

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

“Detección e identificación de *Campylobacter jejuni*
en carne y heces de pollo, utilizando técnicas
moleculares, análisis de ácidos grasos, pruebas
morfológicas y bioquímicas”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

P R E S E N T A :

M.V.Z. LAURA ZEPEDA BARRIOS

DIRECTOR: DR. HUGO CÉSAR RAMÍREZ SAAD
ASESORES : DR. GILBERTO DÍAZ GONZÁLEZ
M. EN S. P. FRANCISCO RAMÓN GAY JIMÉNEZ

2006

	Página
ÍNDICE	1
1. Resumen	3
2. Introducción	4
3 Antecedentes	5
3.1. Taxonómicos	5
3.2. Características morfológicas y bioquímicas	5
3.3. Asociación con alimentos	6
3.4. <i>C. jejuni</i> en carne de pollo	7
3.5. Enfermedades asociadas con <i>C. jejuni</i>	8
3.6. Mecanismos de patogenicidad	9
3.7. Genotipificación	13
3.8. Identificación y detección	13
4. Planteamiento del problema	17
5. Justificación	17
6. Objetivo general y objetivos particulares.	18
7 Diseño experimental	19
7.1. Diagrama de flujo para el Aislamiento e identificación de <i>C. jejuni</i>	20
7.2. Diagrama de flujo para la detección de <i>C. jejuni</i>	21
7.3. Diagrama de flujo para determinar la sensibilidad de pruebas microbiológicas y PCR	22
7.4. Diagrama de flujo para de identificación de ácidos grasos	23
8. Materiales y Métodos	24
8.1. Obtención y mantenimiento de cepas de referencia	24
8.2. Cultivo	24
8.2.1. Cepas de referencia	24
8.2.2. Cepas aisladas	25
8.3. Toma de muestras	25
8.4. Aislamiento e identificación de <i>C. jejuni</i> , por los métodos tradicionales	25
8.4.1. Aislamiento	25
8.4.2. Identificación	26
8.4.2.1. Pruebas morfológicas	26
8.4.2.2. Pruebas bioquímicas	27
8.5. Detección por la Técnica de PCR	31
8.5.1. Extracción de DNA	31
8.5.1.1. Método Beadbeater	31
8.5.1.2. Extracción de DNA de cepas caracterizadas	32
8.5.1.3. Lisis celular	33

8.5.2. Iniciadores utilizados para la amplificación	34
8.5.3. PCR	34
8.5.3.1 Geles de agarosa al 1.5%	35
8.6. Sensibilidad de pruebas microbiológicas y PCR	36
8.6.1. Conteo celular por epifluorescencia	38
8.7. Análisis de ácidos grasos de la membrana celular	39
8.7.1. Extracción de lípidos de la membrana celular	39
9. Resultados y discusión	40
9.1. Cultivo	40
9.2. Aislamiento	41
9.3. Identificación	42
9.3.1. Pruebas morfológicas	42
9.3.2. Pruebas bioquímicas	43
9.4. Detección por PCR	44
9.4.1. Extracción de DNA	44
9.4.2. PCR	46
9.4.2.1. Método Beadbeater	47
9.4.2.2. Extracción de DNA de cepas de referencia y caracterizadas	49
9.4.2.3. Extracción de DNA de muestras de carne	51
9.5. Sensibilidad de pruebas microbiológicas y PCR	52
9.5.1. Conteo celular por epifluorescencia	52
9.5.2. Numeración bacteriana: El Número Más Probable (NMP)	53
9.5.3. PCR-NMP	53
9.6. Análisis de ácidos grasos de la membrana celular	56
10. Conclusiones	58
11. Referencias	60
12. Anexo	66
12.1 Preparación de medios de cultivo	66
12.2 Tablas	69
Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de <i>C. jejuni</i>	69
Tabla 2. Ventajas y desventajas de la técnica RAPD	70
Tabla 3. Ventajas y desventajas de la técnica AFLP	71
Tabla 4. Ventajas y desventajas de la técnica RFLP	71
Tabla 5. Ventajas y desventajas de la técnica PCR	72
Tabla 6. Iniciadores utilizados para la identificación molecular de <i>C. jejuni</i>	72
Tabla 7. Composición de los componentes Supelco 37 FAME Mix	73
Tabla 8. Pruebas bioquímicas y morfológicas para la identificación del género bacteriano <i>Campylobacter</i>	74
Figuras 1 a 10 Cromatogramas	75

1. RESUMEN

Campylobacter jejuni es uno de los principales agentes infecciosos causantes de diarrea a nivel mundial en el humano. Para que la enfermedad aparezca en el humano se requiere una dosis infectiva baja, se ha demostrado experimentalmente, que entre 500-800 células microbianas son suficientes para instaurar la enfermedad; por esta razón es vital que los métodos de aislamiento de los alimentos sean bastante sensibles para detectar un bajo número de *C. jejuni*, en presencia de otros microorganismos competidores. Los métodos normales usados para su cultivo, exigen medios selectivos que incorporan una variedad de antibióticos para suprimir la microbiota competidora. El aislamiento de *C. jejuni* de los alimentos es difícil, no solamente porque está presente en un bajo número, sino también por su crecimiento lento y la necesidad de condiciones microaerobias para su cultivo que requiere de 5 a 6 días.

Actualmente la técnica de PCR proporciona los elementos necesarios para una detección rápida de los agentes causales de campylobacteriosis (*C. jejuni* y *C. coli*), presentes en alimentos.

La presente investigación tuvo como objetivo principal, estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como una prueba rápida y confiable para la detección de *Campylobacter jejuni* en heces y carne de pollo. Para ello se realizaron varias pruebas para identificación de *C. jejuni* por métodos microbiológicos tradicionales que incluyeron pruebas morfológicas para la identificación de la bacteria y sus colonias y pruebas bioquímicas como la prueba de hipurato, métodos químicos como fue la identificación de ácidos grasos de la membrana celular y métodos utilizando la prueba de PCR. Para la realización de la técnica de PCR, se utilizó DNA puro proveniente de cepas de colección, ATCC 33291 y ATCC 5791 y de las aisladas durante la presente investigación, así como DNA extraído directamente de las heces de pollo utilizando la técnica de beadbeater y DNA de muestras de carne obtenido por lisis celular. También se realizó una prueba de PCR-multiplex utilizando dos pares de iniciadores B04263 y B04264 y C-1.

Se aislaron e identificaron un total de 10 cepas de las muestras de heces, y una de muestras de carne de pollo. Por la prueba de PCR, del total de muestras de DNA metagenómico se obtuvieron 20 muestras positivas, equivalente a 38.5 % y 77 % respectivamente para cada técnica, lo que demuestra una sensibilidad mayor para la técnica de PCR. Aunado a esto se realizaron pruebas de sensibilidad para las dos técnicas utilizando la metodología del Número Más Probable (NMP), obteniéndose una sensibilidad aproximadamente 500 veces mayor para la prueba de PCR.

Un total de 7 cepas fueron caracterizadas de acuerdo a los ácidos grasos de la pared celular. El perfil de ácidos grasos para cada cepa aislada esta caracterizado por la presencia de C15:1 o de C16:0 y los 3 ácidos grasos C14:0, C18:1n9c y C18:2n6c presentes en las cepas de referencia ATCC 33291 y ATCC 5791.

2. INTRODUCCIÓN

Campylobacter jejuni es una de las bacterias más comúnmente reportadas a nivel mundial como causante de enfermedades diarreicas en humanos, principalmente en naciones desarrolladas (1,12,67). En estos países se ha calculado que *anualmente C. jejuni* es el agente causal de 2.5 millones de casos de gastroenteritis en humanos (69). En los Estados Unidos y en la provincia canadiense de Quebec, *C. jejuni* es actualmente la principal causa de enfermedades diarreicas de origen bacteriano. También en el Reino Unido, *C. jejuni* es la causa más común de gastroenteritis bacteriana; en este país el número de casos aumentó de 24,809 en el año 1986 a 56,420 para 2001 (55). Dado que la mayoría de las infecciones son esporádicas, las fuentes de infección son raramente determinadas (58). Cabe señalar que se considera a los pollos y sus productos como una de las fuentes principales de infección.

Este microorganismo es el responsable de aproximadamente 200 a 800 muertes por año en Estados Unidos (12) estimándose que el índice de mortalidad es de 0.001% (67). Anualmente son atribuidos mas casos de enfermedades diarreicas a *Campylobacter jejuni*, superando incluso el total de casos combinados causados por *Salmonella* spp, *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, y *Yersinia enterocolitica* (44,79,88).

Aunque otras especies de *Campylobacter* han sido identificadas como agentes causales de gastroenteritis en humanos (Ej. *C. laridis*, *C. hyointestinalis*), *C. jejuni* y *C. coli* son las especies más comúnmente identificadas como causantes de infecciones (3) y se cree que más del 90% de los casos de gastroenteritis en el mundo son causados por *C. jejuni*, la cual ha sido aislada de las heces de pacientes diarreicos, que presentan la enfermedad conocida como campylobacteriosis (48,88).

En México, no existen informes específicos, por parte de la Secretaria de Salud, de diarrea causada por *C. jejuni*, ya que la campylobacteriosis no está contemplada dentro de la vigilancia epidemiológica sobre enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo. Sin embargo, el Instituto Nacional de Pediatría ha notificado la presencia del Síndrome de Guillain Barré en niños de 1 a 14 años, y se está investigando su asociación con infecciones previas por *C. jejuni* (61).

Los mecanismos de patogenicidad de *C. jejuni*, están siendo estudiados con la finalidad de conocer su asociación con el consumo de alimentos contaminados y su implicación como uno de los agentes infecciosos principales, asociado con el síndrome de Guillain-Barre (GBS) y otras enfermedades.

El aislamiento e identificación de *C. jejuni* por el método microbiológico convencional resulta laborioso debido al crecimiento lento, al uso de antibióticos para inhibir la microbiota competitiva y al gran número de pruebas que deben realizarse para su identificación. Debido a esto, existe la necesidad de desarrollar métodos que permitan la detección rápida de esta especie. Actualmente, la utilización de herramientas moleculares ha permitido la detección de *C. jejuni* en carne de pollo y cerdo, leche y

agua. Una de estas pruebas es la utilización del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que tiene como ventaja por su especificidad, sensibilidad y rapidez.

3. ANTECEDENTES

3.1. Antecedentes Taxonómicos

En 1913 las bacterias del género *Campylobacter* eran reconocidas como miembros del género *Vibrio*, causantes de aborto en ovejas. En los años 1918 y 1919 se asoció a este bacilo curvo (conocido como *Vibrio fetus*) con casos de aborto en ganado bovino. En 1931 se sumó la disentería porcina y en becerros a la lista de enfermedades atribuibles a los nuevos vibrios llamados *V. jejuni*. Para el año 1944 *V. jejuni*, *V. doylei*, y *V. coli* ya aparecían en la literatura como patógenos de importancia veterinaria. En el año 1946, se descubrió la presencia de un organismo espiral en la sangre de 350 personas enfermas de gastroenteritis, este organismo fue visto al microscopio pero desafortunadamente, no pudo ser cultivado en ninguno de los casos (72). En 1947 se aisló un organismo conocido como *V. fetus* de la sangre de tres mujeres embarazadas, de las cuales dos tuvieron aborto espontáneo. A partir de ese momento se despertó el interés en estos microorganismos como agentes causales de enfermedades en humano. En 1957 se aisló de la sangre de pacientes un organismo similar a *V. fetus*, descrito por Vincent, el cual creció a 42°C. Sin embargo, fue hasta 1972 que se corroboró que era la misma bacteria que había sido aislada de pacientes con diarrea (72). La diferenciación de especies dentro del género *Vibrio* fue referida por Florent en 1959 (72), quien describió a *V. fetus* subsp. *intestinalis*, como causante de aborto en borregos y *V. fetus* subsp. *veneralis*, causante de infertilidad en el ganado. A través de pruebas bioquímicas, Sebald y Véron designan en 1963, al nuevo género *Campylobacter* y desde entonces este género continúa en estudio (72).

En la actualidad, se distinguen 2 subespecies: *C. jejuni* subespecie *jejuni*, *C. jejuni* subespecie *doylei* que ha sido aislada de heces de niños (8,50,72).

3.2. Características morfológicas y bioquímicas

Campylobacter jejuni es una bacteria Gram negativa, microaerobia, delgada, curva en forma de "S", móvil, con un flagelo único en uno a ambos extremos, tiene una longitud media de 1.12 µm y 0.48 µm de ancho. Las células de *C. jejuni* se vuelven cocoides cuando se exponen al aire. Por ser un organismo microaerobio requiere niveles reducidos de oxígeno, de 3 a 5% y de 2 a 10% de dióxido de carbono para un crecimiento óptimo.

Los aislados de *C. jejuni* crecen bien a 42 °C, la temperatura mínima de crecimiento está entre 31 y 36 °C, aunque hay casos en que puede crecer abruptamente alrededor de 30 °C (15).

Los cultivos se incuban de 48 a 72 horas en medios específicos o especiales para el género, crece bien en agar sangre con sangre de carnero desfibrinada o en medios

comerciales como agar Campy-Cefex, agar CCDA, agar CAMPY y agar Karmali (52) (Anexo,Tabla 1).

Las colonias son redondas, elevadas, translúcidas, algunas veces mucoides. Es sensible a la desecación y al pH ácido (menor a 5.5) (44). *C. jejuni* es capaz de hidrolizar rápidamente el hipurato, crece en presencia de 1% de glicina y 1% de bilis. Es susceptible al ácido nalidíxico (27), ciprofloxacina (85), tetraciclina (42) y resistente a la eritromicina y sulfonamidas (29). Producen grandes cantidades de ácidos grasos de 19 carbonos (C19:0) (72).

C. jejuni subsp *jejuni* aparece después de 24 a 48 horas de incubación en condición microaerobia y entre 37 y 42 °C; es catalasa positivo; *C. jejuni* subs. *doylei* crece pobremente a 37 °C y bien a 42 °C, además es incapaz de reducir el nitrato a nitrito, lo anterior puede ser utilizado como criterio de diagnóstico para la diferenciación entre estas especies, además de ser susceptible a la cefalotina (72).

Este microorganismo puede identificarse en primera instancia a través de su morfología y posteriormente con un número de pruebas bioquímicas, como la de hipurato (Anexo, Tabla 8), que es específica para *C. jejuni* debido a que esta especie contiene una enzima que lo hidroliza (68).

Actualmente, es posible identificar esta bacteria por técnicas de biología molecular como PCR (13) y técnicas inmunológicas como EIA (Inmunoensayo Enzimático) (82).

3.3. Asociación con alimentos

C. jejuni es una bacteria comensal del tracto intestinal de varias especies domésticas, incluidos perros y gatos, en los cuales se ha detectado una correlación entre *C. jejuni* aislado de estas especies y los aislados de sus dueños (16,87).

Los bovinos sanos pueden ser un reservorio de varias especies de *Campylobacter* incluyendo *C. jejuni*. La prevalencia en heces va de 37.7 a 54.5% de la microbiota total, dependiendo de la edad del animal, estación del año y tipo de muestra (heces o contenido intestinal) (83). El aislamiento a partir de carne de bovino solo ha sido reportado en un 0.5% (90).

También ha sido aislado del tracto intestinal de ovinos y cerdos (87). En canales de puerco *C. jejuni* y *C. coli* se encuentran en porcentajes de 13.1 y 86.9% respectivamente (12), mientras que en otro estudio se encontró solamente 2% de *C. jejuni* en carne de cerdo y en carne de pavo en un 14% (90).

