



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* EN MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA .

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

LIRIO IXTLAXOCHITL CALDERÓN GÓMEZ

ASESORES: MVZ, M en B, Dr. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ  
QBP, M en B, Dr. VICTOR H. BUSTAMANTE SANTILLÁN  
MVZ. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ  
MVZ. CRISTINA RODRÍGUEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

*"Todo llega a aquél que mientras espera lucha"*  
**Thomas Alva Edison**

*"Algunas personas ven las cosas como son y se preguntan: ¿Por que?  
Yo veo las cosas que jamás existieron y me pregunto: ¿Por qué no?"*  
**Robert F. Kennedy**

## DEDICATORIAS

A Norma Gómez Alvarado a quién le debo la vida y todo lo que soy, porque gracias a ti siempre he recibido el mejor ejemplo de fortaleza, rectitud, honestidad y perseverancia. Gracias por celebrar y sufrir conmigo tanto alegrías como males, por la confianza y seguridad que me has brindado desde pequeña y que me han permitido concluir todos mis sueños. Nunca terminaré de darle gracias a Dios por permitirme estar junto a ti. Te amo mamá.

A Humberto Alvarez Hernández, mi gran amor. Gracias por entregarme tú corazón y por pasar por alto todos mis errores y debilidades, gracias por ayudarme a ser una mejor persona cada día. Te amo cosita divina.

A mis hermanos y hermanas quienes me han enseñado a sacar el carácter y a ser fuerte. Sin ustedes no habría aprendido a ganar una pelea (Sonia, Juan Manuel, Alfonso, Viridiana y Claudia)

A mis sobrinos que con sus risas y travesuras han llenado mi vida de amor, alegría, ternura y esperanza ya que son el regalo más grande que Dios pudo dar a mí familia (Viri, Memo, Monse, Lalo, Mena, Maty, Dany, Cassandra y Abril).

## AGRADECIMIENTOS

A Dios. Porque siempre me ha guiado por el buen camino para ver la luz de la esperanza y la verdad. Gracias por ayudarme a ser mejor cada día y por estar a mi lado en los momentos mas difíciles de mi vida sin permitir que me rinda. Gracias por la fuerza, paciencia y perseverancia que me han permitido concluir esta etapa en mi vida y por toda la ayuda que me brindas a través de la gente que me rodea.

A Norma Gómez y Humberto Alvarez: Las personas mas importantes en mi vida, quienes con los ojos cerrados han dado todo por mí. Los amo.

A mis Asesores:

Antonio Verdugo Rodríguez quién me dio la oportunidad de trabajar con un microorganismo tan apasionante y fastidioso. Gracias a ti hoy soy mejor, por enseñarme a escuchar, a tener paciencia y a no interrumpir y sobre todo gracias por ayudarme a culminar este sueño.

Daniel Martínez Gómez quién siempre me ha brindado su apoyo incondicional siendo un gran amigo. Gracias por todas tus enseñanzas y por tú gran paciencia.

Cristina Rodríguez Sánchez quién siempre me ha orientado y me ha ayudado a seguir adelante. ¡Gracias por todo su apoyo!

Victor Humberto Bustamante Santillán quién siempre me brindó su ayuda incondicional.

A Alejandro De La Peña Moctezuma quién siempre ha sido un gran amigo y a quién le debo la oportunidad de aprender a controlar mis manos en un laboratorio. Gracias por tener confianza en mí.

A mis mejores amigos y compañeros de quienes sólo he recibido apoyo y confianza:

René, Andrea, Erick, Estrella, Rebeca, Elvia, Elsa, Alfredo, Daniel, Xochitl, Estela, Héctor, Marcela, Edgar, Francisco y Francis.

A toda mi gran familia del Departamento de Microbiología e Inmunología por su sonrisa cada día de este trabajó.

Gracias por su ayuda desinteresada en este trabajo a Alfredo Castañeda, Jose Angel Gutierrez, Jaime Alonso Navarro y Carolina Becker.

Gracias a la Secretaría General de la UNAM que a través del Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de investigación PROBETEL me brindo apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Gracias a la Universidad Autónoma de México que me dio la oportunidad de ser universitaria en esta Facultad.

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN-----	1
INTRODUCCIÓN-----	2
JUSTIFICACIÓN-----	31
HIPÓTESIS-----	32
OBJETIVOS-----	32
MATERIAL Y MÉTODOS-----	33
RESULTADOS-----	49
DISCUSIÓN -----	84
CONCLUSIONES-----	90
LITERATURA CITADA-----	91



## LISTA DE CUADROS

	<u>PÁGINA</u>
<b>CUADRO 1.</b> ESPECIES DE <i>Campylobacter</i> -----	4
<b>CUADRO 2.</b> BROTES DE INFECCIONES POR <i>Campylobacter</i> EN ESTADOS UNIDOS POR CONSUMO DE ALIMENTO Y AGUA CONTAMINADA, DE 1978 A 1996 -----	9
<b>CUADRO 3.</b> CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y BIOQUÍMICAS DE <i>Campylobacter</i> -----	15
<b>CUADRO 4.</b> MEDIOS UTILIZADOS EN EL AISLAMIENTO DE <i>Campylobacter</i> -----	58
<b>CUADRO 5.</b> AGAR SANGRE CON LOS DIFERENTES ANTIBIÓTICOS QUE COMPONEN EL MEDIO BU7 -----	59
<b>CUADRO 6.</b> RESULTADOS DE LAS CUATRO REPETICIONES TANTO PARA EL AISLAMIENTO COMO PARA LA PCR --	72
<b>CUADRO 7.</b> SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD PARA EL AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO-----	73
<b>CUADRO 8.</b> SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD PARA LA PCR-----	73
<b>CUADRO 9.</b> RESULTADOS DE LA MICROSCOPIA DE CAMPO OBSCURO EN HECES Y SOLUCIÓN DE LAVADOS PREPUCIALES (SLP) -----	75
<b>CUADRO 10.</b> RESULTADOS DEL PRIMOAISLAMIENTO A PARTIR DE HECES Y SOLUCIÓN DE LAVADOS PREPUCIALES (SLP) -----	76

## LISTA DE FIGURAS

	<u>PÁGINA</u>
FIGURA 1. MODELO DE TRANSMISIÓN DE <i>C. jejuni</i> -----	7
FIGURA 2. DIAGRAMA DEL CURSO TÍPICO DE LA ENTERITIS POR <i>Campylobacter</i> -----	17
FIGURA 3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA -----	28
FIGURA 4. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE PCR -----	29
FIGURA 5. Secuencia del gene <i>flaA</i> de <i>Campylobacter jejuni</i> -----	37
FIGURA 6. Secuencia del gene <i>flaA</i> de <i>Campylobacter coli</i> -----	38
FIGURA 7. Secuencia del gene 16S ribosomal ARN de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> -----	39
FIGURA 8. Secuencia del gene 16S ribosomal ARN de <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> -----	40
FIGURA 9. EXTRACCIÓN DE ADN POR EL MÉTODO DE CTAB/NaCl Y TIOCIANATO DE Guanidina -----	49
FIGURA 10. PRODUCTOS DE LA PCR 1 ( <i>C. fetus</i> ) -----	50
FIGURA 11. PRODUCTOS DE LA PCR 1, DIGERIDOS CON LA ENZIMA <i>AluI</i> -----	51
FIGURA 12. PRODUCTOS DE LA PCR 1 PURIFICADOS Y PRECIPITADOS DIGERIDOS CON LA ENZIMA <i>AluI</i> -----	52
FIGURA 13. PRODUCTOS DE LA PCR 2 ( <i>C. jejuni</i> Y <i>C. coli</i> ) -----	53
FIGURA 14. PRODUCTOS DE LA PCR 1 PARA OBSERVAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE DE <i>C. fetus</i> ---	55
FIGURA 15. <i>Campylobacter jejuni</i> SUSPENDIDO EN SSF, DILUIDO y SEMBRADO EN AGAR SANGRE PARA REALIZAR LA CUENTA VIABLE DE COLONIAS-----	56
FIGURA 16. HECES DE <i>Campylobacter</i> SEMBRADAS EN AGAR SANGRE -----	60
FIGURA 17. HECES DE <i>Campylobacter</i> SEMBRADAS EN SUPLEMENTO PRESTON -----	60
FIGURA 18. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE HECES POR EL MÉTODO DE GUMERLOOK -----	62
FIGURA 19. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE HECES POR EL MÉTODO DE PITCHER -----	63
FIGURA 20. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE HECES POR EL MÉTODO DE BOOM CON MODIFICACIONES DE LAWSON -----	64
FIGURA 21. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE HECES POR EL MÉTODO COMERCIAL QIAamp DNA STOOL MINI KIT (QIAGEN) -----	65
FIGURA 22. PCR DE ADN OBTENIDO A PARTIR DE HECES POR EL MÉTODO DE GUMERLOOK -----	67
FIGURA 23. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE DILUCIONES EN SSF POR EL MÉTODO DE GUMERLOOK -----	68

<b>FIGURA 24.</b>	PCR DE ADN OBTENIDO A PARTIR DE HECES POR EL MÉTODO DE BOOM CON MODIFICACIONES DE LAWSON -----	69
<b>FIGURA 25.</b>	PCR DE ADN OBTENIDO A PARTIR DE HECES POR EL MÉTODO COMERCIAL QIAamp DNA STOOL MINI KIT (QIAGEN) -----	70
<b>FIGURA 26.</b>	ADN OBTENIDO A PARTIR DE HECES DE OVINAS POR EL MÉTODO DE BOOM CON MODIFICACIONES DE LAWSON -----	77
<b>FIGURA 27.</b>	PCR DE ADN OBTENIDO A PARTIR DE HECES DE OVINAS POR EL MÉTODO DE BOOM CON MODIFICACIONES DE LAWSON -----	78
<b>FIGURA 28.</b>	DIGESTIONES CON LA ENZIMA <i>A<sub>1</sub></i> DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR CON EL ADN OBTENIDO A PARTIR DE HECES DE OVINAS- -----	79
<b>FIGURA 29.</b>	ADN OBTENIDO A PARTIR DE LAVADOS PREPUCIALES DE OVINOS POR EL MÉTODO DE TIOCIANATO DE GUANIDINA -----	80
<b>FIGURA 30.</b>	PCR DE ADN OBTENIDO A PARTIR DE LAVADOS PREPUCIALES DE OVINOS POR EL MÉTODO DE TIOCIANATO DE GUANIDINA -----	81
<b>FIGURA 31.</b>	DIGESTIONES CON LA ENZIMA <i>A<sub>1</sub></i> DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR CON EL ADN OBTENIDO A PARTIR DE LAVADO PREPUCIALES DE OVINOS- -----	82

## RESUMEN

**CALDERÓN GÓMEZ LIRIO IXTLAXOCHITL.** Detección de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter fetus* en muestras clínicas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. (Bajo la dirección de: MVZ, M en B, Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, QBP, M en B, Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán, MVZ. Daniel Martínez Gómez y MVZ. Cristina Rodríguez Sánchez ).

En el presente estudio se utilizaron cultivos puros de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* para estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa [Polimerase Chain Reaction(PCR)] utilizando ciclos específicos para los dos juegos de oligonucleótidos propuestos. El primero (PCR-1) se diseñó para diferenciar *C. fetus* de *C. jejuni* y *C. coli* y el segundo para confirmar a *C. jejuni* y *C. coli*. La sensibilidad obtenida mediante la PCR-1 fue de 10 fg para *C. fetus* y para la PCR-2 fue de 100 fg para *Campylobacter jejuni* y *C. coli* , lo cual equivale a 4 y 6.4 bacterias, respectivamente. La PCR-2 se utilizó para detectar ADN de *C. jejuni* y *C. coli* en heces de bovino, previamente inoculadas con estos microorganismos. Mediante la PCR-1, se detectó ADN de *C. fetus* a partir de heces y solución de lavados prepuciales de ovinos procedentes de casos clínicos. La sensibilidad y especificidad obtenida en la PCR-2 fue de 96.8 % y 100%, respectivamente. Este trabajo constituye el primer reporte donde se utilizó exitosamente la PCR para detectar *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* a partir de muestras clínicas. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone la implementación de PCR en laboratorios de diagnóstico para detectar ADN de estos microorganismos en muestras clínicas y subproductos de origen animal.

## 1. Introducción.

Las Campylobacteriosis son zoonosis importantes de distribución mundial, causadas por varias especies del género *Campylobacter*, las cuales son importantes en el sector pecuario por las pérdidas económicas que provocan debido principalmente al aborto e infertilidad que causan en bovinos y ovinos<sup>(1,2, 3,</sup>

<sup>4)</sup> . *Campylobacter* también provoca enteritis en caprinos, porcinos, aves, gatos, perros, primates y animales silvestres, principalmente en animales jóvenes, estas infecciones pueden volverse crónicas o pasar desapercibidas. *Campylobacter* también puede estar involucrado como un agente secundario en infecciones bacterianas (*Salmonella*), virales ( parvovirus) o parasitarias (*Giardia* )<sup>(2, 3)</sup> . La transmisión es por vía oral-fecal, con difusión principalmente mediante alimento y agua, en el caso de *Campylobacter fetus* la transmisión es por la vía venérea<sup>(1, 2,</sup>

<sup>3)</sup> . La Campylobacteriosis en humanos es una infección que se presenta principalmente en niños menores de cuatro años y en adultos de entre 15 a 44 años, por consumo de alimentos contaminados como leche, productos lácteos, agua, carne de aves y contacto con cachorros infectados<sup>(1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12,13,</sup>

<sup>14)</sup>

### 1.1. Especies del Género *Campylobacter*.

El género *Campylobacter* está constituido por 13 especies, de las cuales, las de mayor importancia clínica y de salud pública son: *C. jejuni* que se divide en 2 subespecies; *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei* y *C. coli*, las cuales

son comensales del tracto intestinal de aves, bovinos, ovinos, cerdos, perros y gatos, a los que les causa enteritis, particularmente a animales jóvenes, lo cual también ha sido reportado en humanos <sup>(1, 7)</sup>. *Campylobacter fetus* (*C. fetus*) que se divide en 2 subespecies; *C. fetus* subsp. *venerealis* se ha adaptado al tracto genital de bovinos y ovinos, siendo el principal causante de infertilidad y *C. fetus* subsp. *fetus*, causante de aborto epizootico en ovinos y abortos esporádicos en bovinos, en humanos actúa como patógeno oportunista que se involucra en infecciones intestinales y sistémicas en pacientes con inmunodeficiencia, en mujeres embarazadas o en recién nacidos <sup>(1, 5, 6, 7, 8, 9)</sup>. Las especies restantes se resumen en el cuadro 1.

## 1.2. Apariencia microscópica, Morfología y Fisiología.

*Campylobacter* spp son microorganismos Gram negativos, que no forman esporas, poseen forma de "S", espiral, coma o alas de gaviota, miden de 0.2 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho por 0.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, son móviles con un flagelo en uno o ambos polos de la célula de acuerdo a la especie, con excepción de *C. gracilis* que es aflagelado. Son oxidasa positivos, no fermentadores, catalasa variable, no hemolíticos, resistentes al ácido nalidixico, son estrictamente microaerofílicos, pues requieren de 5-10 % de oxígeno, 10% de  $\text{CO}_2$  y 85% de  $\text{N}_2$  <sup>(1, 5, 3, 4, 6, 7, 9, 10)</sup>.

En microscopio de campo oscuro o contraste de fases se observa como principal característica su forma curva con movimiento rápido, con tinción de Gram se observa como bastón torcido o serpentina <sup>(3, 5, 7, 10, 13)</sup>.

**Cuadro 1.** Diferentes especies de *Campylobacter*. Modificado de García MM y

Quinn PJ <sup>(2, 3)</sup>.

Especie	Especie afectada	Daño	Transmisión
<i>Campylobacter fetus</i> Subs. <i>venerealis</i>	Bovinos, ovinos y reptiles	Aborto e infertilidad en bovinos.	Venerea
<i>Campylobacter fetus</i> Subs. <i>fetus</i>	Bovinos, ovinos y Humanos	Abortos esporádicos en bovinos, aborto epizootico en ovinos y enteritis en humanos.	Oral
<i>Campylobacter jejuni</i> <i>C.j. jejuni</i> <i>C.j. doylei</i> <i>Campylobacter coli</i> <i>Campylobacter lari</i> ( <i>laridis</i> )	Aves, bovinos, ovinos, cabras, cerdos, perros, gatos y humanos	Causa enteritis en cerdos, bovinos, cabras y aborto en ovejas, particularmente a animales jóvenes. En humanos ocasiona infección gastrointestinal y urinaria.	Oral
<i>Campylobacter mucosalis</i>	Cerdos	Asociado a enteritis proliferativa del cerdo (SPE).	Oral
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	Cerdos, bovinos y humanos	Diarreas en ganado, humanos y cerdos (SPE).	Oral
<i>Campylobacter sputorum</i> biovar <i>sputorum</i> , Biovar <i>bubulus</i> Biovar <i>fecalis</i>	Bovino, ovino y humano	Se considera no patógeno siendo comensal de cavidad oral en humanos, en prepucio de toros y tracto genital de vacas.	Oral
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	Perros, gatos y Humanos	Causante de diarreas, transmitido por perros y gatos, principalmente cachorros.	Oral
<i>Campylobacter concisus</i> , <i>C. showae</i> y <i>C. gracilis</i>	Humanos	Forman parte de la flora natural gingival.	Oral
<i>Campylobacter curvus</i> <i>C. rectus</i>	Humanos	Enfermedades periodontales	Oral
<i>Campylobacter cryaerophila</i>	Bovinos, cerdos, caballos, ovejas.	Aislados de animales sanos y esporádicamente de fetos abortados.	Significancia no conocida

### 1.3. Hábitat.

*Campylobacter* spp. puede encontrarse como flora de cavidad oral, tracto intestinal y tracto genital de algunas especies animales. *Campylobacter jejuni* y *C. lari* se presentan principalmente en aves, por lo cual se considera un reservorio natural y la principal fuente de infección para humanos. *Campylobacter coli* se encuentra con mayor frecuencia en cerdos aunque también es un enteropatógeno importante para humanos. Las aguas de pozos, ríos o residuales frecuentemente se encuentran contaminadas con *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, siendo éstas una fuente importante de infección. *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* se encuentra frecuentemente en prepucio de toros y puede infectar el tracto genital de vacas. Algunas especies de *Campylobacter* son saprofitas encontrándose en el ambiente como es el caso de *C. sputorum* <sup>(1, 3, 5)</sup>.

### 1.4. Epidemiología.

*Campylobacter* se encuentra en todo el mundo como comensal en tracto intestinal de un gran número de animales silvestres y domésticos. La incidencia de la infección no es precisa aunque algunos autores en trabajos realizados en Europa y Estados Unidos han reportado que aumenta en verano y disminuye en los meses siguientes <sup>(15, 16)</sup>. En países del primer mundo *C. jejuni* es aislado frecuentemente de pacientes que viajan constantemente, en contraste, en ciudades llamadas del tercer mundo *C. jejuni* es frecuentemente aislado de personas aparentemente sanas, especialmente en niños en los primeros 5 años de vida<sup>(7)</sup>.



En estudios realizados en Estados Unidos se ha observado que *C. jejuni* es la principal causa de enfermedades entéricas en humanos, superando a *Salmonella* y *Shigella*, lo cual también ha sido reportado en estudios realizados en Inglaterra y Gales. De acuerdo con estos datos, la incidencia de *C. jejuni* en personas con diarrea es similar a la que se conoce para *Yersinia enterocolitica*, o sea de un 9% de los casos diagnosticados <sup>(7, 10, 16)</sup>.

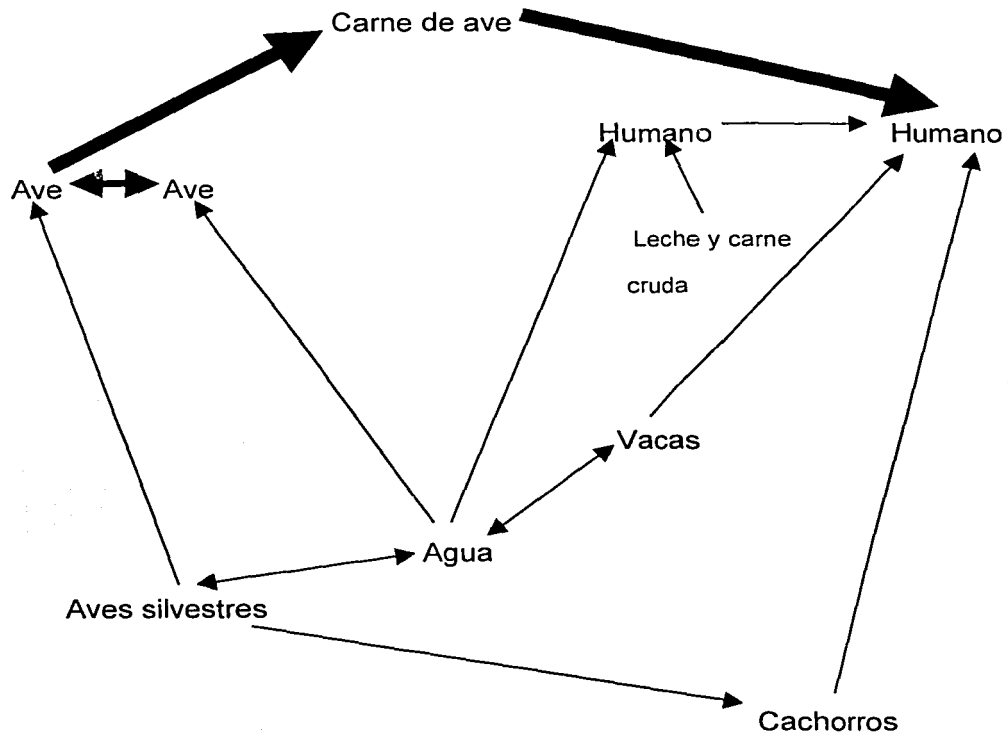
La distribución de la infección por *Campylobacter*, de acuerdo al sexo en varias ciudades del mundo, es similar a la reportada en Estados Unidos siendo la incidencia de 1.2 a 1.5% mas alta en hombres que en mujeres, en donde se ha observado una diferencia mas pronunciada en personas de 30 a 40 años, ya que arriba de los 45 años la incidencia es similar <sup>(15, 16)</sup>.

En humanos, *C. fetus* es oportunista de enfermedades septicémicas fatales en personas debilitadas, mujeres preñadas o recién nacidos. La fuente de estas infecciones es aún desconocida, aunque se sugiere la transmisión venérea. Pocas personas con enfermedad bacterémica debido a *C. fetus* presentan una historia de exposición conocida <sup>(7)</sup>.

### **1. 5. Transmisión.**

La infección por *Campylobacter* es considerada una enfermedad de origen alimentario, se transmite principalmente por vía oral en donde las principales fuentes de infección son la carne de ave y carne de bovino contaminadas, por lo que la infección es común cuando se ha consumido carne mal cocida y otros alimentos crudos. También puede ser transmitida por la leche contaminada al

momento de la ordeña de animales asintomáticos, así como productos lácteos mal pasteurizados o sin pasteurizar. Aunque el origen de la infección raramente se identifica, la fuente más común son las aves domésticas y silvestres ya que *Campylobacter* spp. forma parte de su flora normal <sup>( 10, 11, 15, 16, 17)</sup> ( **Fig. 1**). Otras fuentes incluyen agua contaminada, vegetales y frutas sin desinfectar, contacto con mascotas debido a que en ocasiones son asintomáticos, aunque principalmente se mencionan cachorros perros y gatos con diarrea y raras veces productos del mar <sup>(15, 16)</sup>.



