



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA
EN CEPAS DE *Campylobacter jejuni* Y *Campylobacter coli* AISLADAS
DESDE POLLOS BROILERS, ALIMENTOS DERIVADOS DE
AVES Y DE PACIENTES HUMANOS.

PABLO ANDRÉS CÁCERES REFUSTA

Memoria para optar al título profesional
de Médico Veterinario.
Departamento de Medicina Preventiva
Animal.

PROFESORA GUÍA: LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Proyecto Fondecyt 11110200

Proyecto FIV 2011

SANTIAGO, CHILE

2013



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA
EN CEPAS DE *Campylobacter jejuni* Y *Campylobacter coli* AISLADAS
DESDE POLLOS BROILERS, ALIMENTOS DERIVADOS DE
AVES Y DE PACIENTES HUMANOS.

PABLO ANDRÉS CÁCERES REFUSTA

Memoria para optar al título profesional de
Médico Veterinario.
Departamento de Medicina Preventiva
Animal.

NOTA FINAL:

NOTA

FIRMA

PROFESORA GUÍA : LISETTE LAPIERRE

.....

PROFESORA CONSEJERA: ANITA SOTO

.....

PROFESOR CONSEJERO : GUILLERMO FIGUEROA

.....

SANTIAGO, CHILE

2013

MEMORIA DE TÍTULO

DETERMINACIÓN DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA EN CEPAS DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* Y *CAMPYLOBACTER COLI* AISLADAS DESDE POLLOS BROILERS, ALIMENTOS DERIVADOS DE AVES Y DE PACIENTES HUMANOS.

DETERMINATION OF ASSOCIATED GENES IN STRAINS VIRULENCE *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* ISOLATED FROM BROILERS CHICKEN, FOODS DERIVED FROM POULTRY AND HUMAN PATIENTS

Pablo Andrés Cáceres Refusta*

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto FONDECYT N°11110200 y por el Proyecto FIV 2011.

Agradecimientos

Muchas gracias a mi Familia que me apoyado siempre todos estos años con la aventura de adentrarse en la capital lejos del querido Sur. Gracias a mis grandes amigos sureños Andrés, Panda, Carloco... y a todos los que luego de tantos años seguimos unidos. A mis amig@s de la U que me acompañaron estos años de alegrías y sufrimiento. Palo, Diego y compañía! Gracias por mostrarme un mundo nuevo e increíble. Gracias quienes partieron antes de tiempo... pero viven en la memoria y corazón. Clau! Es cierto que quizás hubiese terminado antes... pero gracias a ti ha sido una etapa maravillosa... ¡tú apoyo y fuerza siempre acompañando! ¡¡Chic@s y canes de 4A fuerza en todo!!

¡Un abrazo enorme a todos!

Pablo.

RESUMEN

Campylobacter es un patógeno entérico, Gram negativo altamente diseminada en el medio ambiente provocando en el humano la campylobacteriosis, que es una de las enfermedades gastrointestinales más frecuente a nivel mundial. Las especies involucradas son *C. jejuni* y *C. coli*. Se considera el consumo de carne de ave la principal fuente de contagio. Para determinar su prevalencia en cepas aisladas desde carne de ave (n=40), heces de ave (n=40) y deposiciones pacientes humanos infectados (n=20), se escogieron once genes que determinan mecanismos de virulencia cómo *flaA*, *cadF*, *racR* y *dnaJ* relacionados con adherencia y colonización, *virB11*, *ciaB* y *pldA* relacionados con la invasión celular y los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* relacionados con la expresión de citotóxicas y el gen *wlaN* relacionado con el síndrome de Guillian Barré (GBS). Tanto *flaA* como *cadF* obtuvieron la mayor prevalencia en *C. jejuni* con 79,7%, mientras la menor la obtuvo *virB11* con 7,6%. La determinación de su distribución en distintas fuentes permitirá conocer la situación del país y contribuir a la creación de métodos de prevención de esta enfermedad.

Palabras Clave: *Campylobacter*, campylobacteriosis, mecanismos de virulencia, genes, carne de ave.

ABSTRACT

Campylobacter is an enteric pathogen, gram negative highly disseminated in the environment causing campylobacteriosis in human, is one of the most common gastrointestinal diseases in worldwide. The species involved are *C. jejuni* and *C. coli*. Consumption of poultry is considered the main source of infection. To determine its prevalence in isolates from poultry (n = 40), bird feces (n= 40) and human patients infected stool (n= 20), eleven genes that determine virulence mechanisms were chosen how *flaA*, *cadF*, *racR* and *dnaJ* related adherence and colonization *virB11*, *pldA* and *ciaB* related to cell invasion and *cdtA*, *cdtC* and *cdtB* genes associated with the expression of cytotoxins and gene *wlaN* related Guillian Barré syndrome (GBS). Both *flaA* as *cadF* obtained the highest prevalence in *C. jejuni* with 79.7%, while the lowest scored *virB11* with 7.6%. Determination of its distribution in different sources will reveal the situation of the country and contribute to the creation of methods of preventing this disease.

