redgrave, L.S., Sutton, S.B., Webber, M.A. & Piddock, L.J. (2014).** Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*; 22:438–445.
- Reeser, R.J. et al. (2007).** Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1908–1913.
- Rivera, N., Bustos, R., Montenegro, S., Sandoval, M., Castillo, J., Fernández, H., et al. (2011).** Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter spp.* aisladas en niños y en aves de corral. *Rev Chilena Infectol* 28: 555-62.
- Robinson, R. & Pugh, R. (2002).** Dogs, zoonoses and immunosuppression. *J. Royal Soc. Health* 122:95-98.
- Schweitzer, N. et al. (2011).** Molecular characterization of *Campylobacter lanienae* strains isolated from food-producing animals. *Foodborne Pathog Dis.* 8, 615–621.
- Sears, A., Baker, M.G., Wilson, N., Marshall, J., Muellner, P., Campbell, D.M., Lake, R.J. & French, N.P. (2011).** Marked campylobacteriosis decline after interventions aimed at poultry, New Zealand. *Emerg Infect Dis* 17:1007–1015.
- Sebald, M. & Veron, M. (1963).** Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Ann Inst Pasteur* 105:897–910.
- Sellars, M.J., Hall, S.J. & Kelly, D.J. (2002).** Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. *J Bacteriol* 184: 4187-96.
- Silva, J., Leite, D., Fernández, M., Mena, C., Gibbs, P.A. & Teixeira, P. (2011).** *Campylobacter spp.* as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology* 200 (2): 1 – 12.
- Smith, J. & Fratamico P. (2010).** Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *J Food Prot* 73: 1141 – 52.
- Smith, K.D. et al. (2003).** Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for portofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* 4: 1247–1253.
- Smith, T. (1919).** The Etiological Relation of Spirilla (*Vibrio fetus*) to Bovine Abortion. *J Exp Med* 30: 313-23.
- Song, Y.C., Jin, S., Louie, H., Ng, D., Lau, R., Zhang, Y., Weerasekera, R., Al Rashid, S. et al. (2004).** *FlaC*, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol Microbiol* 53: 541–553.
- Stahl, M., Friis, L.M., Nothaft, H., Liu, X., Li, J., Szymanski, C.M. & Stintzi, A. (2011).** L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 7194-9.
- Steinberg, J. & Lee, C. (2010).** Síndrome de Guillain – Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (PDIA) y sus variantes. 10ª edición. GBS/CIDP Foundation International.
- Strachan, N.J. & Forbes, K.J. (2010).** The growing UK epidemic of human campylobacteriosis. *Lancet* 376: 665-7.
- Tam, C., Rodrigues, L.C., Viviani, L., Dodds, J.P., Evans, M., Hunter, P.R., Gray, J., Letley, L., Rait, G., Tompkins, D. & O'Brien, S. (2012).** Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut* 61:69–77.
- Tamborini, A., Casabona, L., Viñas, M., Asato, V., Hoffer, A., Farace, M., Lucero, M., Corso, A. y Pichel, M. (2012).** *Campylobacter spp.*: prevalencia y caracterización fenotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 44:266-271.