**Fig. 1.** Modelo de transmisión de *C. jejuni* <sup>(15)</sup>.

La transmisión vertical de *C. jejuni* de aves de engorda a su progenie, por medio de huevo fértil, ha sido subestimada como una transmisión primaria porque el organismo no puede ser cultivado de pollos recién nacidos o de muestras de estos <sup>(18)</sup>. En un estudio realizado en una parvada y su progenie, Eleazer *et al.*, sugieren la existencia de una transmisión vertical, lo cual muestra la primera evidencia de que este microorganismo puede pasar de una generación a la siguiente vía transovarica <sup>(17)</sup>.

En animales también se presenta la vía venérea debido a que *C. fetus* subs. *venerealis* se aloja por largos períodos en el tracto genitourinario del ganado <sup>(7)</sup>. Bajo condiciones naturales, *C. fetus* subsp. *venerealis* es transmitido a las hembras a través de toros contaminados, o por inseminación con semen contaminado. Algunas hembras aparentemente recuperadas son portadoras sanas, diseminando la infección a toros sanos que a su vez contaminan a vaquillas o vacas de reemplazo susceptibles. La transmisión hembra-hembra no es frecuente, aunque entre toros por medio del comportamiento de monta es común y se presenta cuando los animales están en grupo <sup>(2)</sup>.

En estudios realizados en Estados Unidos y Europa (**Cuadro 2**), se ha mostrado que aproximadamente un 50% de las infecciones por *Campylobacter* se presentan por consumo de carne de ave mal cocida, 5% por consumo de leche ya sea de vaca o cabra, 6% por contacto con cachorros, perros o gatos; 8% por consumo de agua contaminada y 9% por contacto con viajeros durante la enfermedad <sup>(15)</sup>.

Es posible que las fuentes de abastecimiento de agua sean contaminadas en muchas ciudades durante la primavera y el otoño debido a migraciones de aves, con lo cual tanto el ganado, como otros animales y el humano pueden ser contaminados <sup>(15)</sup>.

**Cuadro 2.** Brotes de infecciones por *Campylobacter* en Estados Unidos por consumo de alimento y agua contaminada, de 1978 a 1996 <sup>(15)</sup>.

<b>Origen</b>	<b>No. de brotes</b>	<b>No. de casos asociados con los brotes</b>
<b>Alimento contaminado</b>		
Leche	30	1,212
Gallina	2	16
Pavo	1	11
Carne de res	1	24
Otro tipo de carne	2	30
Huevo	1	26
Fruta	4	227
Otros alimentos	4	251
Múltiples alimentos	10	411
Alimentos desconocidos	42	2,775
<b>Agua contaminada</b>		
Agua suministrada a la comunidad	8	5,068
Otro tipo de abastecimiento	4	104
<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>10,155</b>

## 1.6. Características de cultivo, Metabolismo y Condiciones de crecimiento.

Todos los *Campylobacter* son estrictamente microaerófilicos por lo cual no crecen en una atmósfera aerobia, aunque normalmente para su crecimiento utilizan un 5-10% de oxígeno. Para ser cultivados requieren de una mezcla de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (FBP) a una concentración final de 0.05%, los cuales les dan el efecto de aero-tolerancia. La mezcla FBP destruye los peróxidos de hidrógeno y aniones superóxido que aparecen en el medio cuando son expuestos al aire o a la luz. *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* son extremadamente sensibles a estas formas tóxicas del oxígeno. Algunas especies como *C. fetus* y *C. sputorum* pueden crecer anaeróbicamente en presencia de ciertos aceptores como fumarato, aspartato o nitrato<sup>(1)</sup>. El uso de medios que contienen sangre mejoran la aerotolerancia de *Campylobacter* porque la sangre contiene catalasa y superóxido desmutasa<sup>(1, 6)</sup>.

En condiciones ideales, *C. fetus* presenta crecimiento visible de 25 a 37°C a las 24 horas aunque las colonias se encuentran perfectamente formadas a las 48 horas. Estas son pequeñas (1mm), circulares, planas, translúcidas con una apariencia de gota de rocío<sup>(1, 3, 6, 9, 10, 11)</sup>.

La temperatura óptima de crecimiento para *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis* es de 42-43°C por lo que son denominados termofílicos, desarrollando colonias mucoides o acuosas, planas de forma circular o convexa a las 24-48 horas, que en cultivos viejos o expuestos al aire por períodos prolongados adquieren una forma difusa. Son de color gris (en ocasiones rosa), aunque *C. mucosalis* y *C. hyointestinalis* producen un pigmento amarillo,<sup>(1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10)</sup> Su

primoaislamiento requiere de medios selectivos que contengan 5% de sangre de ovino, bovino o equino y varios antibióticos como inhibidores de contaminantes<sup>(1, 3, 5, 6, 9)</sup>

### **1.7. Aislamiento.**

El aislamiento de *Campylobacter* de muestras fecales ha sido facilitado por el desarrollo de medios selectivos que contienen antibióticos inhibidores del crecimiento de la flora intestinal natural, se mencionan los siguientes:

- 1) Butzler's, que contiene 5-7% sangre, bacitracina (2500 UI/l), ciclohexamida (50 mg/l), sulfato de colistina (10,000 UI/l), cefazolina (15 mg/l) y novobiocina (5 mg/l)<sup>(1, 3, 9)</sup>.
- 2) Skirrow's, que contiene 5-7% de sangre de caballo , vancomicina (10mg /l), polimixina B (2500 UI/l) y trimetoprim (5 mg/l)<sup>(1, 3, 6, 9)</sup>.
- 3) Campy-BAP, que contiene agar Brucella, 5% de eritrocitos de oveja, vancomicina (10 mg/l), trimetoprim (5 mg/l), polimixina B (2500 UI/l), cefalotina (15 mg/l) y anfotericina (2 mg/l)<sup>(3, 6, 9)</sup>.
- 4) Campylobacter-cefoperazona-vancomicina- anfoteracina (CVA)<sup>(1, 3, 9)</sup>.
- 5) Campy Thio, que contiene caldo tioglicolato con 0.6% de agar y vancomicina (10 mg/l), trimetoprim (5 mg/l) , polimixina B (2500 UI/l), cefalotina (15 mg/l) y anfotericina (2 mg/l)<sup>(1, 3, 6, 9, 10)</sup>.
- 6) Set, que contiene caldo carne (10 ml), 5-fluouracilo (300µg/ml), verde brillante (50 µg/ml), ciclohexamida (100 µg/ml) y sulfato de polimixina (100 UI/ml)<sup>(5,52)</sup>.

7) Clark y Dufty, que contiene suero de bovino (10 ml), 5-fluouracilo (300 $\mu$ g/ml), verde brillante (50  $\mu$ g/ml), ciclohexamida (100  $\mu$ g/ml) sulfato de polimixina (100 UI/ml) y ácido nalidixico (3  $\mu$ g/ml) <sup>(5,52)</sup>.

Es recomendable el uso de por lo menos dos diferentes medios para incrementar la sensibilidad para el aislamiento e identificación <sup>(10)</sup>.

Aunque *C. jejuni* puede crecer a 37°C, las placas de agar se incuban a 42°C en una atmósfera que contenga 5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y 85% de N<sub>2</sub>, debido a que la alta temperatura suprime la competencia de la flora intestinal normal y permite el crecimiento de *Campylobacter* termofilicos, que desarrollan colonias a las 48 horas <sup>(7)</sup>.

El aislamiento primario de *C. fetus* puede realizarse de muestras como secreciones genitales, placenta, semen, hígado, pulmones o contenido estomacal de fetos abortados, las cuales deben ser inoculadas en agar sangre con antibióticos debido a que la presencia de contaminantes, incubándolas a 37°C por 3 días en microaerobiosis <sup>(8)</sup>.

El método de filtración (membranas con poros de 0.45-0.65  $\mu$ m) de muestras en las que se sospecha la presencia de *Campylobacter*, también puede ser utilizado para separar a la bacteria de otras bacterias contaminantes. En animales con septicemia se puede realizar el hemocultivo, que requiere de una incubación de 10 días con observaciones diarias en el microscopio de contraste de fases <sup>(8, 9)</sup>.

### 1.8. Identificación.

La identificación inicial de *Campylobacter* requiere del examen microscópico antes mencionado, para posteriormente realizar una incubación a diferentes temperaturas (25°C, 37°C y 42° C). Dependiendo del medio utilizado, las colonias pueden tener diferente apariencia, en agar sangre usualmente la hemólisis no se observa en las cepas que la producen, si los cultivos son viejos la identificación se hace mas difícil <sup>(15)</sup>.

Las bacterias pertenecientes al género *Campylobacter* no utilizan azúcares, no producen indol, son oxidasa positivos con excepción de *C. gracilis*, son catalasa variable, reducen nitratos a nitritos, producen hemólisis variable, son resistentes al ácido nalidíxico, presentan producción de H<sub>2</sub>S variable, hidrólisis de indoxil acetato e hidrólisis de hipurato de sodio <sup>(1, 3, 6, 7)</sup>.

Se considera a la prueba de hidrólisis del hipurato de sodio como la prueba de elección para diferenciar *C. jejuni* de *C. coli*, esto debido a que *C. jejuni* hidroliza hipurato de sodio y *C. coli* no <sup>(1, 3, 5, 9, 10, 11)</sup> (**Cuadro 3**).

Otra prueba comúnmente utilizada es la susceptibilidad o resistencia al ácido nalidíxico y cefalotina mediante la prueba de difusión en agar. *Campylobacter jejuni* y *C. coli* son resistentes a cefalotina y susceptibles al ácido nalidíxico, mientras que *C. fetus* es resistente al ácido nalidíxico y susceptible a cefalotina.<sup>(1, 7, 9)</sup>.



Adicionalmente, la prueba de hidrólisis de indoxil acetato es usada para diferenciar especies de *Campylobacter* termofílicos, donde presentan una reacción positiva *C. jejuni* y *C. coli* mientras que *C. lari* una reacción negativa <sup>(1, 9, 18)</sup>.

### **1.9. Colección de la muestra, transporte y conservación.**

Las muestras fecales de las que se sospecha la presencia de *Campylobacter* tomadas de pacientes con infecciones gastrointestinales por medio de hisopos pueden ser sembradas directamente en los medios selectivos, si son obtenidas por evacuación espontánea o por guante de palpación tendrán que conservarse en frascos estériles. Las muestras de prepucio se obtienen a través de lavados con solución salina fisiológica (SSF) pH 7.2, la cual debe ser introducida por medio de una jeringa unida a un catéter, después de un masaje de 20 seg. se obtiene un volumen final de 10 ml de lavado, el cual debe ser conservado en frascos estériles. Para obtener muestras de la vagina se debe limpiar la región vulvar para realizar un lavado de la cavidad vaginal introduciendo SSF con una jeringa unida a un catéter estéril cuatro o cinco veces SSF para colectarlo finalmente en un frasco estéril o bien tomar moco cervicovaginal con un mínimo de contaminación. En caso de aborto, las muestras más adecuadas son, además de la placenta, el contenido estomacal o abomasal, el hígado y los pulmones del feto <sup>(8, 9, 10, 11, 15)</sup>. El medio de transporte más utilizado para el aislamiento de *Campylobacter* es el Cary-Blair que también se utiliza para otros patógenos entéricos.

**Cuadro 3.** Características fenotípicas y bioquímicas de *Campylobacter*.

Especie	Alfa-Hemólisis	Catalasa	Hidrólisis de hipurato	Ureasa	Reducción de Nitratos	H <sub>2</sub> S TSI	Hidrólisis de indoxil acetato	Resistencia a		Crecimiento a				
								Ac. Nalidixico	Cefalotina	25 °C	37 °C	42 °C	3.5% NaCl	1% Glicina
<i>C. coli</i>	V	+	-	-	+	V	+	S	R	-	+	+	-	+
<i>C. concisus</i>	V	-	-	-	+	-	-	R	S	-	V	V	-	V
<i>C. curvus</i>	V	-	V	-	+	+	+	R	S	-	V	+	-	+
<i>C. fetus</i> subs. <i>fetus</i>	-	+	-	-	+	-	-	R	S	+	+	V	-	+
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	V	V	-	-	+	-	-	R	S	+	+	-	-	-
<i>C. gracilis</i>	-	-	-	-	+	+	V	S	R	-	V	V	-	+
<i>C. helveticus</i>	+	-	-	+	+	-	+	-/S	-/S	-	+	+	-	V
<i>C. hyointestinalis</i>	V	+	-	-	+	+	-	R	S	V	+	+	-	V
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	+	V	+	-	-	-	+	S	R	-	-	V	V	-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	+	+	+	-	+	-	+	S	R	-	+	+	-	+
<i>C. lari</i>	V	+	-	V	+	-	-	R	R	-	V	+	-	+
<i>C. mucosalis</i>	-	-	-	-	+	+	-	R	S	-	-	V	-	V
<i>C. rectus</i>	+	V	-	-	+	+	+	R	S	-	V	+	-	+
<i>C. showae</i>	+	+	-	-	+	+	+	R	S	-	V	+	-	V
<i>C. sputorum</i>	+	-	-	-	+	+	-	R	S	-	+	+	V	+
<i>C. upsaliensis</i>	+	-	-	-	+	-	+	S	S	-	V	V	-	+

+, positivo; -, negativo; V, variable; R, resistente; S, susceptible.

Tomado de: Nachamkin I and Blaser MJ. *Campylobacter*. Second edition. ASM Press 2000. Washington, DC.

Murray P, Baron E, Tenover F and Tenover F. *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth edition. ASM Press, 1995.

Collier L, Balows A and Sussman M. *Microbiology and Microbial Infections. Systematic Bacteriology*. Volume 2. Ninth edition. Ed. Arnold. London Great Britain, 1998.

Para que el aislamiento de *Campylobacter* sea óptimo, se requiere de un tiempo de transporte no mayor a 2 horas desde que es tomada la muestra hasta que llega al laboratorio para ser procesada, todas las muestras deben estar perfectamente identificadas y conservadas en frascos estériles y de preferencia deben ser conservadas a 4°C hasta que se entregan al laboratorio para su procesamiento <sup>(9, 10, 11, 15)</sup>.

### **1.10. Presentación de la enfermedad.**

La infección por *Campylobacter* produce una diarrea aguda que clínicamente es similar a la que producen otras bacterias como *Salmonella* y *Shigella*. Inicialmente, la infección por *Campylobacter* presenta fiebre sin diarrea, pero con un intenso dolor abdominal, el cual provoca postración tanto en humanos como en animales <sup>(15)</sup>.

La lesión inicial en la enteritis por *Campylobacter* es una inflamación en la parte baja del intestino afectando a colon y recto, lo cual produce una ileitis y cecitis con adenitis mesentérica <sup>(11, 15)</sup>.

Aunque el período de incubación de *Campylobacter* oscila desde 18 horas hasta 8 días, lo común es tres días presentándose los signos antes mencionados <sup>(15)</sup> (**Figura 2**).

En humanos que han presentado infecciones por *C. jejuni* se ha observado un fenómeno conocido como mimetismo molecular que puede producir el Síndrome Guillain-Barré (SGB) y el Síndrome Miller Fisher (SMF) ambas son neuropatías agudas inmuno-mediadas. Esto se debe a que el núcleo del lipopolisacárido (LPS)

de *Campylobacter* contiene regiones idénticas a varios tipos de gangliósidos de las células nerviosas, por lo que los anticuerpos reaccionan con estas moléculas (15, 19).

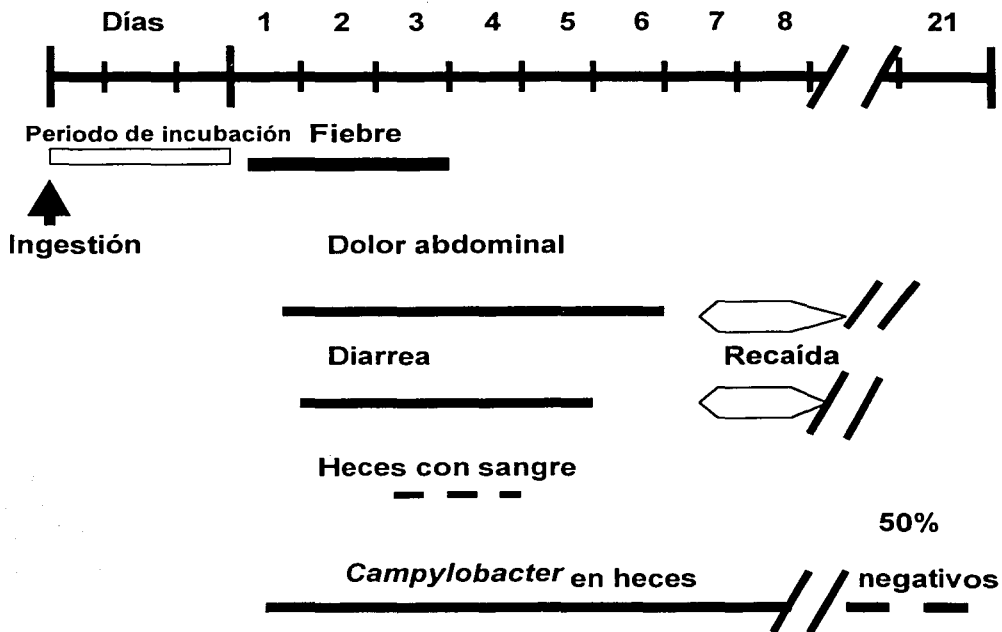


Figura 2. Diagrama del curso típico de la enteritis por *Campylobacter* <sup>(15)</sup>.

La infección en vacas por *C. fetus* subsp. *venerealis* causa principalmente infertilidad y esporádicamente aborto, siendo la causa de la campilobacteriosis venérea bovina (CVB). Este microorganismo se establece en el cuerpo de la matriz donde se multiplica e invade el cuerpo del útero hasta alcanzar el oviducto del mismo. Puede observarse un parto normal, pero casi siempre la multiplicación masiva del microorganismo en el cuerpo uterino produce la muerte temprana del

embrión y la reabsorción subsecuente. La infertilidad es indicada por gestaciones repetidas, siendo común en vacas jóvenes; el aborto ocurre en menos del 10% de las vacas infectadas, principalmente primíparas. Al inicio de la enfermedad se presenta una vaginitis y el aborto usualmente se observa en el quinto o sexto mes de la gestación. Otros signos incluyen endometritis, salpingitis y ciclos prolongados de estro que llegan a durar hasta un mes. Las vacas no quedan permanentemente estériles ya que usualmente retornan a la fertilidad; sin embargo, el organismo infecta vagina, cérvix, útero y oviductos, sobreviviendo en el cérvix hasta el final de la gestación con posibilidad de seguir infectando toros en las siguientes montas. Los toros son altamente susceptibles a la colonización e infección, pero normalmente son asintomáticos; la alta incidencia se debe a toros que actúan como portadores hasta por cinco años, principalmente toros adultos debido al incremento del tamaño y número de criptas en el epitelio del prepucio, lo que provee condiciones favorables para la persistencia de *C. fetus* subs. *venerealis* que también puede estar presente en fluidos prepucciales y semen (1, 2, 15).

*Campylobacter fetus* subsp. *fetus* es un problema menos frecuente en bovinos en los cuales causa aborto esporádico, en ovinos se presenta aborto epizoótico que también se llega a observar en cerdos, este microorganismo no es comúnmente asociado con infertilidad, en humanos se presentan infecciones entéricas y sistémicas. Después de la ingestión se presenta una bacteremia transitoria, durante la gestación en vacas y ovejas el organismo se localiza en placenta lo cual provoca el aborto. *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* es capaz de alojarse en intestino de bovinos y ovinos por lo cual puede ser aislado de heces y bilis de

animales infectados, aunque también puede ser recuperado de hígado, nódulos linfáticos hepáticos, vesícula biliar e intestinos. La infección aguda produce aborto durante el último trimestre de gestación en ovinos, donde el microorganismo se recupera de placenta, corión, cotiledones y líquido alantoideo. Si los corderos nacen, pueden morir en la primer hora o sobrevivir hasta cinco días después de su nacimiento. Las ovejas frecuentemente presentan heces de color amarillo con pigmentos biliares y olor fétido, después del aborto, se observa descarga vaginal purulenta con exudado de color café-rojizo <sup>(2, 8, 15)</sup>.

*Campylobacter fetus* subsp. *fetus* puede infectar otros animales como reptiles y aves, siendo estos últimos muy importantes en la diseminación del microorganismo ya que pueden contaminar el agua de beber <sup>(1, 2, 8, 15, 16)</sup>.

### **1.11. Tratamiento y susceptibilidad microbiana.**

La enteritis por *Campylobacter* requiere de terapia oral y en ocasiones cuando los pacientes se encuentran muy enfermos requieren de hospitalización para su observación, rehidratación y tratamiento antimicrobiano <sup>(1, 9, 11, 15)</sup>. La resistencia a diferentes antibióticos se ha observado en varias cepas de *Campylobacter* spp. de acuerdo a la especie, el origen de la cepa y la historia de antibióticos usados en el hospedero. Aunque la Campylobacteriosis es una enfermedad autolimitante, la terapia antimicrobiana reduce la duración y severidad del curso de la infección. En general, *C. jejuni* y *C. coli* son resistentes a penicilinas, cefalosporinas, trimetoprim, sulfametazol, rifampicina y vancomicina; son susceptibles a eritromicina, fluoroquinolonas, tetraciclinas, aminoglicósidos y clindamicina y son moderadamente susceptibles a cloranfenicol, cefotaxima, ceftazidima y cefpirona

(1, 9, 15, 20, 21, 22). Para *Campylobacter fetus* la terapia parenteral es usada para tratar infecciones sistémicas, siendo usados agentes antimicrobianos como eritromicina, ampicilina, aminoglucósidos y cloramfenicol dependiendo del tipo de infección <sup>(9)</sup>.

### **1.12. Patogenicidad y Factores de Virulencia.**

En infecciones experimentales de pollos y ratones, *C. jejuni* se localiza en el moco de las criptas del ciego, colonizando a las células epiteliales de las microvellosidades <sup>(23, 24)</sup>. *Campylobacter* son microorganismos activamente móviles por medio de un flagelo polar en uno o ambos polos de la célula, jugando un papel importante en la colonización. La rápida movilización del microorganismo por su movimiento espiral facilita la colonización del moco, *C. jejuni* es quimioatraído por la mucina, que es el principal constituyente del moco, la cual puede ser utilizada como substrato único para el crecimiento. La colonización del moco en las criptas cecales de pollos con *C. jejuni* se reduce o previene por la colonización de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter diversus*, quienes ocupan el mismo nicho y producen metabolitos antagónicos para *C. jejuni* <sup>(25)</sup>. La habilidad de *C. jejuni* para invadir células epiteliales intestinales ha sido confirmada por estudios con embriones de pollo, ratones, hamsters y líneas celulares de mamíferos. <sup>(26)</sup>.

Existen variantes no móviles con flagelo completo o incompleto que pueden no colonizar, por lo cual se requiere de cepas móviles con flagelo completo para poder colonizar el tracto gastrointestinal de ratón infante <sup>(27)</sup>.

Factores de virulencia:

A) Lipopolisacárido.

La porción del lípido A del LPS es química y antigénicamente similar a otras bacterias Gram negativas. El LPS de algunas cepas contienen ácido N-acetilneuraminico (NeuAc) que es un componente encontrado en procariontes, pero también encontrado en glicolípidos y glicoproteínas de mamíferos <sup>(28)</sup>.

B) Flagelo.

El flagelo de *C. jejuni* esta compuesto por dos proteínas, la mayor denominada FlaA y la menor denominada FlaB. La movilidad de *Campylobacter* le permite una óptima adhesión e invasión en células del huésped y aunque no ha sido revelado el papel del flagelo en la adherencia, su movimiento en espiral característico le permite la entrada al intestino, y la penetración de la capa de moco para colonizar o invadir la mucosa intestinal <sup>(15)</sup>.

C) Toxinas.

