



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

**ADHERENCIA E INVASIÓN A CÉLULAS INTESTINALES
HUMANAS DE CEPAS DE *Campylobacter jejuni* Y
Campylobacter coli AISLADAS DE HUMANOS Y
ANIMALES PRODUCTIVOS**

NATALIA ANDREA LÁRTIGA FATTAH

Tesis para optar al
Grado de Magíster en
Ciencias Animales y Veterinarias

**Santiago – Chile
2017**



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

**ADHERENCIA E INVASIÓN A CÉLULAS INTESTINALES
HUMANAS DE CEPAS DE *Campylobacter jejuni* Y
Campylobacter coli AISLADAS DE HUMANOS Y
ANIMALES PRODUCTIVOS**

NATALIA ANDREA LÁRTIGA FATTAH

Tesis para optar al
Grado de Magíster en
Ciencias Animales y Veterinarias

Directora de tesis: Lisette Lapierre A. (MV, PhD)
Co-director de tesis: Mauricio Farfán U. (BQ, QF, PhD)

Santiago – Chile
2017

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

Natalia Andrea Lártiga Fattah

Adherencia e invasión a células intestinales humanas de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de humanos y animales productivos

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias en Examen de Defensa de tesis rendido el día del mes del año

Director de tesis

Lisette Lapierre A.

Co-director de tesis

Mauricio Farfán U.

Comisión Evaluadora e Informante de Tesis

Patricio Retamal M.

Consuelo Borie P.

Esta Tesis de Grado se realizó en el Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Doctor Luis Calvo Mackenna.

Contó con financiamiento del Programa de Apoyo Económico para Ejecución y Difusión de Actividades de Investigación para estudiantes de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias.

BIOGRAFÍA

Natalia A. Lártiga Fattah nació el 18 de Julio de 1980 en Santiago, Chile. Cursó su enseñanza básica y media en el Colegio Compañía de María Seminario.

Estudió Medicina Veterinaria en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, titulándose el año 2011 con distinción máxima. El mismo año realizó el curso de Técnicas de laboratorio para la identificación, aislamiento y determinación de la infectividad de Triatoma virus en triatomíneos, en la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Durante dos años trabajó como asistente de investigación en proyectos relacionados con la enfermedad de Chagas, estimando la importancia de vectores y reservorios en la mantención de la enfermedad y estudiando su epidemiología espacial.

Como una manera de lograr mayor especialización para su desarrollo profesional, el año 2014 ingresó al programa de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias en la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, desarrollando su Tesis en el Departamento de Medicina Preventiva Animal de esta Facultad.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lisette Lapierre y al Dr. Mauricio Farfán por todo el apoyo, facilidades y conocimientos entregados durante la realización de esta tesis.

A todos aquellos que trabajaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna durante la realización de esta tesis y que me acompañaron, ayudaron y brindaron alegría.

A mi familia por su apoyo y amor incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Tablas.....	9
Índice de Figuras	11
Resumen	13
Summary	15
1. Introducción	17
2. Revisión bibliográfica.....	19
2.1. Género <i>Campylobacter</i>	19
2.2. Campylobacteriosis	20
2.3. <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i>	21
2.4. Reservorios y transmisión al ser humano	22
2.5. Patogenia y factores de virulencia	25
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos.....	29
4.1. Objetivo general	29
4.2. Objetivos específicos	29
5. Materiales y método	29

	8
5.1. Cepas bacterianas	30
5.2. Crecimiento bacteriano	33
5.3. Cultivo celular.....	33
5.4. Ensayo de adherencia e invasión	33
5.5. Análisis estadístico.....	35
6. Resultados.....	37
6.1. Estandarización de los modelos de adhesión e invasión	37
6.2. Adhesión a células intestinales epiteliales en cultivo	40
6.3. Invasión a células intestinales epiteliales en cultivo	43
6.4. Comparación de adherencia e invasión según especie y genes de virulencia	47
6.5. Asociación entre adhesión e invasión y genes de virulencia.....	48
7. Discusión	53
8. Conclusiones	63
9. Bibliografía.....	64
10. Material complementario	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers usados para la detección de genes de virulencia mediante PCR convencional.....	31
Tabla 2. Especie, origen y presencia de genes de virulencia de las cepas de <i>Campylobacter</i> spp. empleadas en el estudio.....	32
Tabla 3. Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes de virulencia y porcentaje de adhesión de las cepas de <i>C. jejuni</i>	49
Tabla 4. Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes de virulencia y porcentaje de invasión del inóculo de las cepas de <i>C. jejuni</i>	49
Tabla 5. Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes de virulencia y porcentaje de invasión de las adheridas inóculo de las cepas de <i>C. jejuni</i>	50
Tabla 6. Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes de virulencia y porcentaje de adhesión de las cepas de <i>C. coli</i>	50
Tabla 7. Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes de virulencia y porcentaje de invasión del inóculo de las cepas de <i>C. coli</i>	50

Tabla 8. Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes de virulencia y porcentaje de invasión de las adheridas inóculo de las cepas de *C. coli*51

Tabla 9. Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes de virulencia y porcentaje de adhesión de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*51

Tabla 10. Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes de virulencia y porcentaje de invasión del inóculo de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*51

Tabla 11. Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes de virulencia y porcentaje de invasión de las adheridas inóculo de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas para el cálculo de los porcentajes de adhesión e invasión	35
Figura 2. Estandarización del modelo de adhesión evaluando distintos tiempos de infección.....	38
Figura 3. Estandarización del modelo de adhesión evaluando centrifugación de las células infectadas.....	38
Figura 4. Estandarización del modelo de invasión evaluando distintos tiempos de infección.....	39
Figura 5. Estandarización del modelo de invasión evaluando centrifugación de las células infectadas.....	40
Figura 6. Adhesión a células T84 de cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aisladas de pacientes humanos y animales productivos.....	41
Figura 7. Mediana y valor máximo y mínimo del porcentaje de adhesión a células T84 de cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aisladas de distintos hospederos.....	42
Figura 8. Invasión a células T84 de cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aisladas de pacientes humanos y animales productivos.....	44
Figura 9. Mediana y valor máximo y mínimo del porcentaje de invasión a células T84 de cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislada de distintos hospederos.....	45
Figura 10. Invasión a células T84 de cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aisladas de pacientes humanos y animales productivos.....	46

Figura 11. Mediana y valor máximo y mínimo del porcentaje de invasión a células T84 según especie bacteriana y presencia/usencia del gen *dnaJ*48

RESUMEN

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) y *Campylobacter coli* (*C. coli*) son microorganismos comensales en animales productivos y constituyen una de las principales causas de enteritis de transmisión alimentaria. *C. jejuni* es responsable del 90% de las campylobacteriosis humanas y *C. coli* cerca del 10%. Ambas especies son aisladas en proporciones similares de la carne de pollo, la principal fuente de infección del ser humano, representando cada una de ellas cerca del 50% de los *Campylobacter* spp. aislados.

Para estas bacterias, la adherencia e invasión a células intestinales son mecanismos fundamentales de patogenicidad. Se han identificado diversos factores de virulencia asociados a estos mecanismos, como también diferencias entre *C. jejuni* y *C. coli* en las prevalencias y tamaños de algunos de los genes que los codifican.

El propósito del presente trabajo fue caracterizar la capacidad de adherencia e invasión a células intestinales humanas de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de personas y animales productores de alimentos y relacionar esta capacidad con la presencia de siete genes de virulencia (*cadF*, *flaA*, *racR*, *dnaJ*, *virB11*, *ciaB* y *pldA*). La hipótesis fue que las cepas de *C. jejuni* tendrían mayor capacidad de adherir e invadir células intestinales humanas que las cepas de *C. coli*, y que esta capacidad se relacionaría positivamente con la presencia de genes de virulencia.

Se emplearon 15 cepas de *C. jejuni* y 17 de *C. coli* aisladas desde pacientes humanos, cerdos, bovinos y pollos broiler. La presencia de los genes de virulencia de cada una de las cepas fue caracterizada en un estudio previo mediante la técnica de PCR convencional. Para evaluar la capacidad de

adherencia e invasión a células intestinales humanas se realizaron estudios *in vitro* empleando la línea celular T84 de epitelio colónico T84 y midiendo el número de bacterias adheridas luego de una h de infección y las bacterias internalizadas luego de tres. La asociación con los genes de virulencia se valoró mediante análisis de regresión logística, el que se complementó con el test Kruskal-Wallis para evaluar diferencias en adherencia e invasión entre cepas portadoras y no portadoras de los genes.

Los resultados demostraron que tanto las cepas humanas como las aisladas desde animales productores de alimento tienen la capacidad de adherir e invadir células intestinales *in vitro* y que esta capacidad varía entre las diferentes cepas. Estadísticamente, no se encontraron diferencias en la capacidad de adherencia e invasión entre *C. jejuni* y *C. coli*. El análisis Kruskal-Wallis (y test post-hoc Dunn) reveló que las cepas de *C. coli* portadoras del gen *dnaJ* tenían una mayor capacidad de invasión que las cepas de *C. coli* no portadoras del gen y que las cepas *C. jejuni* portadoras del mismo. Asimismo, con el análisis de regresión logística se encontró una asociación significativa entre la presencia del gen *dnaJ* y una mayor capacidad invasora en la especie *C. coli*.

Los resultados de este trabajo sugieren que *C. jejuni* y *C. coli* tendrían la misma capacidad de adherir e invadir células intestinales humanas y que solo existiría una asociación positiva entre el gen *dnaJ* y la invasión de cepas de *C. coli*.

Palabras claves: *Campylobacter* spp., adherencia a células intestinales, invasión a células intestinales, genes de virulencia.

SUMMARY

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) and *Campylobacter coli* (*C. coli*) are commensals microorganisms of food-producing animals, and they are considered one of the major causes of food-borne enteritis. 90% of human campylobacteriosis is caused by *C. jejuni* and most of the rest by *C. coli*. Both species are isolated in similar proportions from chicken meat, the main source of human infection, representing each of them almost the 50% of *Campylobacter* spp. isolated.

The adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells are essential mechanisms in *Campylobacter* pathogenesis. There have been identified several virulence factors related to these mechanisms, besides differences between *C. jejuni* and *C. coli* in the prevalence and size of some of the genes that encode them.

The aim of this work was studied the adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *C. jejuni* and *C. coli* isolated from humans and food-producing animals, and to relate those abilities to the presence of seven virulence genes (*cadF*, *flaA*, *racR*, *dnaJ*, *virB11*, *ciaB* y *pldA*). The hypothesis was that *C. jejuni* strains would have more ability to adhere to and invade human intestinal epithelial cells than *C. coli* strains, and those abilities would be associated with the presence of virulence genes.

We used 15 *C. jejuni* strains and 17 *C. coli* strains isolated from human patients, broiler chickens, swine, and bovines. The presence of virulence genes of each of the strains was determined using PCR before this work. We employed the human colonic epithelial cell line T84 to test *in vitro* the adherence and invasion abilities, and we checked them after one and three hours of infection to

determine the number adhered and internalized bacteria, respectively. To test the association with the virulence genes we used logistic regression, and to evaluate differences of adherence and invasion between strains carrying and non-carrying virulence genes we used the Kruskal-Wallis test.

We observed that both *Campylobacter* isolates from humans and from food-producing animals are capable of adhering to and of invading intestinal epithelial cells *in vitro*, and there are variations between strains in those abilities. Statistically, no significant differences were detected between *C. jejuni* and *C. coli* in their abilities to adhere to and to invade T84 cells. The Kruskal-Wallis test (and post-hoc Dunn test) showed that *C. coli* strains carrying *dnaJ* gene invaded more than *C. coli* strains non-carrying the gene, and more than *C. jejuni* strains carrying the same gene. Besides, a significant association was detected between the presence of the *dnaJ* gene and a higher invasion in *C. coli* strains by logistic regression.

Our results suggest that *C. jejuni* and *C. coli* would have the same adherence and invasion abilities, and that, statistically, it would exist only a positive association between the *dnaJ* gene and the invasion ability of *C. coli* strains.

Key words: *Campylobacter* spp., adherence to epithelial cells, invasion of epithelial cells, virulence genes.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Campylobacter*, particularmente las especies *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) y *Campylobacter coli* (*C. coli*), constituyen una de las principales causas de gastroenteritis de transmisión alimentaria (Eucker y Konkel, 2012; Nadeau *et al.*, 2003). El 90% de los casos es atribuido a la infección por *C. jejuni* y algo menos del 10% a *C. coli* (Wilson *et al.*, 2008). Tanto *C. jejuni* como *C. coli* poseen un amplio rango de hospederos que incluyen animales productivos como aves, bovinos, ovinos y cerdos, siendo considerados microorganismos comensales en estos animales (Friis *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2008).

La transmisión al ser humano se efectúa a través del consumo de alimentos y agua contaminados, siendo el consumo de carne de ave, particularmente la de pollo, la fuente de transmisión más frecuente (Butzler, 2004; EFSA y ECDC, 2015; Friis *et al.*, 2005). Pese a que en los pollos y en sus productos cárnicos, la especie de mayor prevalencia es *C. jejuni*, la diferencia con *C. coli* no llega a ser tan importante, informando prevalencias de 45-72% para *C. jejuni* y 27-54% para *C. coli* (El-Shibiny *et al.*, 2005; Lapierre *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2001). Esta diferencia es sustancial en los aislados obtenidos desde casos humanos, donde el 90% de los pacientes se enferman con *C. jejuni* (Wilson *et al.*, 2008).

Los principales mecanismos de patogenicidad de *Campylobacter* son la motilidad, la capacidad de adherencia e invasión a células eucariontes y la producción de citotoxinas (Silva *et al.*, 2011). Algunas investigaciones empleando técnicas moleculares y cultivos celulares, han dado indicios de posibles diferencias en la patogenicidad de *C. jejuni* y *C. coli*, evidenciando variaciones en la prevalencia de los genes que codifican factores de virulencia o en la capacidad

de adherencia e invasión a células intestinales (Krause-Gruszczynska *et al.*, 2007; Lapierre *et al.*, 2016; Thakur *et al.*, 2010; Wieczorek *et al.*, 2012). Estos hallazgos han conducido al cuestionamiento de las razones que expliquen la mayor prevalencia de *C. jejuni* en personas enfermas y a la sospecha que no necesariamente tendría relación con una mayor exposición a este patógeno, sino con otros factores.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Género *Campylobacter*

Las bacterias del género *Campylobacter*, identificadas por primera vez en 1906 por dos médicos veterinarios británicos, son agentes infecciosos que pueden afectar a seres humanos y animales (Silva *et al.*, 2011). En la población humana constituyen una de las principales causas de gastroenteritis de transmisión alimentaria, con 400-500 millones de casos anuales a nivel mundial (Eucker y Konkel, 2012; Nadeau *et al.*, 2003). Aunque el género está compuesto por 25 especies, la enfermedad en las personas se asocia principalmente a dos de ellas: *C. jejuni* y *C. coli* (Man, 2011; Mavri y Smole Mozina, 2013).

Estos microorganismos se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, pequeños (0,5-8 μm x 0,2-0,5 μm), móviles, con uno o varios flagelos polares y por tener una forma curva o espiral. No fermentan ni oxidan carbohidratos, sino que obtienen su energía a partir de aminoácidos o intermediarios del ciclo de ácidos tricarbónicos y son microaerófilos, pues crecen mejor en una atmósfera con baja tensión de oxígeno (en condiciones de 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂). La mayoría de ellos crece a una temperatura de 37°C, pero las especies termotolerantes como es el caso de *C. jejuni* y *C. coli* son capaces de crecer también a 42°C (Horrocks *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011).