Key words: *Campylobacter*, campylobacteriosis, mechanisms of virulence, genes, poultry

INTRODUCCIÓN

Campylobacter spp., es un patógeno zoonótico de distribución mundial, considerado en los países desarrollados como el primer agente de diarrea en el ser humano y el segundo o tercero en las naciones en vías de desarrollo. Produce en humanos una enfermedad gastrointestinal denominada campylobacteriosis, que es clasificada como una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA). Se reconocen como reservorios una amplia gama de mamíferos y aves, tanto domésticos como de vida libre, los cuales pueden ser fuente de contaminación para el hombre, el medio ambiente y los alimentos. Actualmente, la carne de ave para consumo humano es reconocida como el principal vehículo de transmisión alimentaria de *Campylobacter*, sin embargo existe también evidencia de la contaminación de agua, leche u otros alimentos como carne de bovinos o cerdos con dicho patógeno. Las características clínicas y epidemiológicas de la enfermedad en el hombre entregan claves de los mecanismos moleculares que tendrían un rol en la infección producida por *Campylobacter* spp, sin embargo, el rol que tienen los genes de virulencia y cuáles de ellos son más comúnmente encontrados entre las cepas de *Campylobacter* aislados de distintas fuentes no está del todo claro.

El presente estudio investigó la presencia de 11 distintos genes que codifican mecanismos de virulencia en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde distintas fuentes como: heces de pollos broiler, carne de ave y cepas aisladas desde deposiciones de pacientes humanos con campylobacteriosis.

GENERALIDADES

Las especies del género *Campylobacter spp.* Se ubican en la clase Épsilon de las proteobacterias, en el orden de los Campilobacterales, que incluye las familias *Wolinella*, *Helicobacteraceae* y *Campylobacteraceae*. Esta última comprende los géneros *Campylobacter spp.* y *Arcobacter spp.* *Campylobacter* es una bacteria Gram negativa, microaerofílica, flagelada, con forma en espiral (Butzler, 2004). Es una bacteria zoonótica, con amplia distribución en la naturaleza, reconociéndose como reservorio natural a diferentes clases de mamíferos y aves, siendo estas últimas el principal reservorio (Fernández *et al.*, 2007). Varias especies de *Campylobacter* han sido reconocidas como patógenas para el ser humano y su transmisión se realiza vía oral-fecal a través del consumo de alimentos o agua contaminada, o bien por contacto directo con los animales reservorios. Dentro del grupo *Campylobacter* hay dieciséis especies y seis subespecies, siendo las especies más frecuentemente aisladas desde pacientes humanos *C. jejuni* con un 90% y *C. coli* con un 5 a 10% (Skirrow M. & Blaser M. 2000). La mayoría de las especies crece a 37° C, pero algunas especies llamadas “termotolerantes” como *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* pueden crecer a 42° C (Fernández *et al.*, 2007). El diagnóstico de *Campylobacter* se realiza principalmente por identificación del microorganismo en examen directo y cultivo. También puede diagnosticarse mediante PCR. Los métodos serológicos sólo tienen valor para la investigación (Malbrán, 2001).

EPIDEMIOLOGÍA

La infección con *Campylobacter spp* tiene un impacto económico significativo en la salud de las poblaciones (Hughes *et al.*, 2009). Consecuentemente, existe un esfuerzo continuo para identificar un método efectivo de control. Es conocido que la mayoría de las especies de animales, cómo aves, rumiantes y cerdos, son portadores asintomáticos de *C. jejuni*, haciendo fácil su diseminación. Los estudios epidemiológicos de la infección por *Campylobacter* indican que hay dos manifestaciones de la enfermedad, que son dependientes de la condición socioeconómica. En países desarrollados, la campylobacteriosis se manifiesta como diarrea con sangre, mucus y suele ser autolimitada. En países en vía de desarrollo, la diarrea acuosa predomina y la infección es más frecuente en los niños (Young *et al.*, 2007). Por ejemplo, en los EE.UU., se estima que 2,1 hasta 2,4 millones de casos de campylobacteriosis humana se producen cada año (Pope *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que la dosis infectante 10^4 microorganismos (Rivera *et al.*, 2011) es baja, se entiende que los alimentos de origen animal son un riesgo

importante de infección humana, por lo que se consideran actualmente una zoonosis emergente, de frecuencia creciente en todos los países.

PATOGENIA

Campylobacter spp., se presenta comúnmente en el hombre como una gastroenteritis aguda después de un período de incubación de 1 a 7 días, caracterizada por inflamación, dolor abdominal, fiebre y diarrea (Young *et al.*, 2007). Además, puede provocar septicemia, meningitis o tener secuelas como artritis reactivas y el Síndrome de Guillian-Barré (GBS) que es una neuropatía parálitica aguda (Hughes *et al.*, 2009).

La respuesta de los pollos a la colonización por *C. jejuni*, no conduce a la respuesta inflamatoria patológica que se observa en humanos. *C. jejuni* puede colonizar pollos en números extremadamente altos, hasta 10^{10} unidades formadoras de colonias por gramo de intestino colonizado. El sitio primario de la colonización en las aves son las criptas del intestino delgado cerca de la unión ileal, donde *C. jejuni* se encuentra en la capa de moco cerca de las células epiteliales. Se ha observado una ligera inhibición de la invasión en células epiteliales humanas por *C. jejuni* en presencia de mucus intestinal de aves, lo que sugiere que la mucosidad podría contribuir a la naturaleza asintomática de la colonización en las aves (Young *et al.*, 2007). Una de las diferencias clave entre la infección en los seres humanos y los pollos por *C. jejuni* es el aparente aumento del número de bacterias que pueden invadir las células epiteliales en el humano (Young *et al.*, 2007). Esto sugiere que tanto la adherencia bacteriana y la invasión en las células epiteliales pueden ser etapas críticas que son esenciales para el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, la identificación de los mecanismos implicados en estos procesos es la clave para el desarrollo de terapias para el tratamiento de las infecciones, así como mejorar nuestra comprensión de la patogénesis (Cróinín *et al.*, 2012).