- Taylor, D.E. & Courvalin, P. (1988).** Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother* 32: 1107–1112.
- Tenover, F.C., Williams, S., Gordon, K.P., Nolan, C. & Plorde, J.J. (1985).** Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother* 27: 37–41.
- Threlfall, E. (2004).** Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* and animal drug use. *Int J Infect Dis* 8: 190-2.
- Thwaites, R.T. & Frost, J.A. (1999).** Drug resistance in *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. lari* isolated from humans in North West England and Wales, 1997. *J. Clin. Pathol.* 52:812–814.
- Tsai, H.J., Huang, H.C., Tsai, H.L. & Chang, C. (2006).** PCR-based Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens and dogs in Northern Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 68(8): 815-819.
- Tsoni, K., Papadopoulou, E., Michailidou, E. & Kavaliotis, I. (2013).** *Campylobacter jejuni* meningitis in a neonate: a rare case report. *J Neonatal Perinatal Med* 6:183–185.
- van de Giessen, A., Mazurier, S.I., Jacobs, W., Jansen, W., Berkers, P., Ritmeester, W. & Wernars, K. (1992).** Study on the epidemiology and control of *Campylobacter jejuni* in poultry broiler flocks. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1913–1917.
- van Deun, K., Haesebrouck, F., Hendrickx, M., Favoreel, H., Dewulf, J., Ceelen, L., Dumez, L., Messens, W., Leleu, S., Van Immersal, F., Ducatelle, R. & Pasmans, F. (2007).** Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J. Med. Microbiol.* 56: 1284–1289.
- van Doorn, P.A., Ruts, L. & Jacobs, B.C. (2008).** Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol* 7:939–950.
- Vandamme, P. & De Ley, J. (1991).** Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *Int. J Syst. Bacteriol* 41: 451-455.
- Vandamme, P. (2000).** Microbiology of *Campylobacter* infections: taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In *Campylobacter* ed. Nachamkin, I. and Blaser, M.J. pp. 3–26. Washington, DC: ASM Press.
- Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E. & Falsen, E. (2010).** Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2016-22.
- Vandamme, P., Dewhirst, F.E., Paster, B.J. & On, S. (2005).** Genus I. *Campylobacter* Sebald and Veron 1963, 907 emend. Vandamme, Falsen, Rossau, Hoste, Segers, Tytgat & De Ley 1991a, 98. pp. 1147–1160. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Edited by D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley & G.M. Garrity. New York: Springer.
- Velayudhan, J. & Kelly, D.J. (2002).** Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology* 148: 685-94.
- Verhoeff, L., Jansen, H.A., in 't Veld, P., Beumer, R.R., Zwietering, M.H. & van Leusden, F.M. (2011).** Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *Int J Food Microbiol* 144: 406-12.
- Veron, M. & Chatelain, R. (1973).** Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Veron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. *Int J Syst Bacteriol* 23:122–134.
- Villavicencio, J.S. (2017).** Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en niños con y sin diarrea en el Hospital Isidro Ayora de la provincia de Loja, durante el periodo abril – junio de 2016 (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Vinueza, C. (2017).** *Salmonella* and *Campylobacter* in broilers at slaughter age: a possible source for carcasses contamination in Ecuador (Doctoral Thesis). Ghent University, Belgium.
- von Altrock, A., Hamedy, A., Merle, R. & Waldmann, K. (2013).** *Campylobacter* spp.—prevalence on pig livers and antimicrobial susceptibility. *Prev Vet Med* 109(1–2):152–157.
- Wagenaar, J.A., Mevius, D.J. & Havelaar, A.H. (2006).** *Campylobacter* in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. *Rev. Off. Int. Epizoot.* 25:581–594.
- Wassenaar, T.M. & Newell, D.G. (2000).** Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1-9.
- Wassenaar, T.M., Fernandez, A., Alonso, R., Marteinsson, V.T., Magnusson, S.H., Kristoffersen, A. & Hofshagen, M. (2009).** Comparison of *Campylobacter fla*-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. *Lett Appl Microbiol* 49: 388-95.

- Watson, R.O. & Galan, J.E. (2008).** *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS Pathog.* 4: e14.
- Wittwer, M., Keller, J., Wassenaar, T.M., Stephan, R., Howald, D., Regula, G. & Bissig-Choisat, B. (2005).** Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a *Campylobacter* population isolated from poultry farms in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 71:2840–2847.
- Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221–271.
- Zhao, S., Young, S.R., Tong, E., Abbott, J.W., Womack, N., Friedman, S.L. & McDermott, P.F. (2010).** Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from retail meat in the United States between 2002 and 2007. *Appl Environ Microbiol* 76: 7949-56.

## **ANEXOS**

 <b>UTPL</b> <small>UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA</small>	<b>ANEXO 1</b>  <b>Protocolo de Extracción de ADN Genómico de Bacterias Gram negativas</b>	Código: <b>CBCM-MC-002</b>
		Página: 1 de 2

El siguiente protocolo está basado en el empleo del kit de purificación de ADN genómico de Wizard® diseñado para el aislamiento de ADN procedente de células blancas de la sangre, cultivos celulares (tejidos en general, tejidos animales), tejido vegetal, levaduras y bacterias grampositivas y gramnegativas. Este kit se basa principalmente en 4 pasos: 1) lisado o rotura de la membrana celular así como de la membrana nuclear. 2) Digestión enzimática mediante el uso de RNasas. 3) Las proteínas celulares son eliminadas por un paso de precipitación salina, dejando únicamente el ADN genómico de alto peso molecular en la solución. 4) El ADN genómico es concentrado y desalinizado mediante precipitación con isopropanol.