Otras fuentes de contaminación son la leche cruda o inadecuadamente pasteurizada (55,75), el agua no tratada, carne mal cocida, particularmente de pollo (1,54,79,90). En agua no clorada, bajo condiciones aerobias, *C. jejuni* soporta un rango de temperaturas de 4 a 37°C, a mayor temperatura menor es el índice de sobrevivencia. *C. jejuni* puede llegar a sobrevivir hasta 4 semanas a 4°C (83), disminuyendo a 175.8 horas a 10°C; 42.6 horas a 22°C y 21.8 horas a 37°C (9).

El agua y la leche puede contaminarse con heces y orina; se ha observado que *C. jejuni* puede sobrevivir a 4°C, hasta 3 semanas en heces y cinco semanas en orina (83).

Se ha reportado la detección *Campylobacter* spp a partir de muestras de mariscos y setas, mientras que en muestra de vegetales frescos (lechuga, coliflor, brócoli, col y apio), no ha sido detectado (74).

En otro estudio se logró aislar *C. jejuni* de pollo rostizado, sin embargo se propone que las condiciones sanitarias durante el cortado y despacho del producto final, propiciaron la contaminación cruzada con pollo crudo (58).

Es hasta las últimas 2 décadas, que la comunidad científica ha tomado conciencia de la campylobacteriosis, como una enfermedad debida al consumo de alimentos contaminados. En la actualidad, se reconoce al pollo como el principal agente transmisor de *C. jejuni*, pues la incidencia de este patógeno en carne de pollo, es muy superior a la encontrada en otros tipos de carne.

3.4. *Campylobacter jejuni* en carne de pollo

Muchos estudios han sugerido que el origen de la campylobacteriosis en humanos se debe al manejo y consumo de carne de pollo contaminada con heces del propio animal, debido a que el tracto intestinal de las aves es comúnmente colonizado por *C. jejuni* (76).

Dada la frecuencia con la que la carne de pollo se encuentra contaminada con *C. jejuni* su manejo y consumo es riesgoso, especialmente cuando no ha recibido un tiempo de cocción suficiente. Se ha demostrado que del 30 al 100% de los pollos lleva *C. jejuni* como habitante comensal en el tracto intestinal. El pollo excreta cerca de 10^4 a 10^8 células de esta bacteria por gramo de heces (74,83).

Existen diversos factores que afectan la colonización del tracto intestinal del pollo, por *C. jejuni*. Se ha encontrado variación entre diferentes parvadas, también se han asociado aumentos en la colonización relacionados con la edad de la parvada y durante el ciclo reproductivo. Durante los meses de calor, entre mayo y octubre, se ha observado una mayor incidencia de muestras positivas (84).

Existen varias vías de transmisión de *Campylobacter* hacia el pollo, entre las cuales se pueden citar la exposición a agua contaminada, contaminación durante la crianza a través de vectores potenciales como roedores, insectos, animales domésticos, alimento, personal de la granja, transporte y heces de pájaros (79). Se ha mencionado una transmisión vertical de la madre al embrión vía huevo (1), sin embargo, una característica con respecto a la colonización en pollo, es que el organismo está ausente del tracto intestinal durante las dos primeras semanas de edad, lo que significa que existe una resistencia a esta colonización debida posiblemente, a la presencia de anticuerpos maternos específicos contra *C. jejuni*. Estos anticuerpos transfieren protección a la mucosa contra casi cualquier agente infeccioso que colonice el epitelio intestinal. El pico de producción de estos anticuerpos se detecta en los primeros cuatro

días de vida y decrece gradualmente hasta no detectarse entre las semanas 2 y 3, coincidiendo con el periodo de colonización por *C. jejuni*. En la semana 5 existe un incremento de anticuerpos, continuando en aumento en la semana 6, esto puede deberse a la infección natural (63).

C. jejuni es capaz de colonizar muy eficientemente el ciego de pollos inoculados, llegando hasta un 100%, también se ha encontrado en huevos frescos y a la venta en anaquel (1). Durante la matanza existe un incremento en el número de campylobacterias aislados de carne, y aunque aún no está muy claro, es posible que este incremento esté asociado con el desplume durante el escaldado, ya que el número de *C. jejuni* aumenta en el agua después de este proceso (5).

El microorganismo puede sobrevivir a 4°C y continuar siendo viable pero no cultivable, durante 4 meses; también permanece viable en piel de pollo crudo, congelado a temperaturas de -20°C y -70°C, por 14 y 56 días, respectivamente (15). Por otro lado, temperaturas de más de 42°C y un tiempo de incubación mayor a 24 horas provocan transformación en su morfología celular (58).

3.5. Enfermedades asociadas con *C. jejuni*

Generalmente las infecciones causadas por *C. jejuni* son controladas con antibióticos, y en muchas ocasiones, remiten sin necesidad de ellos. Las fluoroquinolonas son de los agentes antimicrobianos más usados para el tratamiento de infecciones provocadas por este patógeno (85). Sin embargo, las infecciones por *C. jejuni* pueden llevar en algunos individuos a consecuencias potencialmente peligrosas a largo plazo. Estas complicaciones relativamente raras son:

- a) Artritis reactiva (ReA) o Síndrome de Reiter, caracterizada por inflamación de las articulaciones, debido a una infección originada en un sitio no articular, provocada por la circulación de los antígenos bacterianos (65,67). Las infecciones que precipitan ReA tienen su origen en el tracto genitourinario o gastrointestinal, y se estima que el 2% de individuos con enteritis por *C. jejuni* desarrollan ReA (67).
- b) Bacteriemia, presencia de bacterias en la sangre. La bacteriemia, resultado de campylobacteriosis es más común en personas inmunocomprometidas y en pacientes mayores de 65 años con infección por *C. jejuni*. La incidencia de bacteriemia inducida por *C. jejuni* es de 0.3 casos por 1,000 en pacientes de 1 a 4 años y de 5.9 casos por 1,000 en pacientes mayores de 65 años. Se ha reportado que un 25.8% de pacientes inmunocomprometidos, que presentan enteritis por *Campylobacter*, tienen bacteriemia (67).
- c) Síndrome del pescador (FS). Es una enfermedad neurológica caracterizada por ataque agudo de oftalmoplegia y ataxia. Es considerado una variante de GBS porque algunos individuos que presentan FS progresan a GBS (71).

- d) Síndrome de Guillain Barré (GBS). Es una enfermedad neurológica autoinmune del sistema nervioso periférico, caracterizada por debilitamiento generalizado de los músculos (2,17,21,89).

Tiene una incidencia mundial aproximada de 0.5 a 4 casos por cada 100,000 habitantes (21). Se piensa que *C. jejuni* es el responsable de casi la mitad de los casos de este síndrome, ocurridos en los Estados Unidos (65), y se presenta de 1 a 2 semanas después de la infección (66,83).

Según la estadística del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología, en Cuba, la incidencia de GBS es de 3.6 por cada 100,000 habitantes y en la provincia de Camagüey, en la edad pediátrica, es de 2,6 por 100,000 (1 a 2 casos anuales) (66).

Esta enfermedad es de distribución mundial, afecta a todas las razas, edades y sexos, sin embargo existen dos factores que contribuyen a aumentar el riesgo de desarrollar el síndrome, la edad (niños pequeños y ancianos tienen mayor riesgo) y el género, los hombres son más propensos a adquirirlo (38,75).

En México se ha reportado la existencia del GBS en el Distrito Federal, y estados de México, Guerrero y Morelos siendo los sitios con mayor porcentaje de pacientes, que informan de este síndrome al Instituto Nacional de Pediatría (61). Entre enero de 1988 y mayo de 1996 el Servicio de Epidemiología, de este Instituto ha registrado 118 casos, informando que el GBS es más frecuente en hombres de uno a 14 años de edad; los meses de julio, agosto y noviembre se reportaron como los de mayor incidencia, coincidiendo con los reportes de otros países del mundo (61).

- e) La enteritis por *Campylobacter* también ha sido asociada con infecciones del tracto biliar como pancreatitis o hepatitis obstructiva, con casos de peritonitis y nefritis (67).

3.6. Mecanismos de patogenicidad de *C. jejuni*

- a) En infección gastro-intestinal

Su periodo de incubación es de 7 a 53 días después de la ingestión del microorganismo (62). Se ha demostrado experimentalmente, que entre 500-800 bacterias son suficientes para iniciar la enfermedad; y que por debajo de 100 células la enfermedad no se desarrolla. Estas diferencias se deben a variaciones del pH del jugo gástrico del huésped y del tipo de alimento consumido. La leche y alimentos grasos, permiten salvar la barrera ácida del estómago y producir la infección de forma más fácil. (60,83).

Para colonizar el intestino y causar la infección, *C. jejuni* deben competir por los nutrientes con los microbios endógenos, resistir las defensas del huésped, persistir en el intestino, y finalmente infectar al huésped. Durante el trayecto a través del tracto gastrointestinal, *Campylobacter* se debe adaptar a las condiciones de éste como el pH ácido del estómago, osmolaridad alta, los gases intestinales formas reactivas del oxígeno y del nitrógeno, cambios en la disponibilidad de nutrientes, y baja concentraciones de iones inorgánicos (70).

Por su analogía con otros enteropatógenos y considerando su movilidad, se reconocen 4 propiedades virulentas: motilidad, adherencia, invasión y producción de toxina (70,75). En el caso de enteritis, se mencionan tres mecanismos (11): producción de una enterotoxina tipo cólera, producción de una citotoxina y la habilidad para adherirse e invadir las células epiteliales, como se ha demostrado *in vitro*. La adherencia y la invasión de las células epiteliales son mecanismos patógenos importantes de la diarrea provocada por *Campylobacter*; hay una buena correlación entre la presentación clínica con diarrea y el aislamiento de cepas de *Campylobacter* que se adhieren e invaden las células Hep-2, en los casos de pacientes asintomáticos *C. jejuni* resulta ser no invasivo y no se adhiere a las células (11).

Varias adhesinas principales han sido identificadas, tratándose del lipo-oligosacáridos, de flagelos y de unas proteínas de superficie-expuestas denominadas cadF y PEB1 (70).

Otros estudios han sugerido a las glicoproteínas de *C. jejuni* como factores importantes que pueden actuar como adhesinas que promueven el proceso de colonización (35).

C. jejuni tiene la capacidad de penetrar las células fagocíticas del hospedero, lo que puede ser un factor determinante de virulencia; estudios cinéticos indican que la bacteria puede persistir y multiplicarse dentro de las células epiteliales y macrófagos *in vitro* (18). La movilidad a través del flagelo sirve a la bacteria para fijarse al sitio y penetrar en las células intestinales. La bacteria se adhiere a la superficie epitelial y probablemente, esto es un importante determinante para la colonización e incremento en la concentración local de productos bacterianos secretados (75).

C. jejuni posee abundantes lipopolisacáridos en su membrana, los cuales tienen propiedades endotóxicas y juegan un papel importante en la adhesión. La molécula de lipopolisacáridos tiene 3 regiones; lípido A que posee la función endotóxica, núcleo y lípido "O". El gen *galE* está involucrado en la síntesis de lipopolisacáridos y su virulencia (26).

Campylobacter spp produce dos clases de toxinas proteínáceas: enterotoxinas y citotoxinas. Las enterotoxinas son proteínas secretadas con capacidad de unirse a un receptor celular, entrar a la célula y elevar los niveles de AMP cíclico; las citotoxinas se definen como proteínas que matan células diana. La actividad enterotóxica de *C. jejuni* fue documentada en 1983, y su enterotoxina fue llamada CJT por sus siglas en inglés (*Campylobacter jejuni* Toxin) (75).

En el caso de las citotoxinas se han propuesto 6 diferentes (75):

- 1) Citotoxina 70-kDa, que tiene un peso molecular de 50 000 a 70 000, es activa en células CHO, Hela, Hep-2 y MRC.
- 2) Citotoxina de células Vero/Hela, esta toxina como su nombre lo indica, tiene actividad en las células Vero y Hela.
- 3) Toxina citoletal distensora (CDF), descrita originalmente en 1988 por Johnson y Lior como CLDT; las células CHO, Hela, Hep-2 son sensibles a su acción.

- 4) Toxina tipo Shiga, la cual tiene actividad en células Hela, es probablemente idéntica a 70-kDa.
- 5) Citotoxina hemolítica, que tiene actividad hemolítica en las células CHO.
- 6) Hepatotoxina, la cual contiene una fracción tóxica para los hepatocitos, induce hepatitis en ratones.

El principal factor tóxico de virulencia descrito para este patógeno es la toxina citoletal distensora (CDT), la cual representa a un grupo emergente de productos secretados por diversas especies bacterianas, que causan detención del ciclo celular, distensión del volumen celular y la posterior muerte de las células infectadas (23). Esta toxina detiene a las células eucarióticas en la fase G2 del ciclo celular (30). La detección y caracterización de los genes de la proteína CDT se ha logrado mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando diferentes pares de iniciadores (ej.: VAT2 y WMI1). (22,30). También se han encontrado los genes Cdt en algunos aislados de *E. coli*, especies de *Shigella* y *Haemophilus ducreyi* y en todos los casos hay tres genes adyacentes los *cdtA*, *cdtB*, y *cdtC*, cuya expresión se requiere al parecer, para la actividad de la CDT. Las secuencias predecidas de los aminoácidos para las tres proteínas Cdt, indican que existen divergencias en las secuencias, particularmente dentro de las secuencias de CdtA y CdtC. Por ejemplo la secuencia predicha de aminoácidos para la proteína de CdtA de *E. coli* es 9142-88 y para *C. jejuni* de 81-176, lo que significa que son 34% similares (21% idénticas y 13 conservan aminoácidos) (22).

C. jejuni es particularmente vulnerable a los efectos detrimentales del estrés oxidativo, la defensa de este patógeno contra tales efectos incluye la enzima superóxido dismutasa (SodB), considerada la primera línea de defensa, que cataliza la conversión de radicales oxígeno (O_2^-) a peróxido de hidrógeno, y la catalasa (KatA) codificada por el gen *katA* que provee protección contra el estrés oxidativo convirtiendo H_2O_2 a H_2O y O_2 (4,34,57). Otro factor importante para sobrevivir al estrés oxidativo durante la infección y transmisión es la superóxido reductasa (AhpC), la cual es esencial para el transporte de iones de hierro, como cofactor para las enzimas que regulan este proceso (4).

C. jejuni es capaz de permanecer en un estado viable pero no cultivable (VBNC) como una estrategia de supervivencia en respuesta al estrés ambiental. En un estudio realizado, este patógeno fue capaz de colonizar embriones de pollo en huevo inoculados con un mililitro de la suspensión VBNC, con una concentración de 25 VBNC células ml^{-1} (10). Después de 116 días en estado VBNC el contenido de DNA permanece intacto, la integridad celular y la actividad respiratoria se mantienen por 7 meses aproximadamente (58). No obstante, que *C. jejuni* es muy sensible al estrés ambiental, ya que normalmente no crece en presencia de aire y no es transmitido entre los humanos, aun así es el patógeno mas frecuente en los alimentos. *C. jejuni* sobreviven a temperatura de 5°C bajo condiciones anaerobias. Después de 4 semanas, las células bacterianas solo muestran un pequeño declive bajo estas condiciones. A las 11 semanas las células son difíciles de recuperar en placas, pero aproximadamente 90% de las células todavía permanecen viables utilizando análisis de BacLight.

Sorprendentemente, las células sobreviven en condiciones anaerobias o microaerobias por debajo de 25°C y son cultivables (46).

Otra respuesta al estrés térmico o ambiental son las proteínas HSP, estas son un grupo de proteínas reguladoras, cuya síntesis varía con la temperatura, incrementándose rápidamente después de un incremento repentino o en respuesta al estrés ambiental o cambio de nutrientes. La proteína HSP de 70 KDa, se ha identificado en *C. jejuni* desde 37 °C hasta 46 °C a las 24 horas de incubación (10,73). El gen que codifica esta proteína es *dnaK*, un fragmento de 1 869 pares de bases (pb) (10).