Los mecanismos de virulencia que más se han relacionado con el desarrollo de la patogenia son la motilidad por la presencia de flagelos codificados por genes *flaA* y *flaB*, la capacidad de adherencia y colonización se han identificado los genes *cadF*, *racR* y *dnaJ* que participarían en la expresión de esta característica, los genes *virB11*, *ciaB* y *pldA* el cual codifica una proteína implicada en la síntesis de una membrana de fosfolipasa exterior que se ha relacionado con la invasión celular (Quetz *et al.*, 2012), la expresión de citotoxinas en la cual participarían por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* y el gen

wlaN que ha sido involucrado en la expresión de los “*mimics*” de gangliosidos en el síndrome de Guillian-Barré (Willison, 2005; Janssen *et al.*, 2008, Talukder, 2008).

Campylobacter se caracteriza por su rapidez y la motilidad la cual es mediada por flagelos polares; estas estructuras han sido reconocidas como cruciales para la patogénesis. Los flagelos están compuestos de una gran proteína la flagelina, que es codificada por el gen *flaA*, y la flagelina menor codificada por *flaB*, y son altamente homólogas (Guerry P., 2007). Estudios recientes atribuyen al flagelo una participación la expresión del GBS (Tsang *et al*, 2001) por lo que es probable que el flagelo tenga una incidencia mayor en distintos ámbitos de la patogenia. Respecto de la invasión en *Campylobacter* se ha asociado con diferentes proteínas entre ellas *Cia*. Se ha descrito la identidad de sólo una de las proteínas *Cia*, *Ciab* (Konkel *et al.*, 2004). Los genes *racR* y *dnaJ* son determinantes para la colonización de *Campylobacter* y, presumiblemente, se expresan en respuesta a las condiciones del micro ambiente intestinal, tales como las diferencias de temperatura entre el medio ambiente y del intestino (Konkel *et al*, 2004). Luego de la invasión, existe producción de citotoxinas las cuales provocan inflamación celular disminuyendo la capacidad de absorción del intestino (Silva *et al.*, 2011). *Campylobacter spp.* produce una toxina de distensión citoletal (CDT), la cual también es producida por un grupo diverso de otras especies bacterianas, incluyendo *E. coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi* y *Helicobacter hepaticus*. La toxina causa arresto en la transición del ciclo celular G1 / S o G2 / M. La holotoxina activa es un complejo compuesto de 3 proteínas codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* (Young *et al*, 2007). *cdtB* es conocido por ser el componente tóxico, la microinyección o transfección de esta subunidad solo en las células huésped conduce a los efectos que se observan con la holotoxina. Se cree que *cdtB* actúa como una ADNasa, ya que comparte similitud con una familia de proteínas de ADNasa I. *cdtB* se localiza en el núcleo de las células huésped, provocando daños en el ADN eucariótico. Las funciones de *cdtA* y *cdtC* en esta familia de toxinas no son claras.

Se han identificado una serie de proteínas en *C. jejuni* como adhesinas. Este grupo incluye *CadF*, *CapA*, *JlpA* y la proteína principal de la membrana externa (MOMP) (Flanagan *et al*, 2009). Konkel y col. han identificado a *CadF*, que es una proteína de 37-kDa que facilita la unión de *Campylobacter* a Fibronectina. Un estudio reveló la importancia de *CadF* para la colonización, puesto que *Campylobacter* mutantes *cadF* fueron incapaces de colonizar a los pollos (Cróinín *et al.*, 2012). Otro factor de virulencia

importante, es el lipopolisacárido (LPS), que tiene actividad endotóxica típica, como la presente en las enterobacterias. La estructura del antígeno "O" del LPS contiene ácido siálico, semejante al que se observa en los gangliósidos humanos. Su presencia en las cepas aisladas de pacientes con síndrome de Guillain-Barré (SGB) sugiere un papel de *Campylobacter* en la patogenia de esta enfermedad, al probablemente inducir una respuesta autoinmune contra los gangliósidos humanos. Es así como la mayoría de los pacientes que desarrollan el SGB después de una enteritis por *C. jejuni* tienen anticuerpos IgG que reaccionan con los gangliósidos GM1, GD1a y GQ1b (Willison, 2005; Janssen *et al*, 2008).

SITUACIÓN EN CHILE

En nuestro país, la notificación y derivación de *Campylobacter* spp. hacia los laboratorios de referencia es baja, debido principalmente a que la mayoría de los laboratorios no estudian este agente por la falta de implementación de técnicas para su diagnóstico. Esto a pesar que desde el año 1983, *Campylobacter* spp. es un patógeno de vigilancia de laboratorio, según lo establece el reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria indicado dentro del decreto N° 158. Por esto, no existen estadísticas oficiales de la prevalencia de campylobacteriosis en nuestro país. En alimentos, tampoco está incluido en Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) y los datos de la presencia de *Campylobacter* en plantas de procesamiento chilenas son limitados (Figuroa *et al.*, 2009).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de 11 genes de virulencia en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde heces de pollos broiler, desde carne de aves y desde deposiciones de pacientes humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar la presencia de 11 genes asociados a virulencia en las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* previamente aisladas.
- 2.- Comparar la frecuencia de presentación de los genes de virulencia encontrados en las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde heces de aves de producción, carne de aves y deposiciones de pacientes humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de biología molecular perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Recolección de Muestras

Doscientas muestras de carne cruda de pollo fueron recolectadas por personal del proyecto o por personal de la SEREMI del Ministerio de Salud, y llevadas al Laboratorio de Alimentos del Instituto de Salud Pública ISP para el aislamiento del *Campylobacter*. Doscientas tómulas con heces de pollos broiler fueron obtenidas desde la cloaca de estos animales, por médicos veterinarios de los mismos planteles productores y transportadas en medio Cary Blair al laboratorio de Microbiología del ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Veinte cepas aisladas desde pacientes humanos con campylobacteriosis fueron donadas por el ISP.