La caracterización de las toxinas de *Campylobacter* spp. se encuentra en proceso y aunque se han reportado toxinas similares [Toxina de *Vibrio cholerae* (CT), toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT) y toxina de *Shigella dysenteriae* (Stx)], los mecanismos de acción y la importancia en la enfermedad aún no es clara. En algunos estudios se compara las toxinas de *Campylobacter* con toxinas conocidas de otras enterobacterias patógenas. Las toxinas pueden ser clasificadas por su actividad en dos clases: enterotoxinas y citotoxinas <sup>(28)</sup>.

Enterotoxinas: La actividad enterotoxica de *C. jejuni* fue documentada por primera vez en 1983 por Ruiz-Palacios <sup>(29)</sup> y ha sido confirmada por varios grupos como Goossens, Johnson, Klipstein, Mathan y McCardell <sup>(29, 30, 31, 32, 33, 34)</sup>, las toxinas



fueron abreviadas como CJT para la toxina de *C. jejuni* y CYTON o CTON para la toxina citotónica de *Campylobacter*. La CJT ha sido neutralizada con anticuerpos anti-LT y anti-CT por lo cual se sugiere que son similares inmunológicamente a la CT de *Vibrio cholerae* y a la LT de *E. coli* (29, 30, 31, 32, 33, 34).

En México, pacientes infectados con cepas toxigénicas sufren más de diarrea acuosa, existiendo reportes en donde se han demostrado anticuerpos contra CJT en niños (34, 35, 36).

Citotoxinas: La producción de citotoxinas por *Campylobacter* es confusa: debido a que diversos grupos utilizan diferentes líneas celulares, condiciones de cultivo bacteriano y cepas, con lo cual el efecto citotóxico ha sido descrito sin que este haya sido comparado. Con base en la comparación de los datos, se propone la existencia de seis diferentes citotoxinas:

- 1) Citotoxina de 70 KDa con actividad en células HeLa, CHO e inactiva en células Vero, lo cual ha sido reportado por varios autores (36, 37, 38, 39).
- 2) Citotoxina activa en células Vero y HeLa, lo cual ha sido escasamente reportado (31, 38, 40, 41).
- 3) Toxina de distensión citoletal (CDT) (35) como CLDT, células CHO, Vero y HEp-2 son sensibles a su actividad, mientras que células Y-1 son insensibles (16, 42).
- 4) Citotoxina neutralizada por antitoxina Shiga-like de *E. coli*, de la cual solo existe un reporte (43).
- 5) Citotoxina con actividad hemolítica, sólo reconocida en cepas de *Campylobacter* hemolíticas (44, 45).
- 6) Citotoxina hepatotóxica, ésta ha sido aislada de algunos casos clínicos (46, 47).

La incidencia de la actividad de citotoxinas y enterotoxinas fue determinada en varios estudios en donde se comparan también las manifestaciones clínicas. Se ha sugerido que la producción de enterotoxina se da en diarreas de tipo acuoso, lo que se opone a diarreas de tipo inflamatorio con sangre debido a la producción de citotoxinas e invasión <sup>(28, 41)</sup>.

Para *Campylobacter fetus* se mencionan entre otros los siguientes factores de virulencia:

A) Proteínas de Superficie (capa "S").

Las cepas tipo silvestre de *Campylobacter fetus* presentan una capa de subunidades de proteína que forman un componente exterior de su envoltura celular, estas proteínas están sujetadas fuertemente a esta capa jugando un papel importante en la interacción huésped-patógeno. La capa "S" representa menos del 10% del total de las proteínas celulares que son de múltiples formas y tamaños moleculares (90-140 KDa). Inicialmente se reportó una microcápsula de glicoproteínas, estudios bioquímicos recientes muestran que la capa "S" de *Campylobacter fetus* está compuesta en su mayoría por ácidos y proteínas hidrofóbicas con una secuencia única en estas especies amino terminal. Sin embargo no se ha confirmado la evidencia de glicosilación o presencia de azúcares en la capa "S" de *C. fetus* <sup>(2, 15)</sup>.

B) Lipopolisácarido.

Se ha propuesto que el aborto por *Campylobacter* es por una respuesta alérgica a las endotoxinas termoestables. El choque anafiláctico subletal o fatal ha sido demostrado cuando los animales son inyectados con células frescas de *C. fetus* subsp. *venerealis* <sup>(2)</sup>.

### 1. 13. Métodos Diagnósticos para *Campylobacter*.

El diagnóstico de *Campylobacter* por aislamiento requiere de muestras frescas (de no más de dos horas), transportadas en medio Cary Blair a una temperatura de 4°C para su procesamiento inmediato, esto debido a que si transcurre mayor tiempo la cantidad de microorganismos viables disminuye, obstaculizando así la identificación. Este método consume largos tiempos de incubación en medios selectivos bajo condiciones especiales para su crecimiento debido a que este microorganismo es susceptible a los cambios de pH y temperatura, así como a la luz solar y en especial a la concentración de nitrógeno y bióxido de carbono en la atmósfera y aunque éste es lento, caro y poco eficiente es el más utilizado para la detección de animales enfermos, ya que hasta ahora otros métodos no tienen la misma sensibilidad y especificidad<sup>(1, 9, 14)</sup>. Por otra parte, las muestras de heces, lavados prepucales e hisopos vaginales se encuentran generalmente contaminadas con muchas bacterias saprofitas que requieren menos tiempo que *Campylobacter* para multiplicarse y consumen los componentes nutritivos del medio de cultivo inhibiendo el crecimiento de *Campylobacter* que requiere mayor tiempo para desarrollarse, por lo cual es recomendable usar el método de filtración (membranas de 0.45 µm) el cual facilita la separación de la flora microbiana de *Campylobacter*<sup>(15, 51, 52)</sup>.

La microscopía de campo oscuro también es utilizada en muestras frescas únicamente<sup>(1)</sup>.

La técnica de inmunofluorescencia puede ser utilizada como método diagnóstico preliminar o bien para confirmar la identificación de una cepa después de su aislamiento, aunque no permite diferenciar entre subespecies <sup>(51, 52)</sup>.

Otra prueba diagnóstica utilizada es el Inmunoensayo Enzimático el cual es sencillo, rápido y sensible, pero realizado en pocos laboratorios debido a su baja especificidad, esto comparado con el diagnóstico bacteriológico de rutina que es altamente específico. En algunos estudios realizados se ha obtenido una sensibilidad del 89% debido a que se detectan reacciones cruzadas con cepas saprofitas y con algunas otras bacterias de flora normal. Aunque el Inmunoensayo Enzimático es 48 horas más rápido que el aislamiento es una prueba costosa que puede ser utilizada en estudios epidemiológicos, pero no para emitir diagnósticos certeros <sup>(53, 54, 55, 56)</sup>.

Debido a esto, es necesaria la aplicación de técnicas más sensibles, específicas y rápidas para llegar a un diagnóstico confiable. Una de ellas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual combina alta sensibilidad, especificidad y rapidez <sup>(1, 57, 58)</sup>.

### **1.13.1. Métodos de tipificación.**

Algunos sistemas de tipificación se han elaborado para estudios epidemiológicos de infecciones causadas por *Campylobacter*, que varían en complejidad, sensibilidad y especificidad. Estos métodos incluyen serotipificación, biotipificación, detección de enzimas, fagotipificación, auxotipificación, unión a lectinas, sensibilidad a bacteriocinas y métodos de genotipificación como el

análisis de restricción de endonucleasas, ribotipificación y análisis de productos de PCR (1, 48).

Los sistemas más utilizados son biotipificación y serotipificación, el primero se basa en pruebas bioquímicas aunque la diferenciación de cepas es baja, éste es el primer paso para investigaciones epidemiológicas. En el segundo, la identificación y clasificación de *Campylobacter* utiliza principalmente dos esquemas de serotipificación, el esquema Penner (Penner and Hennessy 1980), con base en los antígenos "O" del LPS por medio de la técnica de hemoaglutinación indirecta y el esquema de Lior (Lior *et al.*, 1982) <sup>(49)</sup>, con base en los antígenos proteicos termolábiles de superficie por medio de la técnica de aglutinación en placa (160 serogrupos para *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*). Ambos esquemas son complementarios y utilizándose juntos se puede realizar una mejor diferenciación. Sin embargo, estos sistemas están disponibles en muy pocos laboratorios de referencia por el gasto y tiempo necesarios para mantener la calidad del antisuero usado en la serotipificación y aunque se han elaborado antisueros comerciales, pocos han sido poco utilizados debido a su pobre calidad (1, 7, 9, 10, 12)

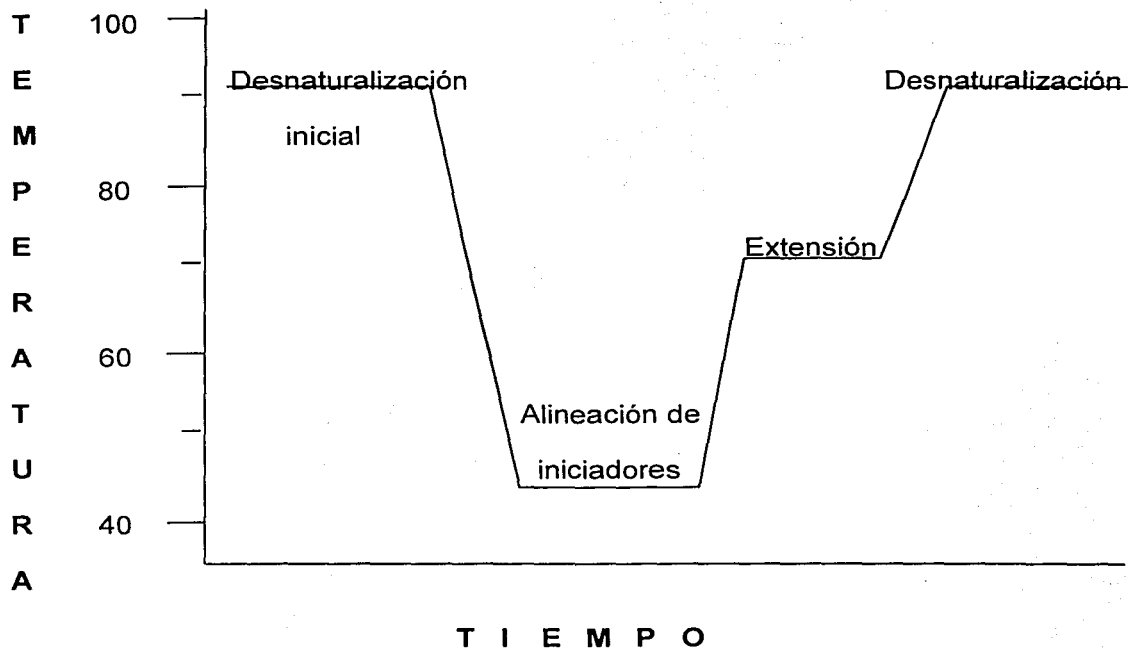
Los métodos de tipificación juegan un papel muy importante en el monitoreo de infecciones por *Campylobacter* en humanos, ya que contribuyen a la identificación de las fuentes que originaron la infección y las principales estrategias de control, sin embargo usados junto con los métodos de genotipificación la identificación de las cepas y de las fuentes de infección puede ser mas certera , rápida y sencilla (15, 50)

#### 1.14. PCR para *Campylobacter*.

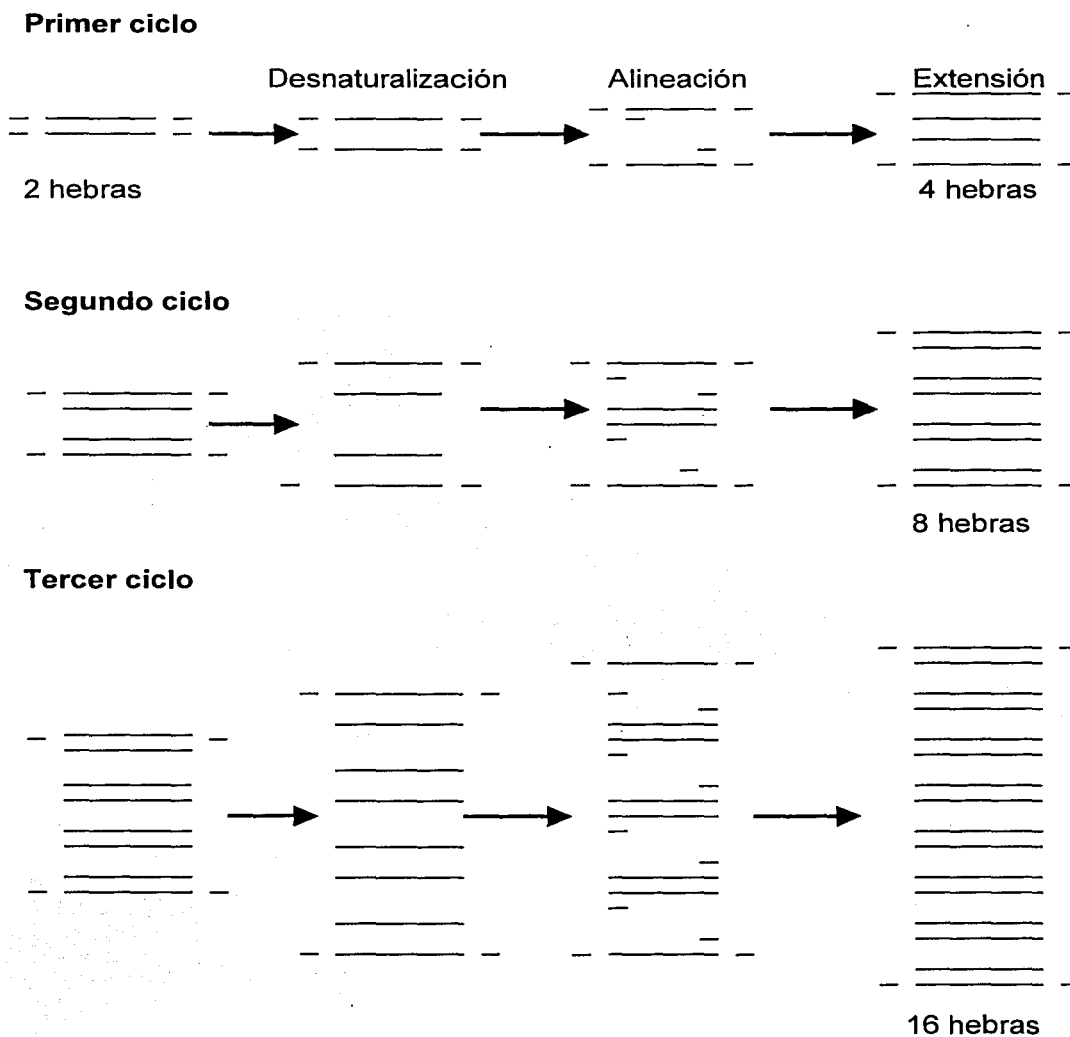
La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica que consiste en la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) blanco mediante el uso de una polimerasa termoestable, dos oligonucleótidos sintéticos con un número variable de nucleótidos que deben hibridar cada uno con una cadena del ADN blanco, así como la adición de nucleótidos libres (dATP, dCTP, dGTP y dTTP ) <sup>(57, 58, 59, 60, 61,</sup>

62, 63, 64, 65, 66)

. El procedimiento implica la desnaturalización inicial a temperatura elevada del ADN blanco, lo cual separa la doble cadena para que las cadenas sencillas estén accesibles para la hibridación por los oligonucleótidos específicos. En el segundo paso, la mezcla se enfría para permitir a los iniciadores alinearse con su secuencia de ADN blanco complementaria, y posteriormente se lleva a cabo la extensión de los fragmentos mediante la acción de la polimerasa con los nucleótidos libres <sup>(57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66)</sup> ( **Fig. 3** ). El conjunto de estas tres reacciones constituye un ciclo y los productos de la amplificación al término de un ciclo sirven de molde para la siguiente extensión. De esta manera, la acumulación de secuencias específicas es exponencial. El empleo de oligonucleótidos de diferentes posiciones del mismo gene puede llevar a la amplificación de secuencias que son específicas para una especie bacteriana, haciendo la técnica aún más específica ( **Fig. 4** ). Finalmente, la detección del ADN amplificado puede observarse por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio <sup>(57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64)</sup>



**Fig. 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa.**



**Fig. 4. Amplificación de ADN mediante PCR.**

La PCR para *Campylobacter* spp. ha sido reportada en numerosos estudios evaluando diferentes muestras clínicas entre las cuales principalmente se encuentran heces de humano <sup>(55, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75)</sup>, leche, queso, yoghurt <sup>(76)</sup>, agua residual, agua corriente <sup>(77)</sup> y diferentes muestras de animales como carne



cruda, heces, lavados prepuciales, semen, etc., provenientes de aves, bovinos, ovinos, reptiles, gatos, perros, animales de zoológico, etc (78, 79, 80, 81, 82).

Cada uno de estos PCR han sido diseñados a partir de diferentes genes por ejemplo Evers *et al.*,<sup>(75)</sup> utilizó el gene 23S ARNr con el cual diferencia especies termofílicas utilizando primero un juego de oligonucleótidos universal para posteriormente usar el específico de cada especie termofílica. Wegmüller *et al.*,<sup>(76)</sup> utilizó el gene *flaA* y *flaB* con los cuales detecta únicamente *C. jejuni* y *C. coli*. Linton *et al.*,<sup>(70)</sup> utilizó el gene 16S RNAr para identificar únicamente *C. jejuni* y *C. coli* posteriormente realiza un segundo PCR basado en la secuencia del gene *hipO* con el se identifica únicamente a la especie *C. jejuni*. Oyarzabal *et al.*,<sup>(83)</sup> utilizó un segmento del gene 16S DNAr con el cual identifica *C. fetus* subsp. *fetus*. Al analizar algunos PCR elaborados con diferentes genes decidimos utilizar dos pares de oligonucleótidos, debido a que estos detectan las especies de mayor importancia en Medicina Veterinaria. El primer par fue reportado por Oyoyo *et al.*,<sup>(67)</sup> el cual demostró que mediante esta PCR se detectan cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* a partir de muestras de heces de humano. Mediante esta técnica se observó la amplificación de una banda de 450 pares de bases, con una sensibilidad del 98.5%, diferenciando a *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* de otras especies de *Campylobacter* además de bacterias de la familia Enterobacteriaceae. Asimismo, Eaglesome *et al.*,<sup>(82)</sup> reportó la utilización de oligonucleótidos específicos para *C. fetus* subespecie *venerealis*, *C. fetus* subespecie *fetus* y *C. fetus* biotipo *intermedius* amplificando

una banda de 362 pares de bases, sin detectar especies saprofitas presentes en el aparato reproductor de bovinos.

Los resultados obtenidos por los autores antes mencionados nos permiten proponer estos mismos oligonucleótidos para detectar *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* respectivamente a partir de muestras de animales domésticos.

**Justificación:** El diagnóstico de *Campylobacter* por aislamiento sigue siendo el método más utilizado para la detección de animales infectados, a pesar de ser un método lento, caro y poco eficiente dado que requiere largos tiempos de incubación en medios selectivos con antibióticos y condiciones especiales para su crecimiento. El uso de la microscopía en campo oscuro, aunque es una prueba sencilla, requiere de personal calificado y constituye sólo un diagnóstico presuntivo. La inmunofluorescencia y el inmunoensayo enzimático son pruebas más sencillas y rápidas que el diagnóstico bacteriológico, aunque con menor sensibilidad y especificidad debido a que se detectan reacciones cruzadas con cepas saprofitas o de flora normal por lo que no son las más recomendadas para establecer diagnósticos finales. Por todo lo anterior es necesario la implementación de una prueba que sea rápida con una sensibilidad y especificidad alta. Para ello una alternativa viable son las pruebas moleculares, la estandarización de una de estas pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es sensible, específica y rápida nos permitirá tener un método diagnóstico rápido, sensible y confiable.

**Hipótesis:** Mediante la utilización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se detectarán *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* en muestras de rumiantes.

**Objetivo General:** Detectar ADN de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de rumiantes.

**Objetivos Específicos:**

1. Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN de cultivos microbiológicos puros.
2. Estandarizar la técnica de PCR a partir de muestras fecales procedentes de rumiantes clínicamente sanos inoculadas con *Campylobacter* spp para establecer la concentración mínima detectable del microorganismo.
3. Evaluar la técnica de PCR en muestras clínicas de rumiantes.

## **2. Material y Métodos.**

### **2.1. Cepas Bacterianas y Medios.**

Las cepas bacterianas utilizadas fueron ocho cepas de *C. jejuni*, siete cepas de *C. coli*, una de *C. lari* y una de *C. fetus* subsp. *fetus* obtenidas del Laboratorio del Dr. José Luis Puente del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, las cuales se cultivaron en agar sangre (AS), en microaerobiosis (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>) durante 48-72 h, a 37°C para *C. fetus* y 42°C para *C. jejuni* y *C. coli*. Los controles negativos, *Salmonella gallinarum* y *Escherichia coli*, se obtuvieron en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, las cuales se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB) durante 24 horas, a 37°C, en agitación. Otro control utilizado es *Helicobacter pylori* obtenida en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina la cual se cultivó en agar sangre a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerobiosis.

Todas las cepas de *Campylobacter* spp se cosecharon en leche descremada con un 10% de glicerol para alicuotarse en criotubos para su conservación en nitrógeno líquido y a -70°C para su posterior uso.

### **2.2. Extracción de ADN.**

Para la obtención de ADN se utilizaron dos métodos:

- 1) El primero fue un método convencional utilizando bromuro de hexadeciltrimetilamonio y NaCl (CTAB/NaCl) ( 63, 66) en el cual el inóculo

bacteriano se resuspendió en buffer T:E ( Tris 10mM, sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1mM pH 8, posteriormente se agregó proteinasa K (20mg/ml) y 0.5% de SDS y se incubó por 1 hora a 37°C. Terminando este tiempo se agregaron 100µl de NaCl 5M y 80 µl de CTAB/NaCl, y se incubó 10 min. a 65°C, posteriormente se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó y se tomó el sobrenadante para después agregar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) repitiendo el procedimiento anterior, para que enseguida se agregaran etanol absoluto frío y finalmente etanol al 70%.

- 2) El segundo método fue el descrito por Pitcher *et al*,<sup>(84)</sup> (que es un método para extracción de ADN genómico utilizando tiocianato de guanidina y fenol), con algunas modificaciones<sup>(85)</sup>. Brevemente: después de haber obtenido la pastilla bacteriana por centrifugación a 10 000 g, se resuspendió en buffer T:E ( Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8), para después lisar las células con tiocianato de guanidina, se agregó RNAasa (50µg/ml) y acetato de amonio 7.5 M y se incubó en hielo, posteriormente se añadió un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) repitiendo esta extracción tres veces más, después se realizaron dos extracciones con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se adicionó etanol absoluto frío, finalmente etanol al 70%, repitiendo este lavado por tres veces.

El ADN obtenido por ambos métodos fue secado en una centrífuga al vacío y resuspendido en 100µl de T:E. La concentración de ADN se determinó en un fluorómetro (DyNA Quant 200, Hoefer). El ADN fue observado en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio <sup>(84, 85, 86, 87, 88)</sup>.

**2.3. Iniciadores.** Para la detección de *C. fetus* se realizó la PCR-1 en donde se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Eaglesome D M et al., <sup>(82)</sup> que amplifican un producto de 362 pares de bases del gene que codifica para la subunidad ribosomal 16S (rARN), debido a que *C. fetus* subsp. *fetus* presenta un 99.9% de homología con *C.fetus* subs. *venerealis*. La secuencia de dichos oligonucléotidos es:

C<sub>1</sub> 5'-CGTAGAGATCACCCAGGAATACCCA-3'

C<sub>2</sub> 5'-CTTGCTAGAAAGTTGAGACAGGTGCTGCAC-3'

Estos oligonucléotidos fueron seleccionados porque no detectan productos de cepas de *Campylobacter* saprofitas que colonizan el aparato reproductivo pero no son patógenas, como son *C. concisus* o *C. sputorum* que se encuentran comúnmente en el prepucio de toros.