La invasión se ha estudiado extensivamente y se ha pensado que es un paso importante en la infección por *Campylobacter*. De hecho, biopsias de humanos diagnosticados con enteritis por *C. jejuni* revelaron la presencia intracelular de células de *Campylobacter* (70).

La diarrea es la evidencia más importante en personas contaminadas con este microorganismo. El dolor asociado con la diarrea probablemente es la respuesta al crecimiento de la bacteria dentro de las células. La respuesta inflamatoria también daña células de la mucosa. En la mayoría de la gente infectada, la respuesta inflamatoria limita la propagación de la bacteria; pero en algunas personas como los niños, jóvenes, ancianos e inmunocomprometidos, esta enfermedad sistémica puede desarrollarse y llevar a un shock séptico y a la muerte (65).

El uso continuo de promotores de crecimiento en animales, podría contribuir a la resistencia de las bacterias en alimentos de origen animal y así debilita la eficacia de tratamiento antibiótico en la medicina humana. La Unión Europea suspendió consecutivamente en 1997 y 1998, el uso de avoparcin y otros cuatro antimicrobianos (virginiamicina, tilosina, spiramicin y bacitracina) promotores de crecimiento (19).

b) En Síndrome de Guillain Barré

La similitud entre el lipopolisacárido bacteriano y el gangliósido GM1 humano, tiene relevancia en la patogénesis del GBS. Conejos sensibilizados con el lipopolisacárido de *C. jejuni*, desarrollaron el anticuerpo IgG anti-GM1 y la debilidad flácida del miembro. Los conejos paralizados presentaron cambios patológicos en sus nervios periféricos idénticos a los presentes en el GBS. La inmunización de ratones con el lipopolisacárido genera una IgM que reacciona con GM1 e imita la patología de los nervios periféricos en humanos. La IgM- y la IgG- anti-GM1 de los pacientes con GBS, no inducen la parálisis pero bloquean la acción potencial de los músculos-espinales, lo que indica que los anticuerpos anti-GM1 pueden estar involucrados en la debilidad del músculo.

La imitación molecular es un mecanismo por el cual los agentes infecciosos activan una respuesta inmune contra el antígeno. Aunque se conocen varios ejemplos de imitación molecular entre componentes bacterianos y estructuras celulares del huésped, en la mayoría de los casos la relación epidemiológica entre las enfermedades autoinmunes y la infección microbiana no ha sido establecida. En el caso de *C. jejuni*, los estudios epidemiológicos que establecieron la relación entre GBS y la infección previa por *C.*

jejuni, mostraron que entre un cuarto y un tercio de los pacientes desarrollan el GBS después de ser infectados por *C. jejuni*. (38,89).

Actualmente con la tecnología de los microarreglos es posible estudiar a todos los genes de un organismo determinado, en un solo experimento. Los microarreglos son un conjunto ordenado de genes en una pequeña superficie y una nueva herramienta de la biología molecular que permite analizar la expresión de miles de genes. Esta tecnología permite el estudio de la patogénesis de bacterias, como es el caso de *Helicobacter pylori* (47), pudiendo ser utilizada para cualquier microorganismo cuyo genoma ha sido secuenciado como es el caso de *C. jejuni*, siendo una herramienta importante para el diagnóstico.

3.7. Genotipificación de *C. jejuni*

Campylobacter jejuni se suma a los microorganismos cuyo genomas ya han sido secuenciados, como es el caso de la cepa de *Campylobacter jejuni* NCTC11168 (53). Su genoma que está conformado por un único cromosoma circular de 1 641 481 pares de bases, con un contenido de G+C del 30.6%, 1629 genes que codifican proteínas y 54 genes que codifican para diferentes RNAs). Este genoma ha sido calificado por los científicos como "inusual", porque no presenta secuencias de inserción y además, tiene muy pocos elementos genéticos repetidos. Uno de los hallazgos más relevantes de esta investigación es que varias regiones del genoma son hipervariables, es decir, su secuencia cambia con facilidad. La proporción aparentemente alta de variación puede ser importante en la estrategia de supervivencia de *C. jejuni* (53).

De las 1,654 secuencias codificantes previstas, por lo menos 20 probablemente representan pseudogenes; la longitud media del gen es de 948 bp, y 94.3% del genoma codifica para proteínas.

En este mismo trabajo fueron descubiertas dos grandes regiones de más bajo contenido G+C que abarcan la secuencias codificantes: Cj1135-Cj1148 (G+C = 25.4%) y Cj1421-Cj1442 (G+C = 26.5%); éstos corresponden a los genes dentro del lipooligosacárido (LOS) y polisacárido extracelular (EPS) respectivamente.

Un rasgo sorprendente del genoma de *C. jejuni* es la falta casi completa de secuencias repetitivas de DNA, encontrando sólo cuatro regiones cortas, dentro del genoma entero. Se anotaron tres copias del operón RNArribosomal.

C. jejuni comparte bastantes rasgos filogenéticos con el género *Helicobacter*, así como algunas propiedades biológicas. Sin embargo, a pesar de estas características compartidas, la mayor parte de las funciones de los microorganismos, relacionadas con la supervivencia, la transmisión y la patogénesis, tienen poco en común. Los datos recogidos sugieren la existencia primigenia de un ancestro común, que al sufrir profundos cambios evolutivos dió origen a dos patógenos muy diferentes. Sin embargo, el 28% de los genes de *C. jejuni* son similares a los de *Escherichia coli*; el 27 % con algunos de *Bacillus subtilis*, el 4.6 % con los de *Archeoglobus fulgidus*, y el 2.1 % con los de *Saccharomyces cerevisiae* (53).

3.8. Identificación y detección

Existen 3 condiciones importantes para el aislamiento de *Campylobacter*: 1) Uso de placas con un medio selectivo y adición de antibióticos; 2) incubación de las placas en una atmósfera de oxígeno reducido con adición de CO₂ y, 3) incubación de las placas a 42°C (88).

El aislamiento de *C. jejuni* es difícil, sobre todo en muestras de alimentos y heces, debido a los altos niveles de microbiota asociada también presente.

Los métodos de aislamiento cualitativos, se realizan a través de caldos de enriquecimiento selectivos, seguido de cultivos en placa en medios de agar selectivos, en donde se pueden observar las características coloniales y celulares. El método cuantitativo comúnmente usado es la cuenta directa en placa, cuando se tienen condiciones de cultivo suficientemente selectivas. En adición también se puede utilizar la técnica del Número Más Probable (NMP) la cual da una aproximación del número de células de *Campylobacter* asociadas a una muestra, al ser comparados los resultados en una tabla estadística (14). Estos métodos son laboriosos y requieren mucho tiempo (aproximadamente 8 días). (40).

El desarrollo de técnicas de filtración, con membranas que permiten el paso de estas bacterias delgadas, pero retienen las de mayor tamaño como las de la microbiota entérica, seguidas del cultivo en medio no selectivo como el agar sangre, ha representado un avance significativo sobre el uso de medios selectivos y es actualmente el método recomendado para el aislamiento primario del género *Campylobacter* (25).

Las técnicas de serotipificación incluyen los esquemas de Penner y de Lior (40,76). El Método Penner, esta basado en un antígeno termoestable (HS) usando una técnica de hemoaglutinación pasiva; el método Lior está basado en el uso de un antígeno termolábil (HL) usando un método de aglutinación bacteriana; ambos métodos tienen como desventajas el alto número de cepas no tipificables, por el tiempo y requerimientos técnicos y los altos costos de los reactivos.

La aplicación de técnicas de Biología Molecular ha abierto grandes posibilidades para la detección de bacterias que como *C. jejuni*, que resultan difíciles de aislar, cultivar e identificar.

Las técnicas moleculares basadas en la detección más o menos específica de secuencias de ácidos nucleicos, han permitido por una parte, incrementar notoriamente la capacidad de detección, evitando generalmente los pasos de aislamiento y cultivo. Además, también se han desarrollado métodos de subtipificación molecular, basados en el análisis de DNA que poseen varias ventajas (76).

- 1) Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados al Azar (RAPD-Random Amplified Polymorphic DNA), es un método molecular basado en la amplificación de fragmentos de DNA a través de iniciadores cortos (≤ 10 pb), por medio de la

técnica de PCR. La localización y número de sitios diana para los iniciadores RAPD puede variar entre diferentes cepas; el resultado de la amplificación es analizado por electroforesis (39). Este método ha sido muy usado en la discriminación inter- e intraespecies bacterianas (30). Esta técnica se ha usado para describir polimorfismos de *C. jejuni* y *C. coli* presentes en excremento humano, agua de mar, carne de pollo y pollos rostizados. (Anexo, Tabla 2)

- 2) Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados (AFLP-Amplified Fragment Length Polymorphism). En esta técnica se combinan los principios de los RFLP y PCR, donde una submuestra de fragmentos producidos por la restricción y modificación del DNA bajo estudio, son amplificados selectivamente en cascada. Los AFLPs usan como iniciadores oligonucleótidos complementarios a las secuencias que han sido ligadas a cada extremo del DNA digerido. El polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de fragmentos. Esta técnica se ha utilizado para asociar el tipo de huésped con las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* (39). (Anexo, Tabla 3)
- 3) Tipificación de genes flagelares, el locus del gen flagelar contiene 2 genes (*flaA* y *flaB*), que están en serie y separados por 170 nucleótidos y que tienen una homología de 92%. Los dos producen un filamento flagelar activo y el tamaño de los productos de PCR es de 185 y 325pb. Para su estudio se sugiere un análisis de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y la técnica de PCR (39).
- 4) Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism). La técnica está basada en la digestión del DNA total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce cantidades equimolares de fragmentos para una molécula de DNA dada. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana es hibridada con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autoradiografía de rayos-X, de acuerdo al peso molecular de la banda. Esta técnica ha sido utilizada para la correlación de serotipos de *C. jejuni* previamente identificados (aproximadamente 48) (47). (Anexo, Tabla 4)
- 5) Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Se realiza una digestión de DNA cromosomal por medio de enzimas de restricción; el bloque que contiene el DNA purificado y digerido es cargado directamente en geles de agarosa y expuesto a impulsos eléctricos intermitentes, con distintas direcciones. Esta forma de electroforesis permite una separación más eficiente de fragmentos de DNA de muy alto peso molecular, que pueden variar desde 10 hasta 800 Kb. Esta prueba molecular ha ayudado a clarificar la epidemiología de *C. jejuni* con respecto a otras infecciones bacterianas. La PFGE es útil para la identificación de *C. jejuni* proporcionando los resultados en 24 horas (16,56). Laboratorios de referencia canadienses y americanos que participan en los Centros de Prevención de Enfermedades

(CDC) han identificado un gran número de campylobacters, en los casos de enteritis a través de esta prueba (44).

Tanto PFGE como RFLP presentan como principal desventaja la necesidad de cultivar los aislados para obtener cantidades suficientes de DNA genómico que pueda ser restringido.

- 6) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR – Polymerase Chain Reaction). *C. jejuni* ya ha sido detectado a través de esta técnica utilizando DNA extraído de muestras de heces (35,43,86). Inclusive se han realizado pruebas para determinar el tiempo de detección, el cual ha sido satisfactorio (3 horas) por lo que resulta una técnica practica y rápida comparada con los métodos microbiológicos convencionales (35,43). Es posible la detección de esta bacteria en un límite inferior de entre 2 y 25 CFU (62). Esta técnica resulta de utilidad para la identificación de especies de *Campylobacter* a través de PCR múltiple, que consiste en la utilización de varios pares de iniciadores en el mismo tubo de reacción, los cuales previamente probados, anillan a la misma temperatura, fragmentos diana distintos pero específicos (62).

Hay que considerar que en la mayoría de las técnicas mencionadas, hay procedimientos comunes como; extracción de DNA, enzimas de restricción usadas, tipo de termociclador, etc. que pueden considerarse fuentes de variabilidad de las técnicas (76).

El desarrollo de métodos para la identificación de microorganismos patógenos causantes de deterioro en alimentos y enfermedades en humanos, se ha enfocado principalmente a la técnica de PCR, debido a que esta técnica proporciona una serie de ventajas por su especificidad, sensibilidad y rapidez. En el control sanitario de alimentos ha sido de gran utilidad en la identificación y diferenciación de patógenos como *C. jejuni* (7,24,36).

Se han desarrollado un gran número de iniciadores, (Anexo,Tabla 6) con los cuales se puede detectar e identificar este género bacteriano y algunos de sus genes relacionados con patogenicidad y mecanismos de defensa.

A pesar de que la técnica de PCR proporciona las ventajas ya mencionadas existen dos desventajas; es sensible a inhibidores presentes en alimentos y otras muestra (heces), y no distingue entre el DNA obtenido de células viables no cultivables, de células viables y de células muertas. Esta última desventaja se resuelve a través de la prueba de flotación que permite la separación entre estas células (86). (Anexo, Tabla 5.)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aislamiento de *C. jejuni* es laborioso debido a varios factores; su crecimiento lento, a las condiciones especiales de cultivo, que requieren de una atmósfera microaerobia, el uso de un medio de cultivo especial enriquecido, suplementado con antibióticos por la presencia de microorganismos fecales competidores y antagónicos (lactobacilos, enterococos y coliformes) (3). Además, para su identificación son necesarias un gran número de pruebas bioquímicas y morfológicas, por lo que se requiere un promedio de 8 días para su aislamiento e identificación.

La campylobacteriosis ocurre en todo el mundo y su incidencia parece estar en aumento, conforme se perfeccionan y actualizan las técnicas de cultivo e identificación apropiadas para el agente causal. Es importante determinar el origen de la infección y aislar al agente causal para tomar las medidas de prevención y control correctas.

El pollo es el principal transmisor de *C. jejuni*, y esta bacteria a su vez, tiene diferentes características que la hacen ser un agente patógeno potencial:

1. El microorganismo permanece viable en piel de pollo crudo a temperaturas de -20°C y -70°C por 14 y 56 días respectivamente (14).
2. También puede sobrevivir en leche y agua, la cual puede contaminarse con heces y orina. Se ha observado que *C. jejuni* puede sobrevivir a una temperatura de 4°C , hasta 3 semanas en heces y cinco semanas en orina (69).
3. No crece por debajo de 28°C , por lo que su viabilidad se reduce en el almacenamiento en refrigeración y congelación, pero sigue siendo infeccioso. *C. jejuni* es capaz de permanecer a 4°C en un estado viable pero no cultivable (VBNC) durante 4 meses como una estrategia de supervivencia en respuesta al estrés ambiental (44).

A pesar de su importancia como patógeno humano y a la reciente secuenciación de su genoma, el conocimiento respecto a sus mecanismos de patogenicidad aún está en desarrollo. Sin embargo, por su analogía con otros enteropatógenos se reconocen 4 propiedades virulentas: motilidad, adherencia, invasión y producción de toxina.

5. JUSTIFICACIÓN

Aunado a esto, se debe reconocer la importancia de algunos alimentos, principalmente cárnicos (especialmente de pollo), como vehículos de propagación de *C. jejuni*. Considerando que el uso extensivo de bajas temperaturas, es práctica común en la conservación y manejo de cárnicos, y a que este microorganismo tiene la capacidad de permanecer viable y no cultivable a bajas temperaturas, manteniendo su capacidad infecciosa. Para que la enfermedad aparezca en el humano, se requiere de una dosis infectiva baja, se ha demostrado experimentalmente, que entre 500-800 células microbianas son suficientes para instaurar la enfermedad; y que por debajo de 100 células la enfermedad no se desarrolla (60), por lo que es importante que los métodos de detección del microorganismo en los alimentos sean bastante sensibles como para

detectar un bajo número de *C. jejuni*, en presencia de un gran número de otras bacterias contaminantes.

