



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN  
MOLECULAR DE *CAMPYLOBACTER FETUS* EN TOROS  
REPRODUCTORES

Autora

Cynthia Carolina Tovar Arias

Año  
2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN  
MOLECULAR DE *CAMPYLOBACTER FETUS* EN TOROS  
REPRODUCTORES

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía  
PhD. Alina Aguirre Quevedo

Autora  
Cynthia Carolina Tovar Arias

Año  
2017

### **DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Alina Aguirre Quevedo  
Doctora en Ciencias Biológicas  
C.I: 1756594600

## **DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR**

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

---

María Gabriela Granja Bastidas

Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina: Especialidad en  
Patología Molecular.

CI: 1712995149

## **DECLARACION DEL DIRECTOR CIENTIFICO**

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.”

---

Maritza Barrera Valle  
Doctora en Ciencias Veterinarias  
CI.1756736011

### **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Cynthia Carolina Tovar Arias

C.I: 0502264567

## **AGRADECIMIENTOS**

Al cumplir una meta más y subir un peldaño en mi vida profesional, agradezco primero a Dios y a la Virgencita de Guadalupe que me han colmado de bendiciones y han estado en mis momentos de decaimiento como mi fuerza más importante.

A mis padres Licenia Arias y Edwin Tovar por su apoyo tanto moral como económico en mi vida universitaria y guiarme por el mejor camino.

A la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro AGROCALIDAD por haberme brindado la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación en los laboratorios de diagnóstico animal y biología molecular. A mi directora científica la Dra. Maritza Barrera, mi docente guía Dra. Alina Aguirre y a la analista Paola Revelo por transmitirme sus conocimientos y apoyarme durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mi novio Alejandro Vega por el apoyo, ánimo y amor brindado todo este tiempo.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de titulación está dedicado de manera especial, con todo amor y cariño a mi papito Marcial Arias y a mi ñaño Mashu quienes partieron de este mundo dejándome un gran vacío, pero también desde el cielo me han bendecido y cuidado a lo largo de mi vida.

A mi hermana Liseth Tovar por ser mi mayor ejemplo de responsabilidad y superación al darme sus consejos y palabras de aliento en todo momento para alcanzar mis metas. Gracias a Dios por haberme dado a la mejor hermana del mundo. Te amo

A mi mamita nena quien me ha cuidado toda mi vida con su amor y ternura llegando a ser mucho más que una abuela.

Finalmente, al resto de mi familia, tíos y primos que me han ayudado en buenos y malos momentos y han depositado en mí su confianza.

Gracias.



## RESUMEN

*Campylobacter* es una bacteria patógena que coloniza el tracto genital de los bovinos, y es la causante de la Campylobacteriosis Genital Bovina (CGB), una enfermedad que ha causado grandes pérdidas económicas en el sector ganadero a nivel mundial. Esta enfermedad es de transmisión sexual, y es producida por dos subespecies de *Campylobacter fetus*; *Campylobacter fetus* venerealis de transmisión estrictamente venérea y *Campylobacter fetus fetus* la cual forma parte de la flora intestinal. La transmisión del agente infeccioso se produce durante la cópula y también durante el proceso de inseminación artificial ya que es capaz de infectar al semen. En los toros esta enfermedad cursa de forma asintomática, por lo que genera serios problemas reproductivos en las hembras como: la infertilidad, los abortos esporádicos y repetición de celos. Desde los años ochenta, se han buscado métodos de diagnóstico de la Campylobacteriosis Genital Bovina que sean más específicos y reproducibles. Entre los métodos más utilizados están: la inmunofluorescencia directa, el ensayo por inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), los cuales requieren de equipos costosos y de un mayor tiempo de análisis para determinar estas dos subespecies bacterianas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método que se basa en la amplificación "in vitro" de secuencias específicas de ADN. Este método es más rápido, sensible, específico y económico para la detección de *Campylobacter*. La presente investigación tiene la finalidad de estandarizar un método de detección molecular de *Campylobacter fetus fetus*. La estandarización de los parámetros se llevó a cabo variando las condiciones de la temperatura de hibridación, la concentración de cebadores y la concentración de MgCl<sub>2</sub> en la reacción en cadena de la polimerasa múltiple. Adicionalmente, se compararon dos métodos de extracción del ADN genómico con el objetivo de seleccionar el método más rápido y económico.

**Palabras clave:** *Campylobacter fetus fetus*, Campylobacteriosis, estandarización, reacción en cadena de la polimerasa múltiple.

## ABSTRACT

Campylobacter is a pathogenic bacterium that colonizes the genital tract of bovines, and is the cause of Bovine Genital Campylobacteriosis (BGC); this disease has caused great economic worldwide losses in the livestock sector. This disease is sexually transmitted, and is produced by two subspecies of Campylobacter fetus; Campylobacter fetus venerealis with strictly venereal transmission and Campylobacter fetus fetus which is part of the gut flora. Transmission of the infectious agent occurs during copulation and during the artificial insemination process because this is able to infect the semen. In bulls this disease is asymptomatic, which generates in the females serious reproductive problems as: infertility, sporadic abortions and repetition of estrus. Since the 1980s, the methods of diagnosis of Bovine Genital Campylobacteriosis have been sought that are more specific and reproducible. Among the most used methods are: direct immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), amplified fragment length polymorphisms (AFLP), which needs expensive equipment and longer analysis time to determine these two Bacterial subspecies. Polymerase chain reaction (PCR) is a method based on the in vitro amplification of specific DNA sequences. This method is more rapid, sensitive, specific and economical for the detection of Campylobacter. The objective of the present investigation is to study a method of molecular detection of Campylobacter fetus fetus. Standardization of parameters was done by changing conditions of hybridization temperature, primer concentration and MgCl<sub>2</sub> concentration in the multiplex polymerase chain reaction. In addition, DNA extraction methods were compared in order to select the most economical and fastest one.

**Keywords:** Campylobacter fetal fetus, Campylobacteriosis, standardization, multiplex polymerase chain reaction.

# ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Justificación .....	5
1.4. Objetivos .....	6
1.4.1. Objetivo general.....	6
1.4.2. Objetivos específicos .....	7
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	7
2.1. Historia .....	7
2.2. Clasificación taxonómica .....	8
2.3. Identificación de <i>Campylobacter fetus fetus</i> .....	10
2.3.1. Morfología .....	10
2.3.2. Pruebas bioquímicas.....	11
2.3.3. Métodos de identificación .....	12
2.4. Enfermedad Campylobacteriosis.....	13
2.4.1. Manifestaciones clínicas.....	13
2.4.2. Diagnóstico.....	14
2.4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	15
2.4.3 Cebadores.....	16
2.4.3.1 GENES sapA .....	17
2.4.4 Control .....	18
2.5 Importancia socioeconómica .....	18
2.6. Enfermedad zoonótica.....	18
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ...	19
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS.....	21
4.1 Población y muestra .....	21

4.2 Materiales y métodos .....	21
4.2.1 Cultivo de las cepas bacterianas .....	21
4.2.1.1 Criopreservación de la cepa bacteriana.....	21
4.2.2 Pruebas de caracterización .....	22
4.2.2.1 Pruebas microbiológicas.....	22
4.2.2.2 Pruebas bioquímicas.....	23
4.2.2.3 Estandarización molecular .....	25
<b>5. CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
5.1 Crecimiento bacteriano.....	33
5.1.1 Identificación morfológica de las colonias de <i>Campylobacter fetus fetus</i> . 34	
5.1.2 Identificación morfológica macroscópica.....	35
5.2 Pruebas bioquímicas .....	36
5.2.1 Pruebas para oxidasa y catalasa .....	36
5.2.2 Cultivo en presencia de cloruro de sodio .....	37
5.2.3 Tolerancia a la glicina .....	38
5.2.4 Producción de <i>H<sub>2</sub>S</i> en medio TSI.....	39
5.3 Estandarización de las pruebas de diagnóstico molecular .....	40
5.3.1 Comparación de métodos de extracción de ADN genómico .....	40
5.3.2 PCR simple del género <i>Campylobacter</i> .....	42
5.3.3 PCR simple de especie <i>Campylobacter fetus</i> .....	43
5.3.4 PCR simple de la subespecie <i>Campylobacter fetus fetus</i> .....	45
5.3.5 Estandarización del protocolo de PCR múltiple para <i>Campylobacter fetus fetus</i> .....	46
5.3.5.1 Amplificación estándar de la PCR múltiple.....	46
5.3.5.2 Estandarización de la PCR múltiple .....	47
5.3.6 Sensibilidad.....	50
5.3.7 Especificidad.....	52
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>54</b>
6.1 Conclusiones.....	54

6.2 Recomendaciones.....	54
REFERENCIAS.....	56
ANEXOS.....	67

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

El nombre *Campylobacter* deriva del vocablo griego que describe a una bacteria en forma de bacilo curvo, siendo un Gram negativo que mide unos 0,5 – 3 µm de largo y 0,3 - 0,5 µm de ancho, también cuenta con un flagelo (monótrico) o uno en cada polo (anfítrico). Este tipo de bacterias son sensibles a la luz y pueden morir fácilmente cuando se exponen a desinfectantes químicos (Romero, J. 2008). *Campylobacter* puede tomar formas onduladas, como de "S" (Orellano et al, 2016) y fue descrita por primera vez en 1909 por Fadyean y Stockman en un aborto ovino y posteriormente en un bovino (Córdova. A. et al, 2015).

Dentro de este género se encuentran las subespecies *Campylobacter fetus venerealis* y *Campylobacter fetus fetus* siendo esta menos exigente que la primera en sus condiciones de crecimiento, *Campylobacter fetus venerealis* llega a producir ácido sulfhídrico en un medio que contenga cisteína, mientras que *Campylobacter fetus fetus* llega a tolerar y reducir el selenito de sodio en un medio que contenga glicina (Marcellino, R. et al, 2015).

*Campylobacter fetus* es la causante de la enfermedad Campylobacteriosis genital bovina (CGB) la cual tiene una amplia distribución a nivel mundial. Los síntomas de esta enfermedad son: repeticiones del celo, disminución en la tasa de preñez, muertes del embrión o abortos. *Campylobacter fetus fetus* habita principalmente en el intestino del animal provocando los abortos esporádicos mientras que *Campylobacter fetus venerealis* se encuentra solo en el tracto genital. La transmisión de esta enfermedad es de carácter sexual, la bacteria en los toros se encuentra en el semen y el prepucio, mientras que en las vacas se aloja en la mucosa vaginal o en los órganos internos del feto abortado (Baldone, V y Fort, M; Urquiza, L. 2014).

*Campylobacter* generalmente es un patógeno de animales como ovinos y bovinos, aunque muchas veces se le ha diagnosticado como un patógeno oportunista del ser humano cuando se encuentra inmunodeprimido, causando serios problemas sistémicos neurológicos y vasculares (Thompson,S y Blaser, M. 2000). Campylobacteriosis genital bovina suele permanecer de manera subclínica por lo cual no suele ser detectada, a menos que se empleen métodos de diagnóstico eficaces (Marcellino.R, Et al 2015), debido a esto, a lo largo de la historia se han establecido diferentes métodos para la identificación de este género tanto a nivel fenotípico como genotípico (Anon, 2012). Entre las técnicas más usadas están:

**Inmunofluorescencia directa:** Esta técnica que se realiza en fluidos prepucciales o en mucus cervicovaginal, utilizando un conjugado comercial específico para *Campylobacter fetus* marcado con isotiocianato de fluoresceína en una dilución de 1/60 con agua destilada, el cual se unirá con el antígeno para posteriormente observar en un microscopio óptico con sistema de epifluorescencia a 40X y 100X, tomando como resultado positivo la observación simultánea de fluorescencia y la morfología de *Campylobacter fetus*, logrando así identificar la bacteria a nivel de especie pero no a nivel de subespecie (Marcellino, R. et al 2015).

**Ensayo por inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA):** Este se realiza para la detección de anticuerpos IgA específicos del antígeno del mucus cervicovaginal después de sufrir un aborto causado por *Campylobacter fetus*. Teniendo una alta sensibilidad para la detección del microorganismos en las hembras (Hum,S. et al 1991).

También se han desarrollado métodos alternativos empleando técnicas moleculares como:

**Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE):** Se han realizado estudios para observar si han existido cambios genotípicos de *Campylobacter fetus*

*fetus* a lo largo de la historia, con la aplicación de PFGE se demostró que desde el estudio realizado en 1987 hasta el 2002 no hubo cambios significativos en el genotipo de la población de *Campylobacter fetus fetus* (Chanban. Et al 2012)

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP): Método muy utilizado para reconocer las diferencias fenotípicas entre las dos subespecies de *Campylobacter fetus*, teniendo como mayor desventaja que es laborioso y altamente costoso (Spence et al., 2011)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es la técnica más utilizada en la actualidad debido a su bajo costo, al igual que su tiempo empleado en la realización de la misma. Llegando hacer una técnica muy sensible y específica al utilizarla de forma convencional, múltiple o en tiempo real, cuando se utilizan cebadores específicos para la amplificación del gen o genes esperados (Iraola et al., 2012).

## **1.2. Planteamiento del problema**

Esta enfermedad ha sido reportada en 52 países, según el Anuario de Sanidad Animal FAO-OMS-OIE en 1990 y se sospechaba su existencia en 17 países no informados, lo que representa el 41% de las naciones. Hasta el 2008 los países que presentaron distintos grados de incidencia fueron: Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Colombia, Cuba, Estados Unidos, Francia, España, Guatemala, India, Japón, México, Panamá, Perú, Portugal, Sudáfrica Venezuela, Polonia, Kenia, Nigeria, Grecia y su presencia aun cuando no existe confirmación, se sospecha en: Afganistán, Belice, Bolivia, Costa Rica, El Salvador, Honduras, y Ecuador (Mshelia,GD et al. 2010). En encuestas realizadas en el 2009 a nivel mundial se han encontrado datos alarmantes en varias zonas geográficas, como por ejemplo Sudáfrica donde se encontró una prevalencia del 28,7 al 47% en vacas lecheras, en Australia una reducción en la producción de terneros de 35% y mientras que en Argentina la producción de terneros se



mantiene en un 65%, en Nigeria la prevalencia de la enfermedad es de 2,9 al 11% y en Uruguay de un 28.05% (Madoroba, E et al. 2011; Mai, H et al. 2013; Mshelia, GD et al. 2010).

En la actualidad existen problemas económicos y pérdidas en la producción en el sector ganadero a causa de enfermedades reproductivas, ya que se dan bajos índices de destete por pérdidas en las diferentes etapas del ciclo reproductivo, como por ejemplo abortos durante la gestación, muertes al momento del parto o en las primeras semanas de vida (Baldone, V y Fort, M; Urquiza, L. 2014). Debido a esto, la tasa de embarazos puede ser muy baja aproximadamente del 20% y la tasa de abortos tan elevada como del 10%, mientras que la esterilidad llega a ocurrir en un 11% en las novillas infectadas, disminuyendo la producción de carne, leche y aumentando los costos por atención veterinaria (Jiménez, DF. 2011; OIE.2008; Mshelia, GD et al. 2012; Schmidt, T. 2010).

La enfermedad Campylobacteriosis genital bovina fue declarada por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) de importancia socioeconómica y de salud pública en todo el mundo, en particular cuando se trata del comercio de animales o de productos de origen animal, para consumo local o de exportación (Fernández, H. 2011). *Campylobacter fetus venerealis* constituye la causa más común de la infección y esta transcurre de forma asintomática en los toros mayores de 3 años por lo que puede transmitirse permanentemente ya sea por monta natural o mediante los programas de inseminación artificial (IA), infectando a las hembras, se caracteriza por causar infertilidad que oscila entre un 10% y un 40%. En una primera etapa hay celos más largos o retorno al celo y luego aparece el aborto. Este puede alcanzar una tasa entre el 4% y el 25%, y se produce generalmente entre el quinto y sexto mes de gestación (Guzmán. 2011) generado grandes pérdidas económicas en el sector pecuario (Moolhuijzen, P et al. 2009).

La presencia de esta enfermedad sigue siendo un factor limitante en el desarrollo de la ganadería ya que impide la libre comercialización entre los países, además de su impacto económico debido a las pérdidas que genera en la producción de leche, carne y terneros, más el freno que representa para el mejoramiento genético. Los métodos de control y erradicación de esta enfermedad en el Ecuador son nulos, debido a la falta de información y seguimiento de la misma. La mayor desventaja radica en el alto costo de los métodos de diagnóstico empleando técnicas tales como: inmunofluorescencia directa, ELISA y pruebas de biotipificación y técnicas moleculares como electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y múltiple. Muchas de estas técnicas tienen un uso limitado (Chaban, B et al. 2012), ya que se requieren reactivos costosos, procedimientos demasiado lentos y que solo permiten cuantificar de manera relativa la presencia de *Campylobacter*, pero no diferenciar las subespecies. (Anón, 2012).