Para la detección de *C. jejuni* y *C. coli* se realizó la PCR-2 en donde se utilizaron los oligonucléotidos reportados por Oyofu et al., <sup>(67)</sup> diseñados a partir de la secuencia del gene *flaA*. La secuencia de dichos oligonucléotidos es :

Pg50, 5' -ATGGGATTTTCGTATTAAC- 3'

Pg3, 5' -GAACTTGAACCGATTTG-3'

El oligonucleótido Pg50 se une al principio de la región N-terminal del gene *flaA*, el oligonucleótido Pg3 se une a la cadena complementaria de ADN para obtener un producto de 450 pb, sin embargo, también se puede unir al gene *flaB*, lo cual puede generar un segundo producto de 1,800pb (1.8 kb). Estos oligonucleótidos fueron seleccionados por su sensibilidad (98.5%) y especificidad ya que no detecta otras especies de *Campylobacter* o de la familia de enterobacterias, ni a *Helicobacter pylori* <sup>(67)</sup>.

A continuación se muestran las figuras con las secuencias de los genes *flaA* (**Fig. 5 y 6**) y 16S ARNr (**Fig. 7 y 8**) de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus*, señalando en azul el producto amplificado y de rojo el juego de oligonucleótidos seleccionado para cada PCR dependiendo de la especie que se desee encontrar.

## Origen

1 ttagcgctta tcaaaaatgg cttgaaaagt ttattgagag gctagaaata aaaaatgcc  
 61 tcataaaaga tacagtggtta aaatatggaa atttgatata aaattttata aaaactctaa  
 121 actatTTTTc cttttaaacg atatagttta taacaagttc atggatggac ttgaatttat  
 181 ttaaaaggat ttaaaatggg atttCGTatt aacacaaatg ttgcagcatt aaatgctaaa  
 241 gcaaattcgg atctaaacag cagagcatta gatcaatcac tttcaagact cagttcaggt  
 301 cttagaatca actccgcagc agatgatgct tcagggatgg cqatagcaga tagtttaaga  
 361 tctcaggcaa aacttttggg tcaggctata tctaattgga atgatgcttt aggtatcttg  
 421 caaaactgcag ataaggctat ggatgagcaa cttaaaatct tagataccat caagactaaa  
 481 gcgactcaag ctgctcaaga tggTcaaacg ttaaaaacaa gaactatgct tcaagcagac  
 541 atcaaccggt tgatggaaga acttgataat atcgcaata ccacttcatt taatggcaa  
 601 caacttttaa gtgggtggtt taccaatcaa gaattccaaa tcggttcaag ttcaaatcaa  
 661 actattaaag caagtatagg agcaactcag tcttctaaaa tcggtgtaac aagatttgaa  
 721 acaggttcac aaagttttc ttcaggcact gtaggactta ctatcaaaaa ctacaacggt  
 781 atcgaagatt ttaaatttga tagtgtagtg atttctactt cagtaggaac aggtcttgga  
 841 gctttggctg aagagatcaa cagaaatgca gataaaacag gaattcgtgc aacttttgat  
 901 gtaaaatctg taggagccta tgcaataaaa cgaggaaata cttctcagga ttttgctatc  
 961 aatggggtg ttatcggaca aataaattat aatgacggtg ataacaatgg tcaacttatc  
 1021 tcagctatca atgctgtaaa agatacaact ggtgttcaag cctctaaaga tgaaaaatgg  
 1081 aaacttggtc ttacttcggc cgatggtaga gggattaaaa tcacaggtag cataggtgta  
 1141 ggagctggta tattgcacac tgaaaattat ggaaggttat ctttagttaa aaatgatggt  
 1201 agagatatca atataagtgg aacaggtctt tcagctatag gtatgggtgc tacagacatg  
 1261 atttctcaat cttcagtatc tctaagagag tcaaaaagggc aaatttcagc agccaatgct  
 1321 gatgctatgg gatttaattc ttataaaggT ggtggaaaat ttgttttac tcaaaatgta  
 1381 agttcaattt ctgcatttat gagtgcacaa ggttcaggat tttctagagg ttcaggattt  
 1441 tctgtgggta gtggtaaaaa tttatctggt ggattgagtc aaggaataca aattatttca  
 1501 agtgcggctt caatgagcaa tacttatggt gtttcagcag gttcaggatt ttctctggc  
 1561 tcaggaaatt ctcaatttgc agcccttaa actactgctg ctaatacaac tgatgagact  
 1621 gcaggtgtaa ccactcttaa aggtgcaatg gcggttatgg atatagcaga aactctata  
 1681 acaaatcag atcaaatcag agcagatatt ggttctatac aaaatcaagt tcaatcaact  
 1741 ataaataaca ttactgtaac tcaagttaat gttaaagcag cagaatcgca aatcagagat  
 1801 gtagactttg caagtgagag tgcaaactac tctaaagcta acatcttagc ccaaagtgg  
 1861 tcttatgcaa tggctcaagc aaattctagt cagcaaaatg ttttaagatt attacaatg  
 1921 taaaatctta aaatcacttt acattctttt aagaatgctg caatttatac aaatccaagc  
 1981 ctagtttaaa tactaggctt tttatttata agctttaaaa tttttaatca a

Fig. 5. Secuencia del gene *flaA* de *Campylobacter jejuni*.



## Origen

```

1 ttttagtgat gataacttta tacaggtggt attttaaaag gggatttgta ttatcgtggg
61 agttttttat ctgaagctat aaaaaaagat ttgaaagatg aggcgtatta tcttttaaat
121 tttattagcg cttatcaaaa atggcttgaa aagtttattg agaggctaga aataaaaaat
181 gccatcataa aagatacagt gttaaaatat ggaaatttga tataaaattt tataaaactc
241 taaactatth ttctttttaa acgatatagt ttataacaag ttcattggatg gacttgaatt
301 tttttaaag gatttaaaat gggatttctg attaacacaa atgttgcagc attaaatgct
361 aaagcaaatt cggatctaaa cagcagagca ttagatcaat cactttcaag actcagttca
421 ggtcttagaa tcaactcgc agcagatgat gcttcaggga tggcgatagc agatagttha
481 agatctcagg caaatacttt gggtcaggct atatctaatg gtaatgatgc tttaggatc
541 ttgcaaactg cagataaggc tatggatgag caacttaaaa tcttagatag catcaagact
601 aaagcagctc aagctgctca agatggtcaa agcttaaaaa caagaactat gcttcaagca
661 gacatcaacc gtttgatgga agaacttgat aatctcgcaa ataccacttc atttaatggc
721 aaacaacttt taagtgggtg ttttccaat caagaattcc aaatcggttc aagttcaaat
781 caaactatta aagcaagtat aggagcaact cagtcttcta aaatcggtgt aacaagattt
841 gaaacaggtt cacaaagttt ttcttcaggc actgtaggac ttactattaa aaactacaac
901 ggtatcgaag attttaaat tgatagtgta gtgatttcta cttcagtagg aacaggtctt
961 ggagctttgg ctgaagagat caacagaaat gcagataaaa caggaattcg tgcaactttt
1021 gatgtaaaat ctgtaggagc ctatgcaata aaagcaggaa atacttctca ggattttgct
1081 atcaatgggg ttggtatagg taaggttgat tattcagatg gtgatgagaa tggttcttta
1141 atttcagcta tcaatgctgt aaaagataca actgggtgctc aagcctctaa agatgaaaaat
1201 ggtaaaactg ttcttacttc ggccgatggg agagggatta aaatcacagg tagcataggt
1261 gtaggagctg gtatattgca cactgaaaat tatggaaggt tatcttttagt taaaaatgat
1321 ggtagagata tcaatataag tggaacaggt ctttcagcta taggtatggg tgctacagac
1381 atgatttctc aatcttcagt atctetaaga gagtcaaaaag ggcaaatctc agcagccaat
1441 gctgatgcta tgggctttaa tgcttataat ggcgggcgcg ctaagcaaat tattttcgct
1501 tctagtattg caggatttat gtctcaggct gggtcaggct tctctgctgg ttcgggattt
1561 tcagtaggta gtggtaaaaa ttattcagcc attttatcag cttctataca gatagtatct
1621 agcgcacgtt ctatcagtag cacctatggt gtttotactg gttcaggttt ctctgctggt
1681 tcaggtaatt ctcaatttgc agctttaaga ataagtacag taagtgtca tgatgaaact
1741 gcaggtgtaa ctacacttaa gggtgcaatg gctgtgatgg atatagcaga aactgctatt
1801 accaatcttg atcaaatcag agcggatata gggtctgtgc aaaatcaaat cacatcgact
1861 ataaacaaca ttactgtaac ccaggtaaat gttaaatcag cagaatcaca aatcagagat
1921 gttagttttg caagcgagag tgcaaatcag tctaaagcaa atatttggc tcaaagtggg
1981 tcttatgcta tggctcaagc aaattcaagc cagcaaaaat ttttaagatt actacagtag

```

Fig. 6. Secuencia del gene *flaA* de *Campylobacter coli*.

Origen

1 tatggagagt ttgatcctgg ctcagagtga acgctggcgg cgtgcctaata acatgcaagt  
 61 cgaacggagt attaagagag cttgcnnnt taatacttag tggcgcacgg gtgagtaatg  
 121 tatagttaat ctgcctaca ctggaggaca acagttagaa atgactgcta ataactcata  
 181 ctccctctta acataagtta agtcgggaaa gtntttcggg ttaggatgag actatattgt  
 241 atcagctagt tggttaaggta atggcttacc aaggctntga cgcataactg gtctgagagg  
 301 atgatcagtc aacttggaac tgagacacgg tccagactcc nncgggaggg agcagtaggg  
 361 aatattgctc aatgggggaa accctgaagc agcaacgccg cgtggaggat gacactnttc  
 421 ggagcgtaaa ctccntttgt tagggaagaa ccatgacggt acctaacgaa taagcacggg  
 481 ctaactccgt gccagcagcc gcggtntac ggagggtgcn agcgttactc ggaatcactg  
 541 ggcgtaaagg acgcgtaggc ggattataca gtcttttgtg aaactcaaca gcttaactgt  
 601 taaactgctt gagaaactga taactagag tgagggagag gcagatgga ttggtggtgt  
 661 aggggtaaaa tccgtagaga tcaccaggaa taccattgc gaaggcgc tgctggaact  
 721 caactgacgc taatgcgtga aagcgtgggq agcaaacagc attngatacc ctggtagtc  
 781 acgcctaaa cgatgtatac taqttgttc tgtgctagtc acggcagtaa tgcacctac  
 841 ggattaagta taccgctgg ggagtcggt ccaagatta aaactcaag gaatagacgg  
 901 ggaccgcac aagcgtgga gnnngtggt taattcgann ntacgcgaag aacctacct  
 961 gggttgata tccaactaat ctottagaga taagagagt ctagcttgc agaaaattga  
 1021 gacaggtgct qcacggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttggttn agtcccgcaa  
 1081 cgagcgcaac ccacgtattt agttgctaac agttcggctg agcactctaa atagactgcc  
 1141 ttgcangga ggaggaaggt gtggacgacg tcaagtcatn ntggccotta tgcccagggc  
 1201 gacacacgtg ctacaatggc atatacaatg agatgcaata tcgcgagatg gagnaactct  
 1261 ataaaatag tcccagttcg gattggagtc tgcaactcga ctccatgaag ccggaatcgc  
 1321 tagtaatcgt agatcagcca tgctacggtg aatacgttcc cgggtcttgt actcanccgc  
 1381 cgtcacacca tgggagttga tttcactcga agtcggaatg ctaaactagc taccgcccac  
 1441 agtggat

Fig. 7. Secuencia del gene 16S ribosomal ARN de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Origen

```

1 ttatggagag tttgatcctg gctcagagtg aacgcngggc gcgtcgctaa tacatgcaag
61 tcgaacggag tattaagaga gcttgctntn ttaatacnta gtggcgcacg ggtgagtaat
121 gtatagttaa tetgcccctac actggaggac aacagttaga aatgactgct aatactccat
181 actccttott aacataagtt aagtcgggaa agtntttcgg tgtaggatga gactatattg
241 tatcagctag ttggtaaggt aatggcttac caaggctntg acgcataact ggtctgagag
301 gatgatcagt cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtagg
361 gaatattgct caatggggga aaccctgaag cagcaacgcc gcgtaggagga tgacactttt
421 cggagcgtaa actccntttg ttagggaaga accatgacgg tacctaacga ataagcaccg
481 gctaactccg tgccagcagc cgcggtaata cggagggtgc nacggtact cggaatcact
541 gggcgtaaaag gacgcgtagg cggattatca agtcttttgt gaaatctaac agctaaactg
601 ttaaactgct tgagaaactg ataatctaga gtgagggaga ggcagatgga attggtgggtg
661 taggggtaaa atccgtagag atcaccagga atacccattg cgaaggcgat ctgctggaac
721 tcaactgacg ctaatgctg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatag cctggtagtc
781 cacgctctaa acgatgtata ctagtgttg ctgtgctagt cacggcagta atgcacctaa
841 cggattaagt ataccgctg gggagtacgg tcgcaagatt aaaactcaa ggaatagacg
901 gggacccgca caagcgggtg agnnngtgg ttaattcgan nntacggaa gaaccttacc
961 tgggcttgat atccaactaa tctcttagag ataagagagt gctagcttgc tagaaaqttg
1021 agacaggtgc tgcacggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca
1081 acgagcgcaa cccacgtatt tagttgctaa cagttcggct gagcactcta aatagactgc
1141 cttcgcaagg aggaggaagg tgtggacgac gtcaagtcat catggccctt atgcccaggg
1201 cgacacagt gtcacaatgg catatacaat gagatgcaat atcgcggaat ggagcaaatc
1261 tataaaaatg tcccagttc ggattggagt ctgcaactcg actccatgaa gccggaatcg
1321 ctagtaatcg tagatcagcc atgctacggt gaatacgttc ccgggtcttg tactcaccgc
1381 cagtcacacc atgggagtgt atttcaactg aagtcggaat gctaaactag ctaccgccc
1441 cagtggaaac agcagctggg g

```

**Fig. 8. Secuencia del gene 16S ribosomal ARN de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.**

### 2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Con las extracciones de ADN se realizó la estandarización del PCR correspondiente para *C. jejuni* y *C. coli* y para *C. fetus*, variando cada una de las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, oligonucleótidos y *Taq* polimerasa hasta obtener la reacción óptima para cada uno de los productos de amplificación.

La PCR se realizó en un termociclador Perkin–Elmer (Gene Amp, PCR System 2400). Cada 50 µl de reacción de PCR utilizó una mezcla de 5µl (5ng) de muestra de ADN de cultivos puros de *Campylobacter*, 5µl de buffer que contenía 10 mM de Tris- HCl (pH 8.3); 50 mM de KCl, 5µl de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5µl de 10 µmol de

cada oligonucleótido, 2.5µl de 200 µmol de cada trifosfato deoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2.5 U de *Taq* polimerasa y el resto de agua bidestilada estéril.

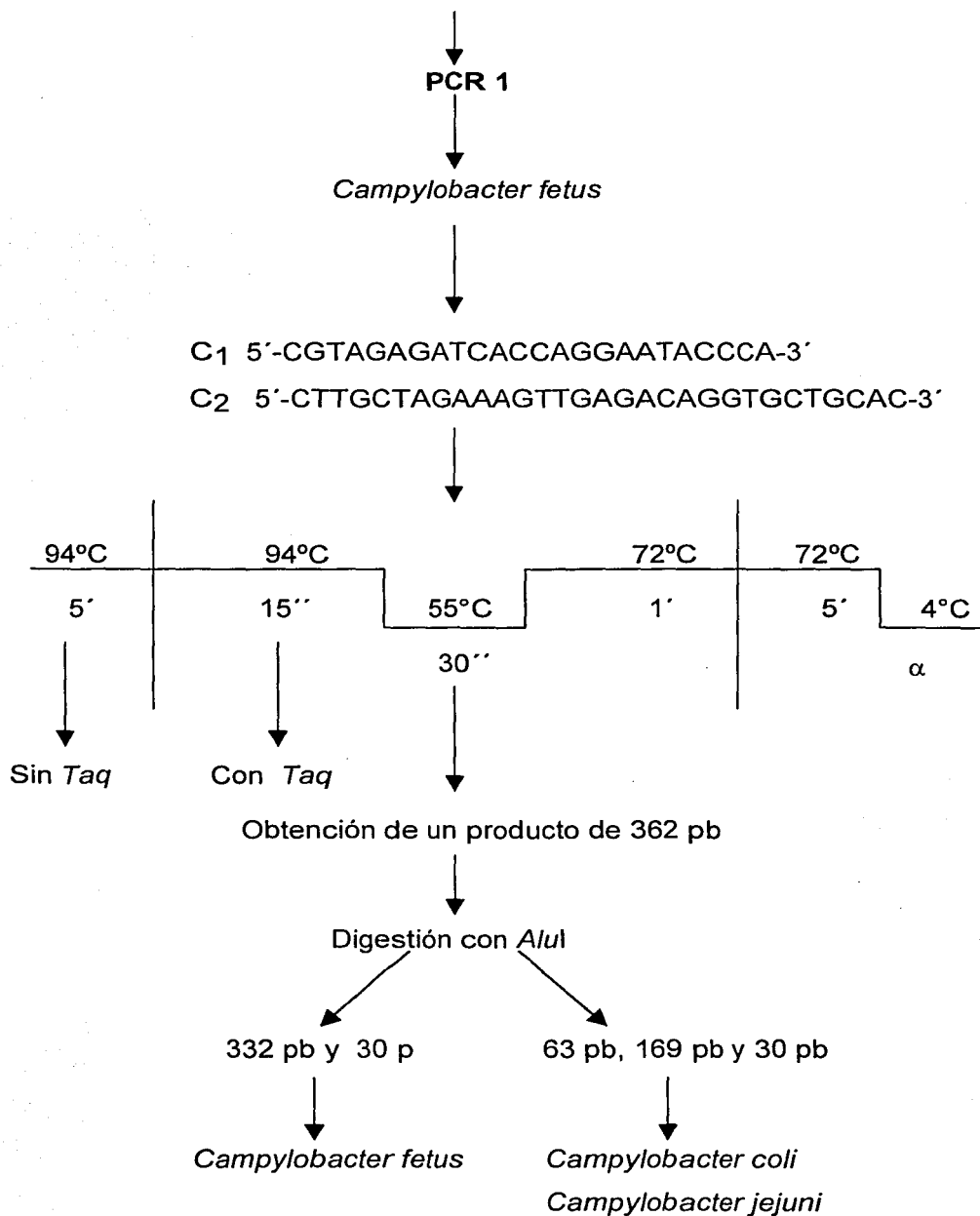
Todos los componentes, excepto la *Taq* polimerasa, se mezclaron e incubaron a 95°C por 5 min., posteriormente se agregó la *Taq* polimerasa y se dió inicio a una serie de 30 ciclos para la PCR-1(*C. fetus*) los ciclos fueron de 94°C por 15 seg., 55°C por 30 seg. y 72°C por 1 min, y el último ciclo de 72°C durante 5 min, posteriormente se realizó una digestión con la enzima *AluI* por 2 horas a 37°C.

Para la PCR-2 (*C. jejuni* y *C. coli*) los ciclos fueron de 94°C por 1 min., 50°C por 1min. y 74°C por 1 min., así como un último ciclo de 74°C por 5 min, los productos de ambas PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en un transluminador de luz UV y documentado mediante fotografía ( 58, 59, 63, 66, 67, 82, 84, 85)

A continuación se muestran los diagramas de flujo simplificando la estrategia utilizada para las diferentes cepas, especificando las condiciones que requieren de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados.

**Diagrama de flujo de la estrategia empleada para el diagnóstico de *Campylobacter* por PCR.**

ADN de muestras de animales ( heces, lavados prepucciales, etc.)



ADN de muestras de animales ( heces, lavados prepuciales, etc.)



PCR 2

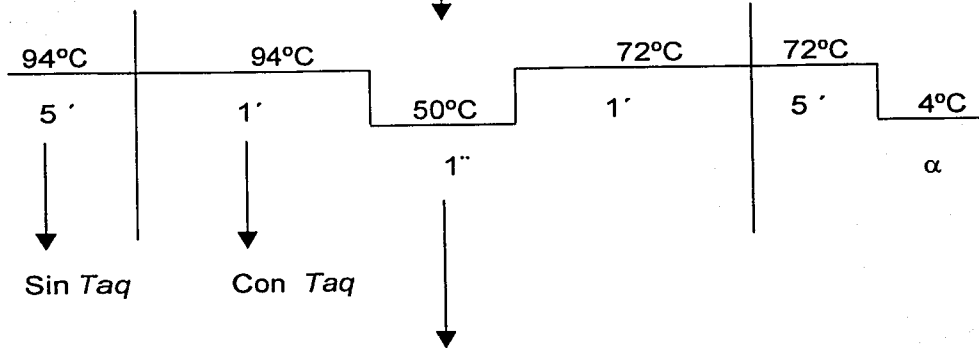


*Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*



Pg50, 5' -ATGGGATTTTCGTATTAAC- 3'

Pg3, 5' -GAACTTGAACCGATTTG-3'



Se obtiene un producto de 450 pb

**2.5. Concentración mínima detectable de ADN obtenido a partir de cultivos puros de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter fetus* por PCR.**

El ADN obtenido de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* fue cuantificado en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech), a partir de ahí se realizó la dilución de estas cuantificaciones iniciando con una concentración de 5 µg por cada 5 µl colocados en un tubo para la reacción de PCR, y a partir de esta concentración se hicieron diluciones para encontrar la concentración mínima detectable.

**2.6. Inoculación de *Campylobacter* en heces.**

Se obtuvieron heces frescas de bovinos clínicamente sanos del Centro de Enseñanza Práctica y de Investigación en Producción y Salud Animal, FMVZ, UNAM. Los inóculos se prepararon de la siguiente manera:

Se resuspendió el cultivo de *Campylobacter* en solución salina fisiológica (SSF) hasta obtener una turbidez similar al 0.5 del nefelómetro de McFarland <sup>(86)</sup> que equivale a  $1.5 \times 10^8$  bacterias por ml. A partir de cada inóculo estandarizado se realizaron diluciones decimales de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Cada muestra de heces (0.5 g) fue inoculada con 100 µl de cada una de las diluciones. El número de *Campylobacter* presentes se determinó mediante una técnica de cuenta viable en placa (miles y misra) en agar sangre y medio BU7 con los siguientes antibióticos; bacitracina (2500 UI/l), ciclohexamida (50mg/ml), sulfato de colistina (10,000 UI/l), polimixina (2500 UI/l) y novobiocina (5mg/l).