Aislamiento e identificación de las cepas:

Se analizaron un total de 100 cepas, 40 provenientes de pollos, 40 de carcasas de pollos y 20 de pacientes humanos. El aislamiento en el caso de las muestras de alimentos fue realizado por el método descrito en el *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) perteneciente al *Food and Drug Administration* (FDA), donde brevemente se incubó la muestra en un caldo de enriquecimiento específico para *Campylobacter* (Caldo Bolton) y posteriormente se traspasó una alícuota del caldo enriquecido a un medio selectivo (Agar mCCDA) para aislar colonias características, hasta que se obtuvo un cultivo axénico (puro). Posteriormente se traspasó el cultivo a un medio nutritivo (Agar Columbia con sangre de equino) y así se obtuvo un cultivo propagado el cual se realizó posteriormente la identificación de especie mediante API Campy, clasificándose como corresponda. Sólo se analizaron las cepas identificadas como *C. jejuni* y *C. coli*.

Obtención del DNA desde las cepas de *Campylobacter*:

Una colonia aislada de cada cepa se introdujo en un tubo Eppendorf estéril con 100 µL de agua libre de nucleasas, el tubo se hirvió en un termociclador a 99° C por diez minutos, se centrifugó a 5000 g por cinco minutos y el sobrenadante se utilizó como templado.

Finalmente se cuantificó el DNA obtenido, leyendo la concentración de DNA por absorbancia de luz con un espectrofotómetro.

Identificación mediante PCR de los genes de virulencia presente en las cepas de *Campylobacter* obtenidas de diversas fuentes:

Para cada gen se utilizó por cada tubo de PCR los siguientes reactivos: 200 μ M de deoxinucleotidotrifosfatos, 2,5 μ L de buffer 10X, 20 mM de $MgCl_2$, 0,5 μ M de cada uno de los partidores (Tabla 1), 1,25 U de Taq polimerasa y 2,5 μ L de DNA templado. El volumen final se ajustó a 25 μ L con agua calidad biología molecular. La cantidad de ADN es ajustada con lo medido con el espectrofotómetro, se realiza una curva y se ve cuanto ADN tiene cada muestra, luego se estandariza cuanto debe haber en cada tubo.

La amplificación fue realizada en un termociclador (ESCO®) utilizando en la primera etapa un único ciclo de denaturación a 95° C por seis minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificación cada uno consistente en: denaturación a 95° C por treinta segundos, alineamiento a la temperatura señalada para cada gen por treinta segundos y extensión a 72° C por treinta segundos. Finalmente se realizó un único ciclo de extensión a 72° C por cinco minutos. Para observar los productos obtenidos de la reacción de PCR se preparó un gel de agarosa al 2%, el cual corrió a 100V (volt) durante cuarenta minutos, usando buffer TAE 1X y marcador de peso molecular de 50 o 100 pares de base. Para la tinción del gel se usó red gel y luego se visualizaron los resultados bajo una fuente de luz Ultra Violeta (U.V.).

Se utilizaron como cepas controles los DNA de las dos cepas, una de *Campylobacter coli* ATCC 43478 y otra de *Campylobacter jejuni* ATCC 29428. Los partidores, el tamaño del producto amplificado y la temperatura de alineamiento utilizada para la realización la amplificación se muestran en la tabla 1.

Estimación de la Diferencia de Proporciones:

Con los resultados obtenidos se construyeron tablas para describir la frecuencia de presentación de los genes encontrados en las cepas aisladas desde heces de pollos, alimentos derivados de aves y pacientes humanos. Se utilizó la prueba de Irwin-Fisher para comparar las proporciones. (Balzarini M. *et al*, 2008)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las cien cepas analizadas todas resultaron positivas para al menos un gen. En los grupos estudiados los genes que presentan la mayor frecuencia en *C. Jejuni* (n=79) son *cadF* con 79,7%, *flaA* con 79,7% y *cdtC* con 78,5%. Mientras que *virB11* (relacionado con invasión), presentó una baja prevalencia en todos los grupos correspondiendo en promedio a un 7,6 % (Tabla 2), concordando lo descrito en la literatura (Biswas *et al.* 2011, Bacon *et al.*, 2010) donde transversalmente independiente del país, este gen es de muy baja frecuencia.

En las cepas de *C. Coli* (n=21) (Tabla 3) el mayor porcentaje de genes positivos lo obtiene *cadF* 95,2%, seguido por *cdtA* 76,2%. Igualmente que con las cepas de *C. Jejuni*, *virB11* es el gen menos frecuente con un 4.8%.

En las cepas de *C. Jejuni* (n=35) (Tabla 2) aisladas en carne de ave, la frecuencia de genes que codifican citotoxinas fue: 48,6% (*cdtA*), 25,7% (*cdtB*) y 68,6%(*cdtC*), para genes de adherencia y colonización su frecuencia fue 68,6% (*flaA*), 68,6% (*racR*), 54,3% (*dnaJ*), 65,7% (*cadF*) e invasión 37,1% (*ciaB*). Es interesante mencionar que un 51,4% de las cepas poseen el gen *wlaN*, el cual está relacionado con la presentación de la enfermedad de Guillian Barré en los pacientes humanos. En cuanto a las cepas de *C. Coli* (n= 5) (Tabla 3) aisladas desde carne, la frecuencia de genes que codifican a citotoxinas fue 60% *cdtA*, 20% *cdtB*, 60% *cdtC*, para genes de adherencia y colonización la frecuencia fue de 40% *flaA*, 40% *racR*, 60% *dnaJ*, y 80% *cadF*. En genes que codifican mecanismos de invasión fue de 60% *pdIA*, 80% *ciaB* y 20% *virB11*. No hubo positivos para *wlaN* en este grupo.