### **1.3. Justificación**

Según el último censo realizado por la encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC) en el 2015, el Ecuador cuenta con 4,12 millones de cabezas de ganado (ESPAC, 2015). Estos datos le sitúan como el segundo país productor de leche y el tercero en la producción de carne de la región andina, por lo que este rubro tiene un destacado impacto económico en el país, además de constituir una fuente importante de empleo (Pezo, J. 2008). Actualmente el país pretende aumentar su producción tanto de carne y leche y de esta forma generar un excedente que se pueda exportar a países como Irán, Venezuela, Cuba, Panamá, Rusia y Perú. Con este objetivo, Ecuador importó desde Paraguay cerca de 35 mil cabezas de ganado para el programa de repoblamiento y mejoramiento genético propuesto por el MAGAP, después de que la OIE declarara al país libre de fiebre aftosa en el año 2015 (MAGAP, 2015).

Para alcanzar este desafío es imperioso tener animales sanos mediante la verificación y regulación de parámetros de calidad y control, para preservar la salud del consumidor y garantizar las ganancias del ganadero (Mera. P, 2013). Una de las medidas perentorias es la implementación de técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares para la identificación de cepas de *Campylobacter fetus fetus* y *Campylobacter fetus venerealis* causantes de la Campylobacteriosis genital bovina (Córdova. A et al. 2015)

El control de la Campylobacteriosis genital bovina reviste importancia desde el punto de vista social ya que representa un gran riesgo debido a su naturaleza zoonótica que puede acarrear severas consecuencias para la salud humana (Aznar et al., 2012) El estudio y control de esta enfermedad es trascendental ya que representar una seria amenaza para las personas y los animales empelados en la producción (Mai, H. 2013). Todo lo anteriormente expuesto destaca la necesidad de implementar métodos de diagnóstico rápidos, eficaces y a bajo costo, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permitan detectar la presencia de *Campylobacter*, así como la posibilidad de establecer una diferenciación a nivel de subespecie con una alta reproducibilidad.

Finalmente, la aplicación de esta técnica redundará en beneficios económicos para ganaderos y para el país, pues permitirá cumplir uno de los requisitos exigidos para la exportación de ganado a los distintos países que lo demanden, obteniendo así mayores ingresos y reduciendo el número de pérdidas en el proceso productivo.

#### **1.4. Objetivos**

##### **1.4.1. Objetivo general**

Establecer un protocolo de detección molecular de *Campylobacter fetus fetus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

#### 1.4.2. Objetivos específicos

- Comparar dos métodos de extracción de ADN bacteriano, para el proceso ulterior de identificación de las cepas.
- Estandarizar las condiciones óptimas de la reacción en cadena de la polimerasa para la cepa de *Campylobacter fetus fetus*.
- Determinar la sensibilidad y especificidad del protocolo de amplificación estandarizado.

## 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Historia

McFadyean y Stockman aislaron por primera vez una bacteria en forma de espirilo en el líquido del abomaso de un aborto ovino en 1909, posteriormente se encontró el mismo microorganismo en un bovino en 1913, por lo cual, en 1918, Smith y Taylor lo denominaron *Vibrio fetus* por su morfología similar a las bacterias del género *Vibrio* (Córdova et al, 2015; Stoessel. 1982).

Investigaciones realizadas en Holanda por Sjollema en 1949, demostraron que la infertilidad enzoótica de los bovinos era causada por *Vibrio fetus*, pero en 1956 el investigador Akkermans y sus colaboradores comprobaron que los abortos esporádicos eran causados por una subespecie distinta a la que causaba la esterilidad enzoótica, esta última podía distinguirse en el laboratorios empleando distintas pruebas; como por ejemplo, su capacidad de desprender ácido sulfhídrico en medios especiales (Cerde, 2010).

En Bélgica en el año de 1959, Florent llega a publicar su trabajo de investigación en el cual menciona las diferencias entre la vibriosis venérea causante de la esterilidad enzoótica, y de algunos casos de abortos,

(provocada por *Vibrio fetus*, subespecie *venerealis*) y una vibriosis de origen intestinal que producía abortos esporádicos causada por *Vibrio fetus*, subespecie *fetus* (Córdova et al, 2015; Stoessel, 1982). Teniendo en cuenta estos hallazgos, Sebal y Veron en 1963, proponen la denominación del género *Campylobacter* para diferenciar estos microorganismos del género *Vibrio*, ya que este nuevo género posee características diferentes; como es su bajo peso molecular, su demanda para el crecimiento en microaerofilia, su metabolismo y varias diferencias encontradas a nivel de ADN entre estos géneros (Koneman et al., 2013). Finalmente, en los años 70, Butzler y Skirrow, Bolton y Robertson establecieron medios específicos para el aislamiento y crecimiento de la bacteria.

## 2.2. Clasificación taxonómica

La taxonomía y nomenclatura del género *Campylobacter* fue propuesta por primera vez en 1991 por Manuel de Bergey. Desde ese momento la clasificación de este microorganismo ha estado en constante modificación, como se muestra en la Tabla 1 (Lapierre, 2013; Who, 2011). Actualmente comprende 25 especies y 9 subespecies, entre ellas predominan *Campylobacter fetus venerealis* y *Campylobacter fetus fetus* (causantes de la enfermedad conocida como campylobacteriosis), las cuales se diferencian en el laboratorio mediante una serie de pruebas bioquímicas, como por ejemplo su tolerancia a la glicina, siendo la subespecie *venerealis* sensible a esta mientras que la subespecie *fetus* es tolerante (Campero, 2010; Cattaneo, 2007).

Tabla 1.

*Clasificación taxonómica del género Campylobacter.*

<b>Categoría Taxonómica</b>	<b>Microorganismo</b>
Filo	Proteobacteria
Clase	Épsilon
Orden	Campilobacterales
Familia	Campylobacteraceae
Género	<i>Campylobacter</i>
Especies	<p><i>C. avium, C. canadensis, C. concisus</i>  <i>C. cunicolorum, C. curvus, C. fetus, C. gracilis,</i>  <i>C. helveticus, C. hyointestinalis, C. lawsonii</i>  <i>C. hominis, C. hyoilei, C. insulaenigrae</i>  <i>C. jejuni, C. lanienae, C. lari, C. mucosalis</i>  <i>C. peloridis, C. rectus, C. showae, C. sputorum</i>  <i>C. subantarticus, C. upsaliensis, C. volucris</i>  <i>C. ureoliticus</i>  <i>C. fetus subespecie fetus</i>  <i>C. fetus subespecie venerealis</i>  <i>C. hyointestinalis subespecie hyointestinalis</i>  <i>C. hyointestinalis subespecie lawsonii</i>  <i>C. jejuni subespecie jejuni</i>  <i>C. jejuni subespecie doylei</i></p>
Subespecies	<p><i>C. sputorum biovariedad bubulus</i>  <i>C. sputorum biovariedad fecalis</i>  <i>C. sputorum biovariedad sputorum</i></p>

Tomado de Lapierre, (2013)

El género *Campylobacter* pertenece a la familia Campylobacteriaceae al igual que el género *Arcobacter*. Las principales diferencias entre estos dos géneros son que *Campylobacter* es incapaz de crecer a 15°C, y cuenta con uno

(monótrico) o dos (anfítrico) flagelos en cada uno de sus polos, por lo que es móvil (Farace. M &Viñas. M, 2007)

### **2.3. Identificación de *Campylobacter fetus fetus***

El nombre *Campylobacter* deriva del vocablo griego que describe a una bacteria en forma de bacilo curvo (Romero, J. 2008). *Campylobacter fetus* y sus dos subespecies *fetus* y *veneralis* son microorganismos patógenos de gran importancia en el campo veterinario por sus efectos sobre el ganado bovino (Farace. M &Viñas. M, 2007).

*Campylobacter* es un microorganismo zoonótico, de muy lento crecimiento causante de la enfermedad campylobacteriosis de transmisión sexual en los bovinos y transmitida en los alimentos a los humanos, por lo que su estudio es de gran importancia a nivel mundial, en especial en los países subdesarrollados (Who, 2011).

#### **2.3.1. Morfología**

Esta bacteria con forma de bacilo curvo, es un Gram negativo que mide unos 0,5 – 3  $\mu\text{m}$  de largo y 0,3 - 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho, también cuenta con uno o dos flagelos en sus polos. Este tipo de bacterias son sensibles a la luz y pueden morir fácilmente por el efecto de desinfectantes químicos (Romero, J. 2008). Su crecimiento se dá a las 72 horas de cultivo en medios específicos y pueden tomar formas onduladas o en forma de "S" (Orellano et al, 2016; Terzolo y Catena 2007), pero después de tres días su forma cambia a esférica y ovoidal ya que ha perdido su motilidad (Figura 1) (Canal. V y Silva, F. 2007). Para su crecimiento *Campylobacter fetus* necesita una atmósfera microaerofílica (5%  $O_2$ , 10%  $CO_2$  y 85%  $N_2$ ) y una temperatura de 37°C (Silva, et al. 2011). Este tipo de bacterias no son fermentadoras de carbohidratos por lo que su energía la obtienen a partir de la degradación de los aminoácidos (Koneman et al, 2013; Levin, 2007).

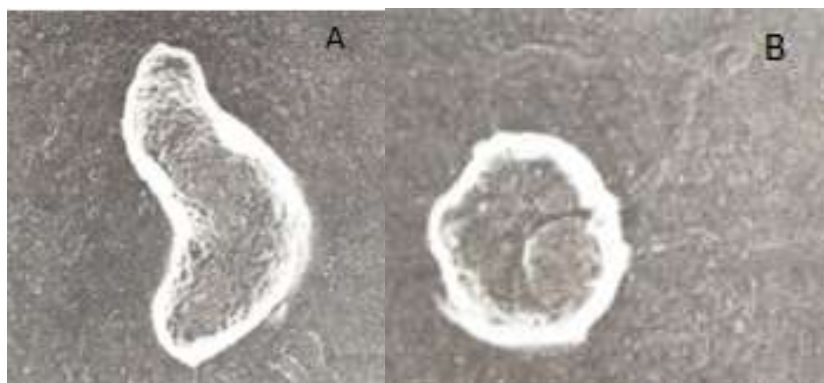


Figura 1: Microfotografía electrónica

Adaptado de Rivera, P. et al. (1983, p.12)

a) Forma de *Campylobacter* joven

b) Forma de *Campylobacter* viejo

### 2.3.2. Pruebas bioquímicas

*Campylobacter fetus* se puede identificar mediante pruebas bioquímicas después de la obtención de los cultivos puros y su identificación morfológica (INS et al, 2013). Dichas pruebas se describen en la Tabla 2.

Tabla 2:

*Pruebas bioquímicas para la identificación de las dos subespecies de Campylobacter fetus.*

Subespecie	Catalasa	Oxidasa	Glicina 1%	NaCl 3,5%	H <sub>2</sub> S	37°C
<i>Campylobacter fetus fetus</i>	+	+	+	-	-	+
<i>Campylobacter fetus venerealis</i>	V	+	-	-	-	V

+ Positivos, - Negativos, V reacción variable. Tomado de (INS et al., 2013; Koneman et al., 2013; OIE, 2008).



Como se observa en la Tabla 2 la mayor diferencia entre estas dos subespecies es su tolerancia a la glicina al 1% (Baldone, V; Fort, M; Urquiza, L.2014).

### **2.3.3. Métodos de identificación**

A través del tiempo se han descrito varios métodos de identificación para *Campylobacter*, su especie *fetus* y sus dos subespecies *fetus* y *venerealis*, entre ellos tenemos la secuenciación del gen 16S, la electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), pero todas estas técnicas presentan desventajas puesto que requieren de mucho tiempo, el empleo de equipos sofisticados y de personal especializado (OIE, 2008).

En la detección de *Campylobacter*, se han empleado otras técnicas tales como el ensayo por inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) aunque este no es suficiente para tener una confirmación por lo que se procede a realizar el análisis mediante métodos moleculares o pruebas de biotipificación, (Chaban, B et al. 2012; Dey et al, 2012). También se ha empleado la técnica de inmunofluorescencia directa (IF) la cual tiene como ventajas ser rápida y de bajo costo y tener una alta sensibilidad y especificidad, pero presenta la desventaja de no permitir diferenciar entre las dos subespecies. (Baldone, V; Fort, M; Urquiza, L.2014).

Estas herramientas son específicas para la identificación del microorganismo, pero en especial la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es una técnica fiable para la detección rápida de segmentos específicos de ADN que son únicos en cada especie y subespecie de este género (Gharst et al, 2013). Mediante su aplicación se puede realizar la detección del microorganismo con una alta especificidad y sensibilidad (Ivanova et al, 2014; Leblanc-Maridor et al, 2011).

## 2.4. Enfermedad Campylobacteriosis

Campylobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad de transmisión sexual causada por el microorganismo *Campylobacter fetus* sub. *fetus* y *venerealis*, la cual se caracteriza por infertilidad, abortos o muerte temprana del embrión lo cual ha producido grandes pérdidas económicas a nivel mundial en la producción de ganado bovino y la obtención de sus derivados: leche y carne (Baldone, V; Fort, M; Urquiza, L.2014). Este microorganismo se aloja en el tracto reproductor de los adultos, en los machos se le puede encontrar en el prepucio y pene mientras que, en las hembras en la vagina, cérvix y en el útero (Medina, J. 2015; Terzolo y Catena, 2007).

### 2.4.1. Manifestaciones clínicas

Macho: los toros son portadores de una infección crónica asintomática de esta enfermedad la cual no perjudica su desempeño sexual y al tener órganos (prepucio y pene) de mayor tamaño también pueden albergar una cantidad importante de la bacteria en ellos (Guzmán López. 2011). Es por ello que existe un alto riesgo de contaminación al momento de la monta natural o si el animal está en un programa de inseminación artificial (IA) (Moolhuijzen,P et al. 2009).

Hembras: en ellas la enfermedad se manifiesta porque ocasiona ciclo estrales muy largos o muy cortos (irregulares), repeticiones de los celos, reducción en los porcentajes de preñez a causa de la alta tasa de mortalidad embrionaria y los abortos que ocurren mayormente en el quinto o sexto mes de gestación o muertes en los primeros días de vida (Mshelia,GD et al. 2012; Schmidt, Tet al. 2010).

En el caso de las novillas que se encuentran infectadas la esterilidad puede llegar al 11%, disminuyendo de forma ostensible la producción de carne y leche, y ocasionando costos elevados debido a atención veterinaria (Jiménez, DF. 2011). Ya que su infertilidad se debe a la limitación de  $O_2$  en vagina y

cérvix ya que es mucho más cerrado que en una hembra adulta lo que aviva la entrada de *Campylobacter fetus* en su útero. (Canal. V y Silva, F. 2007).

Algunas hembras llegan a desarrollar inmunidad frente al patógeno por lo que pueden concebir sin problemas y llevar el embarazo a término, siendo solo portadoras del microorganismo, y seguir infectando al momento de reproducirse. (Campero, 2005).

#### **2.4.2. Diagnóstico**

El diagnóstico se los puede realizar tanto en machos, como en hembras y fetos.

Machos: se toman 3 muestras de raspados o lavados prepuciales con una pausa de 7 a 10 días, entre ellos, así se persigue evitar los falsos negativos o a su vez los falsos positivos. El semen fresco o congelado también es analizado para confirmación de resultados, el cual es colectado en una vagina artificial. Estas muestras se transportan en tampón fosfato salino (PBS) (Canal. V y Silva, F. 2007; OIE, 2008).

Hembras: se realiza un lavado de la cavidad vaginal, en condiciones asépticas. Posteriormente, con una pistola de inseminación artificial que permite acceder al cuello uterino se succiona el mucus cervicovaginal (MCV) y se coloca en un medio de transporte enriquecido (OIE, 2008).

Fetos: para el aislamiento de la bacteria se utiliza el líquido del abomaso, los contenidos estomacales, el hígado o los pulmones del feto, la muestra se coloca en PBS o en un medio de transporte enriquecido (Canal. V y Silva, F. 2007; OIE 2008).

### 2.4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) surgió hace unos 30 años y actualmente existen varias modificaciones de la técnica, cada una con sus ventajas y desventajas como se muestra en la Tabla 3. Este es uno de los métodos moleculares más utilizados para la detección de bacterias patógenas que afectan al ganado y a sus derivados (Velusamy. Et al, 2010).