**NOTA:** Almacenar el kit a temperatura ambiente (15-30°C).

### REACTIVOS

- Solución de Lisis Nuclear (kit)
- Solución de Precipitación proteica (kit)
- Solución de Rehidratación de ADN (kit)
- RNasa A (kit)
- Isopropanol (T° ambiente)
- Etanol al 70% (T° ambiente)
- Agua destilada estéril

### MATERIALES Y EQUIPOS

- Tubos de microcentrífuga (eppendorf) de 1.5ml
- Baño maría o termobloque
- Centrífuga
- Vórtex
- Puntas y micropipetas
- Hielo

### PROCEDIMIENTO

1. Tomar 1ml del cultivo bacteriano (caldo) incubado toda la noche y depositarlo en un tubo eppendorf de 1.5ml. También se puede trabajar con una asada del cultivo bacteriano puro sembrado en medio sólido y colocarlo en 600 µl de agua destilada estéril, dar vórtex.
2. Centrifugar a 13.000 – 16.000 rpm durante 2-5 min hasta obtener un sedimento celular o pellet. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 600 µl de la Solución de Lisis Nuclear. Resuspender las células con movimientos suaves hasta que se deshaga el pellet.
4. Incubar a 80°C durante 5 min para lisar las células, luego enfriar hasta temperatura ambiente.

5. Añadir 3 µl de RNasa al lisado celular. Invertir suavemente los tubos 2 – 5 veces para mezclar.
6. Incubar a 37°C durante 15 – 60 min. Enfriar la(s) muestra(s) hasta temperatura ambiente.
7. Añadir 200 µl de la Solución de Precipitación Proteica al lisado celular tratado con RNasa. Dar Vórtex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar.
8. Incubar la(s) muestra(s) en hielo durante 5 min.
9. Centrifugar a 13.000 – 16.000 rpm durante 3 – 6 min.
10. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN hacia un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril que contenga 600 µl de isopropanol.

**NOTA:** se recomienda dejar un poco de sobrenadante en el tubo original por tal de evitar contaminar la solución de ADN con residuos de proteínas.

**NOTA:** cuando no se obtiene un pellet de proteínas puede deberse a que la muestra no fue enfriada hasta T° ambiente antes de añadir la solución precipitante de proteínas.

11. Mezclar suavemente invirtiendo los tubos hasta que las hebras de ADN formen un conglomerado visible.

**NOTA:** no siempre se observan las hebras de ADN, lo que no implica necesariamente que no haya ADN en el tubo. Se recomienda continuar con el protocolo hasta el final.

12. Centrifugar a 13.000 – 16.000 durante 2 – 5 min.
13. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante (isopropanol) y conservar el pellet (ADN). Añadir 600 µl de etanol al 70% y mezclar suavemente invirtiendo el tubo varias veces para lavar el pellet de ADN.
14. Centrifugar a 13.000 – 16.000 rpm durante 2 – 5 min. Cuidadosamente aspirar el etanol y desechar.
15. Conservar el pellet y dejar secar al aire durante 10 – 15 min.
16. Añadir 100 µl de Solución Rehidratante de ADN al tubo, incubar a 65°C durante 1 hora y periódicamente **mezclar** la solución con ligeros golpecitos en el tubo. Alternativamente rehidratar el ADN incubando la solución toda la noche a T° ambiente o a 4°C.
17. Conservar el ADN obtenido a 2 – 8°C.
- 18.

 <b>UTPL</b> <small>UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA</small>	<b>ANEXO 2</b> <b>Protocolo de Amplificación del gen <i>flaA</i></b> <b>mediante PCR (<i>Polymerase Chain</i></b> <b><i>Reaction</i>)</b>	Código: <b>CBCM-MC-001</b>
		Página: 1 de 2

## REACTIVOS

- Buffer de carga
- dNTPs
- MgCl<sub>2</sub>
- TaqPolimerasa
- Agua destilada desionizada estéril
- Primers

## MATERIALES Y EQUIPOS

- Tubos de microcentrífuga (eppendorf) de 1.5ml estériles
- Puntas y micropipetas
- Tubos y tapas de PCR de 0.2ml estériles
- Tapas para tubos de PCR estériles
- Vórtex
- Microcentrífuga
- Termociclador

## PROCEDIMIENTO

1. Preparar todos los reactivos, materiales y equipos a utilizar, dejar que los reactivos se descongelen mientras son mantenidos en frío.
2. En un tubo eppendorf de 1.5 ml, hacer el master mix con las cantidades establecidas en la tabla de PCR, a **excepción** del ADN.