Dada la frecuencia con la que la carne de pollo se encuentra contaminada con bacterias patógenas, su manejo y consumo es riesgoso, especialmente cuando no ha recibido un tiempo de cocción adecuado. Se ha demostrado que del 30 al 100% de los pollos lleva *C. jejuni* como habitante comensal en el tracto intestinal y excretan cerca de 10^4 a 10^8 células de esta bacteria por gramo de heces (3,83). También se ha detectado en más del 30% de pollo crudo de venta al menudeo niveles de 10^2 a 10^4 unidades formadoras de colonia (CFU) en procesadoras de pollo (3).

Existen varias vías de transmisión de *C. jejuni* hacia el pollo, entre las cuales se pueden citar: a) la exposición a agua contaminada, b) previa contaminación durante la crianza a través de vectores potenciales como roedores, insectos, animales domésticos, alimento, personal de la granja, transporte y heces de pájaros, c) durante la matanza existe un incremento en el número de *Campylobacter* en carne, el cual puede estar asociado con el desplume durante el escaldado, ya que el número de microorganismos aumenta en el agua después de esta actividad (5).

Esta investigación intenta dar alternativas de identificación rápida y eficiente del patógeno en alimentos contaminados, a través de técnicas moleculares como PCR, comparando los datos obtenidos por esta técnica, con los resultados por técnicas microbiológicas y bioquímicas tradicionales.

6. OBJETIVO GENERAL

Detectar e identificar a *Campylobacter* spp. por técnicas moleculares (PCR), microbiológicas (aislamiento y cultivo, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas) y de análisis de ácidos grasos de las membranas celulares.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Montar las técnicas, microbiológica, molecular y análisis de ácidos grasos para la detección de la bacteria
- Determinar la presencia o ausencia de *C. jejuni* de muestras de heces y carne en pollo crudo utilizando la técnica de PCR y los métodos microbiológicos convencionales.
- Comparar resultados de sensibilidad y tiempo entre la técnica de PCR y los métodos microbiológicos convencionales.
- Realizar la identificación de ácidos grasos de la membrana celular por cromatografía de gases con detector de ionización de flama, como un criterio adicional de caracterización de aislados.

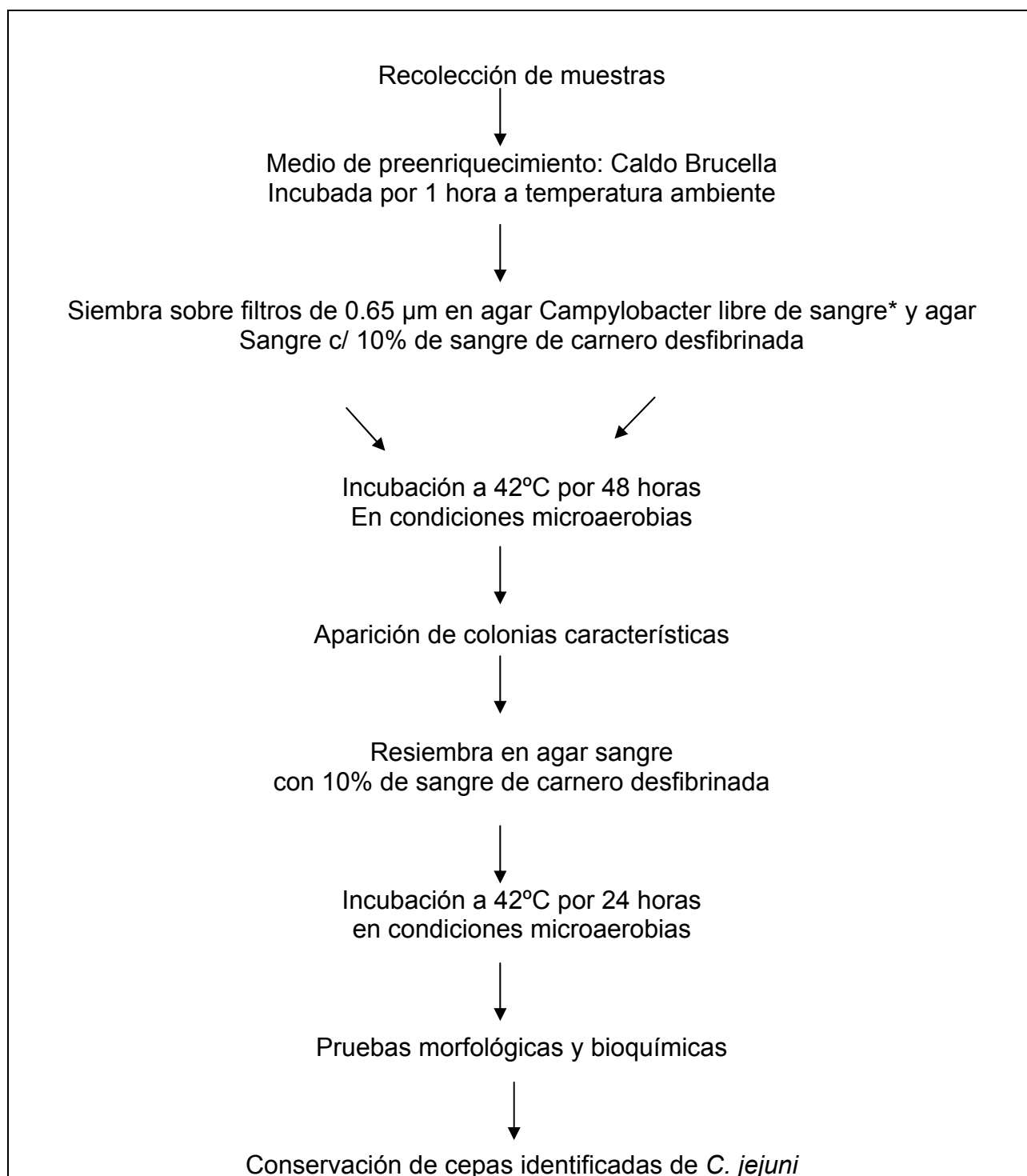
7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el cumplimiento de cada uno de los objetivos planteados, se realizaron una serie de actividades en el laboratorio, que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Metodología para la detección e identificación de *Campylobacter jejuni* en carne y heces de pollo, utilizando técnicas moleculares, análisis de ácidos grasos, pruebas morfológicas y bioquímicas

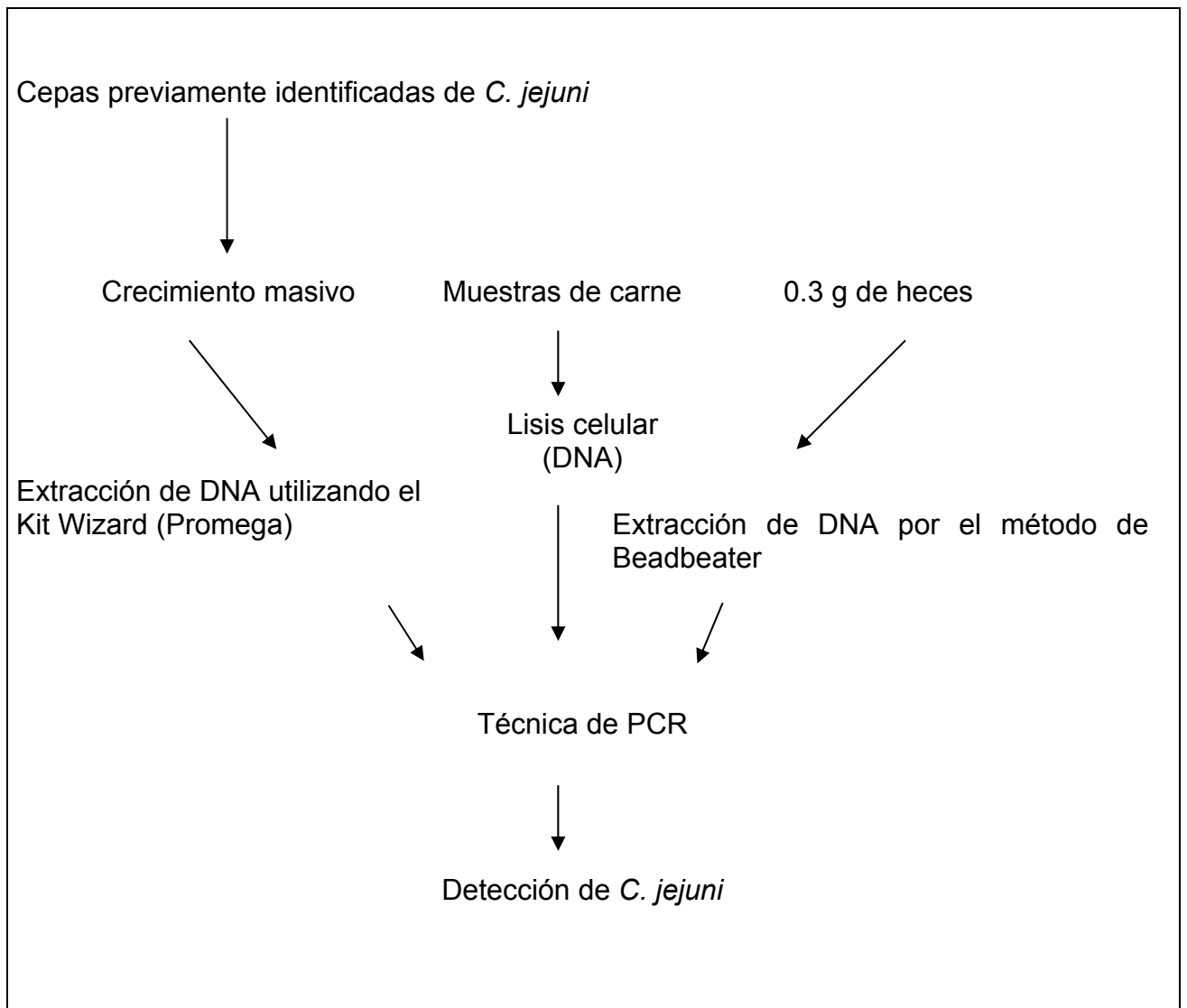
Técnica microbiológica	Técnica molecular PCR	Análisis de ácidos grasos
Actividades	Actividades	Actividades
Montar el procedimiento para el aislamiento de <i>Campylobacter jejuni</i>	Montar el procedimiento para la detección de <i>C. jejuni</i> , utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.	Montar el procedimiento para la identificación de ácidos grasos específicos de membrana celular de la colección de cepas de <i>Campylobacter</i>
Obtención cepas de referencia	Obtención de biomasa de las cepas identificadas para la extracción de DNA	Obtención de biomasa del microorganismo crecido en condiciones microaerobias.
Obtención muestras de intestino de pollo y muestras de carne de pollo	Realizar lisis celular para obtener directamente de las muestras de carne DNA	Estandarizar la extracción de ácidos grasos totales, utilizando la técnica de esterificación.
Aislamiento de la bacteria a partir de muestras de heces	Seleccionar los iniciadores para la técnica de PCR	Realizar el análisis de los ácidos grasos por cromatografía de gases.
Aislamiento de la bacteria directamente de muestras de carne de pollo para determinar la presencia ó ausencia de <i>C. jejuni</i>	Acondicionamiento de la PCR en cuanto a tiempo, temperatura, número de ciclos y concentración de magnesio.	Obtención de cromatogramas y comparación de los resultados con un patrón de ácidos grasos.
Identificación morfológica y bioquímica de las cepas bacterianas aisladas (Anexo, Tabla 8)	Comparar los niveles de sensibilidad de la técnica de PCR y los métodos microbiológicos convencionales	Identificar y cuantificar ácidos grasos característicos para el género <i>Campylobacter</i> , particularmente <i>C. jejuni</i>
Preservar cepas de referencia y las obtenidas de muestras de heces y carne	Determinar el tiempo máximo de identificación bacteriana entre la técnica de PCR y los métodos microbiológicos convencionales. Comparar sensibilidad de ambos procedimientos.	

7.1. Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación de *Campylobacter jejuni* utilizando pruebas microbiológicas

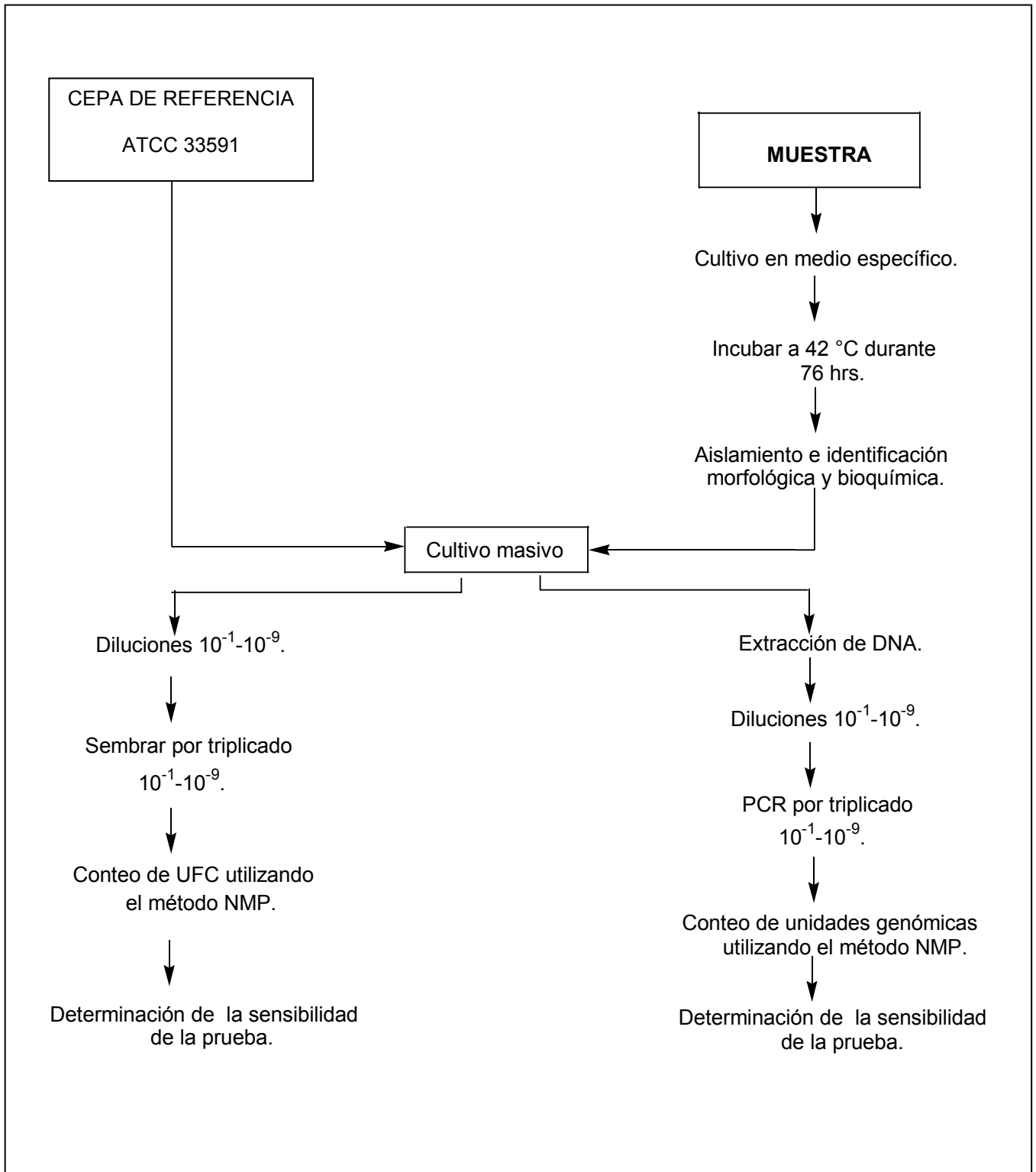


*Campylobacter Blood Free Selective Medium (Modified CCDA_Preston), Oxoid, Agar base CM0739