En las cepas *C. Jejuni* (n=18) (Tabla 2) aisladas desde deposiciones de pacientes humanos, se presenta una frecuencia de los genes que codifican citotoxinas de 77,8% (*cdtA*), 55,6% (*cdtB*) y 83,3% (*cdtC*), genes de adherencia 83,3% (*flaA*), 83,3% (*cadF*), 66,7% (*dnaJ*) y 50% (*racR*), y genes de invasión con 66,7% (*ciaB*), *pdIA* con 61,1% y *virB11* con 5,6%. El gen *wlaN* tiene un 44,4% de positividad. Mientras que en cepas de *C. coli* (n=2) (Tabla 3) se encontró un 50% para *cdtA*, *cdtB*, *pdIA* y *racR* y, 100% para *cdtC*, *flaA*, *cadF* y *ciaB*. No hubo positivos para *wlaN*, *dnaJ* y *virB11*.

En las cepas de *C. Jejuni* (n=26) (Tabla 2) aisladas desde heces de aves, se obtuvo 100% de cepas positivas a *cdtA*, 92,3% a *cdtB* y un 88,5% a *cdtC*, genes de adhesión con un

96,2% en *cadF*, 88,5% *racR*, 92,3% *flaA* y 84,6% *dnaJ*. En cuando a genes de invasión se observó 61,5% *ciaB*, 30,8% *pdIA* y *virB11* con 7,7%. *wlaN* obtuvo 30,8%.

En cepas de *C. Coli* (Tabla 3) aisladas desde heces (n=14), los genes que codifican citotoxinas 85,7% *cdtA*, 71,4% *cdtB* y 64,3% *cdtC*. Genes que codifican mecanismos de adhesión: 100% *cadF*, 85,7% *racR*, *flaA* 71,4 y *dnaJ* 64,3%. Genes que codifican mecanismos de invasión 35,7% *ciaB*, 21,4% *pdIA*, mientras que *wlaN* obtiene 14,3%. Respecto del gen *virb11* ninguna cepa fue positiva.

En la tabla 4 se resume el número de aislados que presentan genes de virulencia. El máximo fue la amplificación de diez genes en dos cepas de *C. jejuni*, una aislada desde deposiciones de un paciente humano y otra cepa aislada desde heces de aves. Se observó que las cepas obtenidas desde heces de aves alcanzan, en relación a los otros grupos estudiados, un alto número de cepas (12) con 9 genes de virulencia tres de éstas corresponden a *C. coli*. El intervalo donde se obtienen la mayor cantidad de genes de virulencia es entre 5 a 9 genes en una sola cepa, agrupando a 76 cepas.

Al realizar la prueba estadística de Irwin - Fisher (Tabla 5), para comparar los tres grupos del estudio, se observó que en cepas de *C. jejuni* el grupo de carne de ave y deposiciones de pacientes humanos existen diferencias significativas en la mayoría de los genes estudiados, excepto en los genes *cdtB*, que codifica parte de la citotoxina de distención, *ciaB* y *pdIA* que codifican mecanismos de invasión.

Mientras al comparar el grupo de carne de ave y heces de ave (Tabla 5) se observa que existe asociación estadística ($p < 0,05$) entre los genes de virulencia de las citotóxicas *cdtA* y *cdtB*, cómo también existe en los genes de adherencia y colonización *flaA*, *dnaJ* y *cadF*. Además, en la comparación del grupo de deposiciones de pacientes humanos y heces de ave se observa asociación estadística en los genes que codifican a la citotoxina de distención *cdtA*, *cdtB* y también en el gen *racR* que codifica mecanismos de adherencia y colonización. En cepas de *C. coli* (Tabla 5) no existe evidencia estadística de asociación de las variables en todos los grupos estudiados.

En las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter Coli* aisladas desde carne de ave, pacientes humanos y heces de aves, se comprobó que existe una alta presencia de los once genes de virulencia analizados en este estudio, lo que concuerda con lo descrito en estudios de prevalencia de genes realizados por otros autores cómo Suvamoy *et al.*,

2003, en el cual se determinó la presencia de los mismos once genes utilizados en este estudio en cepas japonesas aisladas desde carne de ave y heces de broiler. Así también, Feodoroff *et al.*, 2010 en un estudio realizado en Finlandia obtuvo altas frecuencias del gen de virulencia *ciaB* (99%), una baja prevalencia de *virB 11* (2,4%) y 23% de positivos con *wlaN*, en cepas aisladas desde pacientes humanos, similar prevalencia del gen *virB11* fue descrita por Deun *et al*, 2007 obteniendo solo 2 cepas positivas de 20 en cepas de carne de ave y 6 positivas de 24 en cepas aisladas de deposiciones de pacientes humanos que presentaron campylobacteriosis lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

Por otro lado, a pesar que en cepas aisladas en carne de ave se presentaron altos porcentajes de genes que codifican citotoxinas y mecanismos de adhesión, los genes que codifican a mecanismos de invasión son de baja prevalencia, quizás otros genes no analizados sean más prevalentes en dichas cepas. Mientras que en cepas aisladas desde humanos infectados con *Campylobacter jejuni*, las cepas mostraron una alta frecuencia de genes de virulencia, presentando prevalencias en genes de adhesión, invasión y citotoxicidad de entre 60% - 83%, lo que hace suponer que la expresión de estos genes en los pacientes infectados podría haber provocado el cuadro de campylobacteriosis.