La técnica se basa en la amplificación de una secuencia génica específica en tres pasos consecutivos; el primero es la desnaturalización de la doble cadena a altas temperaturas, seguido de la hibridación en sitios específicos de los cebadores o primers en la hebra de ADN y finalmente la polimerización con los cebadores complementarios a la cadena monocatenaria se continúa con la incorporación de los desoxirribonucleótidos, siguiendo la regla de complementariedad de las bases, empleando una ADN polimerasa termoestable (Law, Ab Mutalib, Chan, & Lee, 2015; Velusamy et al., 2010).

### 2.4.2.2 PCR simple

Este tipo de PCR sirve para la detección de un único patógeno bacteriano, pues amplifica una sola secuencia de ADN específica, por lo que se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas para la identificación de *Campylobacter*, y presenta una alta sensibilidad cuando se realiza partiendo de cultivos puros (Gharst et al, 2013).

### 2.4.2.3 PCR múltiple

La reacción en cadena de la polimerasa múltiple es un método rápido, simple y de bajo costo para detectar varias especies o subespecies de un mismo género como es el caso de *Campylobacter fetus fetus* (Gharst et al, 2013). Esta técnica es capaz de detectar dos o más secuencias de ADN específicas en una misma muestra en pocas horas (Medina, J.2015; Oyarzabal et al., 2007).

Tabla 3.

*Ventajas y Desventajas de los tipos de PCR*

<b>Tipo de PCR</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Referencias</b>
PCR Simple	Alta sensibilidad y especificidad. Automatizado.	Presencia de inhibidores, necesita purificación de ADN.	(Mandal, Biswas, Choi, & Pal, 2011; Park et al., 2014; Zhang, 2013)
	Resultados confiables. Rápida. Bajo costo.	No distingue células viables y no viables.	
PCR Múltiple	Alta sensibilidad y especificidad. Detección de dos o más secuencias de ADN.	Presencia de inhibidores. No distingue células viables y no viables.	(Mandal et al., 2011; Park et al., 2014; Zhang, 2013)
	Automatizado. Resultados confiables. Rápida. Bajo costo.	Diseño de cebadores específicos.	

Adaptado de (Law et al., 2015; Romero et al., 2010; Medina, J. 2015).

### 2.4.3 Cebadores

Los cebadores MG3F, MG4R permiten identificar al microorganismo *Campylobacter* de la especie *fetus* (Hum et al., 1997, Vargas et al., 2003), mientras que los cebadores CFF y CFR permiten identificar a *Campylobacter fetus* subespecie *fetus*. Estos cebadores fueron diseñados y publicados por primera vez por Casadem et al. en el año de 1998 y son los más usados hasta la fecha. Su diseño está basado en la secuencia del gen *sapB2*, en este caso

las secuencias nucleotídicas de los genes *sap* se conservan desde su extremo 5' y se van transformando progresivamente hasta llegar al extremo 3'. El cebador CFR se sitúa muy cerca del extremo 3' del gen *sapB2*, mientras que el cebador CFF en el extremo 5' se sitúa en una región que se encuentra bien conservada en el gen *sapA*, no se sabe cuál es el fundamento básico para la utilización de estos cebadores en la amplificación de los genes *sapA*, pero una explicación puede ser la diversidad genética en las regiones de los genes *sap* donde se unen los cebadores CFF y CFR (Willoughby, K. et al., 2005).

#### **2.4.3.1 GENES *sapA***

*Campylobacter fetus* posee una capa superficial cristalina o también conocida como las proteínas de la capa S (LPS), las cuales están codificadas por los genes *sapA* que presentan de 5 a 9 homólogos en cada cepa, Estos genes juegan un papel importante al momento de la virulencia y también para protegerse de la fagocitosis. Los LPS dan lugar además a la variación antigénica por lo que la bacteria puede evadir las defensas de sus hospedadores (Grogono, R. 2003).

Dentro de la especie *Campylobacter fetus* encontramos dos subespecies de gran importancia las cuales tienen secuencias génicas semejantes en sus genes *sap*, los cuales son fundamentales para la unión con el LPS en el extremo 3' de la región de los genes *sap*. Willoughby, K (2005).

Existen dos serotipos de los genes *sap* (A y B). *Campylobacter fetus venerealis* se encuentra dentro del serotipo A por lo que posee genes *sapA* y que *Campylobacter fetus fetus* puede presentar los dos serotipos por lo que posee tanto genes *sapA* como los genes *sapB* (Wang et al. 2002).

#### **2.4.4 Control**

Se requiere de programas de prevención al momento de la inseminación artificial o durante la monta natural para así evitar contaminación y diseminación del patógeno y evitar brotes que dañen la salud ganadera. Se necesita mantener en cuarentena a los animales sospechosos y a los que van a donar semen por primera vez en el caso de los toros o a las vaquillas en las que se detecten problemas eliminarlas o evitar la cópula por al menos 3 meses. Finalmente se requiere realizar exámenes cada 2 o 3 años como control a todo el ganado (Córdova, A. 2015)

#### **2.5 Importancia socioeconómica**

La enfermedad Campylobacteriosis genital bovina es de gran importancia socioeconómica ya que causa pérdidas en la producción a consecuencia de la infertilidad que causa o por la muerte temprana de los terneros, por lo que la eliminación de los animales infectados genera una disminución sensible en la obtención de los derivados que se obtienen de la industria ganadera, principalmente la producción de leche y carne (Catena et al, 2006). Es importante recalcar que la dosis infectiva es tan efectiva que ronda las 500 UFC (Silva, et al. 2011).

#### **2.6. Enfermedad zoonótica**

*Campylobacter fetus fetus* es una bacteria zoonótica de gran importancia tanto en animales como en los seres humano ya que actúa como oportunista y puede llegar a provocar enfermedades como son: meningitis, artritis reactiva, diarrea aguda, complicaciones neurológicas y vasculares especialmente en personas que se encuentran inmunodeprimidas. Estas evidencias fueron reportadas por primera vez en 1996 por Rees. M, Gregson y Hughes. Una de las enfermedades más graves que provoca esta bacteria es el síndrome de

Guillain Barré el cual se caracteriza por la parálisis de las extremidades, ya que *Campylobacter* llega a atacar al sistema nervioso periférico (EFSA. 2012).

En el caso de los animales la enfermedad se presenta raramente, con mayor frecuencia en animales jóvenes (OMS, 2011). Su tiempo de incubación en el hospedero es de aproximadamente 7 días, etapa que se caracteriza por un incremento de la temperatura, náuseas y vómitos, posteriormente a las 24h se presenta la diarrea (Terzolo y Catena, 2007). Sus hospedadores más frecuentes son mamíferos, aves y reptiles (Tu. Et al. 2008)

### **3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL**

Se planteó un diseño experimental como se observa en la Figura 2, comenzando desde la obtención de las cepas de *Campylobacter* para posteriormente realizar pruebas microbiológicas y bioquímicas para corroborar las características descritas por la OIE, seguido de la realización de la extracción de ADN genómico a partir de 2 métodos y después la ejecución y la estandarización de la PCR múltiple, para finalmente elaborar las pruebas de sensibilidad y especificidad de la técnica.



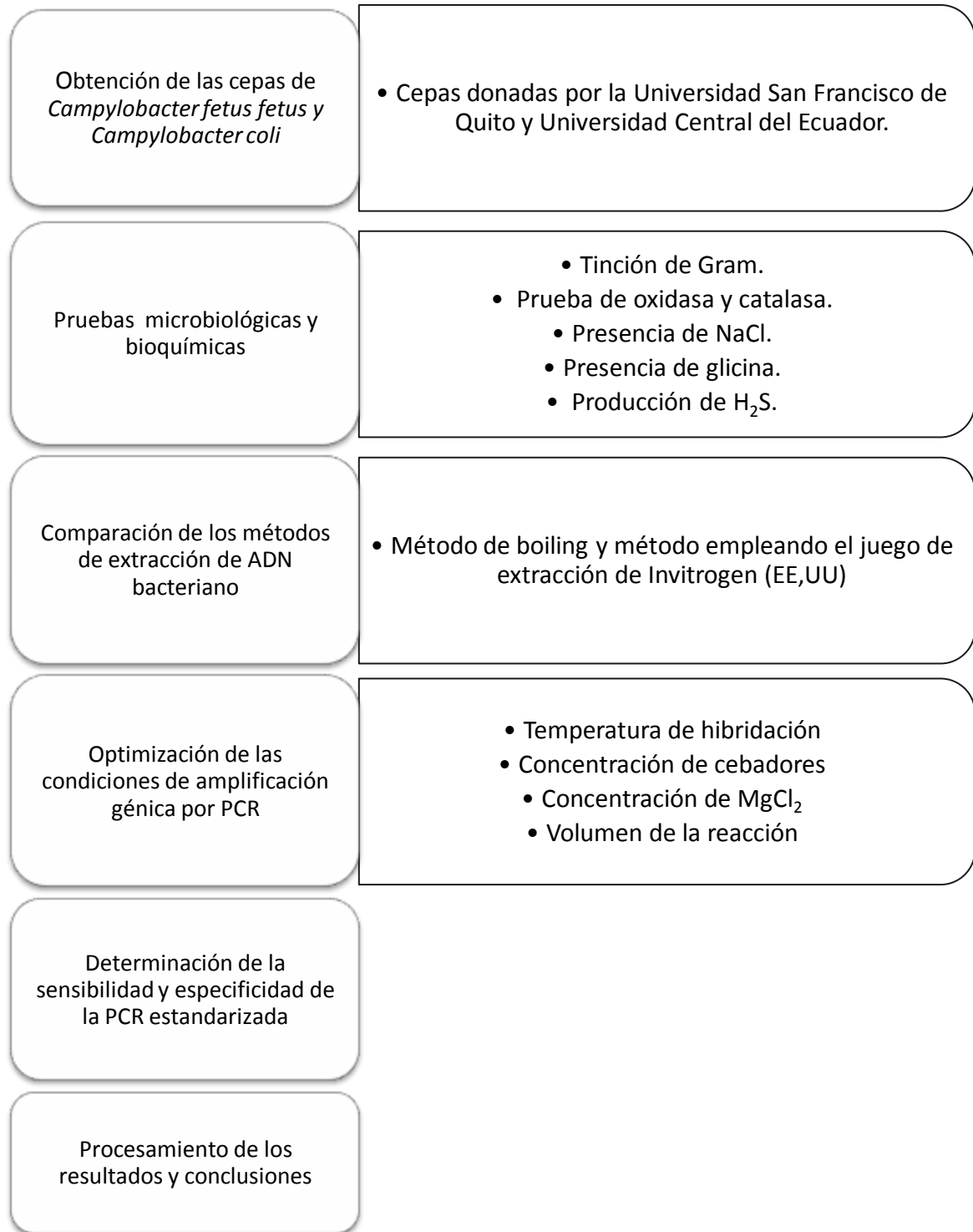


Figura 2:

Esquema del diseño experimental del trabajo de titulación.

## 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

### 4.1 Población y muestra

El presente estudio se llevó a cabo en la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro AGROCALIDAD bajo la supervisión de la Dra. Maritza Barrera, PhD y la analista Paola Revelo. En las instalaciones de los laboratorios de diagnóstico animal y el laboratorio de biología molecular en Tumbaco, Pichincha - Ecuador.

La cepa de *Campylobacter fetus fetus*, empleada en la misma fue donada por la Universidad San Francisco de Quito, mientras que las cepas para la detección de género de *Campylobacter coli* y *C. jejuni* fueron donadas por la Universidad Central del Ecuador.

### 4.2 Materiales y métodos

#### 4.2.1 Cultivo de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se sembraron en medios específicos, y se incubaron en un ambiente anaeróbico a 37°C y 42°C por 72 horas para posteriormente realizar su caracterización mediante las pruebas microbiológicas y bioquímicas para así garantizar su empleo como controles positivos en el proceso de estandarización de la técnica de PCR, finalmente se realizó su criopreservación para el banco de cepas del laboratorio.

##### 4.2.1.1 Criopreservación de la cepa bacteriana

Para conservar las cepas de *Campylobacter* se resuspendió una colonia de la bacteria con la ayuda de un asa de siembra en un medio que contenía 0.5 mL de caldo triptosa fosfato, con 5% de suero equino inactivado estéril, y un 17%

de glicerol estéril, para posteriormente preservarla a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de los 20 minutos de colocada la bacteria en el medio.

#### **4.2.2 Pruebas de caracterización**

Para caracterizar las cepas donadas que se emplearon como controles positivos se llevaron a cabo una serie de pruebas que permiten la identificación de *Campylobacter* y pruebas específicas para diferenciar sus subespecies, en especial *Campylobacter fetus fetus* en la cual se centraba nuestro interés.

##### **4.2.2.1 Pruebas microbiológicas**

###### **Siembra en medios de cultivo**

Las cepas de *Campylobacter* obtenidas como se describió anteriormente se sembraron en cajas petri con Agar sangre, Agar chocolate y Agar Skirrow y fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  y  $42^{\circ}\text{C}$  (*Campylobacter fetus fetus* y *Campylobacter coli* respectivamente) en una incubadora con una atmosfera microaerofílica (Mettler, Alemania) con una mezcla de gases de 10%  $\text{CO}_2$ , 10%  $\text{H}_2$ , 80%  $\text{N}_2$  dentro de jarras de anaerobiosis (Merck, EEUU) con un sobre de anaerocult C (Merck, Alemania) durante 72 horas debido a su lento crecimiento, y así determinar las condiciones óptimas de crecimiento de las mismas.

Las placas sembradas se conservaron en la incubadora por 5 días más para observar un cambio de color en las mismas por el transcurso del tiempo.

###### **Tinción Gram**

Para la identificación morfológica se realizó la tinción de Gram, para lo cual se colocó una gota de agua que contenía la muestra de las cepas bacterianas en un portaobjetos, se dejó secar unos minutos para posteriormente añadir violeta cristal (Nasco, EEUU) con una pureza del colorante del 90% por 1 minutos, se

lavó con abundante agua destilada y se colocó Lugol (Nasco, EEUU) químicamente puro por 1 minutos, y se lavó nuevamente con agua destilada, posteriormente se añadió acetona (Nasco, EEUU) en una concentración del 95% hasta eliminar el exceso de colorante, se lavó con agua destilada, para finalmente colocar safranina (Nasco, EEUU) con una pureza del 90% por 30 segundos lavar nuevamente con agua destilada y dejar secar para luego observar al microscopio óptico (OMAX. EEUU) a una magnificación de 100 X.

#### **4.2.2.2 Pruebas bioquímicas**

##### **Oxidasa**

La prueba de oxidasa se realizó utilizando el reactivo microbiológico Bactident oxidasa (Merck; EEUU), que consiste en una pequeña tira que al contacto con los microorganismos detecta la actividad citocromo oxidasa, que es una enzima que oxida el citocromo C pasándole de su forma inactiva a la activa. Para ello con la ayuda de un asa de siembra se colocó una colonia bacteriana sobre la tira reactiva, se espera de 20 a 60 segundos y se contrasta el cambio de color con las indicaciones del fabricante (siendo morado o azul positivo y amarillo o blanco negativo).

##### **Catalasa**

Para la prueba de la catalasa se utilizó peróxido de hidrógeno el cual se colocó sobre un porta objetos y se mezcló con una colonia tomada con una asa de siembra y se observó la presencia de burbujas que indican la presencia de oxígeno lo cual se considera un resultado positivo, mientras que la ausencia de las mismas implica un resultado negativo.

### **Presencia de cloruro de sodio**

En la prueba de crecimiento en presencia de cloruro de sodio (NaCl) al 3.5% (Merck; EEUU) se colocó una colonia de la bacteria en un tubo con medio Tioglicolato (Merck; EEUU) al que se le adicionó NaCl al 3.5% y en otro que contenía únicamente el medio tioglicolato, y se incubó a 37 °C por 48 horas en atmosfera microaerofílica.

### **Presencia de glicina**

Se colocó una muestra de la cepa en tubos con medio tioglicolato más glicina al 1, 1.3, 1.5, 1.7 y 1.9 % y un tubo solo con medio tioglicolato como Los tubos de incubaron en una atmosfera microaerofílica a 37 °C por 48 horas. Esta es una de las pruebas bioquímicas más importantes para la diferenciación de las subespecies *Campylobacter fetus fetus* y *Campylobacter fetus venerealis* siendo la primera más tolerante a la glicina. Para esta prueba se realizó 3 ensayos independientes con el objetivo de corroborar los resultados.

### **Producción de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) en medio TSI**

Con el medio sólido de triple azúcar- hierro (TSI) (Sigma, EEUU) se puede determinar la capacidad de *Campylobacter* para producir o no  $H_2S$ . Dicho medio se distribuyó en tubos y a continuación, con la ayuda de un asa de siembra se colocó una colonia dentro del tubo y se dejó incubar por 48h a 37°C en una atmósfera microaerofílica. Transcurrido ese tiempo se observa si se ha producido un cambio de coloración de rojo a negro que indica la producción de  $H_2S$ .