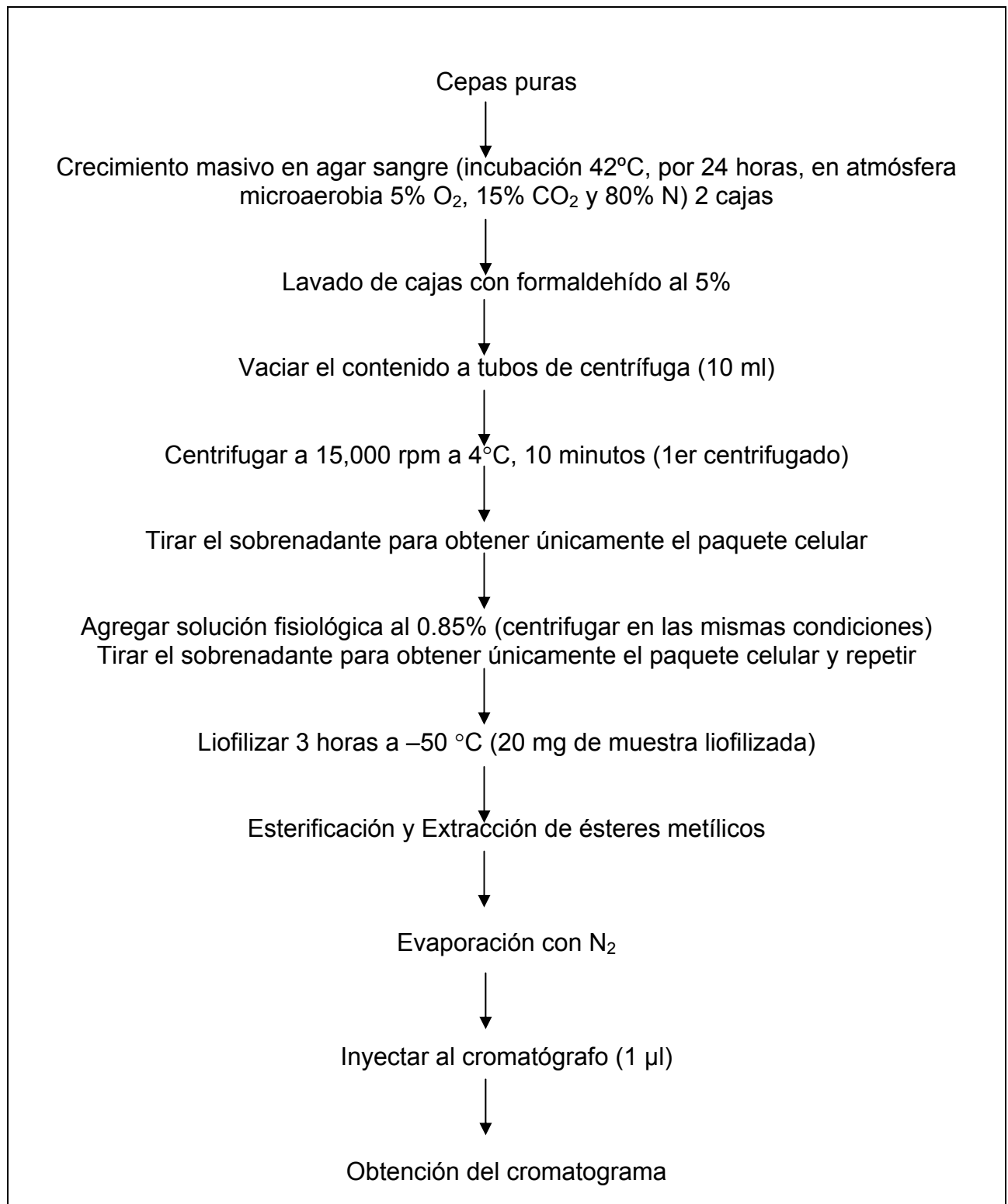
7.2. Diagrama de flujo para la detección de *Campylobacter jejuni* utilizando la técnica de PCR



7.3. Diagrama de flujo para determinar la sensibilidad de pruebas microbiológicas y PCR



7.4. Diagrama de flujo para la identificación de ácidos grasos



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Obtención y mantenimiento de cepas de referencia

Se obtuvieron 4 cepas de referencia de *Campylobacter jejuni*:

1. Cepa INN287ip aislada de pacientes diarréicos del Instituto Nacional de la Nutrición “Dr. Salvador Zubirán”.
2. Cepa NCTC 11168, esta es una cepa secuenciada
3. Cepa ATCC 33591
4. Cepa ATCC 5791

Las dos primeras cepas fueron donadas por el Dr. Guillermo Ruiz Palacio del Instituto Nacional de la Nutrición, Departamento de Infectología. Las dos últimas fueron donadas por la Dra. Yolanda López Vidal de la facultad de medicina de la UNAM.

Para preservar las dos primeras cepas de referencia, fueron sembradas en medios específicos para su crecimiento, agar campylobacter libre de sangre y agar BHI (11), para posteriormente conservarlas en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) con glicerol al 15% en viales de 2 ml a -70°C (20). Las dos últimas cepas fueron crecidas en agar sangre con 10% de sangre de carnero y conservadas de la misma manera.

8.2. Cultivo

8.2.1. Cepas de referencia

El crecimiento masivo de las cepas INN287ip y NCTC11168, para su posterior utilización en las diferentes pruebas, se realizó de la siguiente manera:

1. Siembra en placas con agar campylobacter libre de sangre (88).
2. Siembra en BHI
3. Siembra en BHI enriquecido con 0.6% de extracto de levadura (77).
4. Siembra en caldo BHI enriquecido con extracto de levadura en tubos Hungate gasificados con una mezcla de gases (5% O₂, 15% CO₂ y 80% N₂). Los tubos con caldo fueron incubados por de 72 horas en agitación, a 42°C
5. Caldo BHI con extracto de levadura más vitaminas
6. Caldo Nutritivo
7. Caldo Nutritivo más vitaminas

Todas fueron incubadas por 48 horas en condiciones microaerobias a 42°C y condiciones anaerobias y aerobias a 37°C (24).

Las cepas ATCC se sembraron en agar sangre con 10% de sangre de carnero desfibrinada e incubadas a 42°C por 24 horas, bajo condiciones microaerobias, utilizando generadores CampyPak Plus (BBL, 271045) dentro de jarras de anaerobiosis (Oxoid).

8.2.2. Cepas aisladas

Para la realización de las técnicas de PCR y extracción de lípidos de la pared celular fue necesario el crecimiento masivo de las cepas aisladas y de referencia.

Todas las cepas fueron sembradas en agar sangre con 10% sangre de carnero defibrinada, y cultivadas a 42°C por 24 a 72 horas.

La biomasa para la extracción de DNA fue obtenida con el uso de sobres de microaerobiosis en jarras de anaerobiosis, mientras que la biomasa para la extracción de lípidos se obtuvo en una incubadora anaerobia, utilizando mezcla de gases (5% O₂, 15% CO₂ y 80% N₂).

8.3. Toma de muestras

Se obtuvieron 26 intestinos de pollo los cuales fueron colocados en bolsas estériles, mantenidos en hielo a 4°C y transportados de inmediato al laboratorio de Ecología Molecular en la Planta Piloto de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, para su procesamiento. Ya en el laboratorio, se obtuvieron 0.3 g de heces de cada uno de los intestinos para la realización de las pruebas de aislamiento y 0.3 g. para la extracción de DNA. También fueron obtenidas 20 piezas de pollo, las cuales fueron colocadas en bolsas estériles, mantenidas en hielo a 4°C y transportadas al laboratorio para su procesamiento inmediato.

0.3 g de heces fueron colocados en 3 ml de caldo Brucella y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante una hora, para proceder a la inoculación en los medios, lo cual se llevo a cabo en el laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco.

La toma de muestras a partir de carne, se realizó frotando un hisopo estéril en la superficie de las mismas, una vez realizado lo anterior el hisopo se colocó en tubos estériles que contenían 3 ml de caldo Brucella e incubados a temperatura ambiente por una hora. De este incubado se realizaron las pruebas microbiológicas y la técnica de PCR, obteniendo al DNA a través de lisis celular como se muestra más adelante (8.5.1.3).

8.4. Aislamiento e identificación de *C. jejuni*, por métodos microbiológicos tradicionales

8.4.1. Aislamiento

La metodología utilizada para el aislamiento de *C. jejuni* se basó en la técnica de filtración (25). Se utilizaron placas con Campylobacter Blood Free selective medium (Oxoid-CM0739) enriquecido con suplemento de polienriquecimiento liofilizado (Bioxon-211655) y filtros de 0.65 µm tipo DA estériles (Millipore), como método alternativo para reemplazar la utilización de antibióticos específicos. Los filtros fueron colocados con pinzas estériles sobre el medio de cultivo para la posterior inoculación de las muestras.

De cada suspensión hecha con caldo Brucella, se tomaron tres gotas de +/- 25 µl cada una, que fueron colocadas sobre el filtro las cuales se dejaron secar por 30 minutos aproximadamente; una vez seco el filtro, este fue retirado del medio y se incubaron las cajas a 42°C por 48 horas en condiciones microaerobias utilizando generadores de microaerobiosis (72) CampyPak Plus (BBL, 271045) o Campygen (Oxoid), dentro de jarras de anaerobiosis (Figura 1).



Figura 1

Las muestras obtenidas de carne fueron sembradas en cajas con Agar Campylobacter con 10 % de sangre de carnero y 5 antibióticos (BD-BBL), la fórmula se muestra en el anexo, la incubación fue realizada como ya se mencionó en el párrafo anterior.

Para la resiembra de colonias sospechosas, se utilizó agar sangre con 10% de sangre de carnero desfibrinada, la incubación se realizó por 24 horas en las condiciones mencionadas y posteriormente se procedió a la confirmación bioquímica de las cepas aisladas.

8.4.2. Identificación

Las pruebas de identificación (72) fueron realizadas a las 24 horas de incubación.

8.4.2.1. Pruebas morfológicas

- a) Observación macroscópica de las colonias obtenidas, considerando forma, color y aspecto.
- b) Observación microscópica de la morfología celular utilizando un frotis en fresco y microscopía de contraste de fases, en un microscopio Olympus Bimax 60 a 100x.

Observación en fresco.

C. jejuni tienen movilidad por medio de sus flagelos.

En un portaobjetos se colocó una gota de agua destilada y una asada pequeña de una colonia, se coloca un cubreobjetos y se observa en microscopio de contraste de fases a 100X.

Tinciones

a) Tinción de Gram

La tinción de Gram es la más importante de las tinciones diferenciales. Las células Gram positivas retienen el cristal violeta cuando se tratan con etanol, mientras que las Gram negativas no lo tienen y se tiñen entonces del color rojo de la safranina. Diferencias en la estructura de la pared son las responsables de este comportamiento.

Con los crecimientos bacterianos de 24 horas, se realizó un frotis:

- En un portaobjeto se colocó una gota de agua destilada filtrada con una membrana Millipore HA de 0.25 µm de diámetro de poro y con un asa se tomó una pequeña cantidad de cultivo, se hizo una suspensión ligera y se dejó secar al aire. Se fijó ligeramente a la flama y se realizó la tinción de Gram:
 1. Teñir con cristal violeta durante un minuto.
 2. Escurrir el excedente y agregar yodo-lugol durante un minuto.
 3. Enjuagar ligeramente y decolorar con alcohol-cetona, hasta que deje de salir la coloración azul, lavar ligeramente y contrastar con safranina o carbofucsina básica al 0.8%
 4. Enjuagar y secar al aire.
 5. Observar al microscopio (100X).

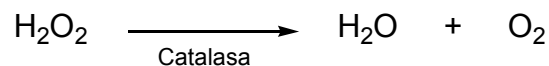
8.4.2.2. Pruebas bioquímica

a) Catalasa

El objetivo de esta prueba es determinar la producción de la enzima catalasa.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono. Si se deja acumular el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas.

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua:



En una laminilla se colocó una gota de agua oxigenada al 3%, se tomó con el asa una porción de una colonia y se colocó en la gota. La lectura se realizó de inmediato. La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva producto de liberación de oxígeno a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno.

Nota: es importante no tocar el medio con sangre, ya que pueden producirse falsos positivos.

b) Oxidasa

El objetivo de esta prueba, es determinar la producción de la enzima citocromo oxidasa. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa (indofenol oxidasa) que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones. En presencia de oxígeno molecular un gran número de electrones pueden ser transferidos por el sistema citocromo oxidasa a una cantidad de compuestos orgánicos entre ellos a la p-amino dimetil amina.

El reactivo para la prueba se preparó con 10 mg de diclorhidrato de tetrametil p-fenil-diamina dimetil y un ml de agua destilada. La mezcla se almacenó en un frasco ámbar.

Se impregnó un trozo de papel filtro con 2 gotas de solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil p-fenil-diamina dimetil y de inmediato se frotó una colonia sobre el papel filtro con un asa.

Si las células no contienen citocromo "C" oxidasa, el reactivo permanece incoloro. La aparición de un color violeta en 10 segundos, indica reacción positiva por la presencia de citocromo "C" oxidasa.

c) Determinación de la producción de ácido sulfhídrico (H_2S)

Sirve para determinar la capacidad de la bacteria para utilizar azúcares, producir H_2S y producción de gas por fermentación. Algunas especies bacterianas son capaces de liberar azufre enzimáticamente, produciendo ácido sulfhídrico. La enzima responsable de esta actividad, es la cisteinasa. Este medio determina la habilidad de un microorganismo de utilizar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal de crecimiento.

Se utilizó el medio Triple Azúcar Hierro (TSI), el cual fue preparado en tubos. A partir de una colonia aislada del microorganismo se inoculó por picadura en el fondo del tubo y estría continua en la superficie y se dejó incubando 24 horas a $37^\circ C$.

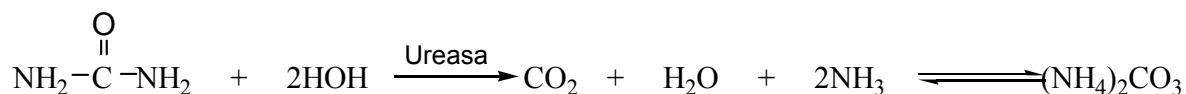
La prueba negativa se manifiesta por la no-fermentación de la glucosa ni la lactosa, y la no-producción de gases, es decir, el medio no muestra cambio de color, tampoco hay aparición de precipitado negro a lo largo de la picadura. La observación del medio de color negro se considera positivo debido a las sales de hierro presentes en el medio.

d) Ureasa

El objetivo es determinar la habilidad de las bacterias para producir la enzima ureasa que desdobla la urea a amoníaco.

La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que hidrolizan la urea. La urea es una diamida de ácido carbónico, todas las amidas son fácilmente hidrolizadas con la liberación de amoníaco y dióxido de carbono.

El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio lo que da como resultado la alcalinización y aumento del pH del medio.



Para esta prueba se utilizaron 2 soluciones:

1. Reactivo A: urea (2g), etanol al 95% (2 ml) y agua destilada (4ml); no necesita esterilizarse y se almacena en refrigeración (4°C).
2. Reactivo B: KH₂PO₄ (0.1g), K₂HPO (0.1g), NaCl (0.5g), rojo fenol al 0.2% (1ml) y se aforó a 100 ml con agua destilada, la solución se esterilizó a 115°C por 20 minutos. Las soluciones se mezclaron A:B – 1:19 (0.1 ml del reactivo A y 19 ml del reactivo B)

En 0.1 ml de la mezcla se colocó una asada de una colonia aislada de la cepa a identificar y se incubó a 37°C por 1 hora.

Si la bacteria no hidroliza urea no se origina un aumento de pH y el medio permanece amarillo lo que indica una reacción negativa.

La hidrólisis de urea origina pH alcalino y el indicador vira a rojo lo que indica una reacción positiva.

e) Reducción de nitrato a nitrito

Tiene como objetivo determinar la capacidad de los microorganismos para reducir nitratos a nitritos o un desdoblamiento mayor de este último.