Existe asociación estadística al comparar las cepas provenientes de carne de ave con las cepas provenientes de deposiciones de pacientes humanos (tres de once obtienen $p < 0,05$, Tabla 5), lo que concuerda con un estudio realizado por Kudirkien *et al*, 2012, en el cual se aislaron cepas desde cloaca de aves al momento del sacrificio, en este estudio se determinó que las cepas obtenidas de esta forma son similares a las cepas que infectan pacientes humanos. El gen que codifica a citotóxicas *cdtB* está asociado estadísticamente en los tres grupos estudiados. Cabe señalar que las cepas aisladas desde aves, podrían ser menos sensibles a las variaciones de temperatura en el proceso de elaboración de la carne, como lo señala Kudirkien *et al*. 2012, lo que plantea que los parámetros de temperatura utilizados para la cadena de frío de la carne no son suficientes para eliminar la contaminación de *Campylobacter* luego del faenamiento y podría ser necesario disminuir aún más la temperatura o el tiempo para lograr alimentos con una menor carga de *Campylobacter*.

Campylobacter jejuni es un patógeno que tiene un gran impacto en la salud pública mundial, y Chile no está exento de esta realidad. Conocer los mecanismos de virulencia presentes en las cepas chilenas, es un paso para poder entender la patogenia de la enfermedad y diseñar medidas de control tendientes a disminuir la presentación de campylobacteriosis. Como la principal vía de infección es alimentaria, cabe señalar que hay que realizar mayores esfuerzos en cuanto a la aplicación de las BPA, higiene, el HACCP, línea de producción y mantención de la cadena de frío, lo cual contribuye para que los cuadros de campylobacteriosis sean cada vez más escasos en la población chilena. También es de vital importancia realizar nuevos estudios de evaluación de riesgos en la población chilena, como etapa previa a la aplicación de políticas de prevención y control de esta importante enfermedad transmitida por los alimentos.

CONCLUSIÓN

De las 100 cepas de *Campylobacter* aisladas desde pollos broilers, carne de ave y pacientes humanos que desarrollaron campilobacteriosis, los resultados indican que existe una alta prevalencia de genes asociados a virulencia de *Campylobacter jejuni* en las cepas chilenas. La gran mayoría de las cepas aisladas corresponden a *C. jejuni* con 79 cepas, mientras que 21 cepas corresponden a *C. coli*, y de estas fueron aisladas principalmente desde heces de ave lo cual es similar a la prevalencia descrita en el resto de mundo. A pesar de la alta presencia de genes de virulencia, esto no puede extrapolarse a la presentación de la enfermedad en la población chilena, por lo que son necesarias mayores investigaciones en este ámbito.

ANEXOS

Tabla 1. Secuencia de los partidores, tamaño del amplificado y temperatura de alineamiento utilizados en los PCR para detección de los genes de virulencia (Talukder, 2008).

Gen	Partidores	Secuencia 5´-3´	T° Alineamiento	Peso (pb)
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> 664	AATAAAAATGCTCATAAAAACAGGTG	53	855
	<i>flaA</i> 1494	TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT		
<i>cadF</i>	<i>cadF- F2B</i>	TTGAAGGTAATTTAGATATG	45	400
	<i>cadF-R1B</i>	CTAATACCTAAAGTTGAAAC		
<i>cdtA</i>	<i>DS-18</i>	CCTTGTGATGCAAGCAATC	49	370
	<i>DS-18</i>	ACACTCCATTTGCTTTCTG		
<i>cdtB</i>	<i>cdtB-113</i>	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT	51	620
	<i>cdtB-713</i>	AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT		
<i>cdtC</i>	<i>cdtC-192</i>	CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA	47	182
	<i>cdtC-351</i>	TTGGCATTATAGAAAATACAGTT		
<i>racR</i>	<i>racR-25</i>	GATGATCCTGACTTTG	45	584
	<i>racR-593</i>	TCTCCTATTTTTACCC		
<i>dnaJ</i>	<i>dnjaJ-299</i>	AAGGCTTTGGCTCATC	46	720
	<i>dnaJ-1003</i>	CTTTTTGTTTCATCGTT		
<i>virB11</i>	<i>virB-232</i>	TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT	53	494
	<i>virB-701</i>	CCTGCGTGTCTGTGTTATTTACCC		
<i>ciaB</i>	<i>ciaB-403</i>	TTTTTATCAGTCCTTA	42	986
	<i>ciaB-1373</i>	TTTCGGTATCATTAGC		
<i>pldA</i>	<i>pldA-84</i>	AAGCTTATGCGTTTTT	45	913
	<i>pldA-981</i>	TATAAGGCTTTCTCCA		
<i>wlaN</i>	<i>wlaN-DL 39</i>	TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG	46	672
	<i>wlaN DL 41</i>	CCATTTGAATTGATATTTTTG		

Tabla 2. Porcentaje de cepas positivas a los 11 genes de virulencia analizados en cepas de *Campylobacter Jejuni* aisladas de carne de ave comercial, pacientes humanos infectados y deyecciones de pollos broiler.