**NOTA:** la *TaqPolimerasa* debe mantenerse todo el tiempo en frío, además se recomienda agregarla al mix al final.

3. Invertir cuidadosamente para homogenizar el mix sin crear burbujas. Centrifugar por 5 segundos a máxima velocidad para juntar las gotas esparcidas.
4. A partir del master mix, tomar alícuotas con el volumen de reacción establecido (20 µl) y repartir en tubos de PCR, luego adicionar a cada tubo el volumen de muestra (5µl) para un volumen final de reacción, en este caso de 25µl. Mantener en hielo o a 4°C hasta llevar al termociclador.

**NOTA:** trabajar con un blanco (mix sin adición del ADN para verificar que la reacción está libre de contaminantes), un control positivo cuyo patrón de bandas amplificado sea conocido y un control negativo.

## PCR

Gen	Componentes	1X (µl)	Concentración inicial	Concentración final	
<i>flaA</i>	H <sub>2</sub> O	11,875			
	Buffer de carga	5,00	5x	1x	
	dNTPs	0,50	10mM	200µM	
	MgCl <sub>2</sub>	1,50	25mM	1,5mM	
	Primers:	A1	0,5	100µM	5 µM
		A2	0,5	100µM	5 µM
	TaqPolimerasa	0,125	5U/µl	1,25U/50µl	
	ADN	5,00			
	<b>Volumen de reacción</b>	<b>25,00</b>			

### 5. Condiciones para el termociclador:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 segundos	
Anillamiento	53	1 min	35
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1

### 6. Una vez finalizado el proceso de amplificación en el termociclador, las muestras deben ser almacenadas a 4°C hasta que vayan a utilizarse.

 <b>UTPL</b> <small>UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA</small>	<b>ANEXO 3</b> <b>Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa – PCR</b>	Código: <b>CBCM-MC-003</b>
		Página: 1 de 2

Una electroforesis en gel de agarosa al 1% permitirá una mejor detección de amplicones de alto peso molecular, al generarse una matriz de un tamaño de poro mayor.

### REACTIVOS

- Agarosa Ultrapura
- Buffer TBE 1X (para gel y para correr)
- Gel RED 3X en agua
- Marcador de peso molecular

### MATERIALES Y EQUIPOS

- Micropipeta y Puntas blancas 1-10ul
- Matraz Erlenmeyer 250ml
- Probeta de 50 ml
- Espátula
- Contenedor del gel y peine
- Balanza analítica
- Plancha térmica/microondas
- Cubeta de electroforesis y fuente de poder
- Transiluminador UV

### PROCEDIMIENTO

1. Preparar un gel de agarosa al 1%, disolviendo la agarosa en Buffer TBE 1X y en el volumen calculado de Gel RED (3X en agua) mediante la aplicación de calor ver tabla 3.  
**NOTA:** evitar exceso de ebullición ya que puede evaporarse demasiado y alterar la concentración final de agarosa.
2. Homogenizar suavemente sin formar burbujas, dejar enfriar hasta aprox. 60°C y luego verter la solución sobre el contenedor del gel. Colocar el peine.
3. Una vez solidificado el gel, colocarlo en la cubeta de electroforesis y añadir el buffer de corrida (TBE 1X) de modo que cubra completamente el gel. Retirar el peine para formar los pocillos.
4. Cargar los pocillos con las muestras (productos de PCR), los controles y el marcador de peso molecular de 100pb.
5. Programar la corrida: 120 V, 30 min, 300 mA.
6. Mediante un transiluminador UV visualizar y hacer un registro fotográfico de las bandas obtenidas.