Se utilizaron dos reactivos.

1. Reactivo A: ácido sulfhanílico (8g), se aforó a 1000 ml con una solución de ácido acético glacial 5N (300 ml de ácido con 700 ml de agua destilada), se mezclaron y almacenaron a 4°C.
2. Reactivo B: α-naphthylamine (5g) y se aforó a 1000 ml con ácido acético glacial 5N y se almacenó a temperatura ambiente.

Se inoculó el medio para reducción de nitratos y se incubó a 42°C durante 5 días bajo condiciones microaerobias. Posteriormente se adicionó 0.1 ml del reactivo A y 0.1 ml del reactivo B y se observó el desarrollo de color de la reacción en el transcurso de un minuto.

La aparición de una coloración roja después de la adición del reactivo A y B indica una reacción positiva que revela la presencia de N-nitrato.

Si no hay presencia de color adicionar 25 mg de zinc en polvo y observar el desarrollo de color en el transcurso de tres minutos.

f) Tolerancia a 3.5% de cloruro de sodio

Para esta prueba se utilizó agar sangre adicionado con 3.5% de NaCl. Se sembró una colonia sospechosas y se incubó por 48 horas a 42°C en condiciones microaerobias.

En las pruebas negativas la bacteria no tolera la concentración de NaCl y no se observa crecimiento en el medio de cultivo.

g) Tolerancia en 2,3,5 cloruro trifeniltetrazolium (TTC)

Se utilizó agar sangre y se adicionaron 0.4 g de TTC por litro de agar. Se sembró una asada y se incubó por 48 horas a 42°C en condiciones microaerobias.

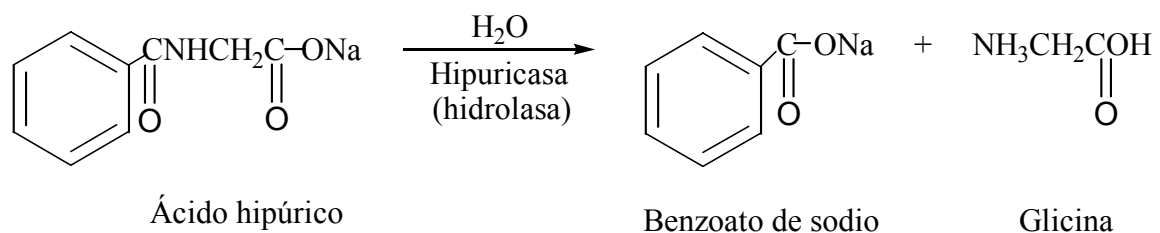
En las pruebas positivas la bacteria tolera la concentración de TTC y se observa desarrollo bacteriano de color metalizado amarillento por reducción de la sal de formazán.

Una vez identificadas las cepas fueron conservadas en caldo BHI con 25% de glicerol a una temperatura de -70°C y en medio semigelosado utilizando caldo Brucella y conservadas en refrigeración a 4°C, para su posterior crecimiento, la realización de las siguientes pruebas y corroborar la identificación de cada cepa.

1. Hidrólisis del hipurato

Esta prueba tiene como objetivo demostrar la capacidad de la bacteria para hidrolizar el hipurato y es útil para confirmar la identificación de *C jejuni* (66).

La hipuricasa, provoca la hidrólisis del hipurato de sodio, con la formación de benzoato de sodio y glicina:



Para la realización de esta prueba fue necesario obtener un crecimiento masivo de 24 horas de cada una de las cepas a identificar, las cuales fueron sembradas en gelosa sangre e incubadas a 42°C bajo condiciones microaerobias.

La biomasa recuperada se mezcló por agitación en 1 ml de ácido hipúrico al 0.5%, hasta obtener una solución lechosa. Esta mezcla se dejó incubando por 2 horas a 37°C en condiciones microaerobias.

Pasado este tiempo, se le agregó 1 ml de solución reveladora de ninhidrina y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

La solución reveladora se preparó con 3.5 g de ninhidrina y 100 ml de una solución 1:1 de acetona-butanol. Se mezcló y almacenó en un frasco ámbar.

La aparición de una coloración violeta indica una reacción positiva que revela la presencia de glicina, producto final de la hidrólisis del hipurato.

8.5. Detección de *C. jejuni* utilizando la técnica de PCR

8.5.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó de 3 maneras:

1. Método Beadbeater (extracción de DNA metagenómico)
2. Extracción de DNA de cepas caracterizadas microbiológicamente, utilizando el Kit Wizard (Promega)
3. Lisis celular de muestras obtenidas directamente de carne de pollo.

Estos métodos de extracción fueron utilizados porque fueron los que más se adaptaron al tipo de muestras

8.5.1.1. Método Beadbeater

Para la extracción del DNA metagenómico por este método, se pesaron 0.3 g de heces obtenidos directamente de las 26 muestras de intestino de pollo, y se colocaron en tubos y se procedió a la extracción de acuerdo al siguiente procedimiento (59):



Figura 2

Extracción de DNA por el método Beadbeater

1. Pesar 0.3 g de heces en un tubo para Beadbeater.
2. Adicionar 500 μ l de buffer TE.
3. Mezclar en vortex.
4. Adicionar 300 mg de perlas de zirconio-sílica de 0.1 mm \varnothing y 200 mg de 0.5 mm. \varnothing
5. Adicionar 500 μ l de fenol.
6. Agitar en el beadbeater (Figura 2) a 5000 rpm durante 30 segundos y enfriar en hielo. Repetir este paso tres veces.
7. Centrifugar a 14,000 rpm durante tres minutos.
8. Recuperar la fase acuosa en un tubo eppendorf y adicionarle 600 μ l de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1). Este paso se realiza las veces que sea necesario, hasta que deje de aparecer una especie de nata en la interfase.
9. Centrifugar a 14,000 rpm durante tres minutos.
10. Recuperar la fase acuosa y agregar 600 μ l de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1).
11. Mezclar en vortex.
12. Centrifugar a 14,000 rpm durante tres minutos y recuperar la fase acuosa
13. Agregar a la fase acuosa 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.3 y dos volúmenes de etanol al 96%. Dejar reposar toda la noche a -20°C o una hora a -70°C .
14. Centrifugar a 14,000 rpm durante cinco minutos y decantar el sobrenadante.
15. Lavar con etanol al 70% y mezclar.
16. Centrifugar a 14,000 rpm durante cinco minutos.
17. Decantar el etanol y secar con corriente de aire durante quince minutos.
18. Resuspender con 50 μ l de TE y dejar a 4°C durante toda la noche.

8.5.1.2. Extracción del DNA a partir de cepas caracterizadas

Se realizó la extracción de DNA de las cepas identificadas bioquímicamente. Cada cepa se resembró en agar sangre con 10% de sangre de carnero desfibrinada durante 24 horas (3), bajo condiciones microaerobias, utilizando generadores CamyPak Plus (BBL-271045) o generadores de microarebiosis Oxoid, para la obtención de suficiente biomasa. Una vez obtenida la biomasa, las cajas se lavaron con agua destilada estéril y posteriormente se hizo la extracción de DNA utilizando un kit Wizard (Promega) como lo indica el fabricante:

Extracción de DNA de cepas. (Wizard Kit, Promega)

1. Realizar la recuperación de las colonias del medio de cultivo a través del lavado de las cajas con solución salina, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm y se desecho el sobrenadante.
2. Adicionar 600µl de solución de lisis Nuclei. Pipetear suavemente hasta que las células queden resuspendidas homogéneamente.
3. Incubar a 80°C durante cinco minutos y enfriar a temperatura ambiente.
4. Adicionar 3 µl de una solución de RNasa y mezclar por inversión.
5. Incubar a 37°C durante 15-60 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.
6. Adicionar 200µl de una solución de precipitación de proteínas y mezclar.
7. Incubar en hielo durante cinco minutos.
8. Centrifugar a 13,000-16,000 rpm durante 3 minutos.
9. Transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo de microcentrífuga y adicionar 600 µl de isopropanol.
10. Mezclar por inversión y dejar 1 h a -70°C.
11. Centrifugar a 13,000-16,000 rpm durante 3 minutos.
12. Tirar el sobrenadante, adicionar 600 µl de etanol al 70% y mezclar por inversión.
13. Centrifugar a 13,000-16,000 revoluciones durante 2 minutos. Aspirar el etanol.
14. Secar el pellet al aire durante 10-15 minutos.
15. Adicionar 50 µl de una solución rehidratante de DNA e incubar a 65°C durante una hora o incubar toda la noche a 4°C.

Una vez obtenido el DNA se corroboró su integridad y tamaño mediante electroforesis en agarosa (0.8%), utilizando como marcador de peso molecular DNA del bacteriófago lamda/BstEII.

8.5.1.3. Lisis celular

La lisis celular se realizó en las muestras obtenidas de carne. Después de la incubación en caldo Brucella, todo el contenido del tubo se centrifugó a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante. Al precipitado se le agregaron 45 µl de agua destilada y 5 µl de SDS al 0.5%. Esta mezcla se sometió a temperatura alta y baja consecutivamente, utilizando un termociclador como se muestra a continuación:

1. Calentar a 97°C x 5 minutos
2. Enfriar a 4°C x 3 minutos

3. Calentar a 97°C x 5 minutos
4. Enfriar a 4°C x 3 minutos

8.5.2. Iniciadores utilizados para la amplificación

Se utilizaron tres pares de iniciadores cuyas características se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para las pruebas de PCR

Iniciadores	Especificidad	Secuencia	Producto (pb)	Tm teórica	Referencia
B04263 BO4264	<i>Campylobacter</i> especies <i>jejuni</i> , <i>coli</i> y <i>upsaliensis</i>	5' AGAACACGCGGACCTATATA 3' 5' CGATGCATCCAGGAATGTAT 3'	256	55.3°C	90
HIP400F HIP1134R	<i>Campylobacter jejuni</i>	5' GAAGAGGGTTTGGGTGGTG 3' 5'AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG 3'	735	58.8°C 57.1°C	90
C-1	<i>Campylobacter jejuni</i> (gen desconocido)	5' CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT 3' 5' GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT 3'	160	58°C	12

6.5.3. PCR

El protocolo para la amplificación de DNA se realizó en el laboratorio de Ecología Molecular; para lo cual se necesitaron los reactivos que se muestran en la Tabla 3. En ella se muestran las cantidades y concentración total utilizada por reacción de 25 µl.

Tabla 3. Reactivos utilizados para realizar la técnica de PCR

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	µl POR MUESTRA
Agua mQ	-	15.3
Amortiguador	10X	2.5
MgCl ₂	25 mM	2.5
dNTP's	10mM c/u	0.5
Iniciador forward	10 pmol/µl	1.5
Iniciador reverse	10 pmol/µl	1.5
Taq polimerasa	1U	0.2
DNA	1/100	1
Volumen total		25

Todos los reactivos anteriores se mezclaron en un tubo Eppendorf en el orden en que se señalan, exceptuando la enzima, la cual se pone hasta el final y el DNA que es

colocado en cada tubo para PCR. Se divide el stock entre los tubos que contienen el DNA, se agitan, se colocan en el termociclador y se inicia el programa.

Los tubos con los componentes para la reacción se sometieron a los siguientes ciclos de amplificación, en un termociclador T-gradient (Biometra) para determinar experimentalmente la temperatura óptima de anillamiento, para cada par de iniciadores previamente determinada por Cloak, et al (2002).

1. 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos
2. 30 ciclos que comprenden:
 - a. Desnaturalización a 94°C durante 45 segundos
 - b. Anillamiento o apareamiento desde 52°C hasta 58°C durante 45 segundos y
 - c. Extensión a 72°C por 45 segundos
3. La extensión final a 72°C, durante 5 minutos

El termociclador de gradiente tiene muchas ventajas, ya que pueden probarse diferentes temperaturas para la determinación de la T_m en una sola corrida ahorrando tiempo. Una vez determinada la temperatura de anillamiento del DNA utilizando los pares de iniciadores, el T-gradient permite programar temperaturas variadas (según la T_m de los iniciadores) y de esta manera utilizar una sola corrida con diferentes iniciadores y diferentes muestras. Para cada ensayo se incluyó un control negativo que no contenía DNA. Las temperaturas alcanzadas en cada columna de pocillos del bloque del termociclador, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Temperatura utilizadas en el Termociclador T-gradient para determinar la temperatura de anillamiento de los iniciadores.

Carril	Tem.	Carril	Tem.	Carril	Tem.	Carril	Tem.
1	52	4	53.2	7	55.3	10	57.4
2	52.1	5	53.9	8	56.1	11	57.8
3	52.6	6	54.6	9	56.8	12	58

La visualización de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforésis en geles de agarosa al 1.5% y 2% en buffer TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) (59) (8.5.3.1), teñidos con bromuro de etidio y un marcador de peso molecular (DNA de pBR322/*Msp* I), el cual mostraba 11 fragmentos (tamaños superior e inferior) en geles de agarosa al 3%. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se documentaron en un sistema Edas 290 (Kodak Corp.).

8.5.3.1. Geles de agarosa al 1.5%.

1. Pesar 0.60 g de agarosa.
2. Adicionar 40 ml de TAE 1X y calentar hasta disolver.
3. Enfriar hasta $\pm 45^\circ\text{C}$, adicionar 1 μl de bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y homogenizar.

4. Vertir en una charola con molde para minigel de electroforésis, aplicar el peine y dejar solidificar.
5. Correr en una cámara de electroforésis para minigeles, a 100 V por 20 min.
6. Visualizar en transiluminador con luz UV.

Para el par de iniciadores HIP400F y HIP1134R, se probaron temperaturas de hasta 62°C, debido a que no se lograban obtener los fragmentos amplificados.

Una vez amplificados los fragmentos de DNA utilizando los pares de iniciadores B04263 y B04264 y C-1 utilizando una cepa de referencia, se procedió a probarlos con las muestras de DNA de heces de pollo extraída por el método Beadbeater (8.5.1.1), muestras de DNA, de cepas previamente identificadas (8.5.1.2) y DNA de muestras de carne de pollo (8.5.1.3).

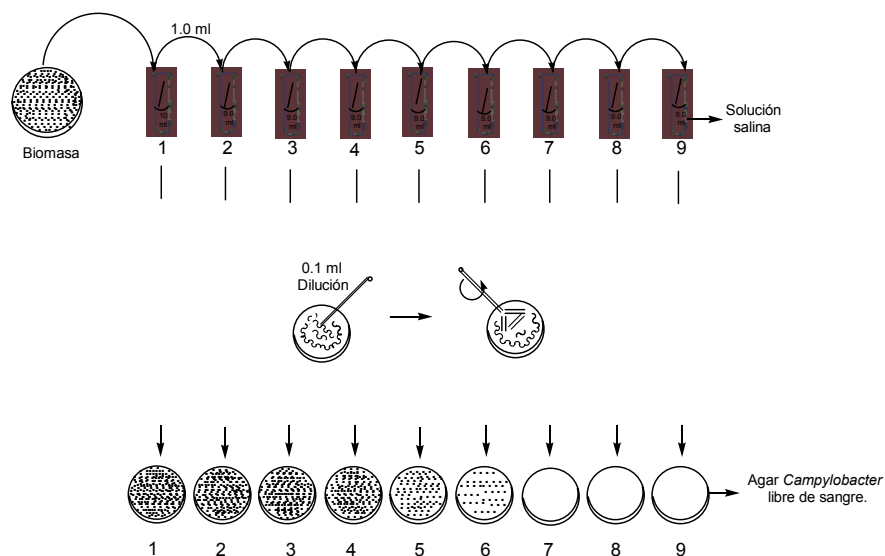
También se realizaron dos pruebas para observar reacción múltiple con los iniciadores B04263 - B04264 y C-1 siguiendo los procedimientos anteriores, y considerando la similitud de T_m en ambos pares de iniciadores.