Gen analizado	Cepas carne de Ave n= 35	Cepas deposiciones de Humanos n = 18	Cepas de Heces de aves n= 26	Total n=79
Positivos	%	%	%	%
<i>cdtA</i> (citotoxina)	48,6	77,8	100	72,2
<i>cdtB</i> (citotoxina)	25,7	55,6	92,3	54,4
<i>cdtC</i> (citotoxina)	68,6	83,3	88,5	78,5
<i>flaA</i> (adherencia y colonización)	68,6	83,3	92,3	79,7
<i>pdIA</i> (invasión)	31,4	61,1	30,8	38,0
<i>wlaN</i> (Guillian Barré)	51,4	44,4	30,8	43,0
<i>racR</i> (adherencia y colonización)	68,6	50,0	88,5	70,9
<i>dnaJ</i> (adherencia y colonización)	54,3	66,7	84,6	67,1
<i>cadF</i> (adherencia y colonización)	65,7	83,3	96,2	79,7
<i>virB11</i> (invasión)	8,6	5,6	7,7	7,6
<i>ciaB</i> (invasión)	65	80	52,5	51,9

Tabla 3. Porcentaje de cepas positivas a los 11 genes de virulencia analizados en cepas de *Campylobacter Coli* aisladas de carne de ave comercial, pacientes humanos infectados y deyecciones de pollos broiler.

Gen analizado	Cepas carne de Ave n= 5	Cepas deposiciones de Humanos n = 2	Cepas de Heces de aves n= 14	Total n=21
Positivos	%	%	%	%
<i>cdtA</i> (citotoxina)	60	50	85,7	76,2
<i>cdtB</i> (citotoxina)	20	50	71,4	57,1
<i>cdtC</i> (citotoxina)	60	100	64,3	66,7
<i>flaA</i> (adherencia y colonización)	40	100	71,4	66,7
<i>pdIA</i> (invasión)	60	50	21,4	33,3

<i>wlaN</i> (Guillian Barré)	0	0	14,3	9,5
<i>racR</i> (adherencia y colonización)	40	50	85,7	71,4
<i>dnaJ</i> (adherencia y colonización)	60	0	64,3	57,1
<i>cadF</i> (adherencia y colonización)	80	100	100	95,2
<i>virB11</i> (invasión)	20	0	0	4,8
<i>ciaB</i> (invasión)	80	100	35,7	52,4

Tabla 4. Número de aislados que poseen los genes de virulencia estudiados.

Número de genes presentes	Cepas carne de ave n= 40		Cepas deposiciones Humanos n= 20		Cepas de Heces de aves n= 40		Total n= 100
	<i>C. Jejuni</i>	<i>C. Coli</i>	<i>C. Jejuni</i>	<i>C. Coli</i>	<i>C. Jejuni</i>	<i>C. Coli</i>	
1	0	0	1	0	0	2	3
2	3	2	0	0	1	0	7
3	6	0	0	0	0	0	6
4	5	0	0	0	0	1	6
5	6	0	2	1	1	0	10
6	3	0	1	0	2	5	11
7	4	2	4	1	5	1	17
8	6	1	6	0	7	2	22
9	2	0	2	0	9	3	16
10	0	0	1	0	1	0	2
11	0	0	0	0	0	0	0
Total							100

Tabla 5. Prueba de Irwin-Fisher para comparación de proporciones en cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas desde carne de ave – deposiciones de pacientes humanos (p_1), carne de ave - heces de ave (p_2) y deposiciones de pacientes humanos - heces de ave (p_3) y en cepas de *Campylobacter coli* aisladas desde carne de ave – deposiciones de pacientes humanos (p_4), carne de ave - heces de ave (p_5) y deposiciones de pacientes humanos - heces de ave (p_6).

Se consideran estadísticamente significativos valores menores que $p < (0,05)$

Gen	p1	p2	p3	p4	p5	p6
<i>cdtA</i>	0,0759	<0,0001	0,0225	>0,9999	0,5304	0,3500
<i>cdtB</i>	0,0400	<0,0001	0,0084	>0,9999	0,1108	>0,9999
<i>cdtC</i>	0,3329	0,1220	0,6760	0,5238	>0,9999	0,5417
<i>flaA</i>	0,3329	0,0302	0,6337	0,4286	0,3047	0,4500
<i>pdIA</i>	0,0459	>0,9999	0,0657	>0,9999	0,2621	0,6000
<i>wlaN</i>	0,7734	0,1243	0,5248	Sin datos	0,5906	>0,9999
<i>racR</i>	0,2370	0,1220	0,0072	>0,9999	0,0844	0,3500
<i>dnaJ</i>	0,5570	0,0148	0,2726	0,4286	>0,9999	0,1750
<i>cadF</i>	0,2145	0,0043	0,2890	>0,9999	0,2632	Sin datos
<i>virB11</i>	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,2632	Sin datos
<i>ciaB</i>	0,0492	0,0736	0,7614	>0,9999	0,1409	0,1750