## 2.7. Extracción de ADN de heces.

La extracción de ADN a partir de las muestras de heces inoculadas con las diferentes diluciones se realizó por medio de cuatro métodos:

- 1) El primer método fue el descrito por Gumerlock *et al.*,<sup>(87)</sup> para el cual se resuspendieron 0.5 g de heces en buffer TEN [Tris-HCL 50mM (pH 8), EDTA 10mM, NaCl 150 mM], posteriormente se agregó lisozima 100mg/ml y se incubó por 1 hora a 37°C, se añadieron 50 µl de SDS al 5% en TEN y proteinasa K 20 mg/ml, incubándose por 30 min. a 55°C, se hirvieron 10 min y se adicionó un volumen de fenol: cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) repitiendo este paso cinco o seis veces, posteriormente se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto, finalmente se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50µl de T:E.
- 2) El segundo método fue el descrito por Pitcher *et al.*,<sup>(84)</sup> con algunas modificaciones<sup>(85)</sup>. Después de colocar 0.5 g de heces en SSF y mezclar bien se obtuvo una pastilla por centrifugación a 10 000 g, la cual se resuspendió en buffer T:E ( Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8), para después lisar las células con tiocianato de guanidina, se agregó RNAasa (50µg/ml) y acetato de amonio 7.5 M y se incubó en hielo, posteriormente se añadió un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) repitiendo esta extracción tres veces más, después se realizaron dos extracciones con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se adicionó etanol absoluto frío, finalmente etanol al 70%, repitiendo este lavado tres veces.
- 3) El tercer método fue el descrito por Boom<sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson<sup>(89)</sup>, en el cual se utilizaron 0.5 g de heces diluidas en 40 µl de una suspensión de



tierra de diatomeas con 900  $\mu$ l de buffer de lisis, se mezcló perfectamente y se incubó por 10 min a temperatura ambiente para centrifugarlo a 11,600 x g por 30 seg., posteriormente la pastilla se lavó con buffer de lavado (dos veces), etanol al 70% ( dos veces) y acetona (una vez) para después secarlo a 54°C por 10 min, la pastilla obtenida se resuspendió en buffer T:E y se incubó a 54°C por 10 min, se centrifugo y se obtuvo el sobrenadante. Por cada 50  $\mu$ l de muestra se añadieron 150  $\mu$ l de polivinilpirrolidona (PVP)<sup>(90)</sup> y T:E, se mezcló y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, después se agregaron 100  $\mu$ l de acetato de amonio 2 M más 600 $\mu$ l de isopropanol lo cual se incubó 30 min a – 20°C, finalmente las muestras se centrifugaron a 11, 600 x g 10 min.

- 4) El cuarto método fue el QIAamp ADN Stool Mini Kit (QIAGEN ) que es comercial, el cual utiliza una columna de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método utilizó 200  $\mu$ g de heces, a la cual se agregó un buffer de lisis para ser incubado 5 min a 70°C, se centrifugo y se tomó el sobrenadante para adicionar la pastilla que adsorbe inhibidores, se centrifugo y se tomó el sobrenadante para adicionar la proteinasa K que posteriormente se incubó 10 min a 70°C, se agregó etanol absoluto, se pasó por la columna, se centrifugo y se tomó el sobrenadante para adherir el buffer de lavado 1, se centrifugo y la columna se pasó a un tubo nuevo para agregar el buffer de lavado 2, se centrifugo y se transfirió la columna a un tubo nuevo para su posterior elusión.

El ADN obtenido por éstos métodos fue secado en una centrifuga al vacío y resuspendido en 100 $\mu$ l de T:E. La concentración de ADN se determinó en un

fluorómetro (DyNA Quant 200, Hoefer). El ADN fue observado en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio ( 63, 66, 84, 85, 88, 90)

## **2.8. PCR de ADN obtenido a partir heces.**

Después de obtener el ADN a partir de las diluciones de *Campylobacter* en heces se realizó un PCR en un termociclador Perkin–Elmer (Gene Amp, PCR System 2400). En cada 50 µl de reacción de PCR utilizó una mezcla de 5µl (5ng) de muestra de ADN de cultivos puros de *Campylobacter*, 5µl de buffer que contenía 10 mM de Tris- HCl (pH 8.3); 50 mM de KCl, 5µl de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5µl de 10 µmol de cada oligonucleótido, 2.5µl de 200 µmol de cada trifosfato deoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2.5 U de *Taq* polimerasa y el resto de agua bidestilada estéril.

Todos los componentes, excepto la *Taq* polimerasa, se mezclaron e incubaron a 95°C por 5 min, posteriormente se agregó la *Taq* polimerasa y se dió inicio a una serie de 30 ciclos para *C. jejuni* y *C. coli* de 94°C por 1 min, 50°C por 1min y 74°C por 1 min y un último ciclo de 74°C por 5 min.

Para *C. fetus* los ciclos fueron de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 min, y el último ciclo de 72°C durante 5 minutos, posteriormente se realizó una digestión con la enzima *AluI* por 2 h a 37°C, el producto de PCR se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en un transluminador de luz UV y documentado mediante fotografía ( 58, 59, 63,

66, 67, 82, 84, 85)

## **2.9. Diagnóstico Bacteriológico y PCR de casos clínicos de ovinos.**

Se utilizaron muestras de ovinos con aborto y diarrea, a este grupo se le realizaron pruebas para descartar de *Brucella*, *Leptospira* y ojo azul. Las muestras tomadas fueron: once muestras de heces (hembras) y diez muestras de solución de lavados prepuciales (SLP). Las muestras de las hembras fueron tomadas con guante de palpación vía rectal, identificadas y conservadas en refrigeración para su posterior procesamiento al llegar al laboratorio. Las muestras de los machos fueron tomadas del prepucio haciendo lavados con solución salina fisiológica, identificados y conservados en medio set <sup>(5, 52)</sup> en una jarra con vela para su posterior procesamiento.

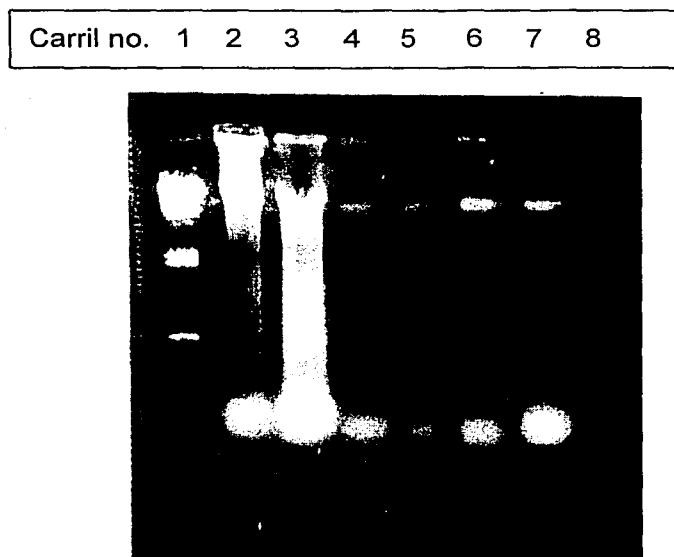
Al llegar al laboratorio ambas muestras, (heces y SLP) se sembraron en agar sangre con suplemento Preston para ser incubadas durante 48 h a 37° C y a 25° C. A todas las muestras se les realizó preparaciones húmedas para observarlas en microscopio de campo oscuro. Estas mismas muestras fueron procesadas para la PCR, a partir de heces se extrajo ADN por el método de Boom <sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson <sup>(89)</sup>, mientras que para las soluciones de lavados prepuciales se extrajo ADN por el método de Pitcher <sup>(84)</sup>, posteriormente a todas las extracciones se les preparó para realizar la PCR 1 antes descrita.

### 3. Resultados.

#### 3.1. Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se probaron dos métodos, en el primero con CTAB/NaCl <sup>(63, 66)</sup>, se obtuvo ADN degradado, el cual se utilizó para la PCR y se comprobó que no es útil, para el caso de *Campylobacter* spp, pero este mismo método se probó para la extracción de ADN de bacterias utilizadas como controles negativos, en este caso el ADN se observó sin degradación y sin ARN.

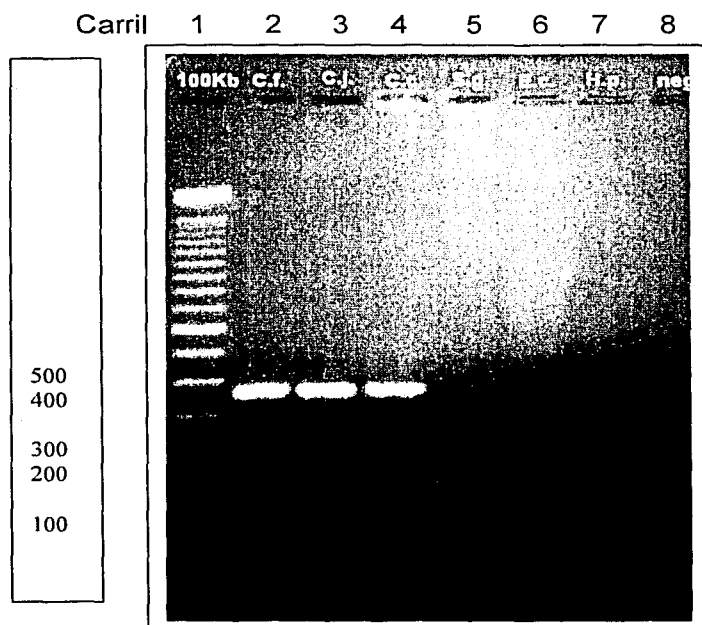
Para el segundo método con tiocianato de guanidina <sup>(84)</sup> utilizado para *Campylobacter* spp se obtuvo un ADN sin observar degradación ni ARN por lo cual se decidió utilizar este método de extracción para realizar la técnica PCR (Fig. 9).



**Fig. 9.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde se muestran las extracciones de ADN obtenidas por los métodos descritos, marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/ *Hind*III (carril 1), ADN de *C. jejuni* (carril 2), *C. coli* (carril 3) obtenidos por el método de CTAB/NaCl y ADN de *C. jejuni* (carriles 4 y 5) y *C. coli* (carriles 6 y 7) obtenidos por el método de tiocianato de guanidina.

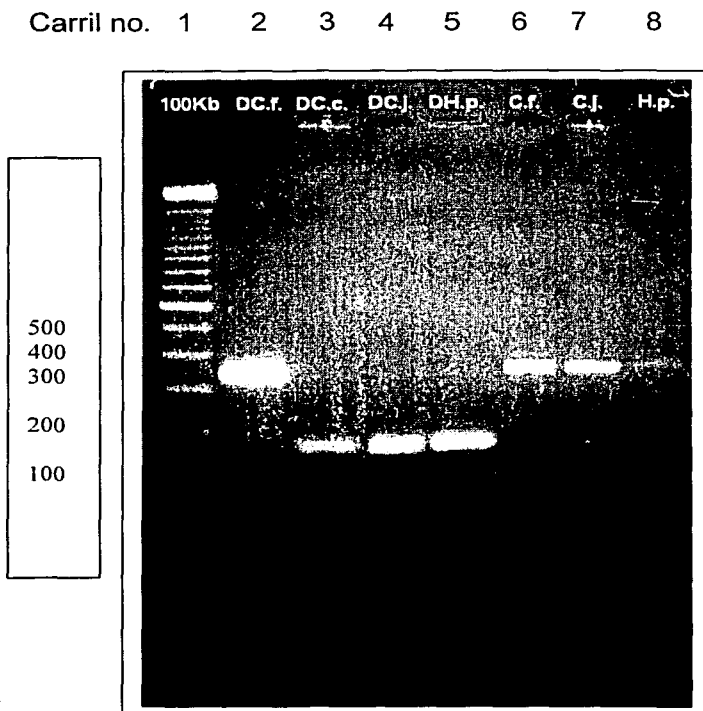
### 3. 2. PCR con ADN de Cultivos Puros de *Campylobacter*.

Con las extracciones de ADN de *Campylobacter* obtenidas por el método de tiocianato de guanidina se realizó la estandarización de las PCR. Para la detección de *C. fetus* (PCR-1) se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Eaglesome DM *et al.*,<sup>(82)</sup> que amplificaron un producto de 362 pares de bases del gene que codifica para la subunidad 16S ribosomal (rRNA). Con dichos iniciadores se detectó también *C. coli*, *C. jejuni* y *Helicobacter pylori* aunque este último fue reportado como no detectado por Eaglesome *et al.*. Con estos oligonucleótidos no se amplificó producto alguno a partir de *Salmonella gallinarum* y *Escherichia coli* (Fig. 10).



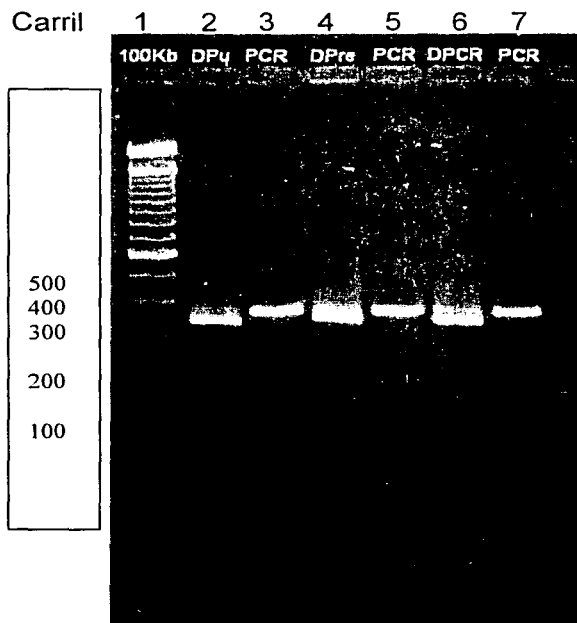
**Fig. 10.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en donde se muestra el fragmento de 362 pb amplificado por el PCR-1. Marcador de peso molecular ladder 100 pb (carril 1), *C. fetus* (carril 2), *C. jejuni* (carril 3), *C. coli* (carril 4), *S. gallinarum* (carril 5), *E. coli* (carril 6), *H. pylori* (carril 7) y control negativo (carril 8).

El fragmento amplificado se digirió con la enzima *AluI* para confirmar que el segmento amplificado corresponde a *C. fetus* en el cual la digestión produce dos fragmentos, uno de 332 pb y otro de 30 pb. Para *C. jejuni* y *C. coli* se obtienen tres fragmentos, uno de 169 pb, otro de 163 pb y por último uno de 30 pb (Fig. 11).



**Fig. 11.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en donde se muestran las digestiones con la enzima *AluI* de los productos obtenidos por la PCR-1. Marcador de peso molecular ladder 100 pb (carril 1), *C. fetus* (carril 2), *C. coli* (carril 3), *C. jejuni* (carril 4), *H. pylori* (carril 5). Las reacciones de PCR sin digerir se muestra en los carriles 6, 7 y 8 con *C. fetus*, *C. coli* y *H. pylori* respectivamente.

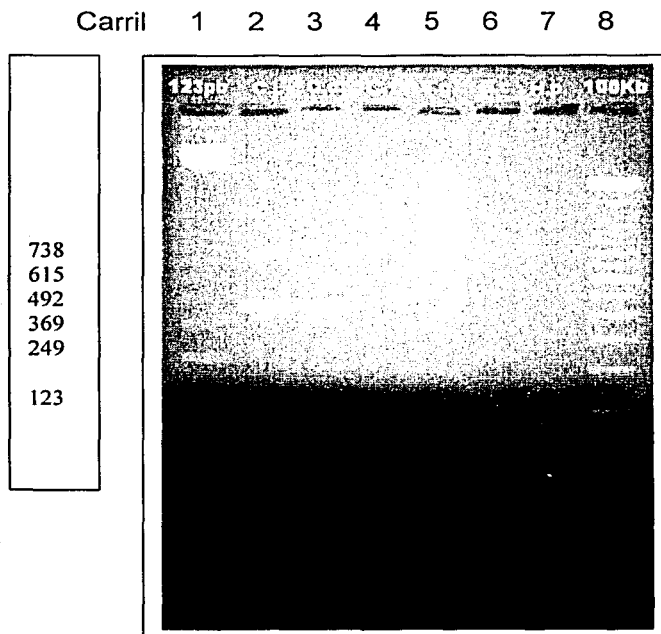
Al observar los fragmentos obtenidos por las digestiones realizadas a partir de los productos de amplificación de la PCR 1 se decidió probar la purificación y la precipitación con el fin de optimizar las digestiones de los productos, esto para observar cual método era más eficiente. Al comparar las digestiones de los productos obtenidas por purificación y precipitación con la reacción tomada directamente después de la PCR-1, se observó que este último no presenta diferencia alguna con los procedimientos antes mencionados por lo cual el producto de PCR puede ser utilizado directamente para la digestión con la enzima *AluI* con las condiciones previamente descritas (Fig. 12).



**Fig. 12.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento amplificado mediante la PCR-1 a partir de *C. fetus* de 362 pb (carril 3, 5 y 7) y el mismo fragmento digerido con *AluI* (carriles 2, 4 y 6). En los carriles 2 y 3 el producto de PCR fue purificado, en los carriles 4 y 5 el producto de PCR fue precipitado y en los carriles 6 y 7 el producto de PCR se utilizó directo. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular 100pb.

En la PCR 2 Oyoyo *et al.*,<sup>(67)</sup> recomienda una temperatura de alineación de 37°C por 1 minuto con la cual no obtuvimos producto de amplificación alguno, finalmente en la PCR se utilizó una temperatura de alineación de 50°C obteniendo un producto de amplificación visible de 450 pb previamente reportado.

A partir de *C. coli* y *C. jejuni* se amplificó un producto de 450 pares de bases, utilizando los iniciadores reportados por Oyoyo *et al.*,<sup>(67)</sup> diseñados a partir de la secuencia del gene *flaA* (Fig. 13).



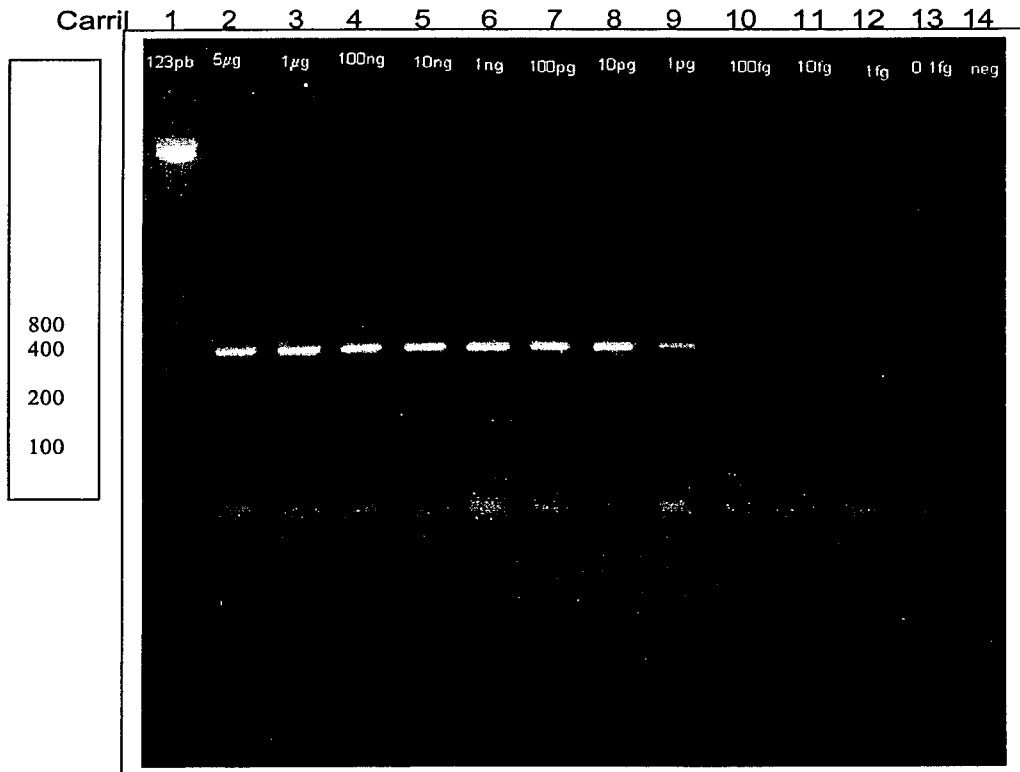
**Fig. 13.** Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento de 450 pb amplificado por el PCR-2 a partir de *C. coli* (carril 2), *C. jejuni* (carril 3), *C. fetus* (carril 4), *S. gallinarum* (carril 5), *E. coli* (carril 6) y *H. pylori* (carril 7). Marcadores de peso molecular ladder 123 pb y 100 pb se observan en los extremos del gel (carril 1 y 8 respectivamente).



Al probar estos iniciadores con los controles negativos se pudo comprobar que no detectan a *S. gallinarum* y *E. coli*, sin embargo se observó para *H. pylori* una banda tenue, aunque Oyoyo *et al.*,<sup>(67)</sup> lo cita como negativo.

### **3.3. Concentración mínima detectable de ADN obtenido de cultivos puros de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* por PCR.**

Con el fin de conocer la mínima concentración de ADN detectado por la PCR se realizaron diluciones, comenzando con una concentración de 5µg por cada 5µl colocados en cada reacción de PCR y de ahí se hicieron diluciones décuples para obtener la concentración mínima detectada, siendo para *C. jejuni* y *C. coli* de 100 fg y para *C. fetus* de 10 fg (Fig. 14).



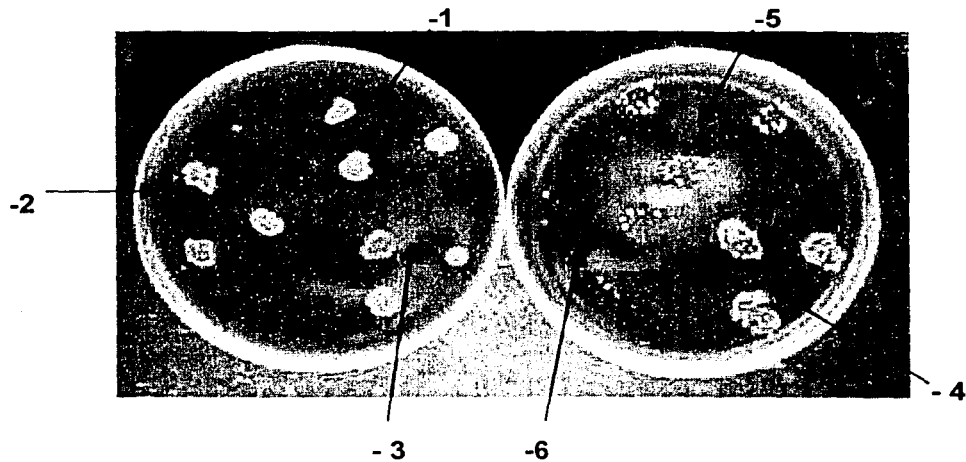
**Fig. 14.** Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio donde se muestra el fragmento de 362 pb amplificado por el PCR-1 a partir de diferentes diluciones de *C. fetus* (carril 2) 5µg, 1µg (carril 3), 100ng (carril 4), 10 ng (carril 5), 1 ng (carril 6), 100pg (carril 7), 10 pg (carril 8), 1 pg (carril 9), 100 fg (carril 10), 10 fg (carril 11), 1 fg (carril 12), 0.1 fg (carril 13), y el control negativo (carril 14). Marcador de peso molecular Low ladder mass en el primer carril.

### **3.4. Aislamiento a partir de heces inoculadas con *Campylobacter*.**

Previo a la inoculación de las heces las diluciones bacterianas fueron sembradas por triplicado en agar sangre para realizar posteriormente la cuenta de células viables en las últimas diluciones de las cuales se obtuvo para *C. jejuni*  $34 \times 10^7$

UFC/ml y para *C. coli*  $36.6 \times 10^7$  UFC/ml, lo cual está dentro del intervalo establecido para la turbidez al 0.5 de McFarland <sup>(86)</sup> con lo cual podemos comprobar la cantidad de bacterias que fueron inoculadas en las heces de bovino (Fig.15).

Para las diluciones  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$  no se pudo realizar la cuenta viable de colonias debido a que la cantidad de UFC/ml ya no es detectable por este método.



**Fig. 15.** *Campylobacter jejuni* suspendido en SSF, diluido  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  sembrado en agar sangre para realizar la cuenta viable de colonias.