Campylobacter es una bacteria ubicua pues puede encontrarse en el medio ambiente, o colonizar el tracto gastrointestinal de animales domésticos y silvestres. Se ha aislado desde granjas de animales, plantas faenadoras y entornos urbanos y desde agua fresca, marina y servidas. En el ganado bovino, porcino y aves alcanzan una alta prevalencia, superando a veces el 80%. Tanto los animales, y sus productos destinados al consumo humano, como el medio

ambiente, son potenciales fuentes de contaminación para el ser humano (Horrocks *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2008).

2.2. Campylobacteriosis

La Campylobacteriosis humana es una enfermedad gastrointestinal aguda que en el 90% de los casos es producida por *C. jejuni* y en el 10% restante lo es principalmente asociada a *C. coli* (Wilson *et al.*, 2008). En general se presenta de forma autolimitada, siendo la diarrea, el dolor abdominal y la fiebre los síntomas más frecuentes. En niños, personas inmunodeprimidas y adultos mayores, la sintomatología puede alcanzar mayor severidad y requerir el uso de antibióticos (Allos, 2001; Butzler, 2004).

Además de la manifestación gastrointestinal, existen otras complicaciones como el Síndrome de Guillain-Barré (SGB) y el Síndrome de Reiter (Whiley *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2008). El primero corresponde a una parálisis neuromuscular aguda de carácter autoinmune y que ocurre en 1 de cada 1000 casos de infección por *C. jejuni*. El segundo es una artritis reactiva que compromete varias articulaciones y que se asocia al 1% de los cuadros de Campylobacteriosis (Whiley *et al.*, 2013).

Se considera una enfermedad emergente, pues solo a inicios de 1980 se le reconoció su importancia en seres humanos (Allos, 2001). En las naciones industrializadas es la enfermedad gastrointestinal bacteriana de transmisión alimentaria más frecuente (Bolton, 2015), superando de 2 a 7 veces la frecuencia de infecciones por otros patógenos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. o *Escherichia coli* O157:H7, y es también una de las causas más comunes de la denominada “diarrea del viajero” (Allos, 2001; ISP, 2014). En naciones en desarrollo *Campylobacter* es el segundo o tercer agente etiológico de diarrea,

afectando preferentemente a niños menores de dos años y disminuyendo su frecuencia a medida que los infantes aumentan en edad (Fernández, 2011; ISP, 2014).

En Estados Unidos se estima que ocurren 1,3 millones de casos anuales y en la Unión Europea, durante el año 2013 se confirmaron 200 mil casos. Sin embargo, debido a que la mayoría de los casos son subdiagnosticados o no informados, la frecuencia de la enfermedad podría alcanzar cifras aún más elevadas (EFSA y ECDC, 2015; Geissler y Mahon, 2016). En Chile, a pesar de ser una enfermedad de notificación obligatoria (MINSAL, 2004), la realización de estadísticas oficiales de prevalencia se ve dificultada por la baja notificación y derivación hacia los laboratorios de referencia, pero los datos disponibles informan de 462 aislamientos de *Campylobacter* spp. confirmadas entre los años 2005 y 2013 (79,2% correspondientes a la especie *C. jejuni* y el 15,2% a *C. coli*), con una tendencia al alza salvo en los dos últimos años, y con la mayor cantidad de cepas confirmadas durante el 2011 (ISP, 2014).

2.3. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*

C. jejuni y *C. coli* son las especies más importantes desde el punto de vista de seguridad alimentaria, pues son la causa más frecuente de campylobacteriosis humana (Horrocks *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2008). Poseen un amplio rango de hospederos, que incluyen animales productivos como bovinos, ovinos, cerdos y aves, animales silvestres y seres humanos; en los animales, generalmente, establecen una relación comensal en el tracto gastrointestinal y no producen enfermedad (Friis *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2008).

Si bien *C. jejuni* es la especie aislada con mayor frecuencia tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, la frecuencia de

aislamiento de *C. coli* difiere según la industrialización de las naciones. En aquellas industrializadas, *C. coli* es reconocido como el agente causal de *Campylobacteriosis* humana en el 5 a 10% de los casos, pero en Sudamérica representa el 25% de ellos (Fernández, 2011).

En cuanto a su presencia en animales productivos, tanto en aves domésticas como en bovinos la especie aislada más comúnmente es *C. jejuni* y en cerdos es *C. coli* (Horrocks *et al.*, 2009). No obstante, El-Shibiny *et al.* (2005) informaron tendencias opuestas, encontrando que la frecuencia de aislamiento de *C. coli* era mayor que la de *C. jejuni* en pollos de una granja orgánica en Inglaterra.

Otra particularidad de *C. jejuni*, además de ser la especie que más frecuentemente se relaciona con la infección humana, es que es el patógeno que más se asocia a casos de SGB, describiéndose que 1 de cada 3 pacientes que padece este síndrome tiene historial de infección con *C. jejuni*; además los casos de SGB relacionados con esta infección son generalmente más severos y requieren tratamiento intensivo hospitalario (Butzler, 2004).

2.4. Reservorios y transmisión al ser humano

Campylobacter spp. tiene como reservorios tanto animales domésticos como silvestres, siendo las aves, y particularmente los pollos, los reservorios y la fuente de infección humana más importante (Butzler, 2004; Horrocks *et al.*, 2009). La transmisión al ser humano se efectúa a través del consumo de alimentos y agua contaminados, siendo la carne de ave, de bovino y los productos lácteos las fuentes involucradas con mayor frecuencia (Mavri y Smole Mozina, 2013; Tareen *et al.*, 2013). El consumo de carne de ave cruda o semicruda es

considerado como el principal factor de riesgo para adquirir el patógeno (Butzler, 2004; EFSA y ECDC, 2015; Friis *et al.*, 2005).

Las aves, gracias a su alta temperatura metabólica (42°C), constituyen un ambiente especialmente favorable para las especies termotolerantes: *C. jejuni* y *C. coli* (Horrocks *et al.*, 2009). El porcentaje de pollos contaminados por *Campylobacter* spp. varía según los países; en Estados Unidos el 90% de los lotes son positivos; en la Unión Europea lo son el 71,2% de los lotes y el 75,8% de las carcasas (Whiley *et al.*, 2013) y en la provincia de Quebec, Canadá, la positividad alcanza el 40% de los pollos y el 60% de las aves faenadas (Nadeau *et al.*, 2002). En relación a datos nacionales, Figueroa *et al.* (2009) comunicaron el aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli* en el 38-68% de las carcasas de pollo luego del enfriamiento en plantas procesadoras. Cuando se hace el desglose según la especie de *Campylobacter*, estudios recientes realizados en Chile informan una prevalencia del 72,2% para *C. jejuni* y del 27,3% para *C. coli* en pollos y del 45,7% para *C. jejuni* y 54,3% para *C. coli* en la carne de estos animales (Lapierre *et al.*, 2016). Por otro lado, Zhao *et al.* (2001), en Estados Unidos, determinaron que del total de los *Campylobacter* aislados de carne de pollo, el 54% correspondía a la especie *C. jejuni* y el 41% a la especie *C. coli*.

Es importante mencionar que casi todas las partes de las carcasas de pollos, ya sea fresca, refrigerada o congelada, están frecuentemente contaminadas con *Campylobacter* spp. (Butzler, 2004). Esta situación se produce debido a la contaminación cruzada desde los contenidos cecales e intestinales durante el proceso de evisceración, permitiendo la detección de la bacteria principalmente en la piel y también en la carne (Horrocks *et al.*, 2009). Esta contaminación cruzada favorece que *Campylobacter* se aisle tan frecuentemente desde la carne de pollo, siendo mucho mayor que lo informado para productos cárnicos de otras especies, incluso aunque la prevalencia en aquellos animales

sea alta (Horrocks *et al.*, 2009; Noormohamed y Fakhr, 2013; Silva *et al.*, 2011; Whiley *et al.*, 2013).

Las investigaciones epidemiológicas han demostrado una correlación significativa entre la manipulación y consumo de carne de pollo y la ocurrencia de campylobacteriosis (Butzler, 2004). Por ejemplo, en estudios realizados en Estados Unidos, Europa y Australia, el 50-70% de todas las infecciones por *Campylobacter* han sido atribuidas al consumo de carne de pollo (Allos, 2001). A nivel mundial, el rango que puede ser atribuido a esta fuente abarca desde 30% al 58-76% y más del 80% en algunos países (Whiley *et al.*, 2013). Aunque en menor proporción, el consumo de carne de vacuno y de leche no pasteurizada también han sido implicados en casos esporádicos y brotes de Campylobacteriosis (Allos, 2001; Butzler, 2004). En bovinos, la bacteria ha podido ser aislada desde el tracto gastrointestinal inferior, vesícula biliar e hígado y desde estanques de acopio de leche (Horrocks *et al.*, 2009).

Estudios recientes han intentado establecer con mayor exactitud el origen de las infecciones humanas. Es así como Wilson *et al.* (2008), empleando la secuenciación genética de las cepas, determinaron que en Inglaterra los animales de granja eran la principal fuente de infección humana por *C. jejuni*, atribuyendo el 97% de los casos esporádicos a estos animales, y la mayoría de ellos a pollos y bovinos; el rol de los cerdos fue despreciable, explicado posiblemente por la baja prevalencia de *C. jejuni* en estos animales. Así mismo, Sheppard *et al.* (2009), a través de la genotipificación de cepas, establecieron que en Escocia entre los años 2005 y 2006, el 76% de los casos de campylobacteriosis (78% por *C. jejuni* y 56% por *C. coli*) podían ser atribuidos al consumo de carne de pollo, que bovinos y ovinos contribuían en menos del 20% de los casos por *C. jejuni* y que cerdos contribuían en menos del 1% de las infecciones por *C. coli*.

2.5. Patogenia y factores de virulencia

En los últimos años se han identificado varios factores de virulencia de *Campylobacter*, sin embargo, aún no está completamente claro el rol de todos estos factores en la patogénesis de la enfermedad. Los factores de virulencia asociados a la motilidad, capacidad de adherencia e invasión a células eucariontes y producción de citotoxinas son los factores que más se han relacionado con la patogenicidad de estas bacterias (Silva *et al.*, 2011).

La motilidad es esencial para que *Campylobacter* colonice efectivamente el intestino. Esta propiedad está dada por la presencia de flagelo y por la forma espiral de la bacteria que, en conjunto, le permiten penetrar eficientemente la barrera mucosa de las células intestinales (van Vliet y Ketley, 2001). El flagelo está formado por dos proteínas codificadas por los genes *flaA* y *flaB*; algunas mutaciones en estos genes, en especial *flaA*, reducen la motilidad y habilidad de colonizar el tracto gastrointestinal. El flagelo también participaría en la adhesión e invasión a células hospederas, ya que organismos aflagelados o con flagelos inmóviles reducen su adherencia e internalización a células epiteliales *in vitro* (Crushell *et al.*, 2004; van Vliet y Ketley, 2001).

La adherencia a células intestinales juega un rol fundamental en la colonización y progresión de la enfermedad, ya que evita la eliminación de *Campylobacter* desde el intestino por acción del peristaltismo y flujo de fluidos (Konkel *et al.*, 2010). Además de los genes que codifican las proteínas flagelares, *cadF*, *racR* y *dnaJ* han sido sindicados como responsables de la expresión de adherencia y colonización de esta bacteria (Talukder *et al.*, 2008). Por otro lado, la invasión celular puede resultar en daño celular e inflamación, conduciendo a una disminución en la capacidad de absorción del intestino; los genes que han

sido identificados como responsables de la invasión son *virB11*, *ciaB* y *pldA* (González-Hein *et al.*, 2013; Talukder *et al.*, 2008).

Otro factor de virulencia importante en *Campylobacter* es la citotoxina de distensión citoletal (CDT) que está formada por 3 subunidades codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. CdtB es la subunidad activa del complejo y tiene actividad DNasa, mientras que CdtA y CdtC son necesarias para la distribución de la subunidad activa. Los efectos de esta citotoxina sobre las células hospederas son la distensión celular, arresto en la fase G2/M (bloqueando la entrada a mitosis) y posterior muerte (Crushell *et al.*, 2004; van Vliet y Ketley, 2001). También es un factor importante para la liberación de interleuquina 8 por células intestinales *in vitro*, lo que juega un rol importante en la respuesta inflamatoria de la mucosa del hospederero (González-Hein *et al.*, 2013).

Para clarificar los mecanismos de patogénesis de *Campylobacter* se han empleado modelos animales, cultivos celulares y técnicas moleculares (Haddad *et al.*, 2010). Asimismo, estos métodos han permitido identificar algunas variaciones en los factores de virulencia dependientes de las cepas y especies del género (Nadeau *et al.*, 2003; Thakur *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2006).

Por ejemplo, mediante la técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) se han establecido las prevalencias de los genes de virulencia en cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas desde diferentes fuentes. Es así como Thakur *et al.* (2010), analizando 360 cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, determinaron que la prevalencia del gen *flaA* en cepas aisladas de pacientes humanos era mayor en *C. jejuni* que en *C. coli*, pero la prevalencia de los genes *dnaJ*, *pldA* y *virB11* en cepas aisladas desde productos cárnicos era significativamente mayor en *C. coli* versus *C. jejuni*. Recientemente en Chile se investigó la prevalencia de 11 genes de virulencia relacionados con adherencia, invasión y citotoxicidad; para esto, se

analizaron 318 cepas de *C. jejuni* y 210 de *C. coli* aisladas de pacientes humanos, animales productores de alimentos y productos cárnicos; el estudio concluyó una mayor prevalencia de todos estos genes, incluyendo aquellos asociados a adherencia y colonización (*flaA*, *dnaJ*, *cadF*, *racR*) e invasión (*ciaB*, *pldA*, *virB11*), en las cepas de la especie *C. jejuni* versus *C. coli*. Esta mayor prevalencia de los genes en *C. jejuni* fue establecida considerando la totalidad de las cepas, sin distinguir el hospedero desde donde fueron aisladas (Lapierre *et al.*, 2016).

Estudios en cultivos celulares han informado que tanto cepas de *Campylobacter* aisladas de seres humanos como aquellas aisladas de animales y productos cárnicos tienen capacidad para unirse e invadir células intestinales, pero que existe variación en el grado con que las distintas cepas se adhieren e ingresan a estas células (Nadeau *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006). En un estudio realizado en líneas celulares de epitelio colónico (células T84) se analizó la capacidad de adherencia e invasión de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas desde carne de pollo, pavo, cerdo y vacuno y no se encontraron diferencias significativas entre estas dos especies, sin embargo, la mayoría de las cepas de *C. coli* presentaron los niveles de invasión más bajos de la clasificación (Zheng *et al.*, 2006).

En el año 2007, un grupo de investigadores demostraron que el gen *cadF* de las cepas de *C. coli* difería por una secuencia de inserción de 39 pares de bases con el mismo gen de cepas de *C. jejuni*, lo que explicaba el mayor tamaño del gen presente en la primera especie mencionada. Adicionalmente, evaluaron la capacidad de unión e internalización de estas bacterias a células epiteliales intestinales (células INT-407) encontrando una mayor adhesión e invasión de *C. jejuni* en comparación con *C. coli* (Krause-Gruszczynska *et al.*, 2007).