### **4.2.2.3 Estandarización molecular**

#### **Extracción de ADN**

El ADN genómico se extrajo mediante dos métodos, uno casero y el otro empleando el juego de extracción Pure link DNA kit de Invitrogen (EEUU):

#### **Extracción de ADN genómico por el método de ebullición**

Este es un método casero en el cual se utilizó una solución tampón que contiene Tris 1 M, y EDTA 0,5 M a pH = 8. Inicialmente se colocaron 200 µL de tampón TE y una asada de la muestra del microorganismo en un microtubo estéril de 1,5 mL y se procedió a agitar en vortex por 1 minuto homogenizando hasta observar la turbidez del medio, se dejó incubar por 5 minutos a 95 °C en baño de maría (PCE, EEUU), se agitó nuevamente en el vortex por 30 segundos, y se centrifugó (Thermo scientific; EEUU) a 10.000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y finalmente se añadieron 50 µL de tampón TE para resuspender el pellet y se procedió a cuantificar el contenido de ADN en la muestra. El ADN obtenido se conservó a -80°C.

#### **Extracción de ADN genómico mediante el juego de extracción Pure link DNA kit**

Para este método se siguió el protocolo del juego de extracción Pure link DNA kit (Invitrogen, EEUU). En primer lugar, se colocó en 200 µL de tampón TE una colonia bacteriana en un microtubo estéril de 1,5 mL. Se centrifugó 5 minutos a 6000 g para recolectar el pellet, el cual se resuspendió en 180 µL del tampón de digestión y se añadieron 20 µL de proteínas K (reconstituida) para lisar las células, se mezcló con vortex 1 minuto y se incubó a 55 °C a diferentes intervalos de tiempo (30, 60 90 y 120 minutos) con vortex ocasional hasta que la lisis se completó. Al terminar el proceso de incubación se añadieron 20 µL de RNAsa A y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente,

se añadieron 200  $\mu$ L del tampón de unión y se aplicó vortex por 1 minuto. Adicionalmente, se añadieron 200  $\mu$ L de etanol absoluto (96-100%) al lisado y se mezcló en vortex por 5 segundos. En una columna acoplada a un tubo colector se añadió el lisado (~640  $\mu$ L) y se centrifugó a 10.000 g por 1 minuto. A continuación, se descartó el tubo colector y se colocó uno nuevo, se añadieron 500  $\mu$ L del tampón de lavado 1 a la columna y se centrifugó a 10.000 g por 1 minuto, se descartó el tubo colector, se colocó uno nuevo y se añadieron 500  $\mu$ L del tampón de lavado 2, y se centrifugó por 3 minutos a máxima velocidad. Posteriormente, se descartó el tubo colector y se colocó la columna sobre un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se añadieron 50  $\mu$ L del tampón de elución, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a máxima velocidad por 90 segundos. Finalmente, el tubo de 1,5 mL contiene el ADN purificado, que se cuantificó y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Cuantificación de ADN**

Para verificar la pureza y concentración del ADN genómico extraído a partir de las cepas de *Campylobacter*, se empleó el equipo Nanodrop 8000 espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific; EEUU). Para ello se tomaron 2  $\mu$ L del tampón de elución para blanquear el equipo, y 2  $\mu$ L de las muestras para determinar la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, esto contribuirá a la absorbancia total. Se realizaron tres repeticiones de la cuantificación de de ambas extracciones, para la validación de los datos.

En cuanto al ratio de 260/280 que se utiliza para evaluar la pureza se consideró los valores entre 1.8 y 2, pero más cercanos a 1.8 como muestras de alta pureza. Por otra parte, como una medida secundaria en la evaluación de la pureza se utiliza la ratio de 260/230 considerando los valores entre 2 y 2.2.

El primer método de extracción fue el de ebullición y se realizó a partir de cepas sembradas en los medios de cultivo. El segundo método empleando el

juego de extracción Pure link DNA kit (Invitrogen) en el cual se varió el tiempo de incubación de 30 minutos a 2 horas con intervalos de 30 minutos.

### Cebadores

Para el protocolo de estandarización de la PCR múltiple de *Campylobacter fetus fetus* se utilizaron cebadores específicos reportados por primera vez por Hum et al. (1997). Por otra parte, para la amplificación de género *Campylobacter* se emplearon las secuencias de nucleótidos que se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4.

*Cebadores específicos para la PCR múltiple para Campylobacter fetus fetus.*

Cebadores	Secuencia 5´-3´	Tamaño del amplicón (bp)	Detección de la especie
MG3F	ggtagccgcagctgctaagat	750	Campylobacter fetus
MG4R	tagctacaataacgacaact		
CFF	gcaaatataaatgtaagcggagag	435	Campylobacter fetus fetus
CFR	tgcagcggccccacctat		
23SF	tataccggaaggagtgtggag	650	Género
23SR	atcaattaacctcgagcaccg		

Tomado de Hum et al. (1997)

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el género *Campylobacter*

Previo a la estandarización de la PCR múltiple para *Campylobacter fetus fetus* se realizó una PCR para la identificación del género *Campylobacter* para lo cual se utilizaron las concentraciones de reactivos descritos en la Tabla 5 para un volumen final de 25 µL, y el ADN genómico de cada una de las extracciones (*Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*), con un control negativo de serovares de *Leptospira spp.* Para la amplificación se utilizó



el termociclador Bio-rad (EEUU), las condiciones de la PCR se muestran en la Tabla 6.

Tabla 5.

*Concentraciones y volúmenes empleados en la PCR para determinación del género Campylobacter.*

Reactivos	[ ]o	[ ]f	Volumen 1Rx (μL)
<i>H<sub>2</sub>O</i>			14,05
Tampon Green Go			
Taq ® (Promega, EEUU)	5X	1X	5
dNTPs (Invitrogen, EEUU)	10mM	0,5mM	1,25
<i>MgCl<sub>2</sub></i> (Invitrogen, EEUU)	25mM	2mM	2
23SF	10μM	1μM	0,25
23SR	10μM	1μM	0,25
Go Taq Polimerasa (Invitrogen, EEUU)	5U/μL	1U/μL	0,2
ADN			2
Total			25

[ ] o= Concentración inicial, [ ] f= Concentración final.

Tomado de: Linton, D. (1996)

Tabla 6.

*Condiciones empleadas en la PCR para determinación del género Campylobacter.*

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b># Ciclos</b>
Denaturación inicial	94°C	2	1
Denaturación final	94°C	1	
Hibridación	55°C	1	35
Elongación inicial	72°C	1	
Elongación final	72°C	8	1
Almacenamiento	4°C	∞	.....

Tomado de Linton, D. (1996)

### **Estandarización del protocolo de la PCR multiplex para especie y subespecie**

Para la PCR multiplex de *Campylobacter fetus fetus*, se realizaron ensayos de amplificación modificando las concentraciones de los componentes de la reacción y del programa de amplificación en el termociclador.

Inicialmente se probaron los cebadores por separado para corroborar que la extracción de ADN genómico se correspondía con *Campylobacter* especie *fetus* y posteriormente, de la subespecie *fetus*. Para ello se empleó una temperatura de hibridación de 60 °C.

### **Protocolo estándar**

Para la estandarización de la PCR multiplex se partió de una PCR estándar propuesta por Hum et al. en el año de 1997 cuyas condiciones se especifican en la Tabla 7 para un volumen final de 50 µL, y el ADN purificado por los dos métodos de extracción descritos en el apartado 4.4.1.1 y 4.4.1.2. El programa empleado para la amplificación se muestra en la Tabla 8.

Tabla 7.

*Concentraciones y volúmenes empleados en la PCR multiplex para determinación de Campylobacter fetus fetus.*

Reactivos	[ ]o	[ ]f	Volumen 1Rx (µL)
$H_2O$			30,8
Tampon Green Go Taq®	5X	1X	10
dNTPs	10mM	0,2mM	1
$MgCl_2$	25mM	1,5mM	3
MG3F	25µM	0,4µM	0,8
MG4R	25µM	0,4µM	0,8
CFF	25µM	0,4µM	0,8
CFR	25µM	0,4µM	0,8
Go Taq Polimerasa	5U/µL	1,5U/µL	0,25
ADN			2
Total			50

Tomado de Hum et al. (1997)

Tabla 8.

*Condiciones de la PCR multiplex para determinación de Campylobacter fetus fetus.*

Etapas	Temperatura	Tiempo (min)	# Ciclos
Denaturación inicial	96°C	1	1
Denaturación final	96°C	15SEG	
Hibridación	60°C	1	35
Elongación inicial	72°C	1:30	
Elongación final	72°C	3	1
Almacenamiento	4°C	∞	.....

Tomado de Hum et al. (1997)

## Protocolo de estandarización de la PCR multiplex

Inicialmente se ensayó un gradiente de temperatura de hibridación o temperatura de annealing con un rango de (50, 52, 54, 56, 58, 60) °C para determinar cuál era la temperatura idónea para la amplificación génica. (Tabla 3, Anexo 1)

Posteriormente, se ajustó la concentración de los cebadores desde una concentración inicial de 25 µM a 10 µM y una variación de la concentración final en un rango desde 0.10 µM a 0.20 µM con un intervalo de 0.02 µM, (Tabla 2, Anexo 2) En este ensayo también se redujo el volumen de la reacción a la mitad, para optimizar la utilización de los reactivos.

Finalmente, se realizó la optimización de la concentración de  $MgCl_2$ , para lo cual se ensayó un gradiente desde 0.5 mM hasta 2.5 mM con incrementos de 0,5 mM (Tabla 2, Anexo 3).

## Electroforesis

La comprobación de la amplificación de cada reacción de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %. Para ello se colocaron en 65 mL de tampón Tris-borato 0.5X (TBE), 0,957 g de Agar (Biomolab, México) en polvo el cual se disolvió con ayuda del horno microondas. Inmediatamente, seguida se colocó 1 µL de sybr safe (Invitrogen, EEUU) por cada 10 mL de la solución preparada. Los amplicones de la PCR fueron cargados en los pocillos del gel (10 µL), y este se colocó en una cámara de electroforesis (SENNA, México), y se empleó el marcador de peso molecular de 1 Kb para comprobar la talla del fragmento amplificado como se detalla en la Tabla 4. La migración de los amplicones se realizó en tampón TBE 0,5X en un campo eléctrico de 100V por 35 minutos. Finalmente se observó el gel en un transiluminador de luz uv (PCE, EEUU).

### Determinación de sensibilidad

Para la determinación de la sensibilidad de la PCR multiplex estandarizada para *Campylobacter fetus fetus*, primero se tomaron unas cuantas colonias de la cepa y se colocaron en PBS (2 mL) para proceder a medir la  $DO_{625nm}$ , y ajustar esta medida a 0.4U en la escala de Mc Farland, obteniendo una concentración de  $0.8 - 1.6 \cdot 10^8$  UCF / mL. Para esto se realizaron diluciones seriadas como se observa en la Figura 3 hasta llegar a 0.4U. Posteriormente se procedió a hacer diluciones seriadas uno en diez como se ve en la Figura 4 hasta determinar la mínima concentración detectable por la PCR estandarizada.

La extracción del ADN genómico de *Campylobacter fetus fetus* se realizó inmediatamente después de la inoculación en PBS, a las 0 y 24 post inoculación, con el objetivo de determinar la sensibilidad de la PCR múltiple en función del tiempo de inoculación, lo cual permite tener una referencia con respecto al tiempo que tardan las muestras clínicas en llegar al laboratorio para ser analizadas.



*Figura 3:* Diluciones de la cepa *Campylobacter fetus fetus* en PBS hasta llegar a medir 0.4U en la escala de Mc Farland, obteniendo una concentración de  $0.8 - 1.6 \cdot 10^8$  UCF / mL.

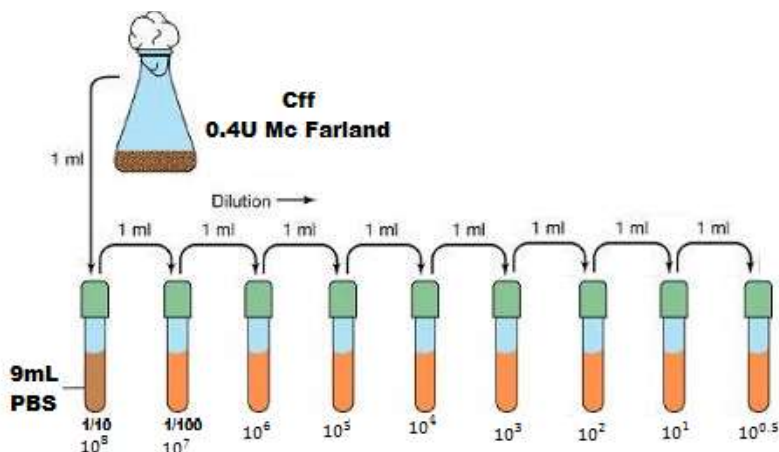


Figura 4: Diluciones 1/10 a partir de la dilución madre de 0.4U en la escala de Mc Farland con una concentración inicial de  $0.8 - 1.6 \cdot 10^8$  UCF / mL hasta llegar a una concentración final de  $0.8 - 1.6 \cdot 10^{0.5}$  UCF / mL.

Adaptado de Thatcher, F y Clark, D. (1993)

### Determinación de la especificidad

Se realizaron ensayos de la PCR multiplex previamente estandarizada utilizando ADN de diferentes cepas que infectan al ganado bovino como es el caso de serovares de *Leptospira spp*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus venerealis*, *Campylobacter fetus fetus* y herpesvirus bovino (IBR-1) para determinar la especificidad de los cebadores empleados en este protocolo.

## 5. CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Crecimiento bacteriano

Se obtuvo crecimiento de las cepas de *Campylobacter fetus fetus* en todos los medios de cultivo como se observa en la Figura 5 a una temperatura de 37 °C mientras que *Campylobacter coli* y *jejuni* crecieron a 42 °C en una atmósfera microaerófila, lo que concuerda con lo descrito por la OIE (2008) sobre las

condiciones para el desarrollo de los microorganismos en diversos medios específicos.

Dichos parámetros una vez establecidos se mantuvieron durante todos los experimentos realizados en este proyecto de investigación.

### 5.1.1 Identificación morfológica de las colonias de *Campylobacter fetus fetus*

Como se observa en la Figura 5 la cepa de *Campylobacter fetus fetus* creció en los 3 medios de cultivo específicos demostrando su efectividad, y logrando observar colonias ligeramente rosáceas y translúcidas con bordes regulares a los 3 días de incubación. Estos resultados corroboran lo expuesto por Epifane, G et al. (2007) y Marcellino, R et al. (2015) en su estudio de la eficiencia del cultivo bacteriológico en la detección de *Campylobacter fetus* en fluidos genitales bovinos.

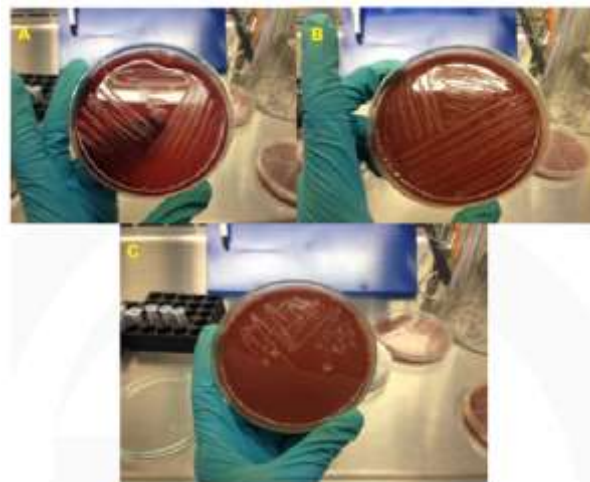


Figura 5. Cultivo de la cepa *Campylobacter fetus fetus* donada por la Universidad San Francisco de Quito, en medios específicos.

- a) Agar sangre
- b) Agar Skirrow
- c) Agar chocolate

Como se observa en la Figura 6 después de los 8 días de sembrada en la cepa existió un cambio de color de rosado a café similar al medio, confirmando así lo descrito por la OIE (2008), en relación al desarrollo óptimo de este tipo de bacterias anaerobias.