8.6. Sensibilidad de pruebas microbiológicas y PCR

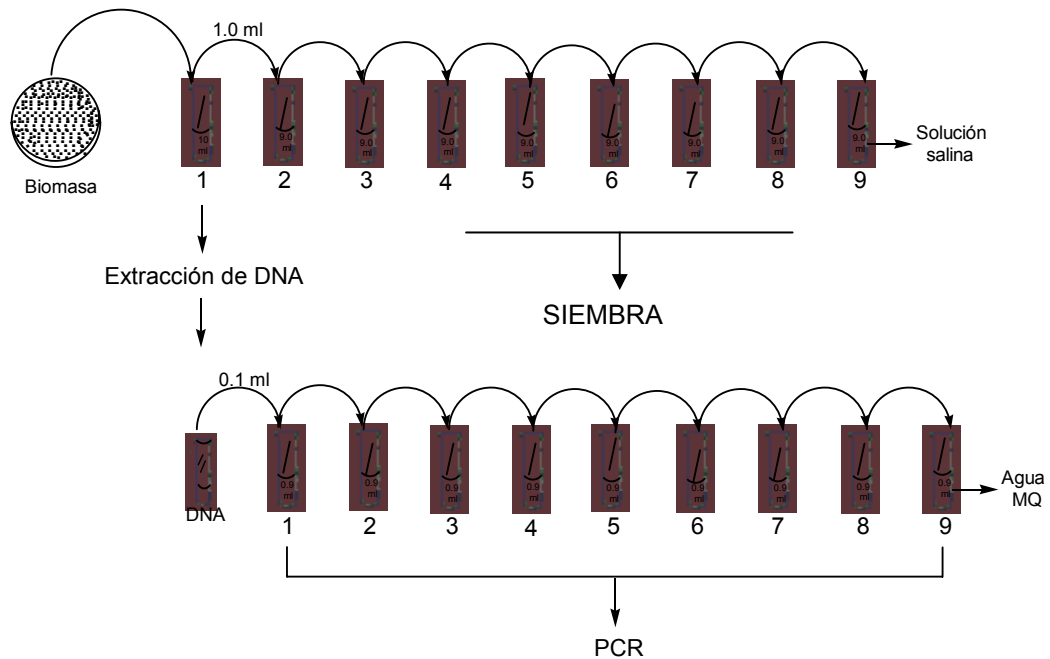
Para determinar la sensibilidad de la técnica de PCR se utilizó la cepa de referencia ATCC 33291, una cepa aislada e identificada obtenida de una muestra de heces y el par de iniciadores C-1

Para cumplir este objetivo se realizaron los siguientes pasos:

1. Las dos cepas se sembraron masivamente por duplicado, en agar sangre con 10% de sangre de carnero desfibrinada, se incubaron por 24 horas en condiciones microaerobias utilizando generadores de microaerobiosis CamyPak Plus (BBL-271045) a 42°C.
2. Se recuperó el crecimiento de una caja y se realizaron diluciones decimales de 10⁻¹ a 10⁻⁹ en 10 ml solución fisiológica al 0.85% de NaCl (40).



- Alícuotas de 100 µl de las diluciones 10^{-4} a 10^{-9} se sembraron por triplicado, por extensión en superficie, con una varilla estéril de vidrio. Se utilizó agar campylobacter libre de sangre y se dejaron incubar por 24 horas en condiciones microaerobias utilizando generadores de microaerobiosis CamyPak Plus (BBL-271045) a 42°C.
- Pasadas las 24 horas se hizo el conteo de unidades formadoras de colonia (CFU) de cada caja.
- De todo el contenido de la dilución 10^{-1} se realizó la extracción de DNA usando un Kit Wizard (Promega).
- A partir del DNA se realizaron una serie de diluciones de 1/10 a 1/1000000000 (10^{-1} a 10^{-9}) en agua mQ.



- Las reacciones de PCR-NMP se realizaron por triplicado para cada dilución, utilizando el par de iniciadores C-1.
- Se registraron las reacciones positivas y negativas para cada dilución.

La visualización de bandas de los amplicones se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta. Y se realizó el conteo de pruebas positivas.

Los reactivos utilizados y la cantidad por reacción de PCR se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentración y cantidades utilizadas para una reacción de PCR-NMP

	Concentración	µl por muestra
H ₂ O mQ		6.5
Buffer	10 X	1.0
MgCl	25 Mm	1.0
DNTP's	10 Mm	0.2
Primer forward	10 pmol/µl	0.6
Primer revers	10 pmol/µl	0.6
TAQ	0.5U	0.1
DNA	*	.5
Volumen final		15

*Fue de acuerdo a las diluciones utilizadas

8.6.1. Conteo celular por epifluorescencia

Para el conteo celular se utilizó la técnica de la Epifluorescencia Directa sobre Filtro (DEFT) (30), la cual se basa en el filtrado de la muestra a través de una membrana que retiene las bacterias y en teñirlas con el colorante fluorescente para su conteo mediante microscopio de epifluorescencia. La fluorescencia es una reacción de luminiscencia en la que la energía de una luz incidente es absorbida por los átomos de moléculas o por iones de sustancias fluorescentes capaces de emitir una luz de longitud de onda superior a las que la ha excitado previamente.

Estos colorantes usados se combinan con el DNA y RNA de las células bacterianas y ello depende fundamentalmente de la edad, ciclo y estado fisiológico del microorganismo, ya que las células en crecimiento tienen el cociente RNA/DNA elevado.

El conteo celular del cultivo obtenido de *Campylobacter jejuni* (cepa ATCC 33591 y una cepa aislada de heces) por la técnica de epifluorescencia se realizó utilizando DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro) como fluorocromo. Se utilizó la dilución 10^{-5} a la cual se le agregaron 8 gotas de DAPI a una concentración de 5 µg / ml (concentración final de 0.5 µg / ml) se agitó y se guardó en refrigeración a 4°C en la oscuridad durante 30 minutos.

Se obtuvieron 0.5 ml del contenido y se filtró utilizando un filtro Nucleopore negro de 0.2 µm de poro. Posteriormente se realizó el conteo en un microscopio de epifluorescencia marca Olympus Bimax 60, se contaron 20 campos al azar.

Obtención del número de microorganismos por mililitro:

Cálculos:

$$N = n \times d \times 19580 \times 1/V$$

Dónde: n es la media de los conteos

d es la inversa de la dilución con la que se trabajó

v es el volumen filtrado

19580 es la superficie del ocular del microscopio por la superficie de filtración

8.7. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de la membrana celular.

8.7.1. Extracción de lípidos de la membrana

Un total de 9 cepas de *Campylobacter jejuni* y una de *Campylobacter coli*, fueron utilizadas para este estudio. De estas cepas dos eran de referencia ATCC 33591 y ATCC 5791, las restantes fueron aisladas de muestras de heces de pollo e identificada a través de pruebas bioquímicas: tinción de Gram, oxidasa, catalasa, urea, reducción de nitratos, crecimiento en NaCl al 3.5%, crecimiento en medio TTC, producción de H₂S en medio TSI e hidrólisis del hipurato, y utilizando la prueba de PCR. También fueron identificadas por el crecimiento a 42°C y la necesidad de condiciones microaerobias.

Se obtuvieron 20 mg de biomasa (8.2) para la extracción de ácidos grasos.

A cada caja se le agregaron 5 ml de formaldehído al 5%, las colonias se rasparon con una varilla "L" y el contenido se vació en dos tubos de 10 ml cada uno. Estas muestras se centrifugaron a 15 000 rpm a 4°C por 10 minutos (1er. centrifugado), se desechó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de solución fisiológica al 0.85% y se centrifugaron bajo las mismas condiciones (2º centrifugado), nuevamente se agregó solución fisiológica y se centrifugó (3er. centrifugado), se desechó el sobrenadante y se procedió a la liofilización por 3 horas a -50°C.

Posteriormente se realizó la esterificación usando dos tipos de solventes, éter de petróleo y metóxido de sodio-metanol, 0.9 y 0.1 ml cada uno respectivamente y se realizó la extracción de ésteres metílicos agregando hexano y se evaporó con N₂ hasta 1 ml (92).

Después de la extracción de los lípidos, se inyectaron a un Cromatógrafo de Gases Perkin Elemer, Modelo Autosystem 9000, con Detector de Ionización de Flama, usando para su separación e identificación una columna capilar de sílica fundida de 100 metros x 0.25 mm D.I. x 0.2 µm de grosor de capa, marca Supelco, cat. SPTM-2560 (92).

Como estándar de referencia se usó la Mezcla FAME Supelco de 37 compuestos, Cat. No. 47885-U, ampula de 1 ml con una concentración de 10 mg/ml disuelta en diclorometano. El porcentaje de peso de cada componente se indica claramente en la hoja de registro del estandar (Anexo, Tabla 7).

El volumen de muestra inyectada de FAME 37 fue de 1 µl, el programa de temperatura usado inició a 140°C por 5 min, con un incremento de 4 °C/min, hasta 240°C. Temperatura inyector y detector a 250°C.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Campylobacter jejuni es considerado parte de la microbiota intestinal normal de pollos, debido a esto la carne de pollo se contamina fácilmente con esta bacteria, principalmente durante el escaldado en el rastro (5,69). Para la realización de este trabajo fueron recolectadas muestras de intestinos y carne de pollo, a fin de tener mayores posibilidades de aislamiento de la bacteria.

9.1. Cultivo

El cultivo de las cepas de referencia y las cepas aisladas durante la investigación, se realizó para la obtención de biomasa, la cual es necesaria para la realización de la técnica de PCR y la extracción de lípidos de la pared celular.

El cultivo de este microorganismo es muy laborioso ya que requiere de condiciones especiales de atmósfera, temperatura y medio de cultivo. En medios de cultivo líquidos *C. jejuni* no crece adecuadamente, como se muestra en la Tabla 7. Durante este periodo se presentaron las siguientes dificultades para el crecimiento del microorganismo:

Poco crecimiento de la cepa INN287ip en un 50% de las cajas con agar BHI

La cepa NCTC 11168 no creció en agar BHI

Poco crecimiento en agar *Campylobacter* sin sangre y no recuperable ya que las colonias se “incrustaban” al medio.

No hubo crecimiento en caldo.

El crecimiento en agar sangre con 10% de sangre de carnero desfibrinada fue muy bueno.

Sin embargo, No se logró obtener crecimiento de las cepas NCTC 11168 y INN287ip, que no fueron sembradas en agar sangre. Se logro obtener suficiente biomasa de las cepas ATCC para la realización de las pruebas y para su conservación en glicerol.

Se presentaron dificultades en cuanto a la obtención de biomasa de las cepas de colección de *Campylobacter jejuni*. En el agar BHI utilizado para este fin no se logró crecimiento y estas dificultades se vieron reflejadas en las cepas de referencia INN287ip y NCTC 11168 de *Campylobacter jejuni* y desafortunadamente no se logró obtener biomasa para la realización de las pruebas con estas cepas. En el medio Agar *Campylobacter* libre de sangre si hubo crecimiento, sin embargo no fue recuperable.

Tabla 7. Crecimiento de cepas de referencia

Cepa de ref/Condiciones de crecimiento	Agar Campylobacter sin sangre	Agar BHI	Caldo BHI	Caldo BHI + extracto de levadura	Caldo BHI + ex. Lev. y vitaminas	Caldo Nutritivo	Caldo nutritivo + vitaminas	Agar sangre con 10% de sangre de carnero
INN287ip	++	+	-	-	-	-	-	*
NCTC 11168	++	-	-	-	-	-	-	*
ATCC 33591	*	*	*	*	*	*	*	+++
ATCC 5791	*	*	*	*	*	*	*	+++

-=sin crecimiento, +=poco, ++=medio, +++=mucho, *No fueron sembradas en este medio

Para la obtención de biomasa se utilizó agar sangre con 10% de sangre de carnero desfibrinada. Todas las cepas crecieron en este medio sin problema (ATCC 5791, ATCC 33591, y cepas obtenidas durante la investigación), sin embargo la cantidad de biomasa obtenida no era suficiente por lo que fueron necesarias varias resiembras consecutivas. Sin embargo, el utilizar la incubadora con mezcla de gases (5% O₂, 15% CO₂ y 80% N₂) tuvo como ventaja la obtención de una mayor cantidad de biomasa en menos tiempo, esto debido al número de muestras procesadas.

El agar sangre es uno de los medios utilizados para el crecimiento de *C. jejuni* (44,52) Varios medios comerciales utilizados para el primoaislamiento de esta bacteria, como Campy-Cefex, mCampy-Cefex y CAMP llevan como suplemento sangre de caballo lisada importante para el aislamiento de esta bacteria porque permite la tolerancia al oxígeno, además de antibióticos para inhibir la microbiota competidora (40,52).

9.2. Aislamiento

El aislamiento tuvo como finalidad obtener colonias características a *C. jejuni* para su posterior identificación y determinar la presencia o ausencia de esta bacteria en carne y heces de pollo, para posteriormente corroborar con la técnica de PCR.

La técnica utilizada de filtración (8.4.1), resultó muy efectiva para el aislamiento primario de *Campylobacter* ya que los filtros retienen a bacterias de mayor tamaño como las de la microbiota entérica y las colonias observadas por esta técnica eran características de *Campylobacter*.

Del muestreo de heces se obtuvieron 10 aislados, los cuales fueron caracterizados utilizando pruebas morfológicas y bioquímicas para su identificación, como fue detallado en la metodología (8.4.2).

Los antibióticos fueron sustituidos por filtros, el método de filtración es usado para el primoaislamiento de campylobacter en heces, el cual esta basado en la separación de esta bacteria de la microbiota presente en las heces. De esta manera se obtiene un

cultivo selectivo, reemplazando el uso de antibióticos (15). El uso de antibióticos en los medios no garantiza que otras bacterias resistentes aparezcan contaminando el medio y compitiendo con *C. jejuni*, como lo mencionan Oyarzabal, *et. al.* (2005), en un estudio hecho con canales de pollo con diferentes medios utilizados para el aislamiento de *C. jejuni*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter Iwoffi*, *Pseudomonas* spp. y *Staphylococcus hominis* fueron reportadas en este estudio como contaminantes que enmascaran el crecimiento de *Campylobacter*. Lactobacilos y coliformes que inhiben el crecimiento de *C. jejuni* por su antagonismo y competición por los nutrimentos crecen en medios específicos para campylobacter que igualmente contienen antibióticos (3).

De las muestras de carne se obtuvo únicamente 1 aislado, el aislamiento se realizó en agar campylobacter con 5 antibióticos (1 anexo). En este caso solo hubo crecimiento de *C. jejuni* ya que las colonias eran uniformes y al realizar las pruebas de identificación sólo resultaron formas características y las pruebas bioquímicas corroboraron el resultado. Hay reportes que mencionan únicamente aislados de *C. jejuni* de carne de pollo de 1.8% (3)

Existen varios factores que pueden interferir en el aislamiento de *C. jejuni*, tales como el método de recolección y transporte de la muestra, método de aislamiento, procedimientos usados durante el sacrificio y condiciones sanitarias durante la crianza (3).

9.3. Identificación

Tanto el método de aislamiento, como la utilización de diferentes pruebas de identificación (8.4), permitieron montar las técnicas microbiológicas para la identificación de *C. jejuni*, lo cual se vio reflejado con la obtención de cepas de esta bacteria.

9.3.1. Pruebas morfológicas

Las colonias resultantes del cultivo primario que fueron resembradas eran características de *Campylobacter*, presentaban forma redonda, elevadas, color grisáceo, mucoides y algunas veces tenían forma de uso (Figura 3).