Considerando (i), el 90% de las campylobacteriosis humanas son producidas por *C. jejuni* y algo menos del 10% son atribuidas a *C. coli*, pero en pollos y sus productos cárnicos (principal fuente de infección para el ser humano) la diferencia en las prevalencias entre ambas especies no es tan marcada. (ii), se han identificado una serie de genes que codificarían factores de virulencia asociados con patogenicidad y algunos estudios han informado mayores prevalencias de estos genes en las cepas de *C. jejuni* que en *C. coli* y (iii), la adhesión e invasión a células intestinales son dos mecanismos fundamentales en la patogénesis de la enfermedad por *Campylobacter*. En este trabajo nos planteamos la pregunta ¿la mayor frecuencia con que *C. jejuni* produce enfermedad en las personas es, necesariamente, por ser la especie que toma mayor contacto con el ser humano? o, dada la mayor prevalencia de genes de virulencia en cepas de *C. jejuni*, incluyendo aquellos asociados a la adhesión e invasión ¿podría *C. jejuni* tener mayor capacidad para adherir e invadir células intestinales humanas que *C. coli*? Estas son las interrogantes que han conducido al planteamiento de la hipótesis del presente proyecto.

3. HIPÓTESIS

Las cepas de *C. jejuni* tienen mayor capacidad de adherir e invadir células intestinales humanas que cepas de *C. coli* y esta capacidad se relaciona positivamente con la presencia de genes de virulencia.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar la adhesión e invasión a células intestinales humanas de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas desde diferentes hospederos y relacionar esta capacidad con la presencia o ausencia de genes de virulencia.

4.2. Objetivos específicos

- a) Comparar la capacidad de adherencia e invasión a células intestinales humanas de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de diferentes hospederos.
- b) Correlacionar la capacidad de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* de adherir e invadir células intestinales humanas con la presencia de genes de virulencia.

5. MATERIALES Y MÉTODO

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna. Se adjunta como material complementario el certificado de bioseguridad de este laboratorio.

5.1. Cepas bacterianas

Se emplearon 32 cepas de *C. jejuni* (n=15) y *C. coli* (n=17) aisladas de muestras fecales de pacientes humanos y animales productores de alimentos. Las cepas humanas (n=8), facilitadas por el Instituto de Salud Pública, se aislaron de pacientes de 4 a 14 años de edad con signos clínicos de Campylobacteriosis atendidos en centros de salud de la Región Metropolitana durante el año 2013. Los aislados de *Campylobacter* spp. de animales se obtuvieron en el marco del proyecto Fondecyt n°11110200 durante el año 2013 y proceden de cerdos (n=8), bovinos (n=8) y pollos broiler (n=8) destinados a la producción cárnica de empresas pecuarias de la Región Metropolitana. Las cepas se conservaron en sangre ovina o en sistema de conservación de cultivos bacterianos Cryobank™ a -80°C desde su obtención hasta el momento del presente estudio.

Durante el desarrollo del proyecto Fondecyt antes mencionado, las cepas se identificaron por la metodología de MALDI TOF para especie (*C. jejuni* y *C. coli*) y se tipificaron mediante la técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para establecer sus relaciones de clonalidad (siendo todas las cepas escogidas para el estudio no clonales). Además, se caracterizaron según la presencia de genes de virulencia involucrados en la adherencia y colonización (*flaA*, *cadF*, *racR* y *dnaJ*) e invasión (*virB11*, *ciaB* y *pldA*) mediante la técnica de PCR convencional, según lo descrito por Talukder *et al.*, 2008. La tabla 1 muestra los primers utilizados para la detección de estos genes.

TABLA 1: Primers usados para la detección de genes de virulencia mediante PCR convencional.

Gen	Primers	Secuencia 5'–3'	T° alineamiento (°C)	Peso (pb)
<i>cadF</i>	<i>cadF</i> -F2B	TTGAAGGTAATTTAGATATG	45	400
	<i>cadF</i> -R1B	TAATACCTAAAGTTGAAAC		
<i>racR</i>	<i>racR</i> -25	GATGATCCTGACTTTG	45	584
	<i>racR</i> -593	TCTCCTATTTTTACCC		
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> 664	AATAAAAATGCTCATAAAAACAGGTG	53	855
	<i>flaA</i> 1494	TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT		
<i>dnaJ</i>	<i>dnaJ</i> -299	AAGGCTTTGGCTCATC	46	720
	<i>dnaJ</i> -1003	CTTTTTGTTTCATCGTT		
<i>virB11</i>	<i>virB</i> -232	TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT	53	494
	<i>virB</i> -701	CCTGCGTGTCTGTGTTATTTACCC		
<i>ciaB</i>	<i>ciaB</i> -403	TTTTTATCAGTCCTTA	42	986
	<i>ciaB</i> -1373	TTTCGGTATCATTAGC		
<i>pldA</i>	<i>pldA</i> -84	AAGCTTATGCGTTTTT	45	913
	<i>pldA</i> -981	TATAAGGCTTTCTCCA		

La elección de las cepas incluidas en el estudio se realizó de manera aleatoria, se seleccionaron 10 – 12 cepas de cada hospedero desde una base de datos que contenía 300 cepas totales, se sembraron en medio de cultivo para *Campylobacter* spp. y se eligieron las 8 cepas que mostraron mayor crecimiento en placa. En la tabla 2 se detalla la especie, origen y presencia de genes de virulencia de cada *Campylobacter* spp. estudiado.

Las cepas ATCC 43478 (*C. coli*) y ATCC 33560 (*C. jejuni*) se utilizaron para estandarizar los ensayos de adherencia e invasión, previo al trabajo con las cepas problema, y como controles positivos para todos los análisis posteriores.

TABLA 2: Especie, origen y presencia de genes de virulencia de las cepas de *Campylobacter* spp. empleadas en el estudio.

Especie	Origen	Cepa	Genes de virulencia						
			<i>cadF</i>	<i>racR</i>	<i>flaA</i>	<i>dnaJ</i>	<i>virB11</i>	<i>ciaB</i>	<i>pldA</i>
<i>C. jejuni</i>	Humanos	H1J	+ ^a	+	+	+	+	- ^b	-
		H2J	-	-	-	-	+	-	-
		H3J	+	+	+	+	+	-	-
		H4J	+	+	+	+	-	-	-
		H5J	+	+	+	-	-	+	+
	Bovinos	B1J	+	+	+	+	-	+	+
		B2J	+	+	+	+	+	+	+
		B3J	+	+	+	-	-	-	-
		B4J	-	-	-	-	-	-	-
		B5J	-	-	+	+	-	+	-
	Pollos	A1J	+	+	+	+	-	+	+
		A2J	+	+	+	+	-	-	-
		A3J	+	+	+	-	-	+	+
		A4J	+	-	+	+	+	-	-
		A5J	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. coli</i>	Humanos	H6C	+	-	-	-	-	-	-
		H7C	+	+	+	-	-	-	-
		H8C	+	+	+	-	-	+	+
	Bovinos	B6C	-	-	-	-	-	-	-
		B7C	-	-	-	-	-	-	-
		B8C	-	+	-	-	-	-	-
	Pollos	A6C	+	+	+	+	-	+	-
		A7C	+	+	+	+	-	+	+
		A8C	+	+	+	+	-	-	-
	Cerdos	C1C	-	-	-	+	-	-	-
		C2C	-	+	+	-	-	-	-
		C3C	+	+	-	-	-	-	-
		C4C	+	-	+	+	-	+	-
		C5C	-	-	+	+	-	-	-
		C6C	-	-	-	+	-	+	-
C7C		+	-	+	-	-	-	-	
C8C		-	-	+	-	-	-	+	

Presencia o ausencia de los distintos genes de virulencia: ^a presencia del gen; ^b ausencia del gen.

5.2. Crecimiento bacteriano

Las cepas bacterianas se sembraron en agar Tripticasa de soya más 5% de sangre ovina (TSS; Biomeriux®) e incubaron durante 48 h, a 37°C y en condiciones de microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂). Para crear la atmósfera adecuada se emplearon jarras de cierre hermético y el sistema de generación de atmósfera CampyGen™ (Oxoid®) o GENbox microaer (Biomeriux®).

Para los ensayos de adhesión e invasión las cepas incubadas se recolectaron en Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM; Hyclone®), determinando su concentración mediante espectrofotometría.

5.3. Cultivo celular

Las células T84 (*human colonic epithelial cell line*) se mantuvieron en medio Dulbecco's Eagle's modificado mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12; Hyclone®) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Hyclone®) al 10%, 10 U/mL penicilina (Hyclone®) y 10 µg/mL estreptomina (Hyclone®), a 37°C y 5% CO₂. Para los ensayos de adhesión e invasión, se sembraron 5x10⁴ células/pocillo en placas de cultivo de 48 pocillos hasta alcanzar una confluencia de la monocapa cercana al 90-100%.

5.4. Ensayo de adherencia e invasión

Los ensayos de adherencia e invasión se realizaron según lo descrito por Zheng *et al.* (2006) con las modificaciones pertinentes luego de la estandarización del modelo con las cepas ATCC 43478 (*C. coli*) y ATCC 33560 (*C. jejuni*).

Para los ensayos de adhesión las monocapas de células se lavaron una vez con buffer salino fosfato (PBS; Hyclone®) y se incubaron con medio sin suplementar durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS (Hyclone®) y se infectaron empleando una multiplicidad de infección (MOI) de 100, a 37°C y 5% CO₂, y durante un periodo de tiempo (1 a 3 h) definido luego de la estandarización del ensayo (tiempo de infección). El número de bacterias inoculadas viables se determinó simultáneamente en placas de agar modificado con deoxicolato, cefoperazona y carbón (mCCDA-Preston; Oxoid®). Transcurrido el tiempo de infección, las células se lavaron tres veces con PBS (Hyclone®) y se lisaron con una solución al 0,5% de Tritón™ X-100 (Sigma-Aldrich®). Para la cuantificación de las bacterias adheridas se realizaron diluciones seriadas del lisado, se sembraron en placas de mCCDA-Preston (Oxoid®) por 48 h, a 37°C y microaerofilia y se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC).

Los experimentos de invasión se realizaron de acuerdo a lo descrito anteriormente, salvo que luego de la infección y lavado con PBS (Hyclone®), la monocapa de células se incubó por tres h adicionales, incorporando en el medio 100 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich®) para destruir las bacterias localizadas extracelularmente. Posteriormente las células se lavaron y lisaron y se cuantificaron las UFC realizando diluciones seriadas y sembrando en placas de mCCDA-Preston (Oxoid®).

Cada cepa se analizó en triplicado, expresando la adhesión como un porcentaje del inóculo inicial viable (porcentaje de adhesión) y la invasión de dos maneras, como un porcentaje del inóculo inicial viable (porcentaje de invasión del inóculo) y como porcentaje de las bacterias adheridas a la hora de infección (porcentaje de invasión de las adheridas). El cálculo se realizó como muestran las fórmulas en la figura 1.

$$\text{Adhesión (\%)} = \left(\frac{\text{bacterias adheridas}}{\text{inóculo inicial viable}} \right) \times 100$$

$$\text{Invasión del inóculo (\%)} = \left(\frac{\text{bacterias internalizadas}}{\text{inóculo inicial viable}} \right) \times 100$$

$$\text{Invasión de las adheridas (\%)} = \left(\frac{\text{bacterias internalizadas}}{\text{bacterias adheridas}} \right) \times 100$$

FIGURA 1: Fórmulas para el cálculo de los porcentajes de adhesión e invasión.

Como control negativo se utilizó la monocapa de células sin infectar. Como control positivo se utilizaron las cepas ATCC 43478 (*C. coli*) y ATCC 33560 (*C. jejuni*).

5.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graphpad Prism 5® e Infostat® versión 2015.

Mediante el test Mann-Whitney se determinó la significancia estadística entre las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* en su capacidad de adherencia e invasión, considerando significativo un valor $p \leq 0,05$.

Mediante el test Kruskal-Wallis (y test post-hoc Dunn) se evaluó la diferencia en la capacidad de adherencia e invasión de las cepas considerando simultáneamente la especie bacteriana y la presencia o ausencia de los diferentes genes; se realizaron 7 análisis independientes para cada uno de los 7 genes de virulencia incluidos en el estudio. Se consideró significativo un valor $p \leq 0,05$.

La correlación entre la adhesión e invasión a células intestinales humanas y la presencia de los genes de virulencia en las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* se verificó mediante un Análisis de Regresión Logística. Se evaluó la asociación entre las variables dependientes binarias (presencia o ausencia de los distintos genes de virulencia) y las variables independientes continuas (adherencia e invasión). Cada modelo incluyó la presencia/ausencia de cada uno de los genes como variable dependiente binaria (0=ausencia; 1=presencia) y la adherencia o invasión como variable independiente; se realizaron dos tipos de análisis, uno incluyó ambas especies bacterianas de forma simultánea y el otro a *C. jejuni* y *C. coli* de forma independiente. Se consideró una asociación significativa con un valor $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Estandarización de los modelos de adhesión e invasión

Para la estandarización de los modelos de adhesión e invasión se emplearon las cepas ATCC 43478 (*C. coli*) y ATCC 33560 (*C. jejuni*), evaluando diferentes tiempos de infección (1, 2 y 3 h) y la centrifugación de las células infectadas.

El mayor porcentaje de adhesión para ambas cepas se alcanzó empleando 1 h de infección, siendo significativa la diferencia con 2 y 3 h ($p < 0,05$) (Fig. 2). A la hora de infección, el mayor porcentaje de bacterias adheridas se obtuvo sin centrifugar para *C. jejuni* ATCC 33560 y centrifugando para *C. coli* ATCC 43478. La diferencia entre las bacterias adheridas centrifugando y no centrifugando las células infectadas fue significativa para *C. jejuni* ATCC 33560 ($p < 0,05$) pero no para *C. coli* ATCC 43478 (Fig. 3).