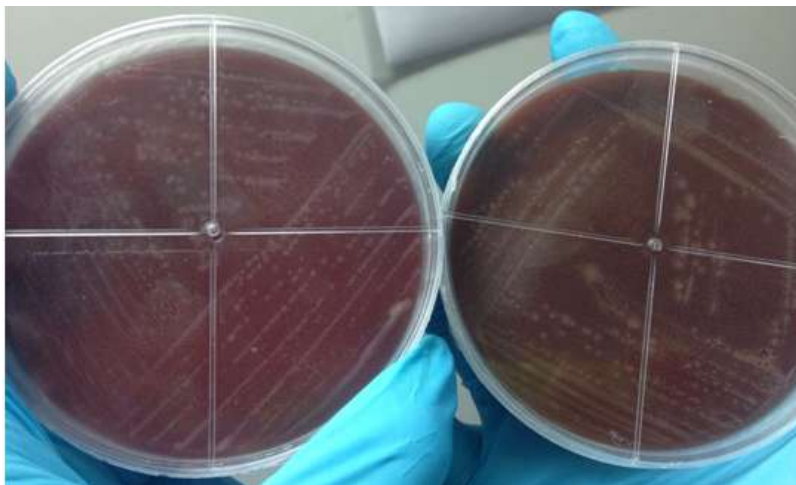


Figura 6. Cultivo de *Campylobacter fetus fetus* en Agar sangre. (Izquierda *Campylobacter fetus fetus* (3 días de cultivo), derecha *Campylobacter fetus fetus* (8 días de cultivo).

### 5.1.2 Identificación morfológica macroscópica

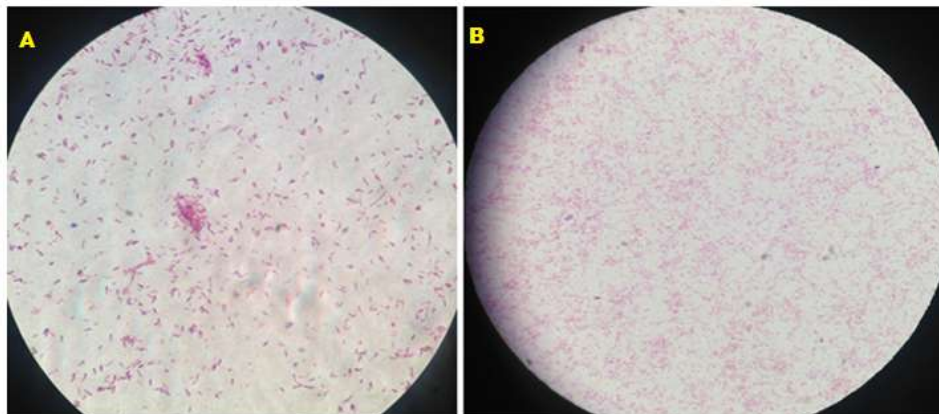
Se pudo observar cómo se muestra en la sección A de la Figura 7, un grupo de bacterias muy pequeñas en forma de S, algunas con uno o dos flagelos en sus polos lo que concuerda con lo obtenido en ensayos realizados por Orellano y sus colaboradores en el 2016 y también la OIE (2008).

También se observó a la bacteria viva en un microscopio con campo oscuro para constatar su movilidad gracias a sus flagelos, siendo esto evidencia para la identificación de la bacteria tal y como lo describe Dutra, F. (2013).

Por otra parte, como se ve en la sección B, el microorganismo cambió de una forma tipo S a una esferoidal u ovoidal, debido a mayor tiempo de sembrado,



esto debido a que éste pierde sus flagelos, como lo manifiestan Canal y Silva. (2007) en varios de sus estudios.



*Figura 7.* Morfología macroscópica de *Campylobacter* (magnificación 100X).

- a) Tinción Gram de *Campylobacter* a los 3 días de cultivo
- b) Tinción Gram de *Campylobacter* a los 8 días de cultivo

## 5.2 Pruebas bioquímicas

Todos los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas se han resumido en el Anexo 4.

### 5.2.1 Pruebas para oxidasa y catalasa

En la prueba de oxidasa *Campylobacter fetus fetus* arrojó un resultado positivo, como se observa en la Figura 8 en su sección A donde se aprecia el color azul en la parte del reactivo bactident oxidasa, debido a que el microorganismo en combinación con el reactivo pasa al citocromo C de una forma inactiva a una activa dando el cambio de coloración en la tira, reafirmando lo mencionado por Romero (2008) y la OIE (2008).

Mientras que en la sección B de la Figura 8, se observa la formación de burbujas que indican la presencia de oxígeno en la reacción, demostrando que

el microorganismo es positivo para la prueba de catalasa, y confirmando lo expuesto por Romero (2008) el cual expone que todas las especies del género *Campylobacter* son positivas a esta prueba a excepción de *Campylobacter sputorum bubulus*.

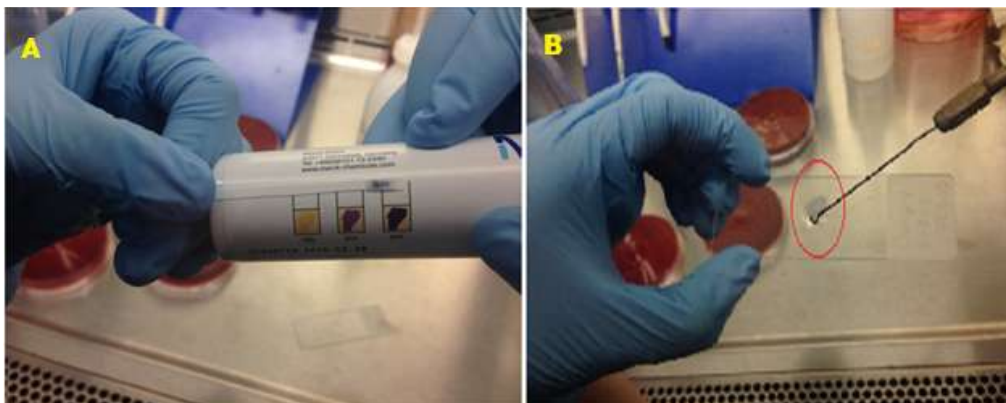


Figura 8. Pruebas para oxidasa y catalasa de *Campylobacter fetus fetus*.

- a) Prueba para la oxidasa.
- b) Prueba para la catalasa.

Los resultados obtenidos en esta investigación confirman lo reportado en la literatura de la OIE (2008), permitiendo así identificar bioquímicamente a *Campylobacter fetus fetus*, tomando en cuenta que la prueba se realizó con cultivos puros.

### 5.2.2 Cultivo en presencia de cloruro de sodio

Como se muestra en la Figura 9 *Campylobacter fetus fetus* fue negativa a la prueba de crecimiento en presencia de NaCl al 3.5%, debido a que no existió turbidez alguna a diferencia del control negativo en el cual si se observó turbidez como lo describe la OIE (2008) al hablar de este género microbiano al igual que los datos presentados por diferentes autores como Kaur et al. 2011y Vandamme et al. 2010.



Figura 9. Prueba bioquímica de crecimiento en presencia de NaCl al 3.5%.

### 5.2.3 Tolerancia a la glicina

En los 3 ensayos se obtuvieron datos similares, en el primer y segundo ensayo se mostró una tolerancia a la glicina 1,5% mientras que en el tercer ensayo se mostró una tolerancia a la glicina hasta el 1,7% a las 48 horas en iguales condiciones como se observa en la Figura 10, más un tubo control sin glicina donde la bacteria creció normalmente, debido a que *Campylobacter fetus fetus* es más resistente a este tipo de medios en comparación con *Campylobacter fetus venerealis*. Corroborando lo presentado por varios autores los cuales se describe que *Campylobacter fetus fetus* es tolerante a glicina al 1% como lo menciona la OIE (2008), o Marcellino, R. et al. (2015) que describe que llega a ser tolerante hasta 1,5 o Baldone, V. et al. (2014) el cual menciona que su tolerancia llega solo a un 1,3%. Llegando a demostrar que lo expuesto en 1982 por Kaplan, R es erróneo al decir que ninguna de las dos subespecies de *Campylobacter fetus* son tolerantes a la glicina.

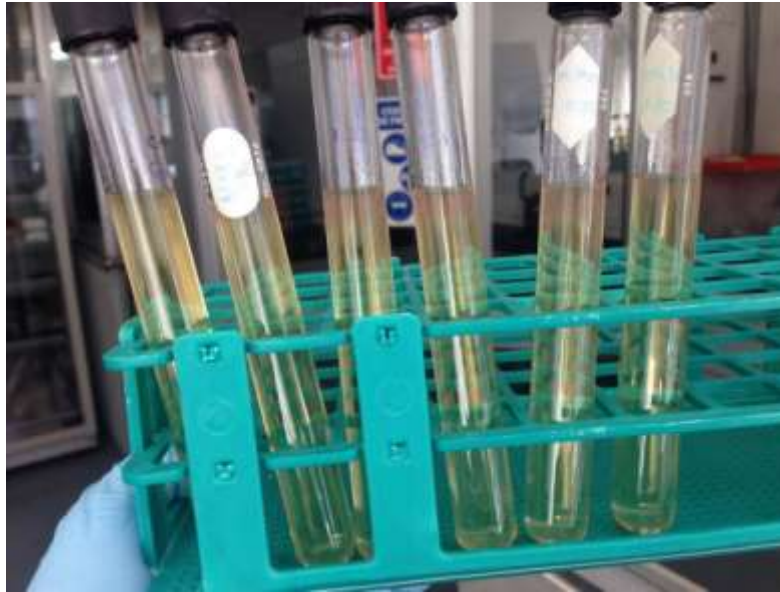


Figura 10. Prueba de tolerancia a la glicina en un medio tioglicolato con glicina al (de izquierda a derecha 1, 1.3, 1.5, 1.7, 1.9% y control) de *Campylobacter fetus fetus*.

#### 5.2.4 Producción de $H_2S$ en medio TSI

El resultado de esta prueba bioquímica en medio TSI dio un resultado negativo como se puede observar en la Figura 11, al no producir  $H_2S$  y no llegar a darse la coloración negra característica de este proceso al igual que lo reportado por la OIE (2008), y se corrobora a lo expuesto por Farace, M y Viñas, M en el 2007 al diferencias a *Campylobacter fetus fetus* de *Campylobacter hyointestinalis* el cual si es positivo al momento de producir  $H_2S$ .



*Figura 11:* Producción de  $H_2S$  en medio TSI.

### **5.3 Estandarización de las pruebas de diagnóstico molecular**

#### **5.3.1 Comparación de métodos de extracción de ADN genómico**

Por el método de ebullición se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 9, dichos resultados fueron adecuados para la realización de la PCR multiplex pese a que los valores de los ratios presentados en 260/280 son un poco más bajos del rango óptimo para evaluar la pureza de ADN según lo indicado por NanoDrop Technologies (2007); esto pudo deberse a la presencia de proteínas, fenol u otro tipo de contaminantes que pudieron estar presentes en la extracción y que absorben en o cerca de 280nm. Por otra parte, en la ratio de absorbancia 260/230 los valores bajos pudieron deberse a la presencia de contaminantes de tipo EDTA que tienen una absorbancia cerca del 230nm.

Si bien estos valores no fueron los ideales en cuanto a la cuantificación ya que por el método de extracción de ebullición no existe mayor purificación por falta de columnas y por ende se quedan sales u otro tipo de contaminantes EDTA, sin embargo, cabe recalcar que estos valores no interfirieron en la estandarización de la PCR ulterior.

Tabla 9.

*Obtención de ADN genómico de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli mediante el método de extracción de hervido.*

<b>Campylobacter</b>					
<b>Cepa</b>	<b>Absorbancia</b>				<b>[ ]ADN</b>
	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>ng/μL</b>
<b>Campylobacter</b>	0,913	0,479	1,91	0,37	45,65
<b>Jejuni</b>					
<b>Campylobacter</b>	2,462	1,395	1,76	1,33	73,12
<b>coli</b>					

Los resultados obtenidos de los métodos de extracción se pueden observar en la Tabla 10, donde podemos apreciar que los valores de 260/280 son idóneos al momento de evaluar la pureza, mientras que los valores de 260/230 no fueron los adecuados, esto puede deberse a que por el método de ebullición quedan contaminantes de tipo EDTA, mientras que por juego de extracción pudieron existir sales u otros compuestos que sean leídos en una absorbancia de 230nm, pero aunque no se encuentran en los rangos establecidos y mencionados por NanoDrop Technologies (2007) no afectaron a la estandarización de la PCR.

Tabla 10.

*Obtención de ADN genómico de Campylobacter fetus fetus por dos métodos de extracción.*

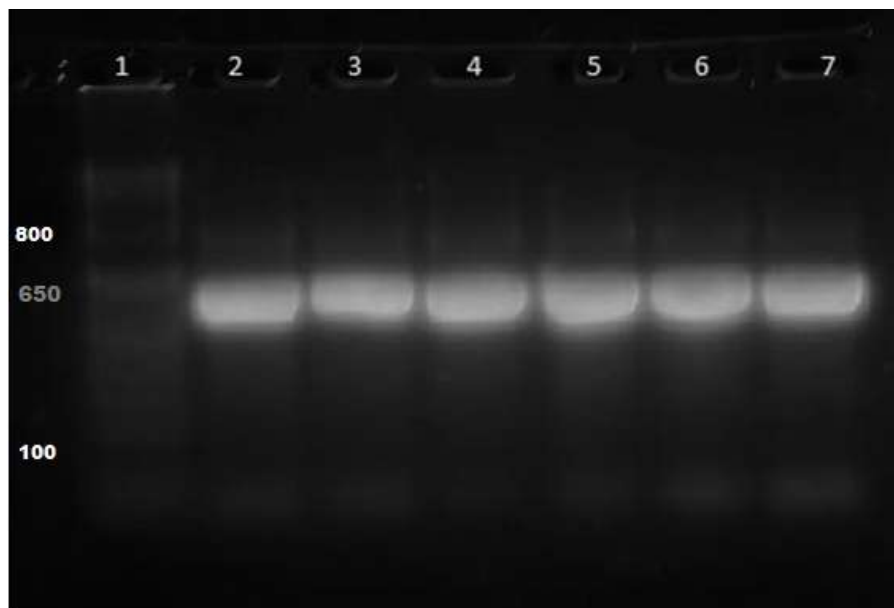
<b>Campylobacter fetus fetus</b>					
<b>Método de Extracción</b>	<b>Absorbancia</b>				<b>[ ]ADN</b>
	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>ng/μL</b>
<b>Hervido</b>	0,833	0,465	1,8	1,48	51,65
<b>Pure link DNA kit</b>	1,509	0,77	2,0	4,15	75,46

Posteriormente, al comparar estos dos métodos de extracción se observaron ventajas y desventajas de los mismos, en cuanto a la su pureza y el rendimiento del ADN. En el caso del juego de extracción Pure link DNA kit se obtiene menor cantidad de inhibidores al momento de realizar la PCR según lo reportado por McGoldrick. et al (2013), aunque es de alto costo y consume más tiempo, además en este método se utilizan solventes orgánicos como es el cloroformo, cuyos residuos pueden afectar la PCR como lo describe Carbajal, A (2013). Por otro lado, el método de extracción de ebullición resultó más factible como lo mencionan varios autores Chaban. B et al (2011) y Pasquel, S. et al (2011) ya que utiliza menos reactivos y menos tiempo puesto que se realizan procesos más simples y de igual manera se ha comprobado que el ADN obtenido es viable por un largo período de tiempo, al igual que reduce significativamente los costos (Peng, X. 2013).

### **5.3.2 PCR simple del género *Campylobacter***

El resultado obtenido de la PCR realizada por Linton (1996), se observa en la Figura 12. Como se aprecia en esta, se observa con intensidad una banda de 650 pb, correspondientes a un segmento de la subunidad 23S de ARN del género *Campylobacter*. En esta PCR se emplearon los cebadores 23SF y 23SR los cuales resultaron ser idóneos ya que funcionaron con una cantidad mínima de ADN como lo menciona Wang et al. en el 2002.

Por otra parte, cabe mencionar, que adicionalmente se observa tenuemente un fragmento de aproximadamente 800 pb, el cual es una amplificación inespecífica de este protocolo, por lo que la presencia de esta demuestra que la técnica de PCR puede ser re estandarizada para mejorar las condiciones de la misma y evitar este tipo de amplificaciones.



*Figura 12.* Electroforesis en gel de agarosa de 1,5% de la PCR para amplificación del fragmento de 650pb de un segmento la subunidad 23S del ARN ribosomal.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen, EEUU)
- b) Carril 2 – 3: Controles positivos (*C. coli*, *C. jejuni*)
- c) Carril 4: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (método de extracción de ebullición).
- d) Carril 5-7: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (juego de extracción Pure link DNA de Invitrogen con un tiempo de incubación de 30, 60 y 120 minutos respectivamente).