**Electroforesis en Gel de Agarosa 1%  
volumen 35ml**

<b>Gen</b>	<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
<i>flaA</i>	Agarosa	0,35 g
	Buffer TBE 1X	23,33 ml
	Gel RED 3X	11,67 ml
	Marcador 100pb	1,5 $\mu$ l
	Producto de PCR	3 $\mu$ l

 <b>UTPL</b> <small>UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA</small>	<b>ANEXO 4</b> <b>Protocolo de Tipificación del gen <i>flaA</i> de <i>Campylobacter</i> por RFLP (<i>Fragment Length Polymorphism Analysis</i>)</b>	Código: <b>CBCM-MC -004</b>
		Página: 1 de 1

## REACTIVOS

- Buffer de carga
- Enzima de Restricción
- Agua destilada desionizada estéril

## MATERIALES

- Puntas blancas estériles 1-10ul.
- Puntas amarillas estériles 10-100ul.
- Micropipetas
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Microcentrífuga
- Termobloque

## PROCEDIMIENTO

1. Preparar un mix en un tubo de 1.5ml con los componentes de la tabla siguiendo ese orden. La enzima debe mantenerse siempre en frío.
2. Realizar alícuotas del mix (10µl por muestra) y añadir al final el producto de PCR (10µl) obteniendo un volumen final de reacción de 20µl.
3. Mezclar suavemente por pipeteo y centrifugar por 5 segundos a máxima velocidad para juntar las gotas esparcidas.
4. Incubar el mix de digestión a 37°C toda la noche en el termobloque. Se estandarizó el protocolo a un tiempo de incubación de 2 horas siguiendo las recomendaciones por el fabricante.  
**NOTA:** la enzima se inactiva al incubar durante 20 min a 65°C o más.
5. Conservar los digeridos a 4°C.
6. Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 3% (Anexo 3).

<b>RFLP (Digestión)</b>				
<b>Gen</b>	<b>Componentes</b>	<b>1X (µl)</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>concentración final</b>
<i>flaA</i>	H <sub>2</sub> O	5,9		
	Buffer de carga	4	5X	1X
	<i>Ddel</i>	0,1	10U/µl	1U/20µl
	Mezclar por pipeteo y luego añadir:			
	Producto de PCR	10		
	<b>Volumen De reacción</b>	<b>20</b>		

 <b>UTPL</b> <small>UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA</small>	<b>ANEXO 5</b> <b>Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa – RFLP</b>	Código: <b>CBCM-MC-003</b>
		Página: 1 de 2

Una electroforesis en gel de agarosa al 3% permitirá una mejor detección de amplicones de bajo peso molecular, al generarse una matriz de un tamaño de poro menor. Los fragmentos de diversos tamaños, en especial aquellos que se encuentren muy próximos es posible separarlos y detectarlos más fácilmente con geles más concentrados.

### REACTIVOS

- Agarosa Ultrapura
- Buffer TBE 1X (para gel y para correr)
- Gel RED 3X en agua
- Marcador de peso molecular

### MATERIALES Y EQUIPOS

- Micropipeta y Puntas blancas 1-10ul
- Matraz Erlenmeyer 250ml
- Probeta de 50 ml
- Espátula
- Contenedor del gel y peine
- Balanza analítica
- Plancha térmica/microondas
- Cubeta de electroforesis y fuente de poder
- Transiluminador UV

### PROCEDIMIENTO

7. Preparar un gel de agarosa al 1%, disolviendo la agarosa en Buffer TBE 1X y en el volumen calculado de Gel RED (3X en agua) mediante la aplicación de calor ver tabla 3.  
**NOTA:** evitar exceso de ebullición ya que puede evaporarse demasiado y alterar la concentración final de agarosa.
8. Homogenizar suavemente sin formar burbujas, dejar enfriar hasta aprox. 60°C y luego verter la solución sobre el contenedor del gel. Colocar el peine.
9. Una vez solidificado el gel, colocarlo en la cubeta de electroforesis y añadir el buffer de corrida (TBE 1X) de modo que cubra completamente el gel. Retirar el peine para formar los pocillos.
10. Cargar los pocillos con las muestras (productos de PCR), los controles y el marcador de peso molecular de 100pb.
11. Programar la corrida: 90 V, 90 min. Seguido de 120 V, 30 min a 300 mA.
12. Mediante un transiluminador UV visualizar y hacer un registro fotográfico de los patrones de bandas obtenidos.

**Electroforesis en Gel de Agarosa 3%**  
**volumen 35 ml**

<b>Gen</b>	<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
<i>flaA</i>	Agarosa	1,05 g
	Buffer TBE 1X	23,33 ml
	Gel RED 3X	11,67 ml
	Marcador 100pb	1,5 $\mu$ l
	Producto de PCR	10 $\mu$ l