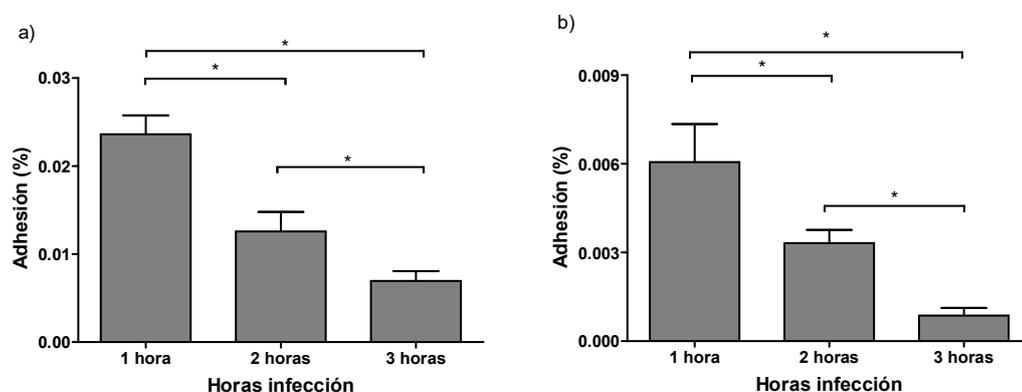


FIGURA 2: Estandarización del modelo de adhesión evaluando distintos tiempos de infección. Adhesión a células T84 evaluando diferentes tiempos de infección. Las células T84 se infectaron por 1, 2 o 3 h y el resultado se graficó como porcentaje del inóculo inicial viable. a) Adhesión de *C. jejuni* ATCC 33560 a células T84. b) Adhesión de *C. coli* ATCC 43478 a células T84. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

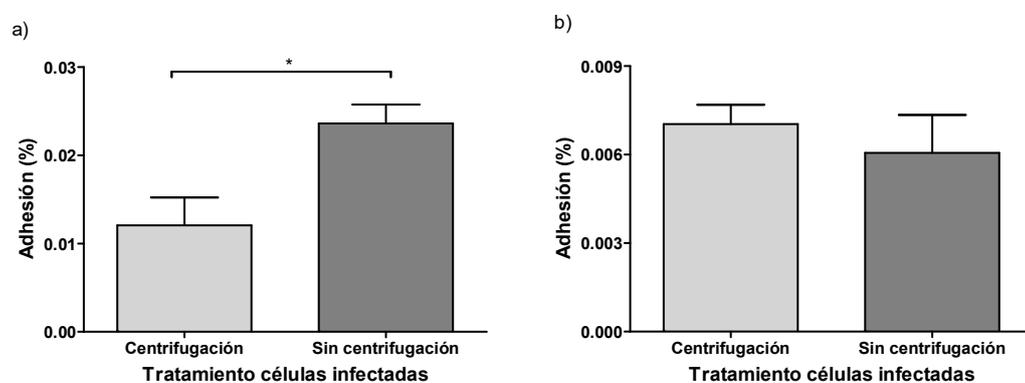


FIGURA 3: Estandarización del modelo de adhesión evaluando centrifugación de las células infectadas. Adhesión a células T84 evaluando la centrifugación de las células infectadas. Las células T84 infectadas centrifugadas y no centrifugadas se incubaron durante 1 h. El resultado se graficó como porcentaje del inóculo inicial viable. a) Adhesión de *C. jejuni* ATCC 33560 a células T84. b) Adhesión de *C. coli* ATCC 43478 a células T84. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

El mayor porcentaje de invasión para ambas cepas se logró a las 3 h de infección, siendo significativa la diferencia con 1 y 2 h ($p < 0,05$) (Fig. 4). Empleando 3 h de infección, el mayor porcentaje de *C. coli* ATCC 33560 internalizado se logró al centrifugar las células infectadas y el de *C. jejuni* ATCC 33560 al no centrifugarlas, en ambos casos las diferencias entre la centrifugación y la no centrifugación no fueron significativas (Fig. 5).

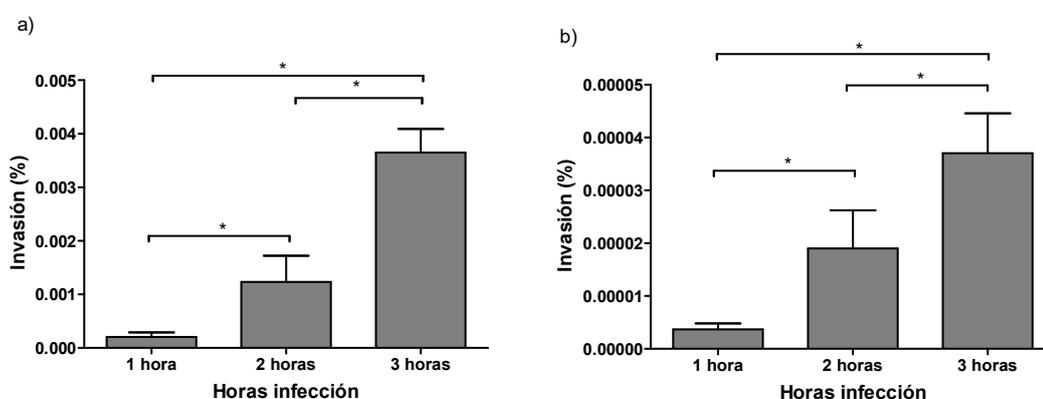


FIGURA 4: Estandarización del modelo de invasión evaluando distintos tiempos de infección. Invasión a células T84 evaluando diferentes tiempos de infección. Las células T84 se infectaron por 1, 2 o 3 h y el resultado se graficó como porcentaje del inóculo inicial viable. a) Invasión de *C. jejuni* ATCC 33560 a células T84. b) Invasión de *C. coli* ATCC 43478 a células T84. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

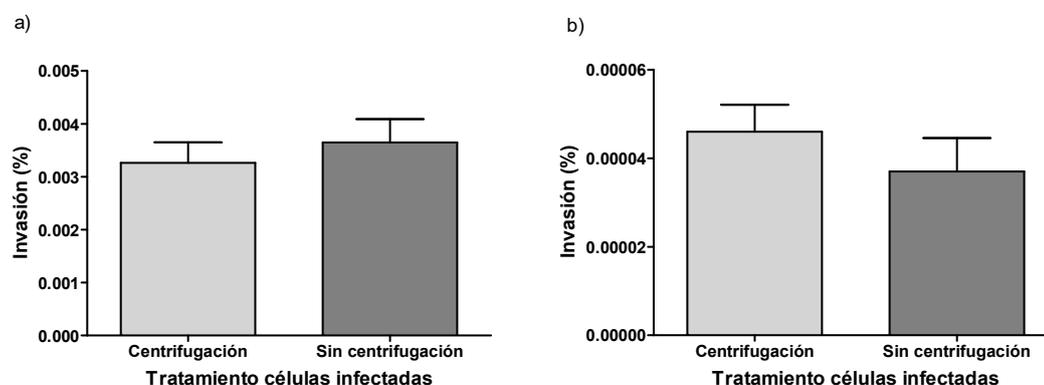


FIGURA 5: Estandarización del modelo de invasión evaluando centrifugación de las células infectadas. Invasión a células T84 evaluando la centrifugación de las células infectadas. Las células T84 infectadas centrifugadas y no centrifugadas se incubaron durante 3 h. El resultado se graficó como porcentaje del inóculo inicial viable. a) Invasión de *C. jejuni* ATCC 33560 a células T84. b) Invasión de *C. coli* ATCC 43478 a células T84. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Tomando en consideración los resultados de la estandarización, se estableció un modelo de adhesión de 1 h de infección, sin centrifugación de las células infectadas, y un modelo de invasión de 3 h de infección, sin centrifugación.

6.2. Adhesión a células intestinales epiteliales en cultivo

Para evaluar la adhesión a células T84 se analizó cada una de las 32 cepas de *Campylobacter* spp. La figura 6 muestra la adhesión de las cepas agrupadas según el origen de aislamiento (pacientes humanos, pollos broiler, bovinos y cerdos). Después de 1 h de infección, las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* adhirieron a las células T84 en un rango entre 0,002 a un 0,718% del inóculo inicial viable.

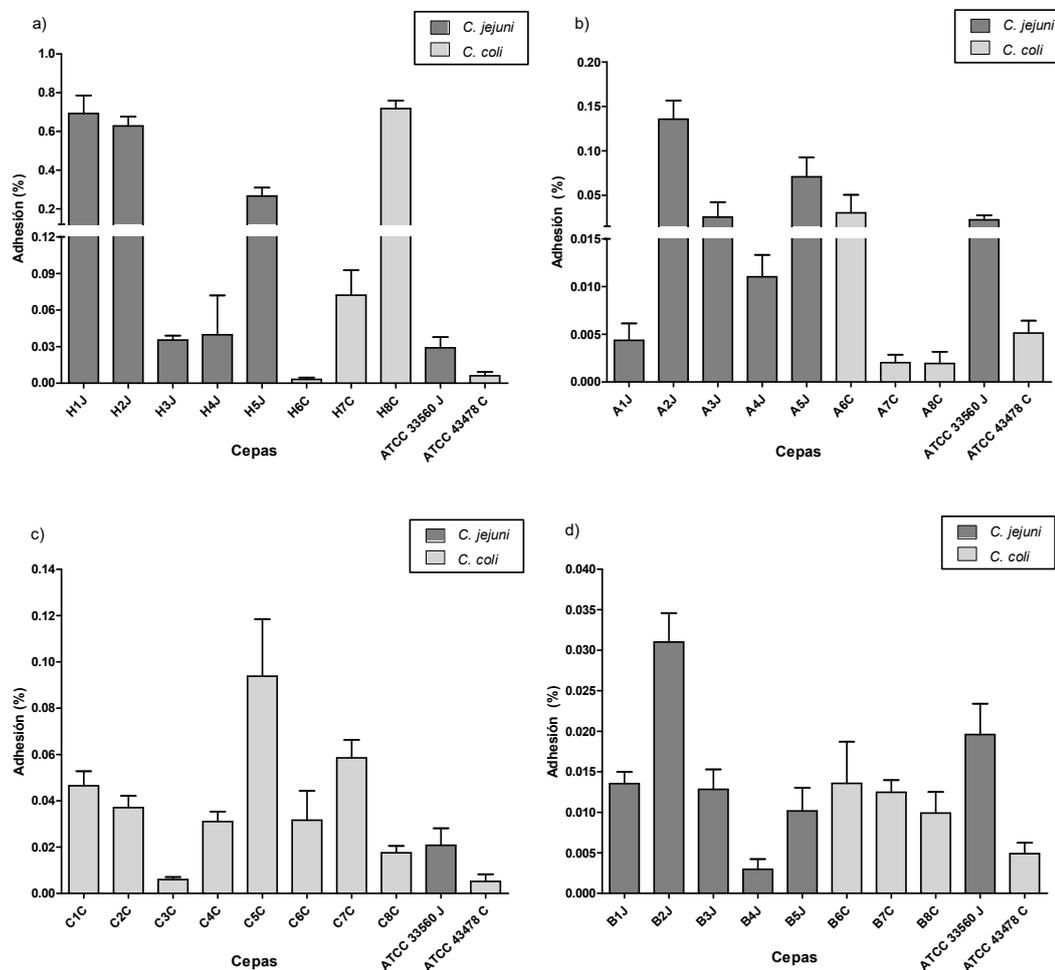


FIGURA 6: Adhesión a células T84 de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de pacientes humanos y animales productivos. Las células T84 se infectaron durante 1 h y el resultado se graficó como porcentaje del inóculo inicial viable. a) Adhesión de cepas aisladas de pacientes humanos. b) Adhesión de cepas aisladas de pollos broiler. c) Adhesión de cepas aisladas de cerdos. d) Adhesión de cepas aisladas de bovinos. Los valores representan la media \pm desviación estándar de 3 mediciones.

Las cepas aisladas de pacientes humanos mostraron el mayor porcentaje de adhesión, con una mediana de 0,169% del inóculo inicial viable. Le siguieron

en orden decreciente las cepas aisladas de cerdos (mediana 0,034%), pollos broiler (mediana 0,018%) y bovinos (mediana 0,013%).

El mayor porcentaje de adhesión se observó para la cepa H8C, de la especie *C. coli* (0,718%), seguida de H1J y H2J, de la especie *C. jejuni* (0,692% y 0,628%, respectivamente), todas cepas aisladas de pacientes humanos (Fig. 6.a.). Las cepas A7C y A8C, ambas de la especie *C. coli* y aisladas de pollos, presentaron el menor porcentaje de adhesión (0,002%) (Fig. 6.b.).

En relación a la adhesión de *C. jejuni* y *C. coli*, la especie *C. jejuni* varió entre un 0,03 y un 0,692%, con una mediana de 0,031% y la especie *C. coli* entre un 0,02 y un 0,718%, con una mediana de 0,03%. No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de adherencia entre las cepas de ambas especies de *Campylobacter* ($p > 0,05$) (Fig. 7).

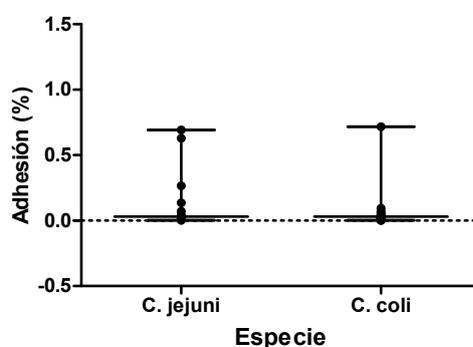


FIGURA 7: Mediana y valor máximo y mínimo del porcentaje de adhesión a células T84 de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de distintos hospederos. Las células T84 se infectaron durante 1 h y el resultado se graficó como porcentaje del inóculo inicial viable.

6.3. Invasión a células intestinales epiteliales en cultivo

La figura 8 muestra la invasión, expresada como porcentaje del inóculo inicial viable, de las cepas agrupadas según el origen de aislamiento. Después de 3 h de infección, las cepas de *Campylobacter* spp. invadieron entre un 0,00006% y un 0,084%. Las cepas aisladas de pacientes humanos presentaron el mayor porcentaje de invasión, con una mediana de 0,0127% del inóculo inicial viable. Le siguieron en orden decreciente las cepas aisladas de cerdos (mediana 0,0051%), pollos broiler (mediana 0,0019 %) y bovinos (mediana 0,0009%).

La cepa de *C. jejuni* H2J (especie *C. jejuni*) y H8C (especie *C. coli*) alcanzaron el mayor porcentaje de invasión (0,0084 y 0,075%, respectivamente) (Fig. 8.a.) y la cepa H6C (especie *C. coli*) mostró el menor porcentaje de invasión (0,00006%), todas estas cepas fueron aisladas de pacientes humanos (Fig. 8.a.).

En relación a la invasión de *C. jejuni* y *C. coli*, la especie *C. jejuni* varió entre 0,0008 y 0,084%, con una mediana de 0,012%, y la especie *C. coli* entre 0,00006 y 0,074%, con una mediana de 0,0085% (Fig. 9.a.)