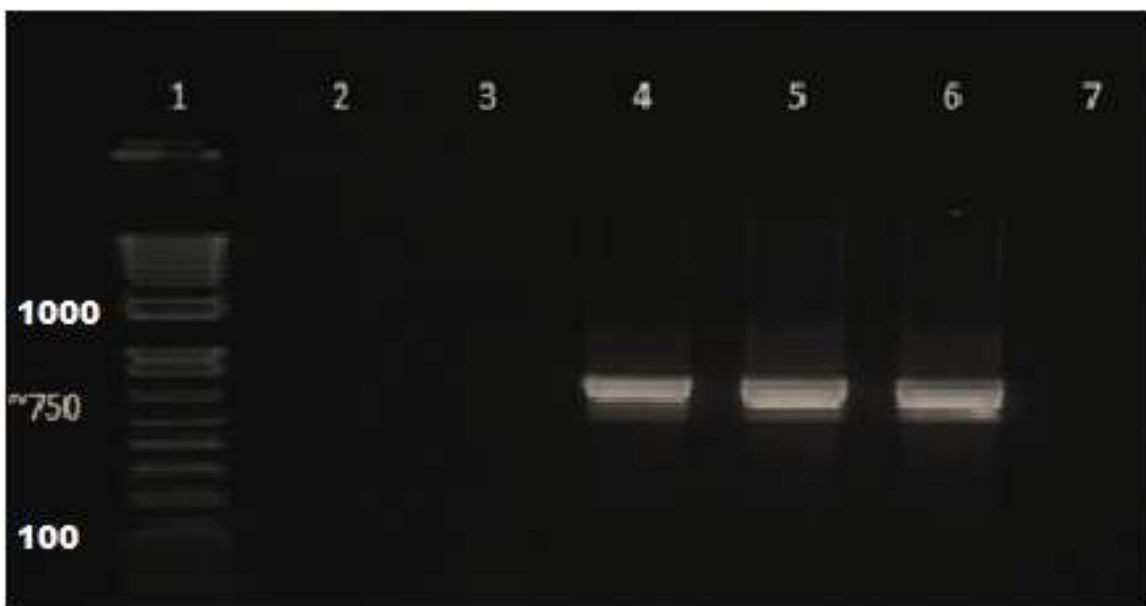
### 5.3.3 PCR simple de especie *Campylobacter fetus*

El resultado de la PCR simple para la detección de la especie *Campylobacter fetus* arrojó un amplicon de aproximadamente 750 pb como se observa en la Figura 13. Estos resultados concuerdan con los antes mencionados por Willoughby, K (2005) y Bagon de Mococa, A (2006), a diferencia de los datos reportados por Hum. S, et al. (1997), On. S, et al (2001), Vargas. A. et al (2003) que mencionan que el peso del amplicon es de 960pb.



Cada mencionar, que debido a la baja resolución de la imagen no se puede analizar la presencia de otros productos inespecíficos, tales como los encontrados por otros autores.

Aunque no existe ninguna investigación que demuestre los motivos exactos de esta diferencia, la explicación más probable son nuevas variantes de cepas de *Campylobacter fetus* cada una de ellas en diversos países, aunque esta teoría aún no ha sido comprobada.

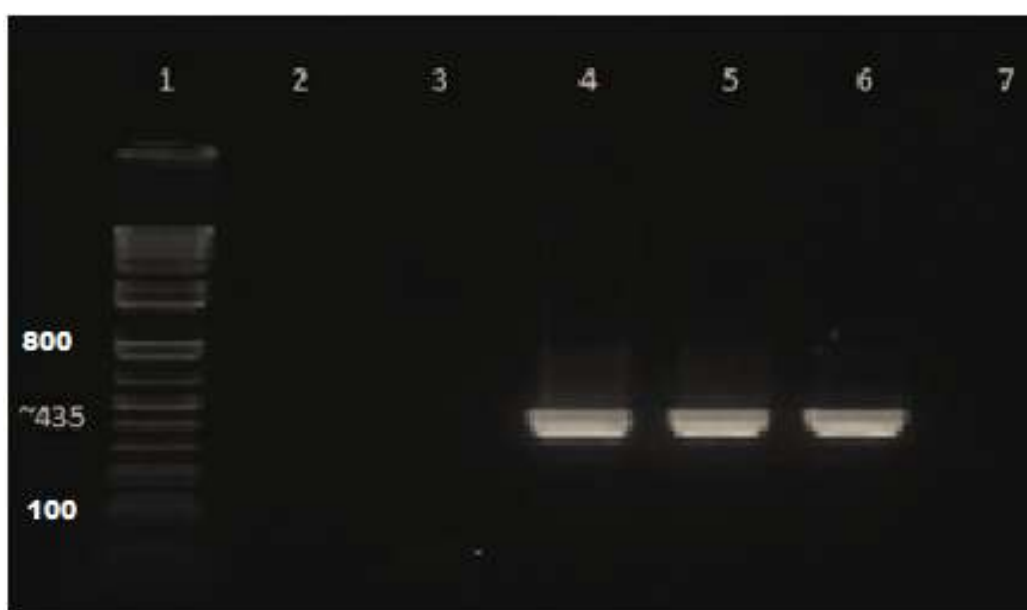


*Figura 13.* Electroforesis en gel de agarosa de 1,5% de la PCR para amplificación del fragmento de 750pb del gen de proteína de inanciación de carbono.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen, EEUU)
- b) Carril 2 – 3: Controles negativos (*C. coli*, *C. jejuni*)
- c) Carril 4: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (método de extracción de ebullición).
- d) Carril 5-6: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (juego de extracción Purelink DNA de Invitrogen a los 30, 120 minutos respectivamente).
- e) Carril 7: control negativo

### 5.3.4 PCR simple de la subespecie *Campylobacter fetus fetus*

En el caso de los cebadores CFF y CFR para la subespecie *fetus* se realizó la misma prueba como se observa en la Figura 14, y se obtuvieron amplicones de un peso molecular de 435 pb, lo cual demuestra que la cepa donada por la Universidad San Francisco de Quito efectivamente es *Campylobacter fetus fetus*, al igual que se demuestra que el método de extracción de ebullición es útil para la amplificación de fragmentos de interés por la técnica de PCR.



**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa de 1,5% de la PCR para amplificación del fragmento de 435pb del gen *sapB2*.

- Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen, EEUU)
- Carril 2 – 3: Controles negativos (*C. coli*, *C. jejuni*)
- Carril 4: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (método de extracción de ebullición).
- Carril 5-6: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (juego de extracción Pure link DNA de Invitrogen a los 30, 120 minutos respectivamente).
- Carril 7: control negativo

### 5.3.5 Estandarización del protocolo de PCR múltiple para *Campylobacter fetus fetus*

#### 5.3.5.1 Amplificación estándar de la PCR múltiple

El resultado de la PCR estándar empleando los cebadores MG3F, MG4R, CFF y CFR mostraron excelentes resultados en la amplificación como lo refieren trabajos previos (Hum et al., 1997, Vargas et al., 2003), demostrando que el amplicón empleando el par de cebadores MG3F y MG4R permite identificar la especie *fetus*, mientras que los cebadores CFF y CFR amplifican un fragmento específico de la subespecie *fetus*, posibilitando así identificar especie y subespecie y a su vez diferenciarla de la subespecie *venerealis* (Wang et al., 2002).



*Figura 15.* Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de la PCR para amplificación del fragmento de 750pb para especie *fetus* y de 435pb para subespecie *fetus*.

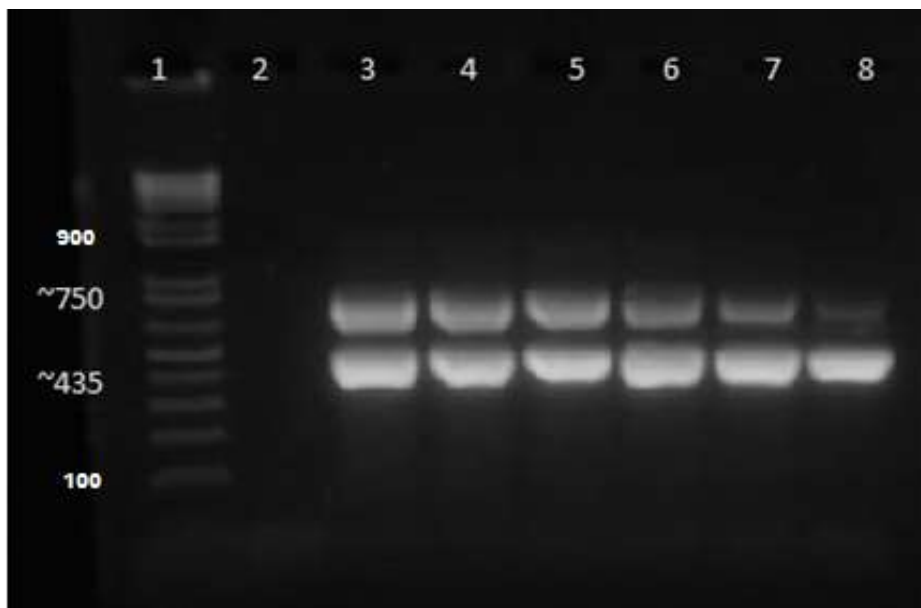
- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen, EEUU)
- b) Carril 2: Control negativo
- c) Carril 3 - 5: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (método de extracción de ebullición a partir de una cepa cultivada en Agar sangre).
- d) Carril 6 - 8: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (juego de extracción Pure link DNA de Invitrogen a los 30, 60 y 120 minutos respectivamente).

### **5.3.5.2 Estandarización de la PCR múltiple**

#### **5.3.5.2.1 Determinación de la temperatura de hibridación**

En el gradiente de temperatura de hibridación se obtuvieron los resultados que se observan en la Figura 16, de los cuales se seleccionó la temperatura de hibridación de 50 °C, ya que es en la que se visualizan mejor las dos bandas. Según lo reportado por Bagon de Mococa. A (2006), esta resultó en una adecuada amplificación de los fragmentos de interés, sin embargo, Tu et al., 2008 proponen la reducción de la temperatura de hibridación sea 54 o 50 °C e indican que temperaturas más altas podrían afectar la sensibilidad de la PCR múltiple.

Según lo reportado por Barletta, F. et al (2013) la temperatura de 60°C es idónea para PCR simple, pero al utilizarse en una múltiple podría producir una disminución de la eficiencia en la reacción en los cebadores de especie como se observa en la Figura 16.

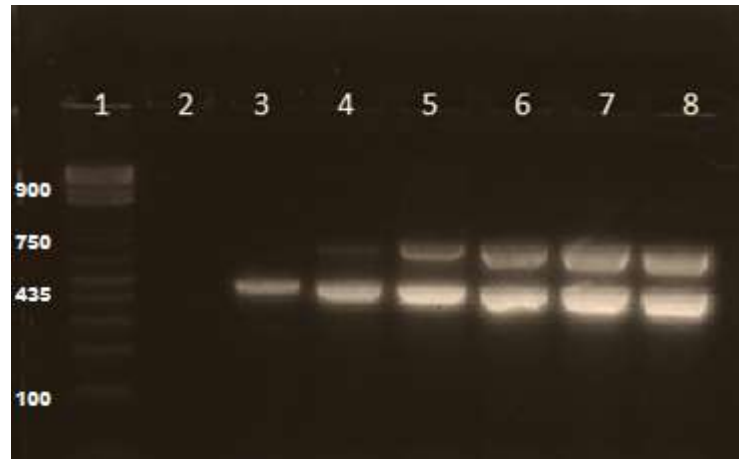


*Figura 16.* Electroforesis en gel de agarosa del 1,5% de la PCR del gradiente de temperatura de hibridación. Amplicones de 750pb para especie *fetus* y de 435pb para subespecie *fetus*.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen, EEUU)
- b) Carril 2: Control negativo
- c) Carril 3 - 8: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (50, 52, 54, 56, 58 y 60°C respectivamente)

#### 5.3.5.2.2 Determinación de la concentración de cebadores

En el gradiente de cebadores se obtuvo el mejor resultado de amplificación para ambas bandas, a la concentración final de 0,16 $\mu$ M generando menos dímeros, bandas claras y del peso molecular correcto. En este experimento se utilizó la temperatura previamente estandarizada, la cual resulto conveniente para ambos pares de cebadores, como se observa en la Figura 17. Corroborando lo expuesto por (Poma.2014) y Bagon de Mococa. A (2006) indicando que la concentración inicial utilizada en sus investigaciones fue de 25  $\mu$ M, pero la reduce a 10  $\mu$ M, obteniendo buenos resultados.



*Figura 17.* Electroforesis en gel de agarosa de 1,5% para el gradiente de cebadores: amplicones de fragmentos de 750pb para especie *fetus* y 435pb para subespecie *fetus*.

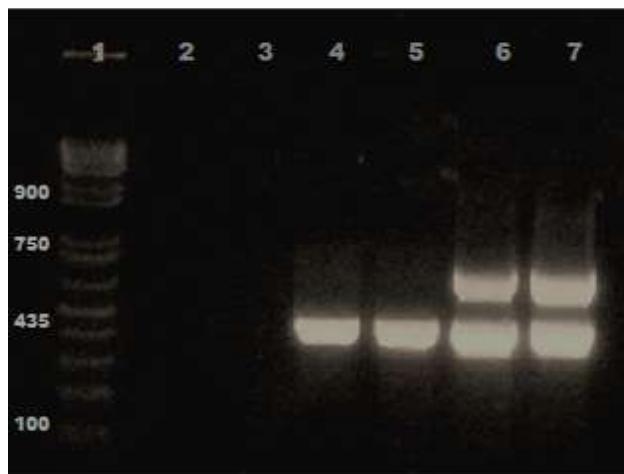
- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb. (Invitrogen, EEUU)
- b) Carril 2: Control negativo.
- c) Carril 3 - 8: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (con concentraciones finales de cebadores de 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20 $\mu$ M respectivamente).

### 5.3.5.2.3 Determinación de la concentración de cloruro de magnesio

Como se observa en la Figura 18 la mejor concentración de  $MgCl_2$  fue de 2 mM, ya que se observan las dos bandas, a diferencia de las concentraciones menores en las cuales no aparece la banda de especie, lo cual también demuestra que los cebadores de especie son muy sensibles a la cantidad de  $MgCl_2$  empleado en la reacción. Demostrando que lo mencionado por (Dey, S. 2004) de que con poca concentración de  $MgCl_2$  afecta el rendimiento de la reacción.

Es fundamental la optimización de iones de magnesio, ya que estos pueden dañar el alineamiento de los cebadores y la sensibilidad de la reacción propiciando la formación de dímeros de cebadores en la misma. Este reactivo es importante para el buen funcionamiento de la enzima Go Taq polimerasa ya

que esta requiere magnesio libre para poder unirse con el resto de reactivos (cebadores y dNTPs) como lo describe Cortazar, A & Silva, E. (2004).

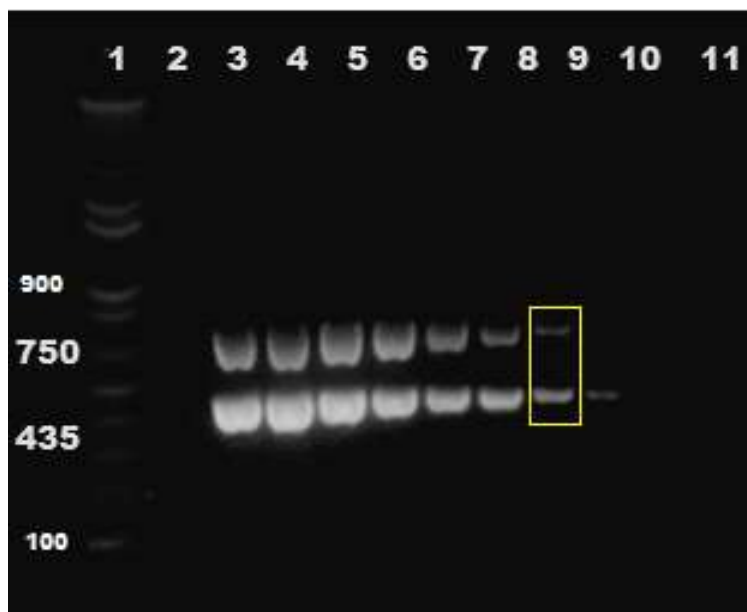


*Figura 18.* Electroforesis en gel de agarosa de 1,5% para el gradiente de  $MgCl_2$ : amplicones de fragmentos de 750pb para especie *fetus* y 435pb para subespecie *fetus*.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb. (Invitrogen, EEUU)
- b) Carril 2: Control negativo.
- c) Carril 3 - 7: control positivo de *Campylobacter fetus fetus* (una concentración final de  $MgCl_2$  de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5mM respectivamente).

### 5.3.6 Sensibilidad

El resultado obtenido es una concentración mínima de 80 - 160 UCF/mL a las 0 horas de realizada la inoculación como se muestra en la Figura 19. Se observa también que en diluciones menores se pierde la amplificación de los cebadores de especie. Estos resultados son muy positivos ya que se encuentran por debajo de los antes reportados por Janssen R (2008) al mencionar que *Campylobacter* puede infectar con dosis muy bajas desde 500 a 800 UFC.