Posteriormente heces frescas de bovino fueron inoculadas con  $100 \mu\text{l}$  de la dilución correspondiente y sembradas en medio BU7 con los antibióticos en las concentraciones recomendadas en la literatura <sup>(1, 5, 6, 7, 8, 15)</sup> para realizar el primoaislamiento de *Campylobacter*. También se utilizó el suplemento comercial Preston (Oxoid), el cual contiene Polimixina B (2500 UI), Trimetoprim (5mg), Rifampicina (5mg) y Ciclohexamida (50mg).

El medio BU7 a pesar de ser el mas recomendado, resultó inhibitorio para todas las cepas probadas, por lo que se elaboró un medio que contenía agar sangre con cada uno de los antibióticos por separado, para comprobar el crecimiento de las diferentes cepas con cada uno de los antibióticos y en su caso determinar si alguno de ellos particularmente resultaba inhibitorio para alguna cepa.

Con lo anterior, se observó que la mayoría de las cepas evaluadas son susceptibles a diferentes antibióticos, por lo cual, como se recomienda en la literatura consultada <sup>(10)</sup>, es necesario utilizar un mínimo de dos medios selectivos para realizar un diagnóstico preciso y confiable. Estos resultados se pueden observar en los siguientes dos cuadros, en el **cuadro 4** podemos ver que las diferentes cepas de *Campylobacter* no crecen en medio BU7, pero sí, en AS y en AS con suplemento Preston, mientras que en el **cuadro 5** se observa la inhibición del crecimiento de algunas cepas por diferentes antibióticos, por ejemplo: colistina inhibió el crecimiento de once cepas (*C. coli* 97, *C. coli* 227, *C. coli* 719, *C. coli* 2232, *C. coli* 183-83, *C. jejuni* 133, *C. jejuni* 286, *C. jejuni* 383, *C. jejuni* 81116, *C. lari* y *C. fetus*), polimixina B el de doce cepas (*C. coli* 97, *C. coli* 252, *C. coli* 719, *C. coli* 2144, *C. coli* 2232, *C. coli* 183-83, *C. jejuni* 133, *C. jejuni* 286, *C. jejuni* 383, *C. jejuni* 81116, *C. lari* y *C. fetus*), novobiocina, colistina, ciclohexamida y polimixina B juntos el de una cepa (*C. jejuni* 81116), únicamente una cepa (*C. laridis*) no presentó crecimiento con ningún antibiótico incluido en el medio y cuatro cepas (*C. jejuni* 15, *C. jejuni* 17, *C. jejuni* 685 y *C. jejuni* 2397) crecieron en presencia de todos los antibióticos con lo cual se puede pensar que posiblemente se presente un sinergismo al estar todos estos antibióticos juntos lo cual favorezca la inhibición del crecimiento de estas cepas.

**Cuadro 4.** Medios utilizados en el aislamiento de *Campylobacter*.

Cepa	Agar Sangre + Suplemento Preston	BU7	Agar Sangre
<i>C. coli</i> 97 *	++	-	+++
<i>C. coli</i> 227 *	++	-	++
<i>C. coli</i> 252 *	+++	-	+++
<i>C. coli</i> 719 *	++	-	++
<i>C. coli</i> 2144 *	++	-	+++
<i>C. coli</i> 2232 *	+++	-	+++
<i>C. coli</i> 183-83 *	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 15 *	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 17 *	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 133 *	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 286 *	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 383 *	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 685 *	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 2397 *	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 81116 *	+++	-	+++
<i>C. lari</i> *	-	-	++
<i>C. fetus</i> subs. fetus <sup>o</sup>	+++	-	+++

- + crecimiento escaso
- ++ crecimiento moderado
- +++ crecimiento abundante
- crecimiento nulo o negativo

\* 42° C en microaerobiosis durante 48 horas

<sup>o</sup> 37° C en microaerobiosis durante 48 horas

**Cuadro 5.** Agar sangre con los diferentes antibióticos que componen el medio BU7.

Cepa	Bacitraci na	Novobio cina	Colis Tina	Ciclohe xamida	Polimi xina B	Agar Sangre
<i>C. coli</i> 97 *	+++	+++	-	+++	-	+++
<i>C. coli</i> 227 *	+++	+++	-	+++	+	++
<i>C. coli</i> 252 *	+++	+++	+++	+++	-	+++
<i>C. coli</i> 719 *	+++	+++	-	+++	-	++
<i>C. coli</i> 2144 *	+++	+++	+	+++	-	+++
<i>C. coli</i> 2232 *	+++	+++	-	+++	-	+++
<i>C. coli</i> 183-83 *	+++	+++	-	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 15 *	+++	+++	++	+++	++	+++
<i>C. jejuni</i> 17 *	+++	+++	++	+++	++	+++
<i>C. jejuni</i> 133 *	+++	+++	-	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 286 *	+++	+++	-	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 383 *	+++	+++	-	+++	-	+++
<i>C. jejuni</i> 685 *	+++	+++	++	+++	+	+++
<i>C. jejuni</i> 2397 *	+	+++	+	+++	++	+++
<i>C. jejuni</i> 81116 *	+++	-	-	-	-	+++
<i>C. lari</i> *	-	-	-	-	-	+++
<i>C. fetus</i> subs. <i>fetus</i> °	+++	+++	-	+++	-	+++

- + crecimiento escaso
- ++ crecimiento moderado
- +++ crecimiento abundante
- crecimiento nulo o negativo

\* 42° C en microaerobiosis durante 48 horas

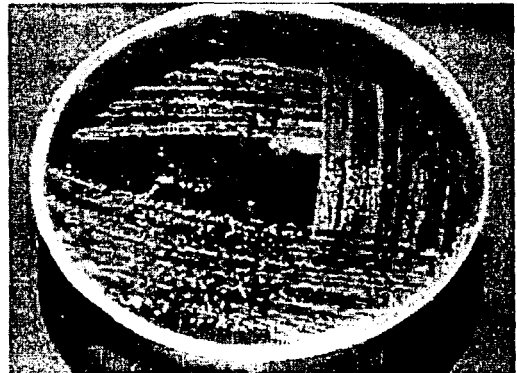
° 37° C en microaerobiosis durante 48 horas

Después de observar que la mayoría de las cepas de *Campylobacter* no crecen en AS con al menos uno de los antibióticos que contiene el medio BU7, pero lo hacen en el medio elaborado con el suplemento comercial Preston, se decidió utilizar este suplemento en el aislamiento de heces inoculadas con cultivo bacteriano. En AS y en AS con suplemento comercial Preston, se observó que para el primero el aislamiento y la identificación de *Campylobacter* sería imposible, mientras que para el segundo no sería complicado (Fig. 16 y 17).



**Fig. 16.** Heces inoculadas con *Campylobacter* sembradas en agar sangre sin antibioticos, a las 24 horas.

**Fig. 17.** Heces inoculadas con *Campylobacter* sembradas en AS con el suplemento comercial Preston a las 48 horas.



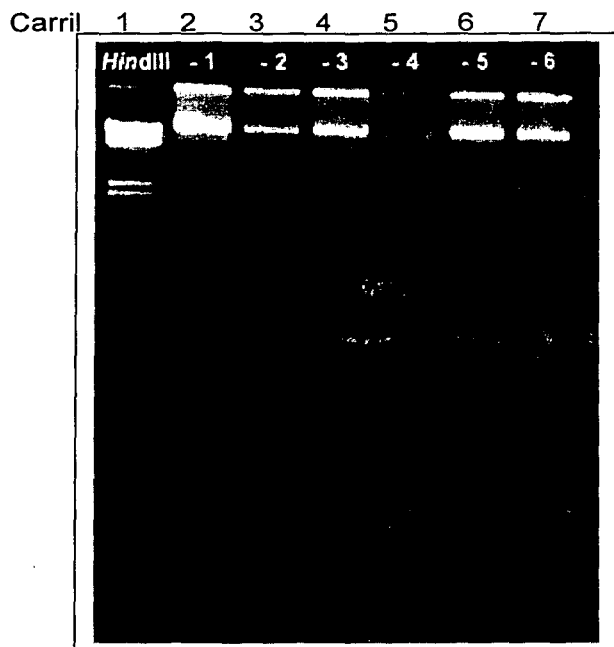
Después de realizar el aislamiento de *Campylobacter* en AS con suplemento Preston de las heces inoculadas se prosiguió a realizar tinción de gram, movimiento en campo obscuro, catalasa y oxidasa para corroborar la presencia de *Campylobacter*. También se sembraron heces sin inocular *Campylobacter* para comprobar que no crecía ninguna otra bacteria presente en las heces.

### **3. 5. Extracción de ADN a partir de heces.**

La extracción de ADN se realizó por cuatro diferentes métodos para cada una de las 10 diluciones (-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10) partiendo del 0.5 de McFarland inoculadas en heces con *C. jejuni* 2397 y *C. coli* 252.

1. El primero fue el descrito por Gumerlook *et al.*, <sup>(87)</sup>, el cual dura aproximadamente 12 h, obteniendo un ADN sin degradación y sin ARN por lo que puede ser utilizado para las reacciones de PCR (**Fig. 18**).

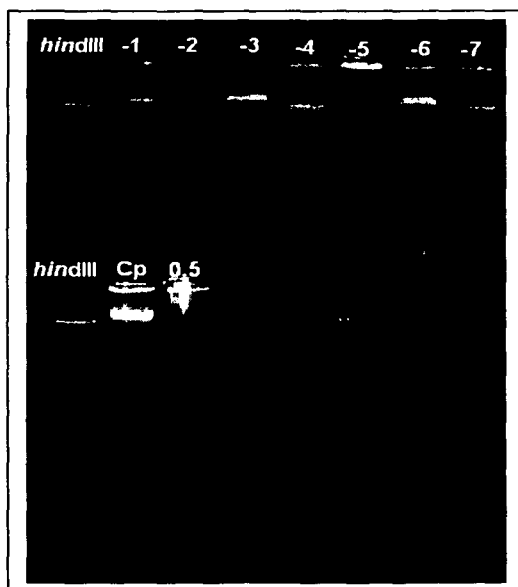




**Fig. 18.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en donde se observa el marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/ *Hind*III y ADN obtenido por el método descrito por Gumerlook *et al.*,<sup>(87)</sup> a partir de heces inoculadas con las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  conteniendo *C. jejuni* 2397.

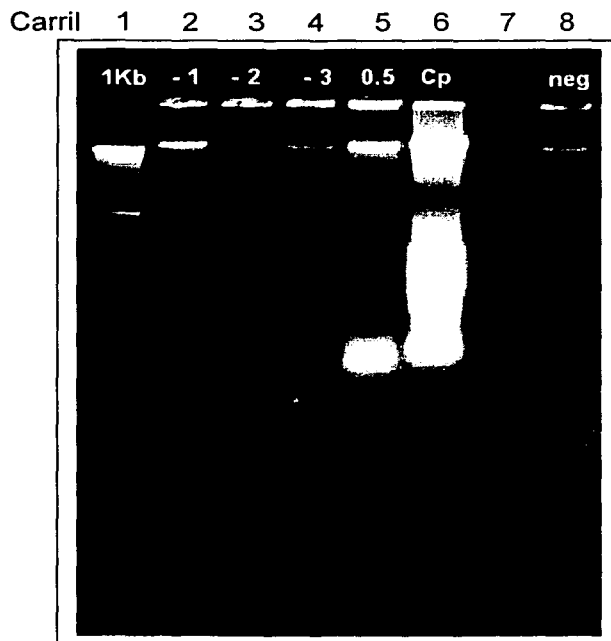
2. El segundo método fue el descrito por Pitcher *et al.*,<sup>(84)</sup> que utiliza tiocianato de guanidina, el cual dura aproximadamente 6h y para el cual se obtuvo ADN sin degradación y sin ARN por lo que también puede ser utilizado para la PCR (**Fig. 19**).

Carril 1 2 3 4 5 6 7 8



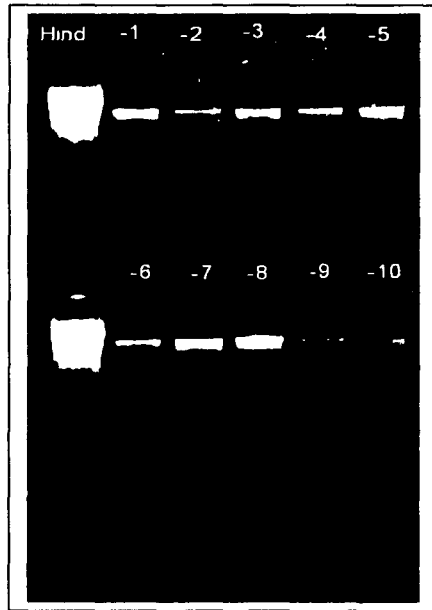
**Fig. 19.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en donde se observa ADN que se obtuvo por el método de tiocianato de guanidina a partir de heces inoculadas con las diferentes diluciones conteniendo *C. jejuni* 2397, el marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/ *Hind*III (carril 1), posteriormente se observan las diluciones de ADN  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  (carril 2 al 8). En el panel inferior el marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/ *Hind*III (carril 1), posteriormente se observa el ADN de cultivo puro sin diluir (carril 2) y el ADN que se obtuvo a partir de la dilución 0.5 de McFarland inoculada con *C. jejuni* 2397 (carril 3).

3. El tercer método fue el descrito por Boom<sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson<sup>(89)</sup> y Young<sup>(90)</sup> utilizando polivinilpirrolidona para remover inhibidores presentes en las muestras, con lo cual se disminuyen los compuestos que puedan intervenir con la reacción de PCR. Este método duró 6h y se obtuvo ADN sin degradación y sin ARN por lo que también puede ser utilizado para la PCR (Fig. 20).



**Fig. 20.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en donde se observa ADN que se obtuvo por el método de Boom <sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson <sup>(89)</sup> a partir de heces inoculadas con las diferentes diluciones de *C. jejuni* 2397, el marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder (carril 1), posteriormente se observan las diluciones de ADN  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  (carril 2, 3, 4) dilución 0.5 de McFarland inoculada con *C. jejuni* 2397 (carril 5), cultivo puro (carril 6) y control negativo con heces sin inóculo bacteriano (carril 8).

4. Para el cuarto método QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) se utilizó una columna comercial, este método dura aproximadamente 3 h obteniendo menor cantidad de ADN pero sin degradación y sin ARN por lo que también puede ser utilizado para la PCR (Fig. 21).

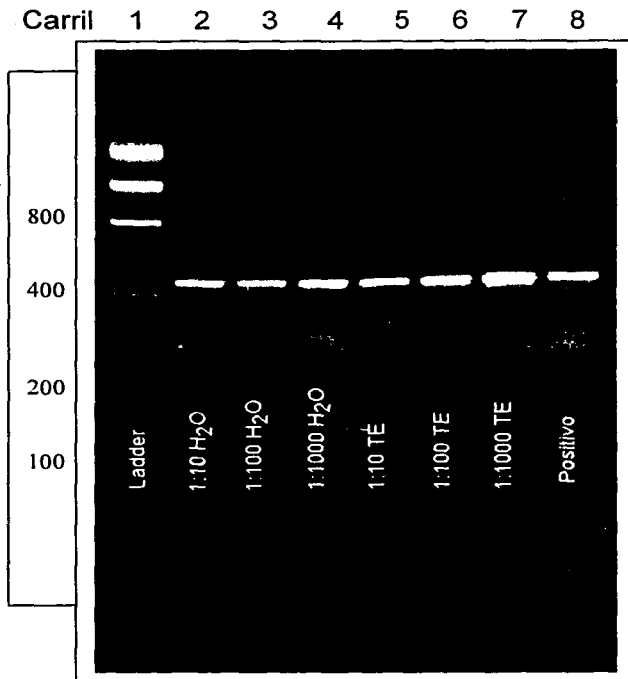


**Fig. 21.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en donde se observa ADN que se obtuvo por el método de columna a partir heces inoculadas con las diferentes diluciones de *C. jejuni* 2397, el marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/HindIII (carril 1), posteriormente se observan las diluciones de ADN  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  (carril 2 al 7 panel superior) y diluciones de ADN  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  (carril 2 al 6 panel inferior).

Al comparar estos cuatro métodos se observó que el ADN obtenido en todos no presenta ADN degradado ni ARN, por lo cual cualquier método podría ser considerado para ser utilizado en la PCR.

### 3. 6. PCR de ADN obtenido a partir heces.

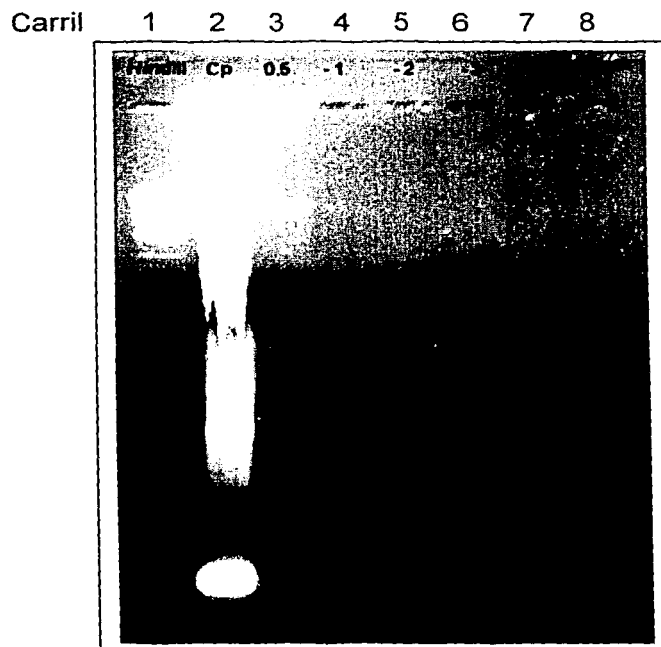
Primero se utilizó el ADN obtenido por el método de Gumerlook *et al.*,<sup>(87)</sup> con el cual se realizó una PCR-2 con las condiciones y concentraciones previamente descritas para *C. jejuni* y *C. coli*. En los primeros experimentos no se obtuvo producto alguno en la PCR, por lo que los experimentos se repitieron, evaluando esta metodología de extracción de ADN a partir de heces. En la literatura consultada<sup>(76, 77, 80, 81)</sup> se menciona que en heces es posible encontrar inhibidores como son el pH, restos de sangre, restos de fibras, EDTA, etc, Dado que algunos autores citan al EDTA como posible inhibidor, se utilizó ADN diluido con agua bidestilada estéril y otro diluido con T:E (10:1), con el fin de comprobar si la existencia de EDTA afecta los resultados obtenidos (**Fig. 22**).



**Fig. 22.** Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio en el que se muestra el marcador de peso molecular Ladder low mass (carril1) siguiendo con los productos de la PCR-2 a partir de ADN obtenido de heces, el cual fue diluido 1:10, 1:100 y 1:1000, más el ADN obtenido a partir de cultivo puro, diluido con agua bidestilada estéril (carriles 2, 3, 4) y con T:E (carriles 5, 6, 7) respectivamente y el control positivo con una cepa de *C. jejuni* (carril 8).

Al observar que el producto de la PCR-2 fue igual en el control positivo como en las diluciones de ADN obtenido a partir de heces mezclado con ADN de cultivo puro, tanto en las diluciones realizadas con agua como con T:E se pudo descartar la presencia de inhibidores que interfirieran con la PCR, por lo cual se decidió utilizar nuevamente el ADN diluido a una concentración inicial de 5ng, pero al observar el resultado se pensó nuevamente que el método de extracción de ADN no era el óptimo, debido a que posiblemente no se obtiene ADN de

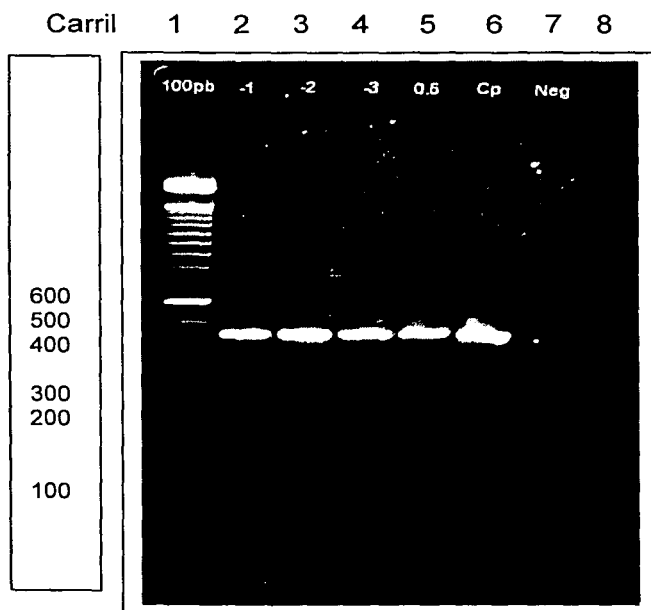
*Campylobacter*, así que se realizó la extracción de ADN de las diluciones sin que estas se inocularan en heces (**Fig. 23**).



**Fig. 23.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde se observa el marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA/HindIII (carril 1), ADN de cultivo puro sin diluir (carril 2), ADN de la dilución 0.5 de McFarland (carril 3), ADN de las diluciones -1 a -5 (carriles 4, 5, 6, 7, 8) respectivamente.

Se observó que en las diluciones -1 a -5 no se obtuvo ADN por lo que se descartó este método y se propuso un segundo método, el cual fue utilizado para la extracción de ADN de cultivos puros de *Campylobacter* y que utiliza tiocianato de guanidina. Al ADN obtenido a partir de heces, se le realizó la PCR-2, sin observar productos de amplificación, por lo que este método se recomienda para extraer ADN de cultivo puro pero no para ADN a partir de heces.

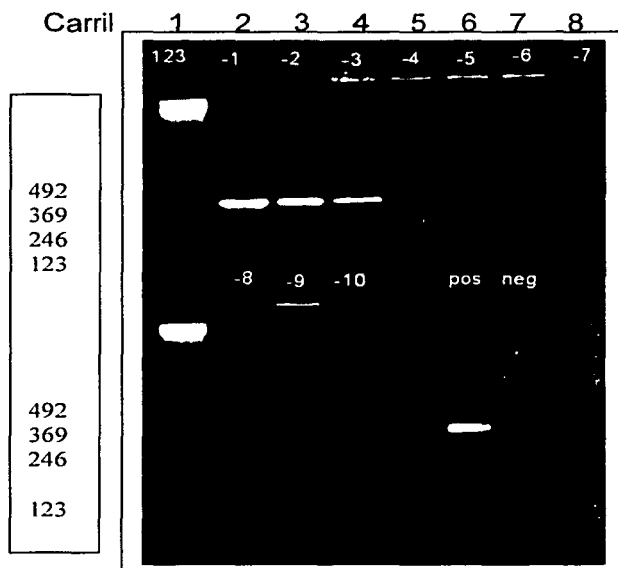
Se utilizó un tercer método para obtener ADN a partir de heces, este fue el método descrito por Boom <sup>(88)</sup> y Lawson <sup>(89)</sup>, el ADN obtenido por este método fue usado para realizar la PCR (Fig. 24).



**Fig. 24.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos de la PCR con ADN obtenido a partir de heces por el método de Boom <sup>(88)</sup> y Lawson <sup>(89)</sup>. Marcador de peso molecular 100 pb (carril 1) y los productos de la PCR-2 del ADN extraído a partir de heces de las diluciones -1 a la -3 (Carriles 2, 3, 4) respectivamente, 0.5 de McFarland (carril 5), cultivo puro (carril 6) y control negativo (carril 7).

Tras realizar la PCR-2 y obtener el producto de amplificación de 450 pb se comprobó que este método era el adecuado para la extracción de ADN. Así mismo, el método comercial QIAamp ADN Stool Mini Kit (QIAGEN), demostró resultados similares (Fig. 25).