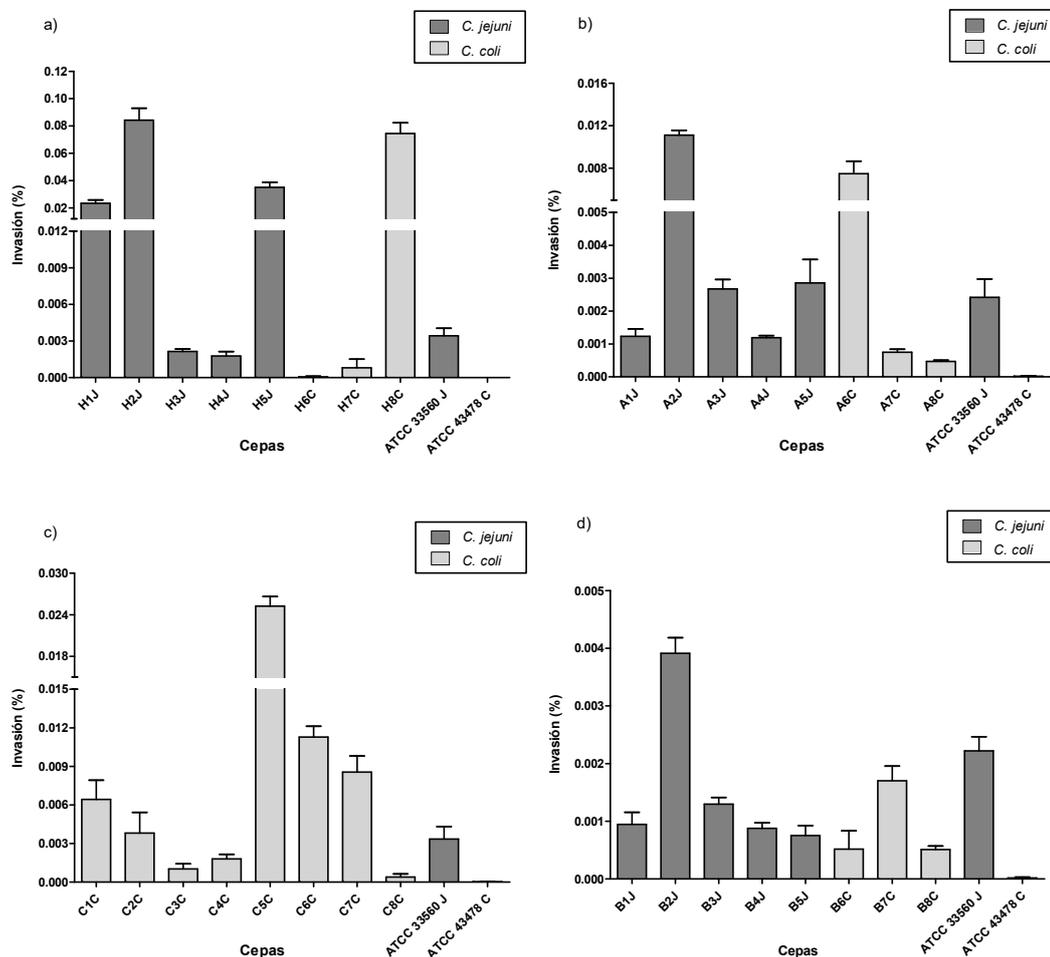


FIGURA 8: Invasión a células T84 de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de pacientes humanos y animales productivos. Las células T84 se infectaron durante 3 h y el resultado se graficó como porcentaje del inóculo inicial viable. a) Invasión de cepas aisladas de pacientes humanos. b) Invasión de cepas aisladas de pollos broiler. c) Invasión de cepas aisladas de cerdos. d) Invasión de cepas aisladas de bovinos. Los valores representan la media \pm desviación estándar de 3 mediciones.

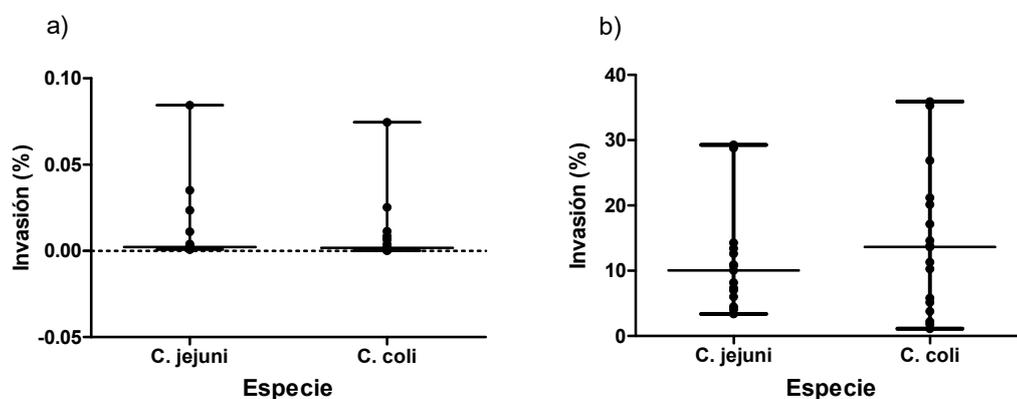


FIGURA 9: Mediana y valor máximo y mínimo del porcentaje de invasión a células T84 de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de distintos hospederos. Las células T84 se infectaron durante 3 h. a) Resultados expresados según lo señalado para porcentaje de invasión del inóculo de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*. b) Resultados expresados según lo señalado para porcentaje de invasión de las adheridas de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*.

La figura 10 muestra la invasión, expresada como porcentaje de las bacterias adheridas, de las cepas agrupadas según el origen de aislamiento. Después de 3 h de infección, el porcentaje de invasión de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* varió entre 1,11% y 35,9%. Las cepas aisladas de pollos broiler presentaron el mayor porcentaje de invasión, con una mediana de 15,54%. Le siguieron decrecientemente las cepas aisladas de cerdos (mediana 14,22%), bovinos (mediana 8,71%) y pacientes humanos (mediana 5,26%).

El mayor porcentaje de invasión fue alcanzado por las cepas A7C (35,9%), aislada de pollo y C6C (35,3%), aislada de cerdo, ambas de la especie *C. coli* (Fig. 10.b., 10.c.). Las cepas H7C y H6C, ambas de la especie *C. coli* y aisladas pacientes humanos, fueron las que invadieron en menor porcentaje (1,11 y 1,81% respectivamente) (Fig. 10.a.).

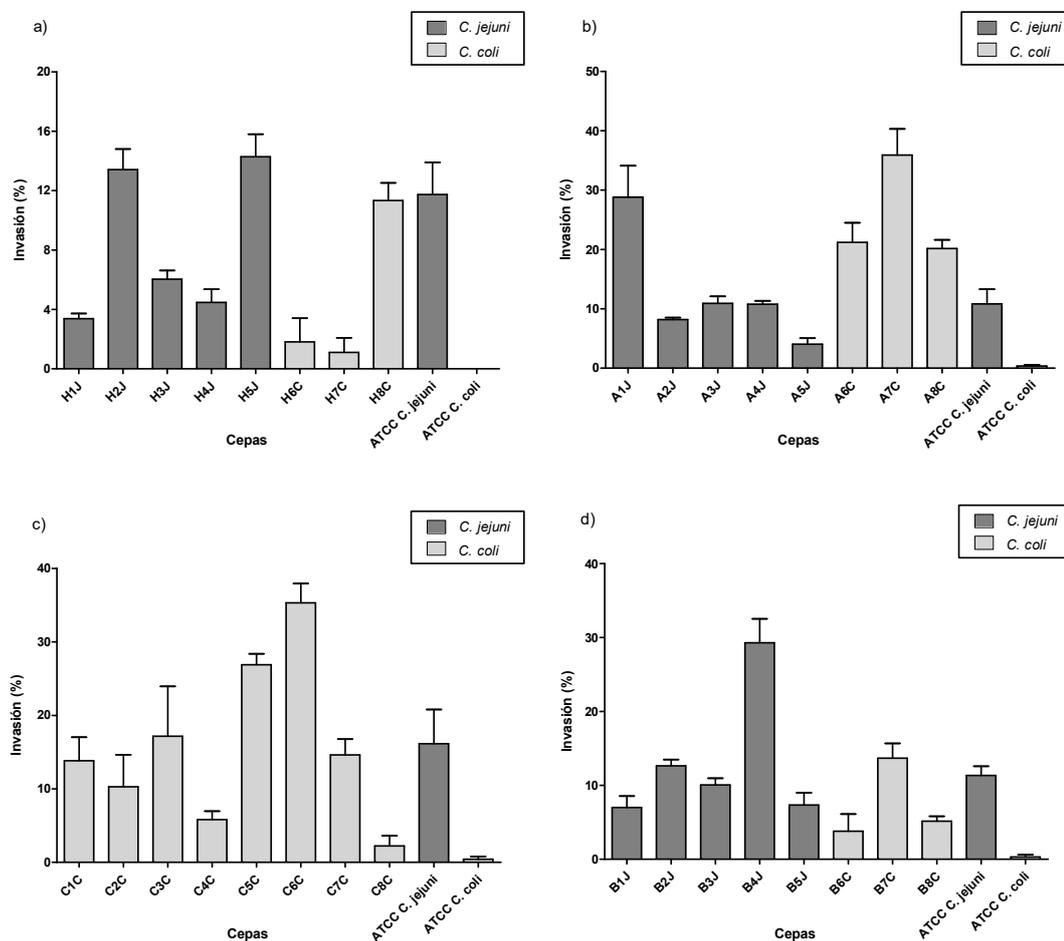


FIGURA 10: Invasión a células T84 de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de pacientes humanos y animales productivos. Las células T84 se infectaron durante 3 h y el resultado se graficó como porcentaje de las bacterias adheridas. a) Invasión de cepas aisladas de pacientes humanos. b) Invasión de cepas aisladas de pollos broiler. c) Invasión de cepas aisladas de cerdos. d) Invasión de cepas aisladas de bovinos. Los valores representan la media \pm desviación estándar de 3 mediciones.

En relación a la invasión de *C. jejuni* y *C. coli*, el porcentaje de invasión de la especie *C. jejuni* varió entre 3,38% y 29,28%, con una mediana de 11,38%, y la invasión de *C. coli* lo hizo entre 1,11% y 35,9%, con una mediana de 14,13% (Fig. 9.b.).

No se detectaron diferencias significativas en la capacidad de invasión entre las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, tanto al comparar los datos de invasión expresada como porcentaje del inóculo inicial viable, como al comparar los datos de invasión expresada como porcentaje de las bacterias adheridas ($p > 0,05$) (Fig. 9).

6.4. Comparación de adherencia e invasión según especie y genes de virulencia

Para evaluar las diferencias en la capacidad de adherencia e invasión de las distintas cepas, considerando simultáneamente especie bacteriana y presencia/ausencia de los diferentes genes de virulencia, se utilizó el análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis y test post-hoc Dunn. Cada análisis consideró la adherencia o invasión de las cepas caracterizadas según la presencia/ausencia de cada uno de los 7 genes de virulencia y según la especie bacteriana (*C. jejuni* y *C. coli*).

Se detectaron diferencias significativas en la invasión, expresada como porcentaje de las bacterias adheridas, entre las cepas de *C. jejuni* positivas al gen *dnaJ* y las cepas *C. coli* positivas al mismo gen ($p < 0,05$), mostrando mayor invasión la especie *C. coli*. También se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de invasión de las adheridas, entre las cepas *C. coli* positivas al gen *dnaJ* y *C. coli* negativas al mismo gen ($p < 0,05$), siendo la invasión mayor en aquellas cepas positivas al gen (Fig. 11).

En el resto de las comparaciones no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (Material complementario).

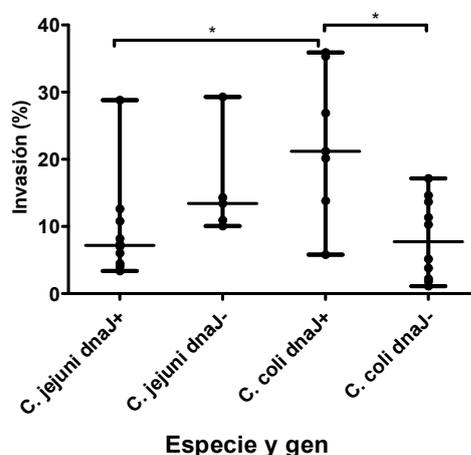


FIGURA 11: Mediana y valor máximo y mínimo del porcentaje de invasión a células T84 según especie bacteriana y presencia/ausencia del gen *dnaJ*. Las células T84 se infectaron durante 3 h y el resultado se graficó como porcentaje de las bacterias adheridas. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

6.5. Asociación entre adhesión e invasión y genes de virulencia

La asociación entre la adhesión e invasión y los genes de virulencia *cadF*, *flaA*, *dnaJ*, *racR*, *virB11*, *ciaB* y *pldA* se evaluó mediante análisis de Regresión Logística. Se realizaron dos tipos de análisis, uno consideró *C. jejuni* y *C. coli* de forma independiente y el otro incluyó simultáneamente las cepas de ambas especies bacterianas.

El análisis independiente de *C. jejuni* no halló asociaciones significativas estadísticamente entre los genes y el porcentaje de adhesión o entre los genes y los porcentajes de invasión (invasión de inóculo inicial e invasión de las bacterias adheridas) (Tabla 3, 4 y 5).

El análisis independiente de *C. coli* (Tabla 6, 7 y 8) solo encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del gen *dnaJ* y el porcentaje de invasión de las bacterias adheridas (O.R > 1; $p \leq 0,05$) (Tabla 8).

El análisis simultáneo de *C. jejuni* y *C. coli* no encontró asociaciones significativas estadísticamente entre los genes y el porcentaje de adhesión o entre los genes y los porcentajes de invasión (invasión de inóculo inicial e invasión de las bacterias adheridas) (Tabla 9, 10 y 11). Sin embargo, se encontró una asociación positiva y en el límite para ser considerada significativa estadísticamente ($p=0,0532$) entre el gen *virB11* y el porcentaje de adhesión (Tabla 9).

TABLA 3: Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes virulencia y porcentaje de adhesión de las cepas de *C. jejuni*.

Genes de virulencia	Porcentaje adhesión	
	OR	valor de p
<i>cadF</i>	0,30	0,6716
<i>racR</i>	0,68	0,8734
<i>flaA</i>	0,04	0,2452
<i>dnaJ</i>	0,19	0,4988
<i>virB11</i>	167,36	0,1369
<i>ciaB</i>	0,03	0,3477
<i>pldA</i>	0,07	0,4556

TABLA 4: Resultados de la regresión logística simple, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes virulencia y porcentaje de invasión del inóculo de las cepas de *C. jejuni*.

Genes de virulencia	Porcentaje invasión del inóculo	
	OR	valor de p
<i>cadF</i>	$1,5 \times 10^{-12}$	0,3611
<i>racR</i>	$3,9 \times 10^{-9}$	0,4448
<i>flaA</i>	0	0,1265
<i>dnaJ</i>	0	0,2205
<i>virB11</i>	$3,2 \times 10^{17}$	0,2475
<i>ciaB</i>	$2,4 \times 10^{-8}$	0,5656
<i>pldA</i>	$4,4 \times 10^{-5}$	0,4251

TABLA 5: Resultados de la regresión logística simple, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes virulencia y porcentaje de invasión de las adheridas de las cepas de *C. jejuni*.

Genes de virulencia	Porcentaje invasión de las adheridas	
	OR	valor de p
<i>cadF</i>	0,96	0,5755
<i>racR</i>	0,96	0,5739
<i>flaA</i>	0,86	0,0986
<i>dnaJ</i>	0,90	0,1764
<i>virB11</i>	0,94	0,4643
<i>ciaB</i>	1,06	0,3972
<i>pldA</i>	1,09	0,2609

TABLA 6: Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes virulencia y porcentaje de adhesión de las cepas de *C. coli*.

Genes de virulencia	Porcentaje adhesión	
	OR	valor de p
<i>cadF</i>	56,40	0,5810
<i>racR</i>	47,54	0,4554
<i>flaA</i>	$9,4 \times 10^{16}$	0,1547
<i>dnaJ</i>	0,03	0,5388
<i>virB11</i>	1,00	>0,9999
<i>ciaB</i>	345,26	0,3613
<i>pldA</i>	710,06	0,2517

TABLA 7: Resultados de la regresión logística simple, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes virulencia y porcentaje de invasión del inóculo de las cepas de *C. coli*.

Genes de virulencia	Porcentaje invasión del inóculo	
	OR	valor de p
<i>cadF</i>	$5,2 \times 10^6$	0,6919
<i>racR</i>	$2,2 \times 10^7$	0,5791
<i>flaA</i>	$5,3 \times 10^{31}$	0,4166
<i>dnaJ</i>	0,01	0,8587
<i>virB11</i>	1,00	>0,9999
<i>ciaB</i>	$1,3 \times 10^{24}$	0,2650
<i>pldA</i>	$1,9 \times 10^{21}$	0,1825

TABLA 8: Resultados de la regresión logística simple, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes virulencia y porcentaje de invasión de las adheridas de las cepas de *C. coli*.