*Figura 19.* Electroforesis en gel de agarosa de 1,5% con amplicones de fragmentos de 750pb para especie *fetus* y 435pb para subespecie *fetus*, para sensibilidad a las 0 horas de la extracción.

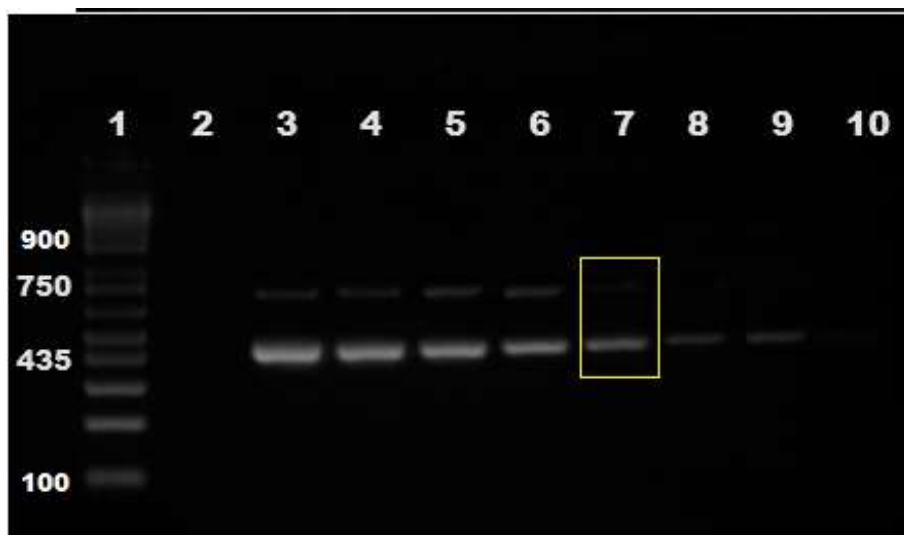
- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb. (Invitrogen, EEUU)
- b) Carril 2: Control negativo.
- c) Carril 3: Control positivo de *Campylobacter fetus fetus*
- d) Carril 4 - 11: Diluciones seriadas de *Campylobacter fetus fetus* (desde  $10^8$  hasta  $10^2$ UFC/mL).

Es importante destacar que los métodos empleados fueron previamente estandarizados por autores como Iraola, G. et al (2012), especialmente en el número de bacterias cultivables de *Campylobacter fetus fetus* por ml de inóculo. Por lo que en cada ensayo se verificó la concentración del inóculo inicial (0.4U) en la escala de McFarland.

Como se observa en la Figura 20, tras 24 horas de su inoculación, para la extracción del ADN del microorganismo el ensayo muestra una sensibilidad menor, en especial, en la identificación de especie pues la reacción es más sensible a cambios tanto de reactivos como al tiempo de extracción del ADN post inoculación. Para este ensayo se obtuvo una concentración mínima de 8000 - 16000 UFC/mL. Esta prueba se realizó por necesidades del Laboratorio



de diagnóstico animal de AGROCALIDAD, tomando como referencia un trabajo previo realizado por Moreno, N y Agudelo, P en el 2010 referente a otra bacteria zoonótica que afecta el ganado bovino: la *Leptospira*, la reacción para la identificación del microorganismo en esta investigación mostró una sensibilidad de 1600 después de 24 horas post inoculación.



*Figura 20.* Electroforesis en gel de agarosa de 1,5% con amplicones de fragmentos de 750pb para especie *fetus* y 435pb para subespecie *fetus*, para determinación de la sensibilidad a las 24 post inoculación.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb.
- b) Carril 2: Control negativo.
- c) Carril 3: Control positivo de *Campylobacter fetus fetus*
- d) Carril 4-11: Diluciones seriadas de *Campylobacter fetus fetus* (desde  $10^8$  hasta  $10^4$  UFC/mL).

### 5.3.7 Especificidad

Como se muestra en la Figura 21, el protocolo de PCR multiplex tiene una alta especificidad, amplificando el control positivo de *Campylobacter fetus fetus*, y la cepa de *Campylobacter fetus venerealis* en la cual solo se observa la banda de especie, debido a las secuencias de los cebadores empleados en la misma, ya que estos fueron diseñados exclusivamente para la detección de esta especie y

subespecie. Tomando en consideración la temperatura de hibridación escogida, la concentración de iones de magnesio empleados en la reacción y que todos estos microorganismos estaban en similares límites de detección, por lo que no existe amplificación en el caso de las demás extracciones de ADN de las distintas bacterias y virus las cuales pueden estar presentes en las muestras clínicas de los reproductores bovinos. Como lo menciona Willoughby. K, (2005) y (OIE. 2008) en sus investigaciones.



*Figura 21.* Electroforesis en gel de agarosa de 1,5% para la especificidad de los cebadores en la reacción con amplicones de fragmentos de 750pb para especie *fetus* y 435pb para subespecie *fetus*.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb. (Invitrogen, EEUU)
- b) Carril 2: Control negativo.
- c) Carril 3: Control positivo de *Campylobacter fetus fetus*
- d) Carril 4: *Campylobacter fetus venerealis*
- e) Carril 5: *Campylobacter coli*
- f) Carril 6: *Campylobacter jejuni*
- g) Carril 7: *Leptospira spp.*
- h) Carril 8: *Herpesvirus bovinum* (IBR-1).

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

El método de extracción de ebullición resultó más económico y factible para la estandarización de la PCR multiplex de *Campylobacter fetus fetus* debido a que utiliza menos reactivos y tiempo, obteniéndose resultados óptimos en la amplificación.

La PCR múltiple estandarizada permite la identificación de la especie *fetus* y subespecie *fetus* de *Campylobacter*, con alta sensibilidad y especificidad.

Los resultados de sensibilidad de la técnica tanto a las 0 como a las 24 horas post inoculación son aceptables para los estándares de AGROCALIDAD, siendo de tanto 80 -160 UFC/mL y tanto 8000 – 16000 UFC/mL respectivamente.

Los cebadores MG3F y MG4R son específicos para el gen proteico de inanición de carbono y los cebadores CFF y CFR para los genes sapB2, de acuerdo a lo mostrado en los resultados de la PCR múltiple estandarizada.

Los cebadores MG3F y MG4R para la determinación de la especie *fetus* resultaron más sensibles a cambios en algunos parámetros como son el cloruro de magnesio y la temperatura de hibridación en comparación con los cebadores CFF y CFR para la determinación de la subespecie *fetus*.

### 6.2 Recomendaciones

Analizar la estandarización de la PCR simple del género *Campylobacter* para evitar las amplificaciones inespecíficas.

Emplear un fotodocumentador para hacer un análisis más fiable.

Validar la PCR múltiple estandarizada con muestras clínicas.

Promover el uso de la PCR multiplex estandarizada para el diagnóstico de *Campylobacter fetus fetus* en el Ecuador.

Realizar estudios de variabilidad genética de *Campylobacter fetus fetus* dentro del país.

Incluir la subespecie *Campylobacter fetus venerealis* en análisis ulteriores empleando la PCR múltiple.

## REFERENCIAS

- Abril. C., Vilei, E.M., Brodard, I., Burnens, A., Frey, J., Miserez, R., (2007). *Discovery of insertion element ISCfe1: a new tool for Campylobacter fetus subspecies differentiation*. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13 993–1000.
- Anon. (2012). *OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Bovine Genital Campylobacteriosis. 661–669.
- Aznar, MN., Samartino, LE., Humblet, MF., Saegerman, C. (2012). *Bovine Brucellosis in Argentina and Bordering Countries: Update*. Transbound Emerg Dis. doi: 10.1111/tbed.12018.
- Bagon de Mococa, A. (2006). *Untersuchungen zu Nachweis und Differenzierung von Campylobacter fetus subsp. venerealis beim Rind mit konventionellen und molekularbiologischen Methoden*. Facultad de veterinaria de la Universidad de Leipzig- Alemania. Recuperado el 5 de mayo del 2017 de: [https://www.researchgate.net/publication/44232352\\_Untersuchungen\\_zu\\_Nachweis\\_und\\_Differenzierung\\_von\\_Campylobacter\\_fetus\\_subsp\\_venerealis\\_beim\\_Rind\\_mit\\_konventionellen\\_und\\_molekularbiologischen\\_Methoden](https://www.researchgate.net/publication/44232352_Untersuchungen_zu_Nachweis_und_Differenzierung_von_Campylobacter_fetus_subsp_venerealis_beim_Rind_mit_konventionellen_und_molekularbiologischen_Methoden)
- Baldone, V. Fort, M & Urquiza, L. (2014). *Caracterización bioquímica y molecular de cepas de Campylobacter fetus aisladas de toros infectados naturalmente, provincia de La Pampa, Argentina*. La Pampa- Argetina. Recuperado el 6 de diciembre del 2016 de: [http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_pt97\\_salud\\_publica\\_veterinaria.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_pt97_salud_publica_veterinaria.pdf)
- Barletta, F. Mercado, E. H., Lluque, A., Ruiz, J., Cleary, T. G., & Ochoa, T. J. (2013). *Multiplex Real-Time PCR for Detection of Campylobacter, Salmonella, and Shigella*. Journal of Clinical Microbiology, 51(9), 2822–2829. doi:10.1128/JCM.01397-13

- Campero, CM., Anderson, ML., Walker, RL., Blanchard, PC. 2005. *Immunohistochemical identification of campylobacter fetus in natural cases of bovine and ovine abortions*. Patología veterinaria, instituto nacional de tecnología agropecuaria, Balcarce, Argentina. J. Vet. Med. B 52: 138–141.
- Campero, C.M.; Morrell, E.; Morsella, C.; Paolicchi, F.; Cano, D.; Lázaro, L. (2010). Detección de anticuerpos séricos en toros inmunizados contra campylobacteriosis. Campylobacteriosis en toros. Rev. vet. 21: 1, 8–12.
- Canal, V & Silva, F. (2007). Estudio para la implementación del análisis de *Campylobacter spp* según la metodología USDA/FSIS MLG. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Carrera de Microbiología Industrial. Rancagua – Chile.
- Carbajal, A. (2013). Extracción y purificación de ADN. Rutgers University, New Jersey, United States. DOI //dx.doi.org/10.13070/mm.es.3.191
- Cattaneo, M. y Bermúdez, J. Vibriosis genital bovina. Laboratorios Santa Elena, Uruguay. 2007; Disponible en el URL: <http://www.produccionanimal.com.ar>
- Catena, M. Soto, P., Monteavaro, C., Echevarría, H. y Racciatti, M. 2006. Infección persistente de *Campylobacter fetus fetus* en hembra bovina preñada. Dpto. de Sanidad Animal y Medicina Preventiva Fac. Cs. Vet. U.N.C.P.B.A.
- Cerda, M. (2010). *Campylobacter agente emergente zoonosis y la importancia de la salud pública*. Recuperado el 09 de Noviembre de 2016, de Universidad de Barcelona: [https://www.ruralcat.net/c/document\\_library/get\\_file?uuid=f3ea5522-bcb8-49e9-a](https://www.ruralcat.net/c/document_library/get_file?uuid=f3ea5522-bcb8-49e9-a)
- Chu.S, Hendrick.S, Waldner.C, Hill. J. (2011). *Evaluation of a Campylobacter fetus subspecies venerealis real- time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples*. Department of Veterinary Microbiology; Departament of Large Animal Clinical Sciences, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan.76:166-173.

- Chaban, B. Chu, S. Hendrick, S. Waldner, C. Hill, J. (2012). *Evaluation of a Campylobacter fetus subspecies venerealis real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples*. The Canadian Journal of Veterinary Research. 76:166–173.
- Córdova, A, Iglesias, A, Guerra, J, Villa, A, Olivares, J, Juárez, M, Sanchez, P. (2015). Campilobacteriosis Genital Bovina: Enfermedad reproductiva de gran importancia. 2-14 Recuperado el 1 de Noviembre del 2016 de [http://www.ganaderia.com/uploads/temp/Articulo\\_Campilobacteriosis\\_Genital\\_Bovina\\_Enfermedad\\_reproductiva\\_de\\_gran\\_importancia%2812%29.pdf](http://www.ganaderia.com/uploads/temp/Articulo_Campilobacteriosis_Genital_Bovina_Enfermedad_reproductiva_de_gran_importancia%2812%29.pdf)
- Cortazar, A & Silva, E. (2004). Métodos fisicoquímicos en biotecnología. Instituto de biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México DC-México. Recuperado el 5 de mayo del 2017 de: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Dey, S. K., Nishimura, S., Okitsu, S., Hayakawa, S., Mizuguchi, M., & Ushijima, H. (2012). *Comparison of immunochromatography, PCR and culture methods for the detection of Campylobacter bacteria*. Journal of Microbiological Methods, 91(3), 566–568. doi:10.1016/j.mimet.2012.09.034
- Dutra, F. (2013). Diagnostico de laboratorio de las principales enfermedades reproductivas de los bovinos en Uruguay. Seminario de actualización técnica: *Cría Vacuna*.
- EFSA, *Analysis of the baseline survey on the prevalence of Campylobacter in broiler batches and of Campylobacter and Salmonella on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: Campylobacter and Salmonella prevalence estimates* EFSA Journal, 2010. 8(03): p. 1503-1603.
- ESPAC. (2015). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. Recuperado el 5 de diciembre del 2016 de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec//documentos/webinec/Estadistica>

- s\_agropecuarias/espac/espac\_2014-2015/2015/Presentacion%20de%20resultados%20ESPAC\_2015.pdf
- Epifane, G., Barbon, S., Sadino, G., Bouchet, D., Suárez, M. E., & Mangiaterra, S. (2007). Bacteriemia por *Campylobacter fetus* aislado mediante métodos convencionales de una paciente inmunocomprometida. *Revista argentina de microbiología*, 39(1), 34-37.
- Farace, M & Viñas, M. (2007). Manual de procedimientos para el aislamiento y caracterización de *Campylobacter spp.* Departamento Bacteriológico del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Recuperado el 5 de Abril del 2017 de: [http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual\\_Campylobacter\\_31-08-2007.pdf](http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual_Campylobacter_31-08-2007.pdf)
- Fernández, H. (2011). *Campylobacter* y campilobacteriosis: una mirada desde América del Sur. Instituto de Microbiología clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. Valdivia- Chile. Recuperado el 5 de diciembre del 2016 de: [http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342011000100019](http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342011000100019).
- Gharst, G., Oyarzabal, O. A., & Hussain, S. K. (2013). *Review of current methodologies to isolate and identify Campylobacter spp. from foods.* *Journal of microbiological methods*, 95(1), 84-92.
- Grogono, R., Blaser, M., Ahmadi, M & Newell, D. 2003. *Role of S-layer protein antigenic diversity in the immune responses of sheep experimentally challenged with Campylobacter fetus subsp. fetus.* *Infect. Immun.* 71:147-154
- Guzmán. (2011). Seminario de actualización técnica "Enfermedades que afectan a la reproducción en bovinos". Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay.
- Harwood, L.J., Thomann, A., Brodard, I., Makaya, P.V., Perreten, V., (2009). *Campylobacter fetus subsp. venerealis transport medium for enrichment and PCR.* *Vet. Rec.* 165, 507–508.