BIBLIOGRAFÍA

1. **BALZARINI M.G.; GONZALEZ L.; TABLADA M.; CASANOVES F.; DI RIENZO J.A.; ROBLEDO C.W.**(2008). Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina. 76-77.
2. **BISWAS D.; SHERRY J.; TOWNSEND H.; POTTER A.; ALLAN B.** 2011. Genes coding for virulence determinants of *campylobacter jejuni* in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. *International microbiology* 14:25-32
3. **BUTZLER, J.** 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and infection*. 10 (10):868-76.
4. **BACON D.; ALM R.; BURR D.; LAN HU.; KOPECKO D.; EWING C.; TRUSTT.; GUERRY P.** 2000. Involvement of a Plasmid in Virulence of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 8(68): 4384–4390.
5. **CRÓINÍN T.; BACKERT S.**2012.Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2(25):1-13.
6. **DEUN K.;HAESEBROUCK F.; HEYNDRICKX M.; FAVIREET H.; DEWULF J.; CEEKEB L.; DUMEZ L.; MESEENS W.; LELEU S.; IMMERSEEL F.; DUCATELLE R.; PASMANS F.** 2007.Virulence properties of *Campylobacter jejuni* insolates of poultry and human origin. *Journal Microbiology* 56(10): 1284-1289.
7. **FEODOROFF B.; ELLSTRÖM P.; HYYTIÄINEN H.; SARNA S.; HÄNNINEN M.; RAUTELIN H.** 2010. *Campylobacter jejuni* isolates in Finnish patients differ according to the origin of infection. *Gut Pathogens*. 2:22.
8. **FERNÁNDEZ H.; VERA F.; VILLANUEVA P.** 2007. Especies de *Arcobacter* *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile. *Archivos Medicina Veterinaria*, (39) 2:163-165.
9. **FERNANDEZ H.** 2011. *Campylobacter* y campylobacteriosis: Una mirada desde América del Sur. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 28(1):121-27.
10. **FIGUEROA G.; TRONCOSO M.; LÓPEZ.; RIVAS P.; TORO M.** 2009. Occurrence and enumeration of *Campylobacter spp.* During the processing of Chilean broilers. *BMC Microbiology*. 9:94
11. **GUERRY P.; SZYMANSKI M.** 2008. *Campylobacter* sugars sticking out *Trends Microbiol*. 16, 428–435.

12. **GUERRY, P.** 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* 15, 456–461.
13. **HUGHES L.; BENNETT M.; COFFEY P.; ELLIOTT P.; JONES T.; JONES R.; LAHUERTA-MARIN A.; LEATHERBARROW A.; MCNIFFE K.; NORMAN D.; WILLIAMS N.; CHANTREY J.** 2009. Molecular Epidemiology and Characterization of *Campylobacter* spp. Isolated from Wild Bird Populations in Northern England. *Applied and environmental microbiology.* 3007–3015.
14. **JANSSEN R.; KROGFELT K.; CAWTHRAW S.; VAN PELT W.; WAGENAAR J.; OWEN R.** 2008. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clinical Microbiology Review.* 21(3):505-18.
15. **KONKEL M.; MONTEVILLE R.; RIVERA V.; JOENS L.** 2001. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Curr. Issues Intest Microbiol.* (2): 55–71.
16. **KONKEL M.; KENA J.; RIVERA V.; MONTEVILLE M.; BISWAS D.; RAPHAEL B.; MICKELSON J.** 2004. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J. Bacteriol.* 186, 3296–3303.
17. **KUDIRKIEN E.; THORUP M.; STABLER R.; STRONG P.; SERNIEN L.; WREN B.; NIELSEN E.; MALAKAUSKAS M.; BRØNDSTED L.** 2012. Phenotypic and Genotypic Characterizations of *Campylobacter jejuni* Isolated from the Broiler Meat Production Process. *Current Microbiology.* 65(4):398-406.
18. **MALBRÁN C.** 2001. Manual de procedimientos *Campylobacter*. Subsecretaría de Investigación y Tecnología. Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas. Ministerio de Salud. Argentina.
19. **POPE J.; KRIZOVA A.; GARG A.; THIESSEN-PHILBROOK H.; OUITMET J.** 2007 *Campylobacter* Reactive Arthritis: A Systematic Review. *Semin Arthritis Rheum.* 37(1): 48–55.
20. **QUETZ J.; LIMA I.; HAVT A.; PRATA M.; CAVALCANTE P.; MEDEIROS P.; CID D.; MORAES M.; REY L.; SOARES A.; MOTA R.; WEIGL B.; GUERRANT R.; LIMA A.** 2012. *Campylobacter jejuni* infection and virulence associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. *Journal of Medical Microbiology.* 61, 507–513.
21. **TSANG R.; FIGUEROA G.; BRYDEN L.; LAI-KING NG.** 2001. Flagella as a Potential Marker for *Campylobacter jejuni* Strains Associated with Guillain-Barré Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology.* 39 (2):762–764

22. **RIVERA N., BUSTOS R., MONTENEGRO S., SANDOVAL M., CASTILLO J., FERNÁNDEZ H., MATURANA M., DELGADO L., CONTRERAS A., CHÁVEZ D., QUEVEDO I.** Genotificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter spp* aisladas en niños y en aves de corral. 2011. Revista Chilena de Infectología. 28 (6): 555-562.
23. **SILVA J.; LEITE D.; FERNANDES M.; MENA C.; GIBBS P.; TEIXEIRA P.** 2011. *Campylobacter spp.* As foodborne pathogen: a review. Frontiers in microbiology.200 (2): 1-12.
24. **SKIRROW M., BLASER M.** 2000. *Clinical aspects of Campylobacter infection*. In: *Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. 69-88.
25. **SOPWITH W.; BIRTLES A.; MATTHEWS M.; FOX A.; GEE S.; JAMESS.; KEMPSTER J.; PAINTER M.; EDWARDS-JONESV.; OSBORN K.; REGAN M.; SYEDQ.; BOLTON E.** 2009. Investigation of Food and Environmental Exposures Relating to the Epidemiology of *Campylobacter coli* in Humans in Northwest England. Applied and environmental microbiology. 129–135.
26. **SUVAMOY D.; HIDEKAZU N.; KIKUJI I.** 2003. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. Journal of Medical Microbiology. 52, 345–348.
27. **TALUKDER K.; ASLAM M.; ISLAM Z.; AZMI I.; DUTTAD D.** 2008. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. Journal of Clinical Microbiology. 46 (4): 1485-1488.
28. **WILLISON H.** 2005. The immunobiology of Guillain-Barré Syndromes. Journal Pripher Nervous System. 10 (2): 94-112.
29. **YOUNG L.; DAVIS L.; DIRITA V.** 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology. 5: 665-679.