Genes de virulencia	Porcentaje invasión de las adheridas	
	OR	valor de p
<i>cadF</i>	1,00	0,9451
<i>racR</i>	1,02	0,6746
<i>flaA</i>	1,02	0,7052
<i>dnaJ</i>	1,25	0,0432*
<i>virB11</i>	1,00	>0,9999
<i>ciaB</i>	1,11	0,0832
<i>pldA</i>	1,02	0,6748

Asterisco indica asociación estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

TABLA 9: Resultados de la regresión logística, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes virulencia y porcentaje de adhesión de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*.

Genes de virulencia	Porcentaje adhesión	
	OR	valor de p
<i>cadF</i>	2,23	0,6916
<i>racR</i>	3,64	0,5247
<i>flaA</i>	1,82	0,7842
<i>dnaJ</i>	0,25	0,4742
<i>virB11</i>	52,24	0,0532
<i>ciaB</i>	1,31	0,8853
<i>pldA</i>	3,12	0,5522

TABLA 10: Resultados de la regresión logística simple, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes virulencia y porcentaje de invasión del inóculo de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*.

Genes de virulencia	Porcentaje invasión del inóculo	
	OR	valor de p
<i>cadF</i>	$1,7 \times 10^{-3}$	0,7251
<i>racR</i>	0,12	0,9072
<i>flaA</i>	$1,7 \times 10^{-3}$	0,7357
<i>dnaJ</i>	$1,7 \times 10^{-11}$	0,2736
<i>virB11</i>	$1,6 \times 10^{12}$	0,1521
<i>ciaB</i>	$3,4 \times 10^4$	0,5666
<i>pldA</i>	$2,7 \times 10^6$	0,4251

TABLA 11: Resultados de la regresión logística simple, análisis de la asociación entre presencia/ausencia de genes virulencia y porcentaje de invasión de las adheridas de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*.

Genes de virulencia	Porcentaje invasión de las adheridas	
	OR	valor de p
<i>cadF</i>	0,98	0,6678
<i>racR</i>	1,00	0,9085
<i>flaA</i>	0,97	0,4627
<i>dnaJ</i>	1,05	0,2229
<i>virB11</i>	0,94	0,3699
<i>ciaB</i>	1,08	0,0690
<i>pIdA</i>	1,04	0,3859

7. DISCUSIÓN

La adherencia e invasión a las células intestinales son pasos esenciales en el desarrollo de la enteritis producida por *Campylobacter* spp. (Nadeau *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006). Estos mecanismos de virulencia han sido estudiados en diversas líneas celulares, entre ellas la línea celular de epitelio colónico T84 (Coote *et al.*, 2007; Krause-Gruszczynska *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2006), la que fue utilizada en el presente estudio para caracterizar la capacidad de adherencia e invasión de *C. jejuni* y *C. coli*.

Nuestros resultados revelaron variación en la capacidad de adherencia entre las diferentes cepas, el mismo hallazgo ha sido informado por otros autores empleando células tanto de origen colónico como intestinal (Biswas *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Coote *et al.*, 2007; Fearnley *et al.*, 2008). Nadeau *et al.* (2003) comunicaron una adherencia del 0,002 – 1,8% del inóculo inicial de cepas de *C. jejuni* aisladas de pollos y casos esporádicos humanos, y Chansiripornchai y Sasipreeyajan (2009) informaron porcentajes de 0,03 – 0,73% de cepas de *C. jejuni* aisladas de pollos, ambos estudios realizados en células de origen intestinal (INT-4007). Zheng *et al.* (2006) determinaron una adhesión a células T84 de 0,002 – 3,115% de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de productos cárnicos, aunque solo una de estas cepas superó el 0,75%. La adherencia determinada en nuestro trabajo varió entre 0,002 y 0,718% del inóculo inicial, cifra en concordancia con los estudios previamente citados.

Por otra parte, los trabajos que han investigado la capacidad de cepas de *Campylobacter* spp. de invadir células intestinales han expresado el resultado como UFC por unidad de volumen o como porcentaje del inóculo inicial viable (Biswas *et al.*, 2000; Chansiripornchai y Sasipreeyajan, 2009; Coote *et al.*, 2007; Fearnley *et al.*, 2008; Ganan *et al.*, 2010; Habib *et al.*, 2009; Krause-

Gruszczynska *et al.*, 2007; Louwen *et al.*, 2008; Nadeau *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006). En nuestro trabajo expresamos la invasión de dos maneras, como porcentaje del inóculo inicial viable (porcentaje de invasión del inóculo) y como porcentaje de las bacterias adheridas a la hora de infección (porcentaje de invasión de las adheridas).

El porcentaje de invasión en las cepas estudiadas fue de 0,00006 – 0,084% del inóculo inicial viable. Investigaciones previas han dado a conocer una amplia variación en la capacidad de invasión dependiente de las cepas (Biswas *et al.*, 2000; Fearnley *et al.*, 2008). Se han informado cifras de 0,0001 – 0,05% y 0,0012 – 0,4246% en células de origen intestinal (línea INT-407), y de 0,0002 – 0,26% y 0,001 – 0,235% en células de origen colónico (líneas Caco-2 y T84, respectivamente), tanto de cepas aisladas de pacientes humanos como animales y productos cárnicos (Biswas *et al.*, 2000; Habib *et al.*, 2009; Nadeau *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006). Aunque algo menores, nuestros resultados se encuentran dentro del rango de las observaciones previas.

Las cepas que mostraron los mayores porcentajes de adherencia e invasión, calculados respecto del inóculo inicial, fueron las aisladas de pacientes humanos. Sin embargo, cuando la invasión se expresó como un porcentaje de las bacterias adheridas, las cepas humanas dejan de estar en el primer lugar y se convierten en aquellas con menor invasión. Considerando que la adherencia e invasión son mecanismos importantes de patogenicidad, es esperable que cepas que hayan sido aisladas de casos esporádicos de campylobacteriosis sean capaces de adherir e invadir células intestinales. Las cepas provenientes de animales productivos también fueron capaces de adherir e invadir. Se ha constatado, en estudios previos, que tanto cepas de *Campylobacter* aisladas de seres humanos como aquellas aisladas de animales y productos cárnicos tienen capacidad para unirse e invadir células intestinales humanas (Nadeau *et al.*,

2003; Zheng *et al.*, 2006). Cerdos, pollos y bovinos actúan como reservorios de estas bacterias, y el consumo de la carne de estos animales es la forma cómo las personas pueden adquirir el patógeno (Butzler, 2004; Horrocks *et al.*, 2009). La observación que cepas aisladas de dichos animales sean capaces de adherir e invadir células intestinales *in vitro* confirma su capacidad patogénica para las personas (hospedero susceptible). Algunos autores han establecido que cepas provenientes de pacientes humanos muestran mayor capacidad de invadir que cepas aisladas de animales (Biswas *et al.*, 2000; Fearnley *et al.*, 2008), mientras que otros han hallado ausencia de diferencias significativas y de correlación entre adherencia y/o invasión y el origen de la cepa (Habib *et al.*, 2009; Nadeau *et al.*, 2003). Una mayor adherencia e invasión de las cepas aisladas de pacientes humanos podría deberse a un efecto de adaptación al hospedero susceptible, fenómeno que podría relacionarse con una mayor expresión de los factores de virulencia asociados a estos mecanismos de patogenicidad.

Mediante la estandarización del modelo de adhesión, se determinó que las bacterias asociadas (porcentaje de adhesión) disminuían significativamente al aumentar de 1 a 3 h el tiempo de infección. Considerando lo anterior, el porcentaje de invasión de las bacterias adheridas podría estar realizándose sobre bacterias que ya no se encuentran asociadas a las células, puesto que la adherencia se midió luego de una h y la invasión luego de tres. Normalmente, los estudios de adherencia/invasión de *Campylobacter* incluyen la evaluación de distintos tiempos de infección, lo que permite a los investigadores la elección de un mejor modelo de trabajo; sin embargo, rara vez se exponen esos datos. Existe una amplia variación en los tiempos de infección empleados por los distintos estudios, los que abarcan desde 30 minutos hasta 6 h (Friis *et al.*, 2005; Habib *et al.*, 2009; Nadeau *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006). La disminución del porcentaje de adhesión al aumentar el tiempo de infección, podría deberse a una

disminución de la viabilidad o cultivabilidad de la bacteria sometida a las condiciones particulares de los ensayos (aerobiosis y medio de cultivo celulares), condiciones que no son las óptimas para *Campylobacter* spp. No existen estudios previos que evalúen tales teorías, aunque está documentado que *C. jejuni* experimenta una disminución significativa de viabilidad cuando es dejado por solo 10 minutos a temperatura ambiente y atmósfera (Davis y DiRita, 2008). Una manera de evaluar si las condiciones de los ensayos de adhesión/invasión afectan la viabilidad y/o cultivabilidad de *Campylobacter*, sería replicar estas condiciones (en ausencia de células intestinales humanas) sobre diversas cepas de *C. jejuni* y *C. coli*; mantener las cepas, por periodos de tiempos crecientes, en un ambiente de aerobiosis y medio de cultivo para células intestinales humanas, y evaluar cada 10 o 30 minutos la viabilidad y cultivabilidad, comparándola con aquella determinada a tiempo cero (sin el efecto de aerobiosis y medio). Para valorar la cultivabilidad bastaría con la siembra en placas de crecimiento para *Campylobacter* y para la viabilidad, se podría utilizar el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ para microscopía, que se basa en la tinción diferencial de la membrana celular intacta (bacterias vivas) y membrana comprometida (bacterias muertas o moribundas).

Respecto de diferencias entre las especies *C. jejuni* y *C. coli* en su capacidad de adherencia e invasión, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Existen escasos trabajos previos respecto de tales comparaciones entre estas dos especies. Zheng *et al.* (2006), estudiaron la capacidad de adherencia e invasión de cepas *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de productos cárnicos y no encontraron diferencias significativas entre estas dos especies, aunque 6 de las 9 cepas de *C. coli* mostraron los menores porcentajes de invasión de todas las cepas estudiadas. Por el contrario, Krause-Gruszczynska *et al.* (2007), estudiando cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de

humanos, animales productivos y productos cárnicos, lograron establecer una mayor eficiencia en la adherencia e invasión a células INT-407 de las cepas de *C. jejuni*. Esta mayor eficiencia fue atribuida al menor tamaño del gen y proteína CadF, adhesina que se une a fibronectina y que participa en la adherencia e invasión, postulando una menor funcionalidad de esta proteína en la especie *C. coli*. En nuestro estudio se incluyó el análisis de la presencia de distintos genes de virulencia, entre ellos *cadF*, y su relación con la adherencia e invasión, pero no se consideraron las posibles diferencias de tamaño de este gen entre ambas especies. Sería interesante incluir este análisis en estudios posteriores (así también el de la proteína codificada) y corroborar si existen o no diferencias entre ambas especies. Considerando nuestros resultados, dos escenarios son posibles: (i) que existan diferencias de tamaño del gen/proteína, pero dado que nuestros resultados revelaron que ambas especies tienen la misma capacidad de adherencia/invasión, el tamaño del gen/proteína no sería un marcador categórico para una mayor eficiencia de adhesión/invasión; (ii) que no existan diferencias de tamaño entre ambas especies, lo que significaría que, a diferencia de lo que informan Krause-Gruszczynska *et al.* (2007), no todas las cepas de *C. coli* tendrían un gen/proteína CadF de mayor tamaño al que se le pueda atribuir una menor funcionalidad.

Es importante considerar que ambos estudios anteriormente señalados emplearon líneas celulares de tejidos distintos (intestinal vs colónico). Las diferencias entre *C. jejuni* y *C. coli* en su capacidad de adherencia e invasión podrían estar restringidas a un solo tipo celular, puesto que existen antecedentes que dan cuenta de variaciones en la adherencia e invasión según el tipo de células humanas empleadas, aunque no han existido comparaciones específicas entre células INT-407 y T84 (Coote *et al.*, 2007; Friis *et al.*, 2005). La ausencia de diferencias entre ambas especies detectada en nuestro estudio sugiere que,

tanto *C. jejuni* como *C. coli* tendrían la misma capacidad de adherir e invadir células hospederas y, por tanto, la mayor cantidad de campylobacteriosis humanas producidas por *C. jejuni* no podrían atribuirse a diferencias en estos mecanismos de patogenicidad. Otros fenómenos podrían explicar la mayor causalidad por *C. jejuni*, entre ellos: posibles diferencias en la producción de la citotoxina de distensión citoletal (CDT), otro mecanismo importante de patogenicidad en *Campylobacter*; diferencias en la respuesta inflamatoria del hospedero frente a la infección por *C. jejuni* y *C. coli*; diferencias en la supervivencia de la bacteria dentro del ambiente intestinal. Futuros estudios debieran incluir la comparación de estos fenómenos, evaluando la cantidad de CDT producida y el efecto *in vitro* sobre células intestinales; midiendo la producción de interleuquina 8 por células intestinales *in vitro*, como un indicador de la respuesta inflamatoria frente a la infección; y/o valorando la resistencia de *C. jejuni* y *C. coli* a sales biliares, como un indicador de su supervivencia en el medio intestinal.

Mediante el análisis Kruskal-Wallis y test post-hoc Dunn se estableció que cepas de *C. coli* positivas al gen *dnaJ* presentaban mayor invasión (porcentaje de invasión de las bacterias adheridas) que cepas de *C. coli* negativas al mismo gen y que cepas de *C. jejuni* positivas al gen (Fig. 11). Adicionalmente, el análisis de regresión logística comprobó una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del gen *dnaJ* y una mayor invasión (porcentaje de invasión de las bacterias adheridas) de las cepas *C. coli* (Tabla 8). Ambos resultados sugieren que este gen tendría un rol importante en la capacidad de invadir de las cepas *C. coli*, un rol que sería, aparentemente, más importante que en la especie *C. jejuni* (no asociación con el gen). El gen *dnaJ* codifica una proteína de shock térmico (DnaJ) y se expresa en respuesta a la exposición de temperaturas sobre los 37 – 42 °C; en términos generales, las proteínas de shock térmico actúan

como chaperonas, promoviendo el plegamiento de algunas proteínas y la proteólisis de otras mal plegadas y potencialmente dañinas. Además de a la termotolerancia, el gen se ha asociado con la capacidad de colonización, puesto que mutantes de este gen experimentan una severa reducción en la colonización del tracto intestinal de pollos; no obstante, los mecanismos por los cuales ejercería esta función son aún desconocidos (Bolton, 2015; Dasti *et al.*, 2010; Konkel *et al.*, 1998). El nuestro, es el primer reporte de una asociación entre el gen *dnaJ* y la capacidad de invasión de bacterias *Campylobacter*; sin embargo, este vínculo ha sido comunicado para otros patógenos. Takaya *et al.* (2004) informaron que el sistema DnaK/DnaJ de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium es esencial para la invasión de células intestinales *in vitro*, demostrando que al bloquear la expresión de los genes *dnaK* y *dnaJ* se abolía la secreción de otras proteínas promotoras de invasión y disminuía el número de bacterias internalizadas. Este mismo fenómeno podría presentarse en *Campylobacter*, puesto que ambas proteínas son sintetizadas por estos patógenos. En el futuro, debiera estudiarse el impacto de la expresión de este gen sobre la capacidad de invadir células intestinales y, de esta manera, poder establecer si la asociación estadística encontrada en nuestra investigación tiene una base biológica.