**Fig. 25.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio mostrando los productos de amplificación de la PCR-2 con ADN obtenido a partir de heces por el método comercial QIAamp ADN Stool Mini Kit (QIAGEN ), el marcador de peso molecular 123pb (carril 1) y los productos de amplificación de la PCR-2 con ADN extraído a partir de heces de las diluciones  $-1$  a la  $-7$  de McFarland (Carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 panel superior) respectivamente y las diluciones  $-8$  a  $-10$  (carriles 2, 3, 4 panel inferior). Control positivo (carril 6 panel inferior) y control negativo (carril 7 panel inferior).

### 3.7. Comparación de Aislamiento y PCR para *Campylobacter* spp.

Dado que el aislamiento es la prueba mas utilizada para el diagnóstico de *Campylobacter* esta fue utilizada para conocer y comparar la sensibilidad y especificidad en la prueba de PCR, para estas se utilizaron heces de bovino en donde se inocularon diluciones decimales de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  partiendo de una concentración de 0.5 de McFarland<sup>(86)</sup> (que equivale a  $1.5 \times 10^8$  bacterias por ml). Cada muestra de heces (0.5 g) fue inoculada con  $100 \mu\text{l}$  de la dilución correspondiente para posteriormente realizar la extracción de ADN y la PCR,

mientras que para el aislamiento, estas heces se sembraron en agar sangre con suplemento Preston llevando a cabo la identificación a las 48 h mediante la observación de movimiento por microscopía de campo oscuro, tinción de Gram, oxidasa y catalasa.

Al sembrar las diluciones bacterianas en agar sangre con suplemento Preston, en las cuatro repeticiones se observó crecimiento hasta la dilución -6 (con dos repeticiones negativas)(**cuadro 6**), que corresponde a 1,500 bacterias mínimo para que se pueda obtener el cultivo mediante técnicas convencionales.

Al realizar la PCR-2 con estas mismas diluciones se obtuvieron resultados positivos hasta la dilución -8 ( con una repetición negativa)(cuadro 6). Por lo anterior para lograr un resultado por PCR positivo requeriríamos la presencia de 15 bacterias como mínimo para que la muestra pueda ser óptima para diagnóstico.

En las diluciones -9 y -10 no se obtuvieron tampoco resultados positivos por PCR, debido a que las diluciones partieron del 0.5 de McFarland por lo que en la dilución -9 sólo se encontrarían 1.5 bacterias y en la dilución -10 0.15, bacterias las cuales no son detectadas por ninguna de las dos pruebas diagnósticas.

Como control negativo tanto para el aislamiento, como para la PCR-2 se utilizaron las mismas heces de bovino sin inóculo, con las cuales no se obtuvieron resultados positivos, observando para las cuatro repeticiones en las diez diluciones únicamente resultados negativos.

**CUADRO 6.** Resultados de las cuatro repeticiones tanto para el aislamiento como para la PCR.

Dilución	A1	A2	A3	A4	PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 4	No. de microorganismos
-1	+	+	+	+	+	+	+	+	150,000,000
-2	+	+	+	+	+	+	+	+	15,000,000
-3	+	+	+	+	+	+	+	+	1,500,000
-4	+	+	+	+	+	+	+	+	150,000
-5	+	+	+	+	+	+	+	+	15,000
-6	+	-	+	-	+	+	+	+	1500
-7	-	-	-	-	+	+	+	+	150
-8	-	-	-	-	+	+	-	+	15
-9	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5
-10	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15

A = Aislamiento

PCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa

1-2-3-4 = Número de repeticiones para aislamiento

1-2-3-4 = Número de repeticiones para PCR

### **Sensibilidad y Especificidad en el Aislamiento de *Campylobacter* spp.**

Debido a que en la dilución -9 y -10 no se obtuvieron aislamientos, ni resultados positivos por PCR, con los resultados obtenidos se consideró únicamente hasta la dilución  $10^{-8}$  que fue la dilución en donde se encontró el último resultado positivo (Cuadro 7 y 8).

**Cuadro 7. Sensibilidad y Especificidad para el aislamiento bacteriológico**

	<b>Inoculados</b>	<b>No inoculados</b>	<b>Total</b>
<b>Aislamiento +</b>	22	0	<b>22</b>
<b>Aislamiento -</b>	10	32	<b>42</b>
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>64</b>

**Sensibilidad = 22/ 32 = 68 %**

**Especificidad = 32/32 = 100%**

**22/64**

**VPP = Valor Predictivo Positivo =  $\frac{22}{64} = 1$**

**22/64**

**32/64**

**VPP = Valor Predictivo Negativo =  $\frac{32}{64} = 0.76$**

**42/64**

En el cuadro 7 se observan que de las 32 muestras inoculadas se logró sólo el aislamiento en 22 de ellas, por lo que la sensibilidad fue de 68%, y la especificidad del 100%.

**Cuadro 8. Sensibilidad y Especificidad para la PCR.**

	<b>Inoculados</b>	<b>No inoculados</b>	
<b>PCR positivo</b>	31	0	<b>31</b>
<b>PCR negativo</b>	1	32	<b>33</b>
<b>Suma</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>64</b>

**Sensibilidad = 31/32 = 96.8 %**

**Especificidad = 32/32 = 100%**

$$\text{VPP} = \text{Valor Predictivo Positivo} = \frac{31/64}{32/64} = 0.96$$

$$\text{VPP} = \text{Valor Predictivo Negativo} = \frac{32/64}{33/64} = 0.96$$

En el cuadro 8 se observa que de 32 muestras inoculadas se obtuvieron 31 productos de amplificación en la PCR con el ADN obtenido a partir de estas, con un solo resultado negativo, por lo cual la sensibilidad y la especificidad obtenidas fue de 96.8 y 100% respectivamente.

### **3.8. Evaluación de la técnica de PCR en muestras clínicas de rumiantes.**

A las once muestras de las hembras (heces) y las diez de machos (SLP) se les realizó preparaciones húmedas para ver movimiento obteniendo los siguientes resultados (**Cuadro 9**):

**Cuadro 9.** Resultados de la microscopía de campo oscuro en heces y solución de lavados prepuciales (SLP).

<b>No. de muestra</b>	<b>Campo oscuro heces (hembras)</b>	<b>Campo oscuro de solución de lavados prepuciales (machos)</b>
1	Negativo	Negativo
2	Negativo	Positivo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Positivo
5	Negativo	Positivo
6	Negativo	Negativo
7	Negativo	Positivo
8	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo
11	Negativo	-

Negativo = Sin formas similares a *Campylobacter* spp ni movimiento característico.

Positivo = Con formas similares a *Campylobacter* spp y movimiento característico.

Después de 48 h a diferentes temperaturas no se obtuvo crecimiento de *Campylobacter* por lo tanto las cajas se incubaron 72 h más encontrando que solo tres cultivos provenientes de SLP fueron sospechosos de *Campylobacter* (**Cuadro 10**).

**Cuadro 10.** Resultados del primoaislamiento a partir de heces y solución de lavados prepuciales.

No. de muestra	Cultivos heces (hembras)	Cultivos de solución de lavados prepuciales (machos)
1	Negativo	Negativo
2	Negativo	Sospechoso
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Sospechoso
5	Negativo	Sospechoso
6	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo
11	Negativo	-

Negativo = Sin crecimiento a los 5 días.

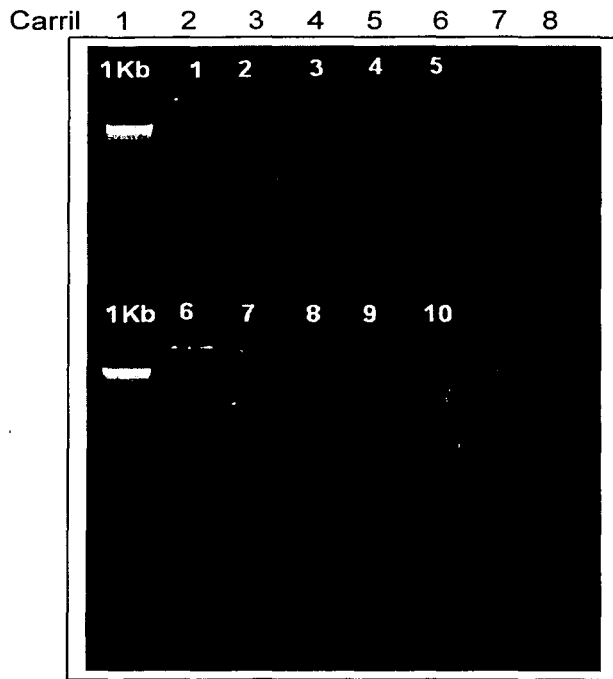
Sospechoso = Con crecimiento (colonias características de *Campylobacter*)

Los resultados negativos de las hembras se pueden atribuir al tiempo que demoraron las muestras en ser procesadas, esto debido a que el tiempo de transporte requerido es de dos horas para un aislamiento exitoso, mientras que en este caso, el tiempo fue de cuatro horas.

Los cultivos sospechosos de los machos se revisaron nuevamente por microscopía de campo obscuro sin observar movimiento característico o formas similares a *Campylobacter*, sin embargo, se resembraron en agar sangre con suplemento Preston y se incubaron durante 48 h. Una vez transcurrido este tiempo

(48h) no se observaron bacterias Gram negativas con formas similares a *Campylobacter* sino únicamente bacterias Gram positivas, por lo que finalmente estas muestras fueron diagnosticadas como negativas por aislamiento.

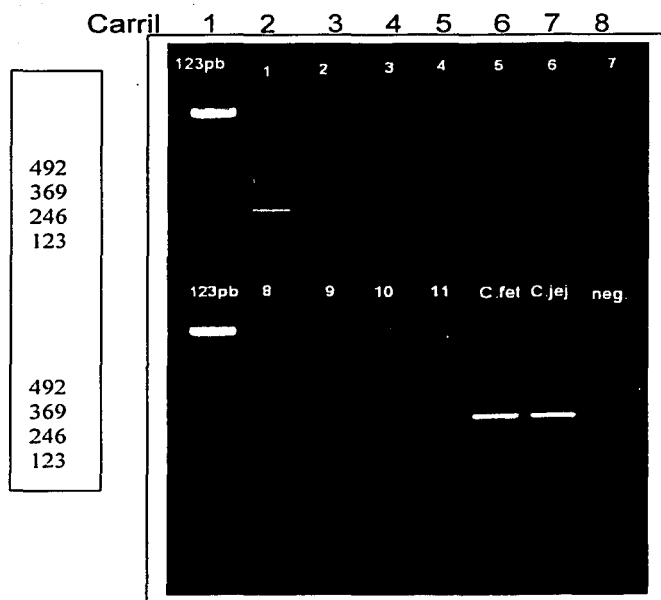
Las once muestras de las hembras (heces) fueron procesadas para realizar la PCR-1, a estas muestras se les extrajo ADN por el método de Boom<sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson<sup>(89)</sup> (Fig. 26).



**Fig. 26.** Gel de agarosa al 1% en donde se observa el ADN obtenido a partir de heces por el método de Boom<sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson<sup>(89)</sup>. Marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder (carril 1 panel superior e inferior), muestras de 1 a 5 (carriles 2, 3, 4, 5, 6 panel superior), muestras 6 a 10 (carriles 2, 3, 4, 5, 6 panel inferior).

Después de obtener el ADN de heces de ovino se realizó la PCR-1 específica para *C. fetus* (Fig. 27).

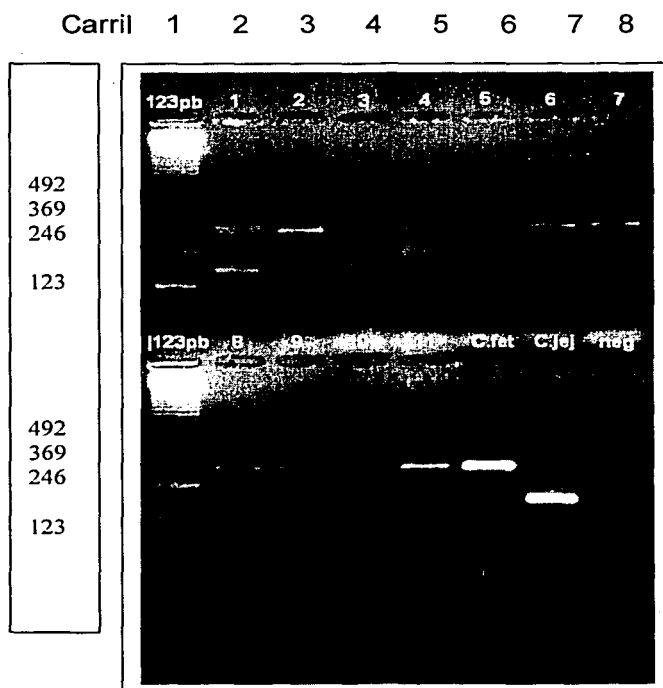




**Fig. 27.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en donde se muestra el marcador de peso molecular 123 pb (carril 1), muestras 1 a 7 (carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 panel superior), muestras 8 a 11 (carriles 2, 3, 4, 5 panel inferior), control positivo *C. fetus* (carril 6 panel inferior), control positivo *C. jejuni* (carril 7 panel inferior) y control negativo (carril 8 panel inferior).

En la figura 27 se puede observar que en los carriles 2, 3, 5, 6, 7, 8 superior y 2, 3, 4, 5 inferior hay un producto de amplificación de 362 pb correspondiente al producto que se espera para la PCR-1 específico para *C. fetus*, *C. jejuni* y *C. coli*.

Debido a que la PCR-1 puede diferenciar *C. fetus* de *C. jejuni* y *C. coli* se realizó la digestión con la enzima de restricción *AluI* para observar el tamaño de los fragmentos obtenidos después del corte y así verificar la especie (**Fig. 28**).

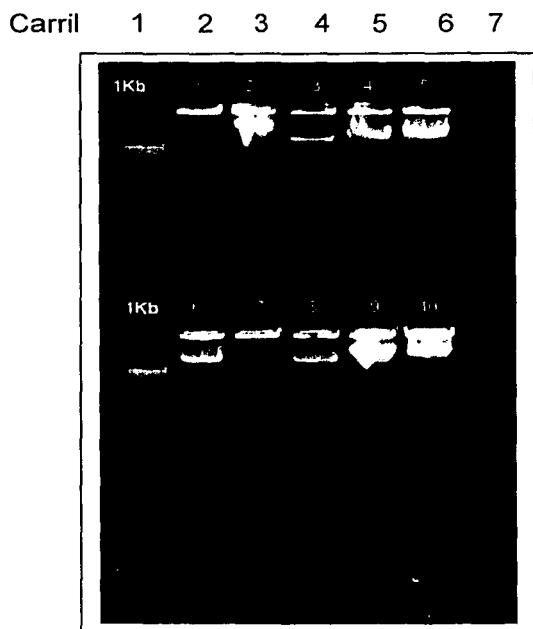


**Fig. 28.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en donde se muestra el marcador de peso molecular 123 pb (carril 1), muestras 1 a 7 (carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 panel superior), muestras 8 a 11 (carriles 2, 3, 4, 5 panel inferior), control positivo *C. fetus* (carril 6 panel inferior), control positivo *C. jejuni* (carril 7 panel inferior) y control negativo (carril 8 panel inferior).

En la figura 28 se puede observar cada fragmento obtenido de los productos de amplificación de la PCR-1 en los diferentes controles positivos, siendo para *C. fetus* (carril 6 inferior) de 330 pb y 30 pb, mientras que para *C. jejuni* (carril 7 inferior) es de 169 pb, 163 pb (se aprecian como una sola banda) y 30 pb, con lo cual comprobamos que las muestras procesadas presentan *C. fetus*. En el carril número dos se observan las bandas correspondientes a ambas especies de *Campylobacter* (*C. fetus* y *C. coli*).

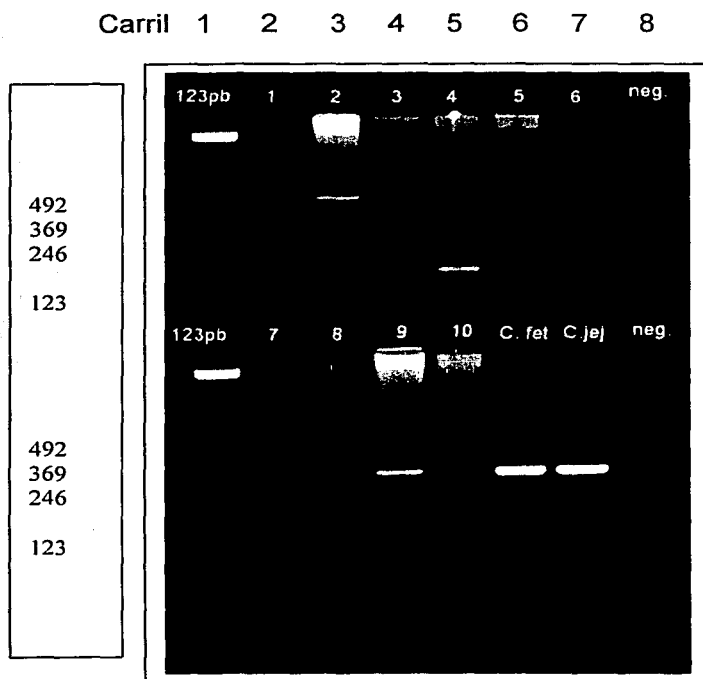
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las diez muestras de los machos (lavados prepuciales) fueron procesadas para realizar la PCR, a estas muestras se les extrajo ADN por el método de Tiocianato de guanidina <sup>(84)</sup> (Fig. 29).



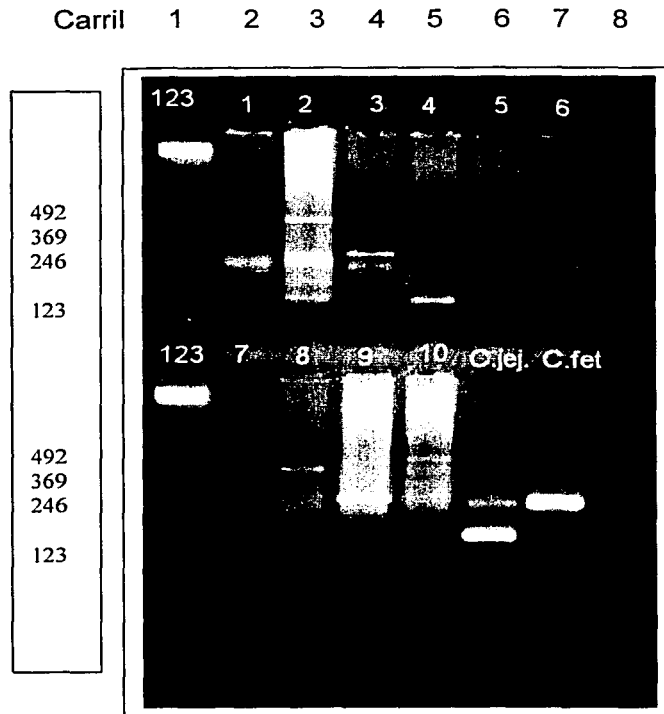
**Fig. 29.** Gel de agarosa al 1% en donde se observa el ADN obtenido a partir de lavados prepuciales por el método de tiocianato de guanidina <sup>(84)</sup> el marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder(carril 1), muestras de 1 a 5 (carriles 2, 3, 4, 5, 6 panel superior), muestras 6 a 10 (carriles 2, 3, 4, 5, 6 panel inferior).

Después de obtener el ADN se realizó la PCR-1 específica para *C. fetus*, *C. jejuni* y *C. coli* (Fig. 30).



**Fig. 30.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en donde se muestra los productos de amplificación de la PCR-1. Marcador de peso molecular 123 pb (carril 1), muestras 1 a 6 (carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 panel superior), muestras 7 a 10 (carriles 2, 3, 4, 5 panel inferior), control positivo *C. fetus* (carril 6 panel inferior), control positivo *C. jejuni* (carril 7 panel inferior) y control negativo (carril 8 panel inferior).

De las 10 muestras analizadas se observó que todas presentaban un producto de amplificación de 362 pb que es específico para *C. fetus*, *C. jejuni* y *C. coli*, posteriormente se realizó la digestión con la enzima *AluI* para verificar estos resultados (**Fig. 31**).



**Fig. 31.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en donde se muestra el marcador de peso molecular 123 pb (carril 1), muestras 1 a 6 (carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 panel superior), muestras 7 a 10 (carriles 2, 3, 4, 5 panel inferior), control positivo *C. fetus* (carril 6 panel inferior), control positivo *C. jejuni* (carril 7 panel inferior) y control negativo (carril 8 panel inferior).

En la figura 31 se puede observar cada fragmento que se obtiene de los productos de amplificación de la PCR-1 en los diferentes controles positivos, siendo para *C. fetus* (carril 6 inferior) de 330 pb y 30 pb, mientras que para *C. jejuni* (carril 7 superior) es de 169 pb, 163 pb (se aprecian como una sola banda) y 30 pb, con lo cual comprobamos que en las muestras procesadas se encontraba presente *C. fetus* que aunado a la historia clínica se sugiere como posible patógeno a *C. fetus* subsp. *fetus*.

Al analizar estos resultados observamos que en este rancho si se encontraban animales positivos a *Campylobacter fetus*.

Posteriormente se analizaron 80 muestras de heces de hembras y 10 muestras de solución de lavados prepuciales de machos. De las primeras se obtuvieron 49 muestras positivas y 31 muestras negativas, mientras que de las segundas se obtuvieron cinco muestras positivas y cinco muestras negativas.

Con estos resultados se verificó que la PCR-1 es capaz de detectar *C. fetus* en animales sospechosos por lo que se recomienda esta prueba para el diagnóstico de rutina en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ de la UNAM en cualquier muestra clínica de la cual el diagnóstico presuntivo sea *Campylobacter* spp.

#### 4. Discusión.

El aislamiento de *Campylobacter* es un procedimiento particularmente complicado ya que la muestra a analizar debe contener un mínimo de 1,500 microorganismos viables, requiriendo el uso de medios selectivos con antibióticos y largos tiempos de incubación, de tal forma que el diagnóstico definitivo se obtiene en no menos de cinco días. En este trabajo presentamos la estandarización de una técnica molecular alternativa, PCR, la cual no presenta las complicaciones descritas para el aislamiento bacteriológico.

Esta prueba es altamente sensible pues solo se requieren 15 microorganismos en la muestra y no necesariamente viables. En lo concerniente al tiempo, éste se redujo a 24 h, lo que reduce el lapso para emitir el resultado del diagnóstico cuatro días en comparación con el aislamiento bacteriológico.

El costo de la PCR es similar al del diagnóstico bacteriológico, debido a que en éste se utilizan medios selectivos.

La PCR ya ha sido utilizada para diagnosticar diversas enfermedades mostrando una alta sensibilidad y especificidad. Los oligonucleótidos reportados por Oyoyo *et al.*,<sup>(67)</sup> utilizados en este trabajo, detectaron únicamente *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Estos oligonucleótidos se diseñaron a partir de la secuencia de los genes *flaA* y *flaB* de la proteína flagelar que presenta un alto grado de homología entre ciertas regiones de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, *Salmonella* y *Klebsiella*.

Esta PCR-2 no amplifica a partir de ninguna otra especie del género *Campylobacter* (*C. fetus* subs. *verrealis*, subsp. *fetus* y subs. *intermedius*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. hyointestinalis*, *C. sputorum*, *C. upsaliensis*, *C. consisus*, *C. showae*, *C. gracilis*, *C. curvus*, *C. rectus* y *C. cryaerophila*) ni de la familia *Enterobacteriaceae* (*Salmonella* y *Escherichia coli*), aunque detecta, en menor grado, a *Helicobacter pylori* lo cual no fue previamente reportado por Oyoyo *et al.*,<sup>(67)</sup>. La amplificación de *H. pylori*, no interfiere con el diagnóstico de *Campylobacter*, como se discutirá más adelante, , sin embargo, representa una evidencia de que estas dos bacterias presentan una secuencia similar en el fragmento de los genes (*flaA* y *flaB*) que amplifica, lo cual es comprensible ya que anteriormente *H. pylori* estaba clasificado dentro del género *Campylobacter* spp., lo cual sugiere una alta similitud en varios de sus genes. Aunque la diferenciación de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* no fue posible en este estudio, esto se puede lograr utilizando un segundo grupo de iniciadores basados en la secuencia del gene *hipO*, con lo cual se tendría una prueba diagnóstica altamente sensible y aún mas específica, capaz de diferenciar a estos dos microorganismos a partir de diferentes muestras clínicas.