- Hormeño García, L. (2016). Resistencia frente a los antimicrobianos de mayor interés clínico en cepas de " *Campylobacter*" aisladas del hombre y los animales.
- Hum. S., Quinn, K., Brunner, J. and On, S.L. (1997) *Evaluation of aPCR assay for identification and differentiation of Campylobacter fetus subspecies. Aust Vet J* 75, 827–831.
- INS (Instituto Nacional de Salud), UERIA, (Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos), & MINSALUD, (Ministerio de Salud y la Protección Social). (2013). *Perfil de Riesgo de Campylobacter spp. en Pollos de Engorde*. (V. Garcés, B. Klotz, J. Mantilla, R. Ramírez, & J. Romero, Eds.) (1st ed.). Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia.
- Iraola, G., Hernández, M., Calleros, L., Paolicchi, F., Silveyra, S., Velilla, A. Pérez, R. (2012). *Application of a multiplex PCR assay for Campylobacter fetus detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. Journal of Veterinary Science*, 13(4), 371–376. <http://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.4.371>
- Ivanova, M., Singh, R., Dharmasena, M., Gong, C., Krastanov, A., & Jiang, X. (2014). *Rapid identification of Campylobacter jejuni from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR. Poultry Science*, 93(6), 1587–1597. doi:10.3382/ps.2013-03736
- Janssen, R., Krogfelt, K. A., Cawthraw, S. A., van Pelt, W., Wagenaar, J. A., & Owen, R. J. (2008). *Host-pathogen interactions in Campylobacter infections: the host perspective. Clinical microbiology reviews*, 21(3), 505-518.
- Jiménez, DF. Perez AM, Carpenter TE, Martinez A. (2011) *Factors associated with infection by Campylobacter fetus in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. Prev Vet Med.* 101:157–162.
- Kaur, T., Singh J., Huffman M.A., Petrzalkova K.J., Taylor N.S., Xu S., Dewhirst F.E., Paster B.J., Debruyne L., Vandamme P. and others. 2011. *Campylobacter troglodytis sp. nov., isolated from feces of human-*

- habituated wild chimpanzees (Pan troglodytes schweinfurthii) in Tanzania.* Appl Environ Microbiol 77: 2366-73
- Kaplan, R. L., Goodman, L. J., Barrett, J. E., Trenholme, G. M., & Landau, W. (1982). *Comparison of rectal swabs and stool cultures in detecting Campylobacter fetus subsp. jejuni.* Journal of clinical microbiology, 15(5), 959-960.
- Koneman. E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (2013). *Diagnóstico microbiológico, Texto y Atlas en Color.* (6a ed.). Mexico: Panamericana Editorial.
- Lapierre, L. (2013). Factores de Virulencia asociados a especies zoonóticas de *Campylobacter spp.* *Avances En Ciencias Veterinarias*, 28(1), 25–31. doi:10.5354/0719-5273.2013.27866. Recuperado el 5 de Abril del 2017 de: file:///C:/Users/pc/Downloads/27866-93885-1-PB.pdf
- Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). *Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations.* *Frontiers in Microbiology*, 5(January), 1–19. doi:10.3389/fmicb.2014.00770
- Leblanc-Maridor, M., Beaudreau, F., Seegers, H., Denis, M., & Belloc, C. (2011). *Rapid identification and quantification of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni by real-time PCR in pure cultures and in complex samples.* *BMC microbiology*, 11(1), 113.
- Levin, R.E., *Campylobacter jejuni: A review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection.* Food Biotechnology, 2007. 21(3-4): p. 271-347.
- Madoroba, E., Gelaw, A., Hlokwe, T., & Mnisi, M. (2011). *Prevalence of Campylobacter foetus and Trichomonas foetus among cattle from Southern Africa.* *African Journal of Biotechnology*, 10(50), 10311-10314.
- MAGAP. (2015). Ecuador país libre de fiebre aftosa. Recuperado el 5 de Diciembre del 2016 de: <http://www.agricultura.gob.ec/ecuador-recibecertificados-de-pais-libre-de-fiebre-aftosa/>

- Mai, H. Irons, P. Kabir, J. Thompson, P. (2013). *Prevalence of bovine genital campylobacteriosis and trichomonosis of bulls in northern Nigeria*. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55:56
- Marcellino, R. B., Morsella, C. G., Cano, D., & Paolicchi, F. A. (2015). Eficiencia del cultivo bacteriológico y de la inmunofluorescencia en la detección de *Campylobacter fetus* en fluidos genitales bovinos. *Revista argentina de microbiología*, 47(3), 183-189.
- McGoldrick, A, Chanter. J, Gale. S, Parr. J, Toszeghy. M, Line, K. (2013). *Real Time PCR to detect and differentiate Campylobacter fetus subspecies fetus and Campylobacter fetus subspecies venerealis*. Animal health and veterinary laboratories Agency Starcross, United kingdom. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.014>
- Medina Santana, J. L. (2015). *Cuantificación de Campylobacter spp. en un matadero Semi-industrial de aves, y posterior identificación de especies (C. jejuni y C. coli) mediante técnicas de Diagnóstico Molecular* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Mera, P. (2013). Evaluación de la calidad de la leche mediante citometría de flujo, proveniente de bovinos de la parroquia machachi, provincia de pichincha. Universidad de las fuerzas armadas. ESPE. Recuperado el 8 de diciembre del 2016 de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7465/1/T-ESPE-047485.pdf>
- Moolhuijzen, P. Lew-Tabor, A.E., Wlodek, B.M., Agüero, F.G., Comerci, D.J., Ugalde, R.A., Sanchez, D.O., Appels, R., Bellgard, M., (2009). *Genomic analysis of Campylobacter fetus subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets*. *BMC Microbiol.* 9, 86. Recuperado el 9 de Noviembre del 2016 de: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/86>
- Moreno, N., & Agudelo-Flórez, P. (2010). Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 27(4), 548-556.

- Mshelia, G. D., Amin, J. D., Woldehiwet, Z., Murray, R. D., & Egwu, G. O. (2010). *Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques*. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5), e221-e230.
- Mshelia, GD. Amin JD, Egwu GO, Woldehiwet Z, Murray RD. (2012). *The prevalence of bovine venereal campylobacteriosis in cattle herds in the Lake Chad basin of Nigeria*. *Trop Anim Health Prod*. 44:1487–1489.
- OIE. (2008). *Campylobacteriosis genital bovina*. Recuperado el 5 de diciembre del 2016 de: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.04.05.%20Campylobacter%20g.%20bovina.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.04.05.%20Campylobacter%20g.%20bovina.pdf)
- OMS. (2011). *Campylobacter*. 255. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/index.html>
- On, S. & Harrington, C. (2001). *Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating Campylobacter fetus subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods*. *J. Appl. Microbiol.* 90:285-293.
- Orellano, R. Preisegger, G. Echevarria, H. (2016). *Agentes infecciosos causales de aborto de presentación frecuente en bovinos*. (Tesis de pregrado, UNCPBA). Recuperado el 28 de Noviembre del 2016 de <http://ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/621/Tesis%20Orellano%20Roc%20C3%ADo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Oyarzabal, O.A., Wesley, I.V., Harmon, K.M., Schroeder-Tucker, L., Barbaree, J.M., Lauerman, L.H., Backert, S., Conner, D.E., (2007). *Specific identification of Campylobacter fetus by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA*. *Vet. Microbiol.* 58, 61–71.
- Pasquel, S. Casa, E. Huanca, W. Lopera, L & Huanca, T. (2011). *Determinación de la presencia de Campylobacter fetus subsp. Venerealis en alpacas y llamas en la zona de puno*. *Lima- Perú* 22(3); 278. 282.

- Peng, X. Yu, K. Q., Deng, G. H., Jiang, Y. X., Wang, Y., Zhang, G. X., & Zhou, H. W. (2013). *Comparison of direct boiling method with commercial kits for extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNA tags. Journal of microbiological methods, 95(3), 455-462.*
- Pezo, J. (2008). Determinación de las principales malezas en potreros y su relación con las prácticas de manejo realizadas en las ganaderías bovinas de la provincia del Guayas. Escuela superior politécnica del litoral. Guayaquil-Ecuador.
- Poma Vivanco, V. S. (2014). *Aislamiento y tipificación molecular de Campylobacter Jejuni y Campylobacter Coli en contenido cecal de pollos faenados en camales industriales en la Provincia de Pichincha* (Bachelor's thesis, Quito: UCE.).
- Promega Technical bulletin. (2005). PCR Core Systems. Instructions for use of products M7660 and M7665. [www.promega.com/tbs/tb254/tb254.html](http://www.promega.com/tbs/tb254/tb254.html).
- Rivera, P., Hernández, F., Rodríguez, R., & Herrera, M. L. (1983). Observaciones sobre la epidemiología de las infecciones por *Campylobacter fetus ssp jejuni*. *Rev Med Hosp Nal Niños Costa Rica, 18*, 21-29.
- Romero, J. (2008). Enfermedades venéreas de los Bovinos. P: 12- 22. Recuperado el 9 de Noviembre del 2016 de: <http://cedivechascomus.com.ar/wpcontent/uploads/2014/03/VENERE A2.pdf>
- Romero Gomez M.P., Garcia-Perea A., Ruiz Carrascoso G., Bajo M.A., and Mingorance J. 2010. *Campylobacter fetus peritonitis and bacteremia in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. J Clin Microbiol 48: 336-7*
- Schulze, F., Bagon, A., Muller, W., Hotzeli, H. 2006. *Identification of campylobacter fetus subspecies by phenotypic differentiation and PCR. Journal of clinical microbiology 44(6): 2019–2024.*
- Schmidt, T. Venter EH, Picard JA. (2010). *Evaluation of PCR assays for the detection of Campylobacter fetus in bovine preputial scrapings and*

- the identification of subspecies in South African field isolates.* J S Afr Vet Assoc. 81:87–92.
- Siano, G. (2015). TRABAJOS PRÁCTICOS DE TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS. Recuperado el 5 de Mayo del 2017 de: <http://ley.exam-10.com/biolog/6580/index.html>
- Silva, J., et al., *Campylobacter spp. as a foodborne pathogen: a review.* Frontiers in Microbiology, 2011. 2: p. 200. doi: 10.3389/fmicb.2011.00200.
- Spence. R.P., Bruce, I.R., McFadden, A.M., Hill, F.I., Tisdall, D., Humphrey, S., van der Graaf, L., van Bergen, M.A., Wagenaar, J.A., (2011). *Cross-reaction of a Campylobacter fetus subspecies venerealis real-time PCR.* Vet. Rec. 168, 131.
- Stoessel, F. (1982). Las enfermedades venéreas de los bovinos: Trichomoniasis y vibriosis genital bovina. Ed. Acribia, Zaragoza España. pp. 57-109.
- Terzolo, H. R., & Catena, M. (2007). *Campylobacter.* Microbiología veterinaria, 1, 274-80.
- THATCHER, F. S. y D. S., CLARK (1993) Análisis Microbiológico de los Alimentos. Edit. Acribia. Zaragoza
- Thompson, S & Blaser, M. (2000). *Pathogenesis of Campylobacter fetus infections.* In *Campylobacter*, Second Edition, I. Nachamkin & Blaser M.J., ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA, 321–347.
- Tu, Z.C., Hui, J., & Blaser, M. J. (2008). *Conservation and Diversity of sap Homologues and Their Organization among Campylobacter fetus Isolates.* Infection and Immunity, 72(3), 1715–1724. <http://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1715-1724.2004>
- Vargas. A.C., Costa, M.M., Vainstein, M.H., Kreutz, L.C. and Neves, J.P. (2003) *Phenotypic and molecular characterization of bovine Campylobacter fetus strains isolated in Brazil.* Vet Microbiol 93, 121–132.
- Vandamme, P., Debruyne L., De Brandt E., and Falsen E. 2010. *Reclassification of Bacteroides ureolyticus as Campylobacter*

- ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2016-22
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). *An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. Biotechnology advances*, 28(2), 232-254.
- Wagennar, J. A., M. A. P. van Bergen, D. G. Newell, R. Grogono-Thomas, and B. Duim. 2001. *Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate Campylobacter fetus strains isolated from animals.* *J. Clin. Microbiol.* 39:2283-2286.
- Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L. and Rodgers, F.G. (2002) *Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, C. upsaliensis, and C. fetus subsp. fetus.* *J Clin Microbiol* 40, 4744–4747.
- Willoughby, K. Nettleton, P. Quirie, M. Maley, M. Foster, G. Toszeghy, M D.G. Newell. (2005). *A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate Campylobacter fetus subspecies fetus and Campylobacter fetus subspecies venerealis: use on UK isolates of C.fetus and other Campylobacter spp.* Moredun Research Institute, Bush Loan, Penicuik, Midlothian, UK. Recuperado el 5 de mayo del 2017 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02680.x/epdf>
- Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). *Antimicrobial resistance mechanisms among Campylobacter.* *BioMed research international.*
- WHO World Health Organization). (2011). *Campylobacter.* Recuperado el 5 de Abril del 2017 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>

## **ANEXOS**



**ANEXO 1: Gradiente de temperatura de hibridación de la PCR multiplex para *Campylobacter fetus fetus*.**

**Tabla 1:** Mezcla de reacción.

<b>Reactivo</b>	<b>[Inicial]</b>	<b>[Final]</b>	<b>Volumen una reacción (µL)</b>
H2O			30,55 ul
Tampón Green	5x	1x	10 ul
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.5mM	3ul
dNTPs	10mM	0,2 mM	1ul
Cebador MG3F	25pmol	0,4 pmol	0,8 ul
Cebador MG4R	25pmol	0,4 pmol	0,8 ul
Cebador CFF	25pmol	0,4 pmol	0,8 ul
Cebador CFR	25pmol	0,4 pmol	0,8 ul
Go Taq Polimerasa	5U	1,5U/ 50ul	0,25 ul
Volumen de la mezcla			48ul
ADN			2ul
Volumen final			50ul

**Tabla 2:** Condiciones de la PCR multiplex para *Campylobacter fetus fetus*

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Denaturación inicial	96°	1
Denaturación final	96°	15S
Hibridación	Temperatura de hibridación	1
Elongación inicial	72°	1:30
Elongación final	72°	3
35 ciclos, tiempo total 2horas 15min		

**Tabla 3:** Gradiente de Temperatura de annealing.

<b>Temperaturas de hibridación ensayadas</b>					
50°	54°	56°	58°	60°	62°

**Tabla 4:** Tipo de banda y tamaño aproximada de la misma.

<b>Bandas</b>	<b>Tamaño aproximado</b>
Especie	750 pb
Subespecie	435 pb

**ANEXO 2: Gradiente de cebadores y reducción de volumen de la reacción de la PCR multiplex para *Campylobacter fetus fetus*.**

**Tabla 1:** Mezcla de reacción.

<b>Reactivo</b>	<b>[Inicial]</b>	<b>[Final]</b>	<b>Volumen una reacción (µL)</b>
H2O		*	*
Tampón Green	5X	1X	5ul
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5mM	1,5ul
dNTPs	10mM	0.2mM	0,5ul
Cebador MG3F	10µM	*	*
Cebador MG4R	10µM	*	*
Cebador CFF	10µM	*	*
Cebador CFR	10µM	*	*
Go Taq Polimerasa	5U/ µl	1.25u/50 ul	0,125ul
Volumen de la mezcla		L	7,125µL
ADN			2µL
Volumen final			9,125µL

\*:Gradiente de cebadores.

**Tabla 2:** Gradiente de Cebadores

	0.10 μM	0.12 μM	0.14 μM	0.16uM	0,18uM	0.2 μM
H2O	13,375	12,875	12,375	11,875	11,275	14,625
Cebador MG3F	0,625	0,75	0,875	1	1,125	1,25
Cebador MG4R	0,625	0,75	0,875	1	1,125	1,25
Cebador CFF	0,625	0,75	0,875	1	1,125	1,25
Cebador CFR	0,625	0,75	0,875	1	1,125	1,25

**Tabla 3:** Condiciones de la PCR multiplex para *Campylobacter fetus fetus*.

Etapas	temperatura	Tiempo (min)
Denaturación inicial	96°C	1
Denaturación final	96	15s
Hibridación	50	1
Elongación inicial	72	1:30
Elongación final	72°C	3

**ANEXO 3: Gradiente de  $MgCl_2$  de la PCR multiplex para *Campylobacter fetus fetus*.**

**Tabla 1:** Mezcla de la reacción.

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Volumen una reacción ( $\mu$ L)
H2O		*	*
Tampón Green	5X	1X	5ul
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	*	*
dNTPs	10mM	0.2mM	0,5ul
Cebador MG3F	10 $\mu$ M	0,14 $\mu$ M	0,88
Cebador MG4R	10 $\mu$ M	0,14 $\mu$ M	0,88
Cebador CFF	10 $\mu$ M	0,14 $\mu$ M	0,88
Cebador CFR	10 $\mu$ M	0,14 $\mu$ M	0,88
Go Taq Polimerasa	5U/ $\mu$ l	1.25u/50 $\mu$ L	0,125ul
Volumen de la mezcla			9,14

\*:Gradiente de MgCl<sub>2</sub> Tabla 2

**Tabla 2:** Gradiente de MgCl<sub>2</sub>.

	0,5mM	1mM	1,5mM	2mM	2.5mM
H2O	13,36	12,86	12,36	11,86	11,36
MgCl <sub>2</sub>	0,5ul	1ul	1,5ul	2ul	2,5ul

**Tabla 3:** Condiciones de la PCR multiplex para *Campylobacter fetus fetus*

<b>Etapas</b>	<b>temperatura</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Denaturación inicial	96°C	1
Denaturación final	96	15seg
Hibridación	50	1
Elongación inicial	72	1:30
Elongación final	72°C	3

**ANEXO 4. Resultados de la pruebas bioquímicas de *Campylobacter fetus fetus*.**

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Reacción</b>
<b>Crecimiento a 37°C</b>	Positivo
<b>Oxidasa</b>	Positivo
<b>Catalasa</b>	Positivo
<b>NaCl 3.5%</b>	Negativo
<b>1%</b>	Positivo
<b>1,3%</b>	Positivo
<b>Glicina 1,5%</b>	Positivo
<b>1,7%</b>	Variable
<b>1,9%</b>	Negativo
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Negativo