El análisis de regresión logística realizado separadamente para *C. jejuni* y *C. coli*, contó con 15 observaciones para *C. jejuni* y 17 para *C. coli*. Es importante tener presente que, a modo de obtener estimaciones confiables, hubiera sido recomendable contar con al menos 20 observaciones para cada especie; pese a esto, es posible observar una tendencia en las asociaciones (o ausencia de ellas) entre los genes y la capacidad de adherencia e invasión. Como una forma de complementar los estudios independientes, se realizaron análisis de regresión logística considerando en conjunto ambas especies, pero no se encontraron

asociaciones significativas estadísticamente entre el gen *dnaJ*, ni los otros 6 genes de virulencia (*cadF*, *virB11*, *pldA*, *flaA*, *ciaB* y *racR*), y la capacidad de adherencia o invasión. Sin embargo, el resultado de la asociación entre la presencia del gen *virB11* y el porcentaje de adherencia estuvo al límite de ser considerado significativo ($p=0,0532$). El gen *virB11* está presente en el plásmido pVir de bacterias *Campylobacter* y codifica un componente del sistema de secreción tipo IV (sistema que permite la inyección de proteínas efectoras al interior de células hospederas). Estudios previos han documentado que la mutación de este gen reduce significativamente la adherencia e invasión a células intestinales *in vitro*, pero la transferencia del pVir no incrementa la invasión en bacterias aceptoras (Bolton, 2015; Dasti *et al.*, 2010; Fearnley *et al.*, 2008). La asociación de *virB11* con un mayor porcentaje de adhesión podría ser indicador de una mayor importancia de este gen sobre este mecanismo patogenicidad, mayor incluso que otros genes sin asociación. Sin embargo, es importante tener en cuenta que en este trabajo se estudió la asociación de los genes y no de sus productos génicos; investigaciones que incluyan este ítem aportarán mayor entendimiento en los mecanismos de patogenicidad.

Otros autores tampoco han podido establecer una clara correlación entre la presencia de distintos genes de virulencia y una mayor capacidad de adherencia y/o invasión (Chansiripornchai y Sasipreeyajan, 2009; Habib *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2006), pese a que el rol de tales genes en estos mecanismos de patogenicidad ha sido corroborado en diversos estudios (Crushell *et al.*, 2004; Friis, *et al.*, 2005; Haddad *et al.*, 2010). La ausencia de asociación entre la presencia de los genes y una mayor capacidad de adherencia e invasión podría deberse a varios fenómenos. Primero, puede que, por un polimorfismo de los genes de virulencia, los primers diseñados hayan sido incapaces de detectar diferencias en el gen y por lo tanto la presencia del gen, entregando resultados

falsos negativos. Segundo, puede que los genes estén presentes, pero que se encuentren mutados y no funcionales o no se estén expresando. En relación a esto último, las bacterias pueden desarrollar adaptaciones al medio ambiente que involucran la disminución de las características de virulencia; por ejemplo, se ha visto que la restricción de nutrientes produce una disminución en la adherencia, invasión y sobrevivencia intracelular en células intestinales *in vitro* (Klančnik *et al.*, 2009; Mihaljevic *et al.*, 2007). Por último, la adherencia e invasión dependen de una multiplicidad de genes, algunos de los cuales podrían ser redundantes en su función. Al respecto, se han identificado, además de los genes incluidos en nuestros análisis, otros genes (como por ejemplo, *capA*, *jlpA*, *peb1A*, *flpA*, *iamA*, *flaC*, etc.) que codifican para factores de virulencia relacionados con estos mecanismos y que podrían estar presentes en las cepas estudiadas (Bolton, 2015; Haddad *et al.*, 2010). Al mismo tiempo, estudios en donde se ha mutado alguno de estos genes (evitando su expresión), han logrado efectivamente reducir la adherencia y/o invasión *in vitro*, pero nunca anularla completamente, lo que indicaría la participación simultánea de varios factores (Bacon *et al.*, 2002; Eucker y Konkel, 2012; Monteville *et al.*, 2003).

Mayores investigaciones deben realizarse para lograr una mejor comprensión de los factores de virulencia involucrados en los mecanismos de patogenicidad. De utilidad sería incluir el estudio de la expresión de los genes de virulencia, evaluando si el contacto con células hospederas potencia o suprime su expresión, y explorar si dos o más genes trabajan en conjunto al momento de establecer la asociación con células hospederas. Considerando que, *C. jejuni* y *C. coli* no mostraron diferencias significativas en su capacidad de adherencia/invasión, sería interesante el estudio de otros fenómenos que expliquen la mayor causalidad por *C. jejuni*, por ejemplo, evaluar la respuesta inmune desencadenada o la supervivencia dentro del medio intestinal. Un mayor

conocimiento de los mecanismos de patogenicidad permitiría establecer mejores medidas de control, disminuyendo la transmisión de estos patógenos al ser humano.

8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados permiten obtener las siguientes conclusiones:

Las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* tienen la misma capacidad de adherir e invadir *in vitro* células intestinales humanas.

Las cepas de *C. coli* portadoras del gen *dnaJ* presentan mayor capacidad de invasión que las cepas de *C. coli* no portadoras del gen.

Las cepas de *C. coli* positivas al gen *dnaJ* tienen mayor capacidad de invasión que las cepas de *C. jejuni* positivas al gen.

Las cepas de *C. coli* mostraron una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del *dnaJ* y una mayor capacidad de invasión.

Por último, se rechaza la hipótesis que las cepas de *C. jejuni* tienen mayor capacidad de adherir e invadir células intestinales humanas que las cepas de *C. coli* y que esta capacidad se relaciona positivamente con la presencia de genes de virulencia.

9. BIBLIOGRAFÍA

- **ALLOS, B. M.** 2001. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. Clin. Infect. Dis. 32:1201-1206.
- **BACON, D. J.; ALM, R. A.; HU, L.; HICKEY, T. E.; EWING, C. P.; BATCHELOR, R. A.; TRUST, T. J.; GUERRY, P.** DNA sequence and mutational analysis of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. Infect. Immun. 70(11):6242-6250.
- **BISWAS, D. ITOH, K.; SASAKAWA, C.** 2000. Uptake pathways of clinical and healthy animal isolates of *Campylobacter jejuni* into INT-407 cells. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29(3):203-211.
- **BOLTON, D. J.** 2015. *Campylobacter* virulence and survival factors. Food Microbiol. 48:99-108.
- **BUTZLER, J. P.** 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin. Microbiol. Infect. 10:868-876.
- **CARVALHO, A. C. T.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; RAMOS-CERVANTES, P.; CERVANTES, L. E.; JIANG, X.; PICKERING, L. K.** 2001. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. J. Clin. Microbiol. 39(4):1353-1359.
- **CHANSIRIPORNCHAI, N.; SASIPREEYAJAN, J.** 2009. PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilities of adhesion to and invasion of INT-407 cells. J. Vet. Med. Sci. 71(6):839-844.
- **COOTE, J. G.; STEWART-TULL, D. E. S.; OWEN, R. J.; BOLTON, F. J.; SIEMER, B. L.; CANDLISH, D.; THOMPSON, D. H.; WARDLAW, A. C.; ON, S. L. W.; CANDLISH, A.; BILLCLIFFE, B.; JORDAN, P. J.; KRISTIANSE, K.; BORMAN, P.** 2007. Comparison of virulence-associated *in vitro* properties of typed strains of *Campylobacter jejuni* from different sources. J. Med. Microbiol. 56(6):722-732.
- **CRUSHELL, E.; HARTY, S.; SHARIF, F.; BOURKE, B.** 2004. Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets? Pediatr. Res. 55(1):3-12.
- **DAVIS, L.; DIRITA, V.** 2008. Growth and laboratory maintenance of *Campylobacter jejuni*. [en línea]. Curr. Protoc. Microbiol. Suppl. 10: s. p. <

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mc08a01s10/full> > [consulta: 28-09-2016].

- **DASTI, J. I.; TAREEN, A. M.; LUGERT, R.; ZAUTNER, A. E.; GROß.** 2010. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:205-211.
- **EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC).** 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13(1):3991-4153.
- **EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P. L.; CONNERTON, I. F.** 2005. Enumeration and diversity of *Campylobacters* and bacteriophages isolated during the rearing cycles of free-range and organic chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(3):1259-1266.
- **EUCKER, T. P.; KONKEL, M.E.** 2012. The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cell. Microbiol.* 14(2):226–238.
- **FEARNLEY, C.; MANNING, G.; BAGNALL, M.; JAVED, M. A.; WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D.** 2008. Identification of hyperinvasive *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry and human clinical sources. *J. Med. Microbiol.* 57(5):570-580.
- **FERNÁNDEZ, H.** 2011. *Campylobacter* y Campylobacteriosis: una mirada desde América del Sur. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública* 28(1):121-127.
- **FIGUEROA, G.; TRONCOSO, M.; LÓPEZ, C.; RIVAS, P.; TORO, M.** 2009. Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *BMC Microbiol.* 9(1):94-99.
- **FRIIS, L. M.; PIN, C.; PEARSON, B. M.; WELLS, J. M.** 2005. In vitro cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *J. Microbiol. Methods* 61(2):145–160.
- **GANAN, M.; CAMPOS, G.; MUÑOZ, R.; CARRASCOSA, A. V.; DE PASCUAL-TERESA, S.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J.** 2010. Effect of growth phase on the adherence to and invasion of Caco-2 epithelial cells by *Campylobacter*. *Int. J. Food Microbiol.* 140(1):14-18.

- **GEISSLER, A. L.; MAHON, B. E.** 2016. Infectious diseases related to travel. [en línea]. Nueva York, Estados Unidos. cap.3. In: CDC Health Information for International Travel. <
<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/Campylobacteriosis> >. [consulta: 28-09-2015].
- **GONZÁLEZ-HEIN, G.; HUARACÁN, B.; GARCÍA, P.; FIGUEROA, G.** 2013. Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler. Braz. J. Microbiol. 44(4):1223-1229.
- **HABIB, I.; LOUWEN, R.; UYTENDAELE, M.; HOUF, K.; VANDENBERG, O.; NIEUWENHUIS, E. E.; MILLER, W. G.; VAN BELKUM, A.; DE ZUTTER, L.** 2009. Correlation between genotypic diversity, lipooligosaccharide gen locus class variation, and Caco-2 cell invasion potential of *Campylobacter jejuni* isolates from chicken meat and humans: contribution to virulotyping. Appl. Environ. Microbiol. 75(13):4277-4288.
- **HADDAD, N.; MARCE, C.; MAGRAS, C.; CAPPELIER, J. M.** 2010. Overview of methods used to clarify pathogenesis mechanisms of *Campylobacter jejuni*. J. Food. Protect. 73(4):786-802.
- **HORROCKS, S. M.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J.; RICKE, S. C.** 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. Food Microbiol. 15:18-25.
- **INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE (ISP).** 2014. Vigilancia de laboratorio de *Campylobacter* spp. Chile, 2005-2013. Boletín ISP. 4(1):1-17.
- **KLANČNIK, A.; GUZEJ, B.; JAMNIK, P.; VUČKOVIĆ, D.; ABRAM, M.; MOŽINA, S. S.** 2009. Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. Res. Microbiol. 160(5):345-352.
- **KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; KLENA, J. D.; YOUNG, C. R.; ZIPRIN, R.** 1998. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 66(8):3666-3672.
- **KONKEL, M. E.; LARSON, C. L.; FLANAGAN, R. C.** 2010. *Campylobacter jejuni* FlpA binds fibronectin and is required for maximal host cell adherence. J. Bacteriol. 192(1):68-76.

- **KRAUSE-GRUSZCZYNSKA, M.; VAN ALPHEN, L. B.; OYARZABAL, O. A.; ALTER, T.; HÄNEL, I.; SCHLIEPHAKE, A.; KÖNIG, W.; VAN PUTTEN, J. P. M.; KONKEL, M. E.; BACKERT, S.** 2007. Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. FEMS Microbiol. Lett. 274(1):9-16.
- **LAPIERRE, L.; GATICA, M. A.; RIQUELME, V; VERGARA, C.; YAÑEZ, J. M.; SAN MARTÍN, B.; SÁENZ, L.; VIDAL, M.; MARTÍNEZ, M. C.; ARAYA, P.; FLORES, R.; DUERY, O.; VIDAL, R.** 2016. Characterization of antimicrobial susceptibility and its association with virulence genes related to adherence, invasion, and cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from animals, meat, and humans. Microb. Drug Resist. 22(5):432–444.
- **LOUWEN, R.; HEIKEMA, A.; VAN BELKUM, A.; OTT, A.; GILBERT, M.; ANG, W.; ENDTZ, H. P.; BERGMAN, M. P.; NIEUWENHUIS, E. E.** 2008. The sialylated lipooligosaccharide outer core in *C. jejuni* is an important determinant for epithelial cell invasion. Infect. Immun. 76(10):4431-4438.
- **MAN, S. M.** 2011. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 8:669-685.
- **MAVRI, A.; SMOLE MOŽINA, S.** 2013. Resistance to bile salts and sodium deoxycholate in macrolide- and fluoroquinolone-susceptible and resistant *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. Microb. Drug Resist. 19(3):168–174.
- **MIHALJEVIC, R. R.; SIKIC, M.; KLANCNIK, A.; BRUMINI, G.; MOZINA, S. S.; ABRAM, M.** 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. Microb. Pathog. 43:120-125.
- **MINISTERIO DE SALUD (MINSAL), CHILE.** 2004. Decreto N° 158 Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. 22 octubre 2004.
- **MONTEVILLE, M. R.; YOON, J. E.; KONKEL, M. E.** 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. Microbiology 149:153-165.
- **MÜLLER, J.; SHULZE, F.; MÜLLER, W.; HÄNEL, I.** 2006. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential

ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Vet. Microbiol.* 113:123-129.

- **NADEAU, É.; MESSIER, S.; QUESSY, S.** 2002. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of Campylobacteriosis in humans. *J. Food. Prot.* 65(1):73-78.
- **NADEAU, É.; MESSIER, S.; QUESSY, S.** 2003. Comparison of *Campylobacter* isolates from poultry and humans: association between in vitro virulence properties, biotypes, and pulsed-field gel electrophoresis clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(10):6316–6320.
- **NOORMOHAMED, A.; FAKHR, M.** 2013. A higher prevalence rate of *Campylobacter* in retail beef liver compared to other beef and pork meat cuts. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10(5):2058-2068.
- **SHEPPARD, S. K.; DALLAS, J. F.; STRACHAN, N. J. C.; MACRAE, M.; MCCARTHY, N. D.; WILSON, D. J.; GORMLEY, F. J.; FALUSH, D.; OGDEN, I. D.; MAIDEN, M. C. J.; FORBES, K. J.** 2009. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 48:1072-1078.
- **SILVA, J.; LEITE, D.; FERNANDES, M.; MENA, C.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P.** 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* 2:1-12.
- **TAKAYA, A.; TOMOYASU, T.; MATSUI, H.; YAMAMOTO, T.** 2004. The DnaK/DnaJ chaperone machinery of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is essential for invasion of epithelial cells and survival within macrophages, leading to systemic infection. *Infect. Immun.* 72(3):1364-1373.
- **TALUKDER, K. A.; ASLAM, M.; ISLAM, Z.; AZMI, I. J.; DUTTA, D. K.; HOSSAIN, S.; NUR-E-KAMAL, A.; NAIR, G. B.; GRAVIOTO, A.; SACK, D. A.; ENDTZ, H.** 2008. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 46(4):1485-1488.
- **TAREEN, A. M.; LÜDER, C. G. K.; ZAUTNER, A. E.; GROB, U.; HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; LUGERT, R.** 2013. The *Campylobacter jejuni* Cj0268c protein is required for adhesion and invasion in vitro. *PLoS ONE* 8(11):1-10.