Con los oligonucleótidos utilizados para *C. fetus*, descritos previamente por Eaglesome D M *et al.*,<sup>(82)</sup> se detectó *C. fetus* subsp. *venerealis*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. jejuni* y *C. coli*. Estos oligonucleótidos en el ensayo realizado por Eaglesome D M *et al.*,<sup>(82)</sup> no detectaron cepas saprofitas del aparato reproductor de animales, principalmente bovinos (prepuccio), como lo son *C. concisus*, *C. sputorum* y *Campylobacter sputorum* biovar *bubulus*, garantizando así la detección



de la especie causante de enfermedad, lo cual fue comprobado en nuestro estudio por medio de muestras de SLP de ovinos las cuales mostraron el producto de amplificación específico mediante la PCR-1 y por la microscopía de campo obscuro con la cual fueron sospechosas a *Campylobacter spp*, confirmando lo descrito por Eaglesome D M et al.,<sup>(82)</sup>.

En el ensayo reportado por Eaglesome D M et al.,<sup>(82)</sup> no se utilizó como un control negativo *Helicobacter pylori*, mientras que en nuestro ensayo sí, obteniendo dos productos de amplificación, uno de 362 pb y otro menor de 100 pb. Al realizar la digestión de estos productos se obtuvieron tres fragmentos como en el caso de *C. jejuni* y *C. coli*, esto no podría considerarse una interferencia en el diagnóstico, ya que en la amplificación, como ya se mencionó, se obtienen dos productos de amplificación y no uno solo como en el caso de *C. jejuni* y *C. coli*, descartando la posibilidad de falsos positivos debido a *H. pylori*.

Aunque las técnicas moleculares son altamente sensibles y específicas, no se pueden realizar pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos como con el aislamiento por lo cual el clínico tendrá que aplicar los antimicrobianos de elección recomendados en la literatura, siendo esta una de las desventajas que presentan este tipo de pruebas. Sin embargo, esto no representa problema alguno en el caso de *Campylobacter*, ya que no hay tratamiento específico para cada especie.

En los ensayos realizados con ADN obtenido de cultivos puros las concentraciones mínimas detectadas fueron de 100 fg para *C. jejuni* y *C. coli* lo que equivale a 6.4 bacterias, siendo superior a lo reportado por Oyoyo et al.<sup>(67)</sup> de 0.0062 pg para ambas cepas, equivalente a 4 bacterias. La explicación de dicha

diferencia, puede deberse a la enzima *Taq* utilizada, ya que diversos reportes se menciona la existencia de enzimas con diferentes eficiencias. Para *C. fetus*, la concentración mínima fue 10 fg (4 bacterias), mientras que Eaglesome D M et al.,<sup>(82)</sup> detectaron 500 fg lo cual equivale a 40 bacterias, en este caso la diferencia en la sensibilidad puede deberse a que en sus ensayos Eaglesome D M et al.,<sup>(82)</sup> realiza un procedimiento en el cual el ADN es sometido a temperaturas elevadas, en nuestra experiencia dicha acción provoca que el ADN se degrade alterando la eficiencia en la PCR.

Una parte importante en este trabajo fue la evaluación de métodos de extracción de ADN a partir de heces inoculadas con bacterias. De los métodos evaluados el de Boom<sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson<sup>(89)</sup>, fue el más eficiente logrando la amplificación de los productos esperados, con una sensibilidad mayor que en el aislamiento bacteriológico, como se discutirá adelante. Esta metodología aunque es eficiente presenta el problema de ser un procedimiento largo, para lo cual una alternativa para disminuir el tiempo fue el método comercial que utiliza una columna, con lo cual la extracción se reduce a 2 horas. Las otras metodologías no son recomendables debido a que el tiempo es como mínimo un día y el ADN obtenido se degrada mas fácilmente alterando la eficiencia del diagnóstico por PCR.

Como se aprecia en los resultados de las muestras de heces previamente inoculadas, la sensibilidad obtenida con la técnica de PCR (96.8 %) fue mayor al aislamiento bacteriológico (68%), y como ya se mencionó, el aislamiento requiere de organismos viables en gran cantidad, mientras que con las técnicas

moleculares no es necesario, lo cual hace a la PCR mas eficiente. Aunque el aislamiento es 100% específico, es poco sensible, debido a que si en la muestra se encuentran pocos microorganismos, el aislamiento es difícil dando como resultado un diagnóstico negativo, aunque posiblemente si se encuentre el microorganismo pero en una cantidad no detectada por aislamiento, en contraste, la PCR detecta una concentración menor de microorganismos con lo cual podemos tener mayor certeza de que si la prueba es positiva el resultado va tener un mínimo grado de error.

Por otra parte, los ensayos de aislamiento bacteriológico con los dos medios probados (BU7 y Preston) con las cepas utilizadas, mostraron que existe una diferencia notable en la sensibilidad a los antibióticos comúnmente utilizados, por esta razón se debe considerar la combinación de medios para el aislamiento bacteriológico evitando así la emisión de resultados falsos negativos, de ahí que en la literatura se recomiende el uso de al menos dos medios para el aislamiento bacteriológico.

Finalmente, se evaluó el costo de los reactivos utilizados en los métodos de extracción de ADN a partir de heces, comparando el método de Boom <sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson <sup>(89)</sup> contra el método comercial que utiliza una columna. En el primero, el costo de la extracción de ADN es de aproximadamente \$13.90 mientras que en el segundo, el costo fue de \$ 39.70. Si se considera el método comercial, el tiempo disminuye 24 h aunque los costos de la prueba se elevan, aumentando así el monto total si la PCR se usara como diagnóstico de rutina, mientras que el método de Boom <sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson <sup>(89)</sup> disminuiría el costo aunque aumentaría el tiempo de trabajo requerido 24 h. De tal modo que

tratándose de una bacteria tan complicada en su aislamiento como lo es *Campylobacter*, el costo del método comercial sería justificado, ya que la rapidez y la sensibilidad de esta prueba, permite emitir un diagnóstico confiable en corto tiempo con lo cual el clínico o el productor estarían en condiciones de aplicar un tratamiento convencional al inicio de la infección. Esto debido a que la prueba no se lleva mas de 24 h desde que se recibe la muestra hasta que se emite el resultado, comparándolo con el tiempo utilizado para el diagnóstico bacteriológico de 96 h.

En las muestras de heces y SLP de ovinos utilizadas para comparar el aislamiento bacteriológico y la PCR, se observó que en 20 de las 21 muestras se obtuvo un producto de amplificación, en contraste, no se logró ningún aislamiento bacteriológico. Esto puede deberse principalmente a las características restrictivas requeridas en el manejo de la muestra para el aislamiento bacteriológico, mientras para la PCR no se requiere de este manejo, ya que no es necesario mantener viable a *Campylobacter* para esta prueba.

Por todo lo anterior, el desarrollo e implementación de estas herramientas biotecnológicas repercute en la economía de los usuarios del diagnóstico, lo cual nos permite sugerir de manera muy contundente que estas metodologías se implementen en los laboratorios de diagnóstico.

## 5. Conclusiones.

1. El método recomendado de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo para la extracción de ADN a partir de cultivos puros para *Campylobacter* es el de Pitcher *et al.*,<sup>(84)</sup>.
2. Los iniciadores utilizados para la PCR-1 detectaron *C. fetus* en heces y SLP en todos los animales clínicamente enfermos.
3. Los iniciadores utilizados para la PCR-2 resultaron con una sensibilidad de 96.8% y una especificidad del 100%, por lo cual pueden utilizarse para el diagnóstico de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* a partir de muestras clínicas de cualquier especie animal o subproductos de origen animal.
4. De los métodos de extracción de ADN utilizados a partir de heces, el método recomendado en relación al tiempo es el comercial QIAamp ADN Stool Mini Kit (QIAGEN), mientras que el de menor costo es el método de Boom<sup>(88)</sup> con modificaciones de Lawson<sup>(89)</sup>.
5. La técnica de PCR estandarizada en este trabajo es una herramienta más para el diagnóstico de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. fetus*, aunado a el aislamiento bacteriológico.

## LITERATURA CITADA.

1. Nachamkin I and Skirrow. *Campylobacter, Arcobacter and Helicobacter*. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. *Microbiology and Microbial Infections. Systematic Bacteriology*. Ninth edition. London Great Britain: Arnold, 1998:1237-1246.
2. Gyles LC, Thoen OC. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Second edition. United States of America: IOWA State University Press/Ames, 1993.
3. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology*. London, England: Wolfe, 1994.
4. Cowan ST. *Identification of Medical Bacteria*. Second edition. Great Britain: Cambridge University Press, 1974.
5. Prescott JF. *Campylobacter*. In: Carter GR. *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*. Fourth edition. Illinois, U. S. A: Springfield, 1984: 59-70
6. Krieg RN, Holt GJ, Murray GE, Chaiman, Brenner JD, Bryant PM, Moulder WJ, Pfenning N, Sneath AHP, Staley TJ. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, London: Williams and Wilkins, 1984. Volumen 1.
7. Joklik KW, Phil D, Willett PH, Amos BD, Wilfert MC. *Zinsser Microbiology*. 20<sup>th</sup> edition. Norwalk Connecticut: Appleton and Lange, 1992.
8. Cottral GE. *Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology*. Cornell University Press, 1978.

9. Murray RP, Baron E, Tenover CF, Tenover CF, Tenover CF, Yolken HR. Manual of Clinical Microbiology. Six edition. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 1998.
10. Lennette EH, Balows A, Husler WJ, Shadomy JH. Manual of Clinical Microbiology. Fourth edition. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 1985.
11. Altekruze SF, Stern JN, Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni*- An emerging foodborne pathogen. Emerg. Infect. Dis. 1999; 5:28-35.
12. Mims AC, Playfair HLJ, Roitt MI, Wakelin D, Williams R. Med. Microbiol. Ed. Mosby: Hong Kong, 1995.
13. Anderson NV, sharding RG, Merritt AM, Whitlock RH. Veterinary Gastroenterology. Second edition. Lea and Febiger. USA, Philadelphia, 1992.
14. Nachamkin I, Bohachick K, Patton M.C. Flagellin Gene Typing of *Campylobacter jejuni* by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 1531-1536.
15. Nachamkin I and Blaser MJ. *Campylobacter*. Second edition. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 2000.
16. Ketley JM. Virulence of *Campylobacter* species: a molecular genetic approach. J. Med. Microbiol. 1995; 42: 312-327.
17. Eleazer TH. *Campylobacter* can be egg transmitted. Poultry Digest 2000; 59, 2: 4.
18. Popovic-Uroic T, Patton CM, Nicholson MA, Kiehlbauch JA. Evaluation of Indoxil Acetato Hydrolysis Test for rapid differentiation of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* species. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2335-2339.

19. Ang CW, Klerk MA, Endtz HP, Jacobs BC, Laman JD, Meché FG, Doorn PA. Guillain-Barré Syndrome and Miller Fisher Syndrome associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti- GM1 and anti- GQ1b antibodies in rabbits. *Infect. Immun.* 2001; 69: 2462-2469.
20. Hindiyeh M, Jense S, Hohmann S, Benett H, Edwards C, Aldeen W, Croft A, Daly J, Mottice S, Carroll KC. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in Stool specimens by an Enzyme Immunoassay and surveillance for *Campylobacter upsaliensis* in the Greater Salt lake City area. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 3076-3079.
21. Sáenz Y, Zarazaga M, Lantero M, Gastañares MJ, Baquero F, Torres Carmen. Antibiotic Resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2000, 44: 267-271.
22. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smid P, Nachamkins I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 2001, 7.
23. Walker RI, Caldwell BM, Lee CE, Guerry P, Trust JT, Ruiz-Palacios GM. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol. Rev.* 1986; 50: 81-94.
24. Lee A, O'Rourke JL, Barrington PJ, Trust TJ. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infect. Immun.* 1986; 51: 536-546



25. Schoeni JL, Doyle MP. Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti-*C. jejuni* metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 1992; 58: 664-670.
26. De Mélo MA, Gabbiani G, Péchere JC. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEP-2 cells. Infect. Immun. 1989. 57: 5214-2222.
27. Caldwell MB, Guerry P, Lee EC, Burans JP, Walker IR. Reversible expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 1985. 50: 941-943.
28. Wassenaar TM. Toxin Production by *Campylobacter* spp. Clinical Microbiol. Rev. 1997. 10: 466-476.
29. Ruiz-Palacios GM, Torres J, Torres E, Escamilla B, Ruiz-Palacios R, Tamayo J. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Lancet 1983. ii: 250-253.
30. Gossens HJ, Butzler P, Takada Y. Demonstration of Cholera-like enterotoxin production by *Campylobacter jejuni*. FEMS Microbiol. Lett. 1985. 29: 73-76
31. Johnson WM, Lior H. Toxins produced by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Lancet 1984. i: 229-230.
32. Klipstein FA, Engert RF. Properties of crude *Campylobacter jejuni* heat-labile enterotoxin. Infect. Immun. 1984. 45: 314-319.
33. Mathan VI, Rajan DP, Klipstein FA, Engert RF. Enterotoxigenic *Campylobacter jejuni* among children in South India. Lancet 1984. ii: 981.
34. McCardell BA, Madden JM, Lee EC. Production of cholera-like toxin by *Campylobacter jejuni/coli*. Lancet 1984. i: 448-449.

35. Ruiz-Palacios GM, Lopez-Vidal Y, Torres J, Torres N. Serum antibodies heat-labile enterotoxin of *Campylobacter jejuni*. J. Infect. Dis. 1985. 152: 413-416.
36. Pang T, Wong PY, Puthucheary, Sihotang K, Chang WK. *In vivo* and *in vitro* studies of cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. J. Med. Microbiol. 1987. 23: 193-198.
37. Goosens, H, Rummens E, Cadranel S, Butzler JP, Takeda Y. Cytotoxic activity on Chinese hamster ovary cells in culture filtrates of *Campylobacter jejuni/coli*. Lancet 1985. ii: 511
38. Johanson WM, Lior H. Cytotoxic and cytotoxic factors produced by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lariidis*. J. Clin. Microbiol. 1986. 24: 275-281.
39. McCardell BA, Madden JM, Stanfield JT. Production citotoxins by *Campylobacter*. Lancet 1986. i: 1031.
40. Florin I, Antillon F. Production of enterotoxin and citotoxin in *Campylobacter jejuni* strains isolated in Costa Rica. J. Med. Microbiol. 1992. 37: 22-29.
41. Klipstein FA, Engert RF, Short H, Schenk EA. Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: assay and correlation with clinical manifestations. Infect. Immun. 50: 43-49.
42. Johanson WM, Lior H. A new heat-labile cytholetal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. Microb. Pathog. 1988. 4: 115-126.
43. Moore MA, Blaser MJ, Perez-Perez GI, O'Brien AD. Production of shiga-like cytotoxin by *Campylobacter*. Microb. Pathog. 1988. 4: 455-462.

44. Arimi SM, Park RWA, Fricker CR. Study of haemolytic activity of some *Campylobacter* spp. on blood agar plates. J. Appl. Bacteriol. 1990. 69: 384-389.
45. Kita E, Odu D, Hammuro A, Nishikawa F, Emoto M, Yagyu Y, Katsui N, Kashiba S. Hepatotoxic activity of *Campylobacter jejuni*. J. Med. Microbiol. 1984. 33: 171-1183.
46. Kita E, Nishikawa F, Kamikaidou N, Nakano A, Katsui N, Kashiba S. Mononuclear cell response in the liver of mice infected with hepatotoxigenic *Campylobacter jejuni*. J. Med. Microbiol. 1992. 37: 326- 331.
47. McFarland BA, Neill SD. Profiles of toxin production by thermophilic *Campylobacter* of animal origin. Vet. Microbiol. 1992. 30: 257-266.
48. Patton CM, Wachsmuth IK, Evins GM, Kiehlbauch JA, Plikaytis BD, Troup N, Tompkins L, Lior H. Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated *Campylobacter* strains. J. Clin. Microbiol. 1991. 29: 680-688.
49. Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J. Clin. Microbiol. 1982; 15: 761-768.
50. Gibson JR, Owen RJ. *Campylobacter* infections. Species identification and typing. Meth. Mol. Med. 1998; 23: 584-598.
51. OIE. Manual de normas – Enfermedades de la lista B. 3.2.2.. *Campylobacteriosis* genital bovina.
52. Suárez GF. Diagnóstico de la Vibriosis Genital de los Bovinos en México, mediante la Técnica de Anticuerpos Fluorescentes (Tesis de Licenciatura). México, D:F: UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1975.

53. Ismail TF, Wasfy MO, Oyofa BA, Mansour MM, El-Berry MH, Churilla AM, Eldin SS, Perusky LF. Evaluation of antibodies reactive with *Campylobacter jejuni* in Egyptian diarrhea patients. Clin. Diagn. Lab. Immun. 1997;4: 536-539.
54. Rice BE, Lamichhane C, Joseph SW, Rollins DM. Development of a rapid and specific colony-lift immunoassay for detection and enumeration of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C.lari*. Clin. Diagn. Lab. Immun. 1996; 3: 669-677.
55. Hindiyeh M, Jense S, Hohmann S, Benett H, Edwards C, Aldeen W, Croft A, Daly J, Mottice S, Carroll KC. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in Stool specimens by an Enzyme Immunoassay and surveillance for *Campylobacter upsaliensis* in the Greater Salt lake City area. J. Clin. Microbiol. 2000, 38: 3076-3079.
56. Hoorfar J, Nielsen EM, Stryhn H, Andersen S. Evaluation of two automated enzyme-immunoassays for detection of thermophilic campylobacters in fecal samples from cattle and swine. J. Microbiol. Meth. 1999, 38: 101-106.
57. Coll M. J. Técnicas de Diagnóstico en Virología. Madrid, España, 1993.
58. Waegel A, Nachamkin I. Detection and molecular typing of *Campylobacter jejuni* in fecal samples by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 1996; 10: 75-80.
59. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press , St. Diego, California, USA, 1990.
60. Monteros ELE. Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) en el Diagnóstico Clínico. Revisión del uso de la Técnica. Rev. Lat-Amer. Microbiol 1993; 35:225-230.

61. Stanley RM, Stewart VJ, Taylor RK. Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria a Laboratory Manual. CSHL Press, New York, 1996.
62. Old RW and Primrose SB. Principles of Gene Manipulation. Fifth edition. Blackwell Science, Australia, 1994.
63. Ausebel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Strul K. Current Protocols in Molecular Biology. Supplement 26, John Wiley and Sons, USA, 1994.
64. Alcamo EI. DNA Technology. The Awesome Skill. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, San Diego, California, 2001.
65. Smith CA and Wood EJ. Biología Molecular y Biotecnología. Addison Wesley Logman Iberoamericana, México, 1998.
66. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
67. Oyoyo BA, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR, Guerry P. Specific Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2613-2619.
68. Fermér C, Engvall EO. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic *Campylobacters*, *Campylobacter jejuni* , *C. coli* , *C. lari* and *C. upsaliensis*. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 3370-3373.
69. Metherell LA, Logan JMJ, Stanley J. PCR- Linked immunosorbent assay for detection and identification of *Campylobacter* species: application to isolates and stool samples. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 433- 435.

70. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 2568-2572.
71. Steinbrueckner B, Haerter G, Pelz K, Kist M. Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples. FEMS Microbiol. Lett. 1999; 179: 227-232.
72. Nishimura M, Nukina M, Yuan JM, Shen BQ, Ma JJ, Ohta M, Saida T, Uchiyama T. PCR – based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheic patients in China and Japan. FEMS Microbiol. Lett. 1996; 142: 133-138.
73. Stonnet V, Guesdon JL. *Campylobacter jejuni*: specific oligonucleotides and DNA probes for use in polymerase chain reaction-based diagnosis. FEMS Immun. Med. Microbiol. 1993;7: 337-344.
74. Giesendorf JAB, Belkum VA, Koeken A, Stegeman H, Henkens CHM, Plas DVJ, Goossens H, Niesters M G H, Quit V G W. Development of Species-Specific DNA Probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by Polymerase Chain Reaction Fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 1541-1546.
75. Eyers M, Chapelle S, Camp VG, Goossens H, Wachter DR. Discrimination among Thermophilic *Campylobacter* Species by Polymerase Chain Reaction Amplification of 23S rRNA Gene Fragments. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 3340-3343.

76. Wegmuller B, Luthy J, Candrian U. Direct chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 2161-2165.
77. Waage AS, Vardund T, Lund V, Kapperud. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 1636-1643.
78. Zheng-Chao T, Dewhirst FE, Blaser MJ. Evidence that the *Campylobacter fetus* sap Locus is an ancient genomic constituent with origins before mammals and reptiles diverged. *Infect. Immun.* 2001; 69: 2237-2244
79. Misawa N, Shinohara S, Satoh H, Itoh H, Shinohara K, Shimomura K, Kondo F, Itoh K. Isolation of *Campylobacter* species from zoo animals and polymerase chain reaction-based random amplified polymorphism DNA analysis. *Vet. Microbiol.* 2000; 71: 59-68.
80. Wang H, Farber JM, Malik N, Sanders G. Improved PCR detection of *Campylobacter jejuni* from chicken rinses by a simple sample preparation procedure. *Int. J. Food Microbiol.* 1999; 52: 39-45.
81. Giesendorf BAJ, Quit W GV, Henkens MHC, Stegeman H, Huf F A, Niesters GM. Rapid and Sensitive Detection of *Campylobacter spp.* in Chicken Products by Using the Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; 58: 3804 – 3808.
82. Eaglesome MD, Sampath MI, Garcia MM. A detection assay for *Campylobacter fetus* in Bovine semen by Restriction Analysis of PCR amplified DNA. *Vet. Res. Commun.* 1995; 19: 253-263.

83. Oyarzabal OA, Wesley IV, Harmon KM, Schroeder-Tucker L, Barbaree JM, Lauerman LH, Backert S, Conner DE. Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. *Vet. Microbiol.* 1997; 58:61-71.
84. Pitcher DG, Saunders NA and Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with Guanidinium Thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 1989; 8: 151-156.
85. Bustamante VH, Puente JL, López SF, Bobadilla M, Calva E. Identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using the *rpo B* gene and cryptic DNA fragment from *C. jejuni* . *Gene* 1995; 165: 1-8.
86. Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenber HD, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. American Society for Microbiology Press, 1991.
87. Gumerlock HP, Tang JY, Silva JJr. PCR Detection of Toxigenic *Clostridium Difficile* in Persing H D, Smith FT, Tenover C F, White J T. *Diagnostic Molecular Microbiology*. American Society for Microbiology. United States, 1993.
88. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Noordaa JVD. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 495-503.
89. Lawson AJ, Linton D, Stanley J, Owen RJ. Polimerase chain reaction detection and speciation of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* in human faeces and comparison with culture techniques. *J. Appl. Microbiol.* 1997; 83: 375-380.



90. Young CC, Burghoff RL, Keim LG, Minak-Bernero V, Lute JR, Hinton SM. Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 1972-1974.
91. Grogono-Thomas R, Dworkin J, Blaser MJ, Newell DG. Roles of the Surface Layer Proteins of *Campylobacter fetus* subs. *fetus* in ovine abortion. *Infect. Immun.* 2000; 1687-1691.