- **THAKUR, S., ZHAO, S.; MCDERMOTT, P. F.; HARBOTTLE, H.; ABBOTT, J.; ENGLISH, L.; GEBREYES, W. A.; WHITE, D. G.** 2010. Antimicrobial resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human and retail meats. *Foodborne Pathog. Dis.* 7(7):835-844.
- **VAN VLIET, A. H. M.; KETLEY, J. M.** 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *J. Appl. Microbiol.* 90:45S-56S.
- **WHILEY, H.; VAN DEN AKKER, B.; GIGLIO, S.; BENTHAM, R.** 2013. The role of environmental reservoirs in human *Campylobacteriosis*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10(11):5886-5907.
- **WIECZOREK, K.; SZEWCZYK, R.; OSEK, J.** 2012. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from retail raw meat in Poland. *Vet. Med-Czech.* 57(6):293-299.
- **WILSON, D. J.; GABRIEL, E.; LEATHERBARROW, A. J. H.; CHEESBROUGH, J.; GEE, S.; BOLTON, E.; FOX, A.; FEARNHEAD, P.; HART, C. A.; DIGGLE, P. J.** 2008. Tracing the source of *Campylobacteriosis*. *PLoS Genet.* 4(9):1-9.
- **ZHAO, C.; GE, B.; DE VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D.; MENG, J.** 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D. C., Area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(12):5431-5436.
- **ZHENG, J.; MENG, J.; ZHAO, S.; SINGH, R.; SONG, W.** 2006. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *J. Food Prot.* 69(4):768–774.

10. MATERIAL COMPLEMENTARIO



To: FONDECYT Program
Present

Dear Sir,

The Risk Prevention and Biosafety Units of Dr. Luis Calvo Mackenna Hospital hereby certifies that the proposal from Dr. Mauricio J. Farfan entitled "**Bacterial microbiota strains associated with diarrheogenic *E. coli* infection promotes fimbrial-mediated adherence and inflammation induction of Enteroaggregative and ShigaToxin-producing *E. coli* to intestinal cell models**" will be perform at the Center of Molecular Studies located in our institution. This laboratory satisfies all basic Biosafety requirements to carry out the experimental activities included in this proposal. It also meets every demand established on manuals: CONICYT "Biosafety 1st edition 1994" and "Manual of Safety Standards, 2nd edition 2008", "Center for Control and Prevention of Diseases, CDC, 4^a edition, "Safety in Laboratories Manual", World Health Organization WHO, Geneva 2005, reasons why this unit approves its eventual execution.

The responsible investigator, Dr. Mauricio J. Farfán, is committed to meet all biosafety standards established in the formerly cited manuals and those established in the Internal Regulations for the functioning of the Laboratories, Risk Prevention and Biosafety Unit, Dr. Luis Calvo Mackenna Hospital. Concomitantly he is responsibly for the proper complying of established biosafety regulations, of all participants of the aforementioned project.



Nicolás Santander
Risk Prevention Unit Director
Dr. Luis Calvo Mackenna Hospital

José Luis Cerva Cortes
Laboratory Biosafety Unit Director
Dr. Luis Calvo Mackenna Hospital

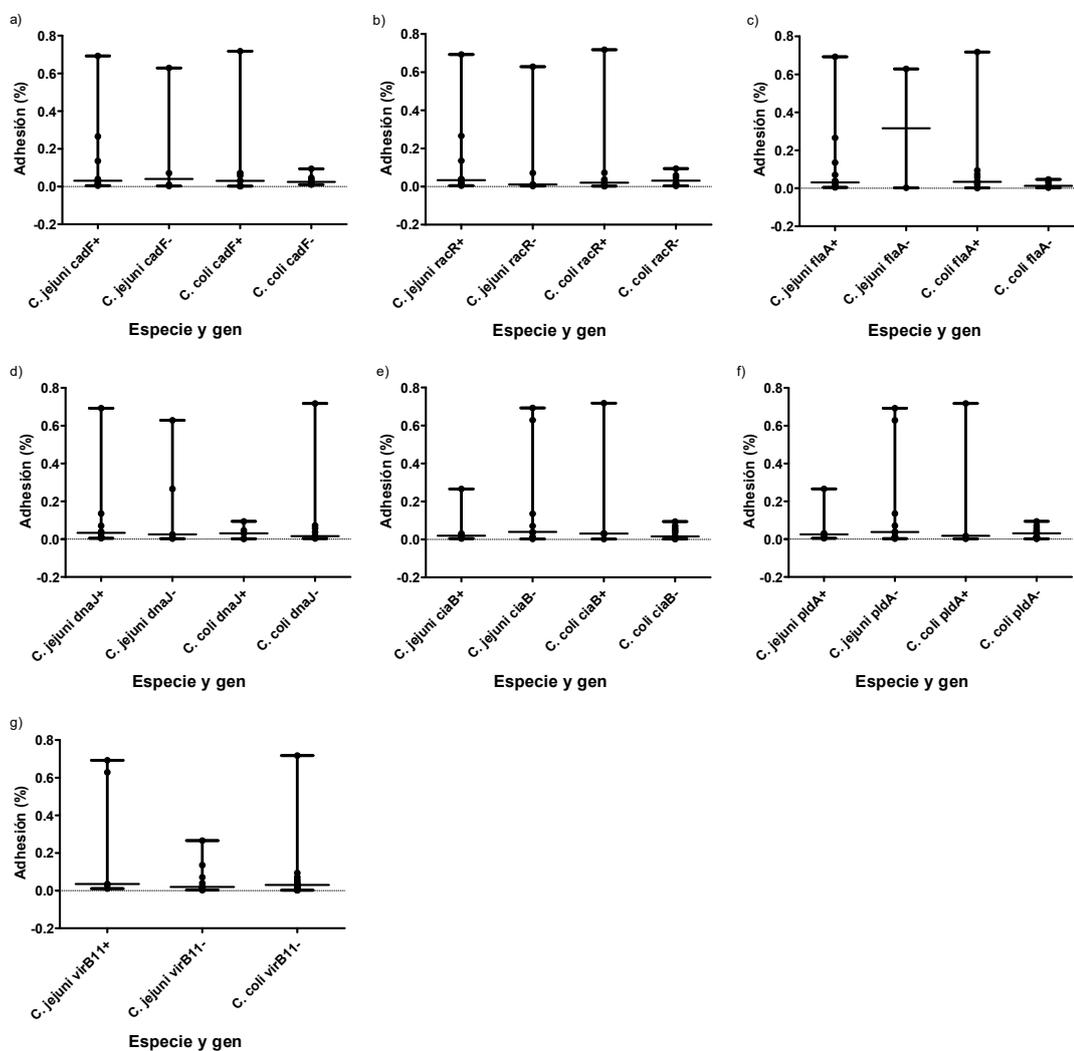


FIGURA COMPLEMENTARIA 1: Mediana y valor máximo y mínimo del porcentaje de adhesión a células T84 según especie bacteriana y presencia/ausencia de genes de virulencia. Las células T84 se infectaron durante 1 h y el resultado se graficó como porcentaje del inóculo inicial viable. a) Presencia/ausencia del gen *cadF*. b) Presencia/ausencia del gen *racR*. c) Presencia/ausencia del gen *flaA*. d) Presencia/ausencia del gen *dnaJ*. e) Presencia/ausencia del gen *ciaB*. f) Presencia/ausencia del gen *pldA*. g) Presencia/ausencia del gen *virB11*.

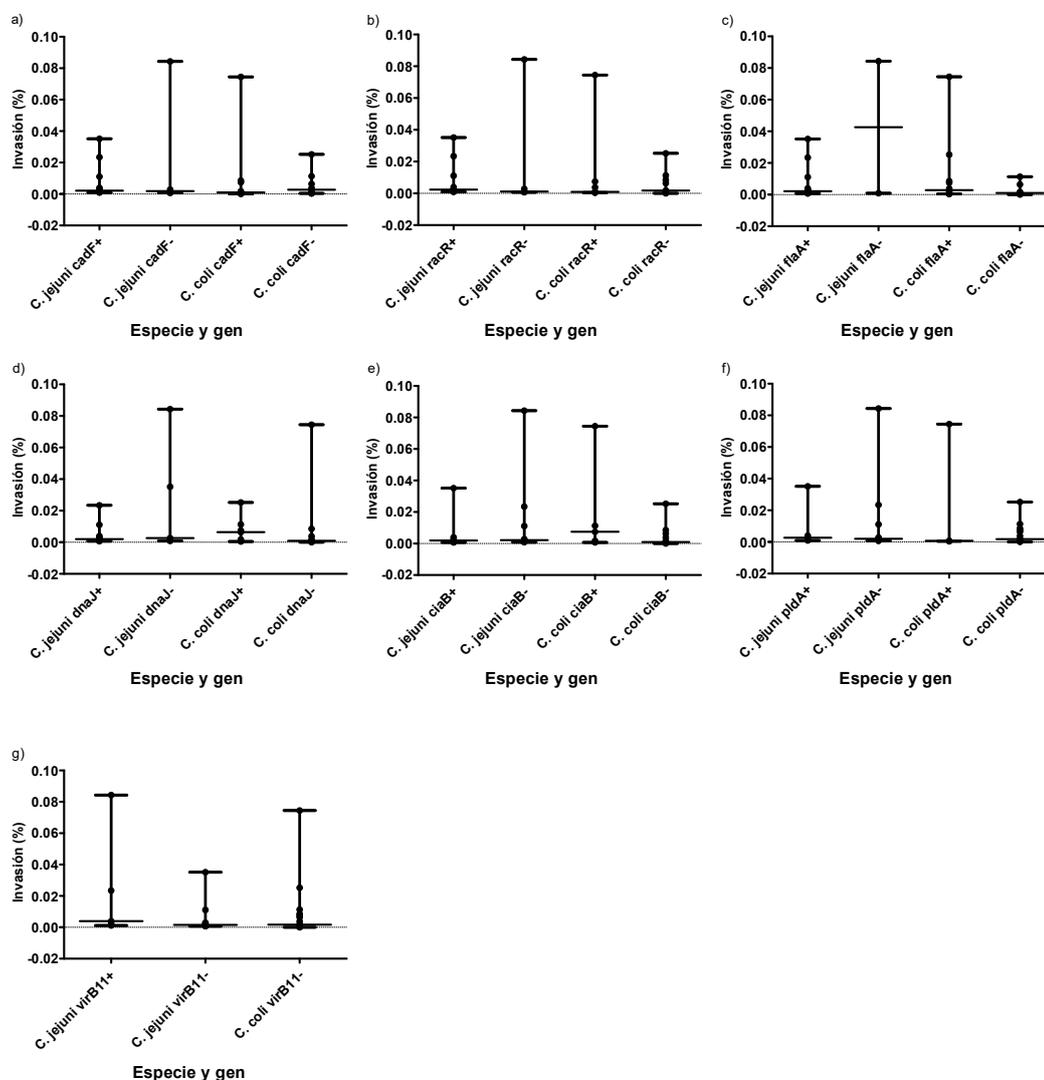


FIGURA COMPLEMENTARIA 2: Mediana y valor máximo y mínimo del porcentaje de invasión a células T84 según especie bacteriana y presencia/ausencia de genes de virulencia. Las células T84 se infectaron durante 3 h y el resultado se graficó como porcentaje del inóculo inicial viable. a) Presencia/ausencia del gen *cadF*. b) Presencia/ausencia del gen *racR*. c) Presencia/ausencia del gen *flaA*. d) Presencia/ausencia del gen *dnaJ*. e) Presencia/ausencia del gen *ciaB*. f) Presencia/ausencia del gen *pldA*. g) Presencia/ausencia del gen *virB11*.

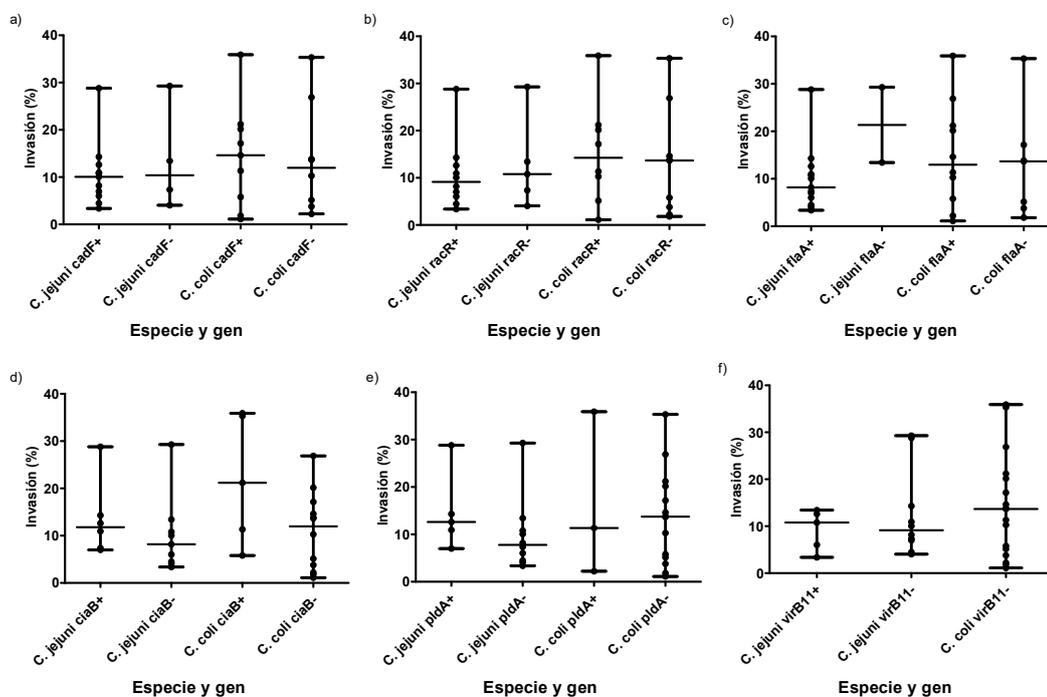


FIGURA COMPLEMENTARIA 3: Mediana y valor máximo y mínimo del porcentaje de invasión a células T84 según especie bacteriana y presencia/ausencia de genes de virulencia. Las células T84 se infectaron durante 3 h y el resultado se graficó como porcentaje de las bacterias adheridas. a) Presencia/ausencia del gen *cadF*. b) Presencia/ausencia del gen *racR*. c) Presencia/ausencia del gen *flaA*. d) Presencia/ausencia del gen *ciaB*. e) Presencia/ausencia del gen *pldA*. f) Presencia/ausencia del gen *virB11*.