Figura 3. Colonias de *C. jejuni* sembradas en Agar Campylobacter libre de sangre

Microscópicamente eran bacterias pequeñas, con la morfología característica de *Campylobacter*, observadas a partir de cultivos jóvenes, de 24 horas de incubación (Figura 4). Con más de 24 horas de incubación o tras prolongada exposición al aire adoptaron una forma cocoide. Las bacterias observadas en frotis fresco presentaban movimiento a modo de sacacorchos, característico de la especie.

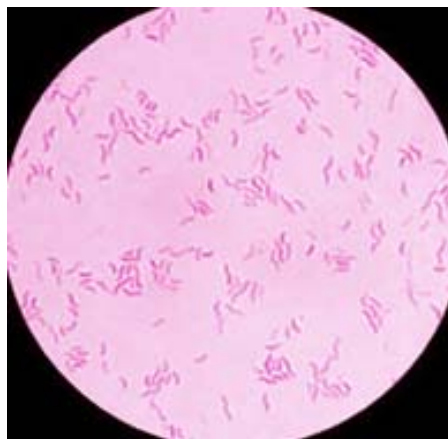


Figura 4. Morfología de *C. jejuni* en tinción de Gram a las 24 h de incubación

9.3.2. Pruebas bioquímicas

Se realizaron una serie de pruebas bioquímicas para la identificación del género, los resultados se muestran en la Tabla 8. Las pruebas fueron realizadas por duplicado y el resultado en ambas fue igual. Para la identificación de esta bacteria se usó la Tabla 8 (anexo).

Tabla 8. Pruebas Bioquímicas realizadas a las cepas aisladas de contenido intestinal y carne de pollo

Muestra	Gram	Oxidasa	Catalasa	TTC	S. H, en TSI	Ureasa	3.5% NaCl	Hipurato	R. de Nitrate
1	-	+	+	+	-	-	-	+	+
2	-	+	+	+	-	-	-	+	+
3	-	+	+	+	-	-	-	-	+
4	-	+	+	+	-	-	-	-	+
11	-	+	+	+	-	-	-	+	+
17	-	+	+	+	-	-	-	+	+
21	-	+	+	+	-	-	-	+	+
22	-	+	+	+	-	-	-	+	+
23	-	+	+	+	-	-	-	+	+
24	-	+	+	+	-	-	-	+	+
30	-	+	+	+	-	-	-	+	+

Se trata de bacterias Gram-negativas, que pudieron diferenciarse de otras bacterias utilizando las pruebas bioquímicas específicas. La capacidad de hidrolizar el hipurato distinguió a *C. jejuni* de otras especies, debido a que esta especie cuenta con una enzima hidrolasa hipurato, la cual puede ser identificada a través de PCR, por la amplificación del gen *hipO* utilizando primer específicos (68).

Se obtuvieron 8 cepas de *C. jejuni* (muestras 1, 2, 11, 17, 21, 22, 23 y 24) y dos de *C. coli* (muestras 3 y 4) de las muestras de contenido intestinal y una cepa de *C. jejuni* de muestra de carne (muestra 30).

Tomando en cuenta cada uno de los puntos anteriores, desde la preparación de los medios de cultivo, el aislamiento del agente etiológico, los tiempos de incubación, la preparación y realización de pruebas morfológicas y bioquímicas, se requiere aproximadamente de 8 días para la identificación de *C. jejuni*.

9.4. Detección por PCR

La técnica de PCR tiene como finalidad corroborar los resultados obtenidos por las técnicas microbiológicas convencionales, y a su vez determinar la sensibilidad de ambas técnicas.

9.4.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA es el primer paso para montar la técnica de PCR y la posterior detección de *C. jejuni* de todas las muestras obtenidas.

La integridad del DNA extraído (8.5.1) de las distintas muestras, se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se obtuvo una gran cantidad de DNA y se pudo proceder a las siguientes pruebas.

La Figura 5 muestra la extracción de DNA por el método de Beadbeater (8.5.1.1), a pesar de que existe una gran cantidad de DNA, esta fragmentado debido al propio método de extracción. Se obtuvo DNA de un total de 26 muestras fecales. En el carril 1 esta el marcador de DNA del bacteriófago lamda/BstEII.

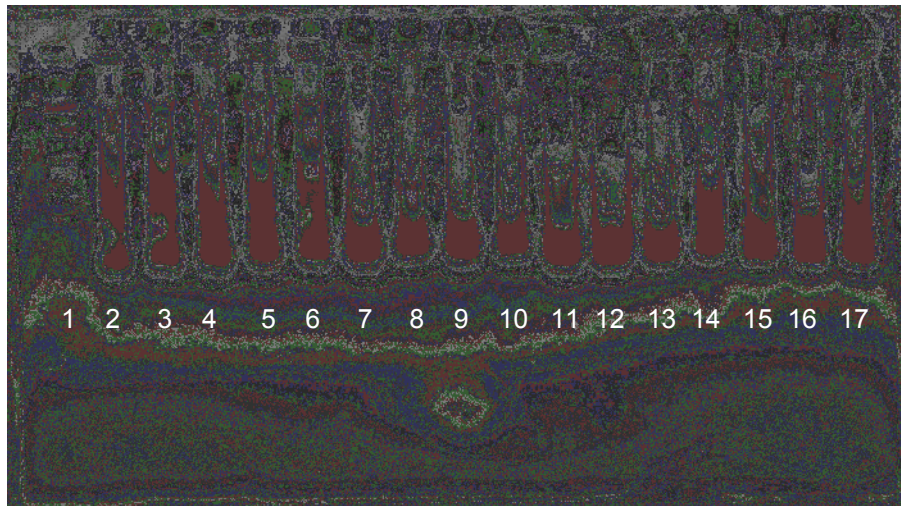


Figura 5. Electroforésis de las extracciones de DNA mediante Beadbeater, de muestras de heces de pollo.

En la Figura 6, se observa el DNA obtenido de muestras de carne, mediante lisis celular (8.5.1.3). A pesar de que este método no es tan destructivo como el de beadbeater, el DNA obtenido también muestra el barrido típico de DNA fragmentado (Figura 6).



Figura 6. Electroforésis de las extracciones de DNA por lisis celular, de las muestras obtenidas por raspado superficial de piezas de pollo

La Figura 7, muestra la integridad del DNA de las cepas de referencia ATCC33291 y ATCC5791 (carril 3 y 4) y una cepa aislada de contenido intestinal identificada por pruebas bioquímicas (muestra 1, carril 2), existe una gran cantidad de DNA y la integridad es muy alta. En el carril 1 esta el marcador de DNA del bacteriófago lamda/BstEII.

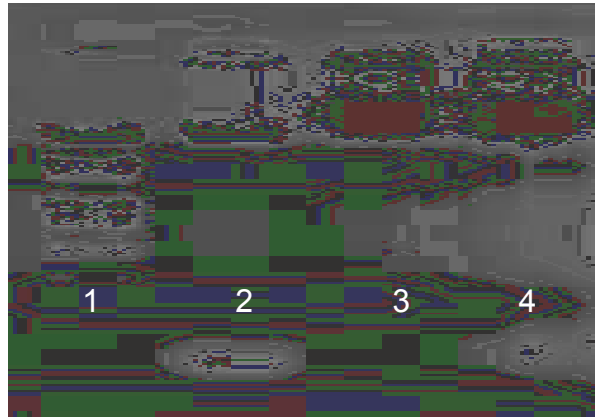


Figura 7. Electroforésis de las extracciones de DNA de cepas de referencia, utilizando el Wizard kit

También se realizó la extracción de DNA del resto de las cepas obtenidas.

Una vez comprobado que se obtuvo DNA de todas las muestras, bajo las distintas formas de extracción, se procedió a corroborar que los DNAs extraídos tenían la calidad suficiente para ser utilizados en PCR. Cabe señalar que la pureza del DNA es importante en las reacciones de PCR, principalmente cuando es obtenido de muestras como las heces, que pueden tener contaminantes que interfieran o inhiban la actividad de la polimerasa. En adición, un DNA muy fragmentado tampoco es útil, sobre todo si el tamaño medio de los fragmentos es menor que el esperado del amplicón, dando como resultado pruebas negativas.

9.4.2. PCR

La utilización de los iniciadores seleccionados, y las condiciones de PCR establecidas en este trabajo, permitió la detección de *Campylobacter jejuni* utilizando DNA extraído por los 3 métodos mencionados (8.5.1).

La determinación experimental de la temperatura de anillamiento para cada par de iniciadores, se realizó con el termociclador T-gradient, lo que permitió probar varias temperaturas en una sola corrida.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las primeras pruebas se determinó lo siguiente:

1. 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos
2. 30 ciclos que comprenden:

- a. Desnaturalización a 94°C durante 45 segundos
- b. Hibridación a 52°C durante 45 segundos y
- c. Extensión a 72 °C 45 segundos

La extensión final a 72°, durante 3 minutos

Este resultado es similar al obtenido por Cloak, et al., donde la temperatura de anillamiento para el par de iniciadores C-1 es de 52°C, variando el tiempo de cada paso.

Después de varias pruebas, en las que inclusive se amplió el gradiente de temperatura utilizado, no se logró amplificación utilizando el par de iniciadores HIP400F y HIP1134R por lo que no fue posible trabajar con ellos.

La Figura 8, muestra la electroforesis de productos amplificados por PCR, utilizando el par de iniciadores B04263 y B04264, y DNA obtenido de: cultivo puro de *C. jejuni* de las cepas de referencia ATCC (carril 1 y 2); cultivo puro de cepa aislada de heces (carril 4), y DNA metagenómico (carril 5), estos dos últimos proviene de la muestra 1.

Los carriles 3 y 6 control negativo y carril 7 marcador DNA de pBR322/*Msp*. En todos los casos, los productos tienen el tamaño esperado.

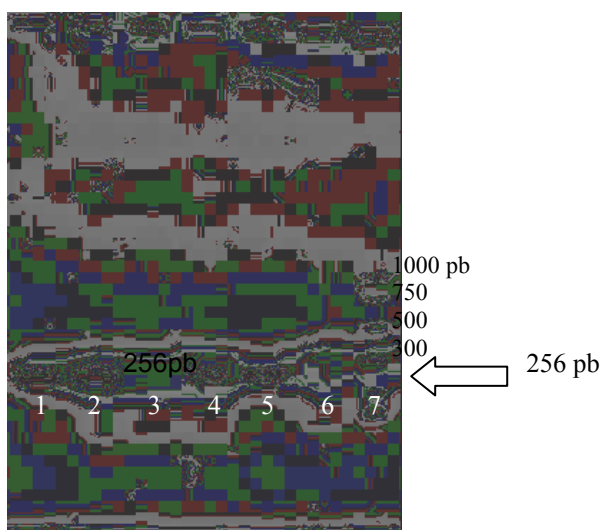


Figura 8. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos con el par de iniciadores B04263 y B04264, utilizando DNA de distinto origen

Con esta prueba se confirma la identificación de la muestra 1 obtenida de heces de pollo, previamente identificada por pruebas bioquímicas, además de determinar que el DNA obtenido por las distintas técnicas es útil para reacciones de PCR.

9.4.2.1. Método Beadbeater

La finalidad de este método fue la detección de *C. jejuni* utilizando DNA extraído directamente de heces, sin tener que pasar por el aislamiento e identificación de la

bacteria, y de esta manera comparar la los resultados obtenidos por la técnica de PCR, con los obtenidos por la técnica microbiológica convencional.

Con las muestras de DNA obtenidas de directamente de heces y utilizando el par de iniciadores B04263 y B04264 se obtuvieron muestras positivas (Tabla 9)

En la Tabla 9 se realiza la comparación de los resultados obtenidos por pruebas microbiológicas y por la prueba de PCR.

Tabla 9. Comparación de resultados de las pruebas microbiológicas y PCR

No. de muestra	Microbiología	PCR
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	-	+
6	-	+
7	-	+
8	-	-
9	-	+
10	-	+
11	+	+
12	-	+
13	-	+
14	-	-
15	-	-
16	-	+
17	+	+
18	-	+
19	-	+
20	-	+
21	+	+
22	+	+
23	+	-
24	+	+
25	-	-
26	-	-
Total pruebas positivas	10	20
Total pruebas negativas	16	6

De las 26 muestras procesadas con ambas técnicas, un 38.5% (10 muestras) resultaron positivas mediante pruebas microbiológicas, mientras que con la técnica de PCR, el

77% de las muestras fueron positivas (20 muestras). Por lo cual podemos inferir que la técnica de PCR es más sensible.

Los resultados son comparables a los obtenidos por Keramas, *et. al.* (2004), quienes realizaron un estudio con muestras de heces de pollo comparando ambas metodologías, obteniendo de 65 muestras probadas, un 60% positivas a *Campylobacter* por pruebas microbiológicas, y mediante PCR 95% de las muestras fueron positivas, usando iniciadores específicos para el género *Campylobacter*. Utilizando iniciadores específicos para el gen Cj0047 específico de *C. jejuni*, el 71% fueron positivas.

Un 90% de las muestras positivas obtenidas a través del aislamiento e identificación por pruebas microbiológicas, resultaron positivas para la prueba de PCR, y por el contrario no todas las muestras positivas por PCR lo fueron por pruebas microbiológicas (50%).

Dado que en todas las reacciones de PCR siempre se corría un control que no contenía DNA diana, y este resultaba negativo en amplificación, se puede descartar que la mayor sensibilidad de detección obtenida con PCR, sea producto de DNA contaminante.

También hay que considerar que hubo muestras que dieron negativo por ambas metodologías. Aunque no se puede descartar la posibilidad de que en el DNA metagenómico existan secuencias diana, que no pertenezcan a *Campylobacter*, esta posibilidad es difícil de corroborar.

9.4.2.2. Extracción de DNA de cepas de referencia y caracterizadas.

Se realizó la extracción de DNA de las cepas de referencia y las identificadas como *C. jejuni* por técnicas microbiológicas (9.3) para corroborar este resultado con la técnica de PCR.

A través de la prueba de PCR resultaron positivas un total de 20 muestras, de las cuales corresponden las muestras 1, 2, 3, 4, 11, 17, 22 y 24 de DNA obtenido de cepas previamente identificadas por pruebas bioquímicas de muestras de heces.

Los resultados obtenidos de PCR utilizando crecimiento masivo (8.2) de las muestras mencionadas en el párrafo anterior se muestran en las Figuras 9 y 10.

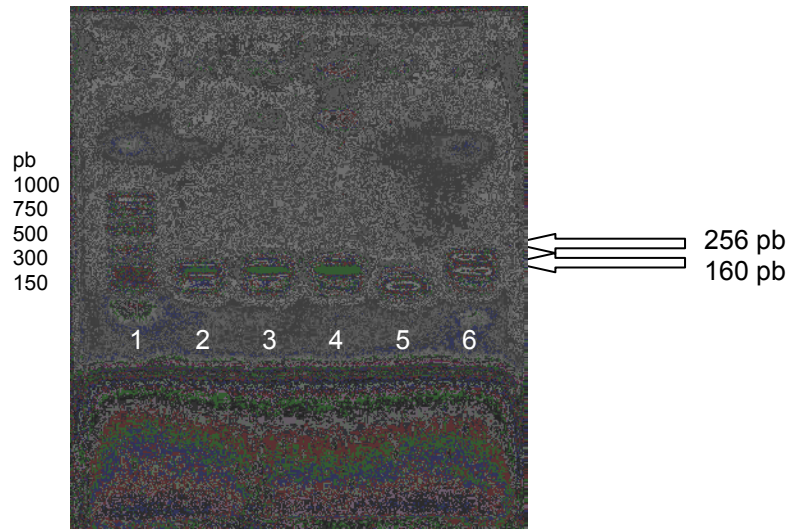


Figura 9. Electroforésis de productos amplificados por PCR utilizando un par de iniciadores C-1 de las muestras 2, 11 y 17 (carriles 2 a 4). Carril 1. marcador DNA de pBR322/*Msp* y carril 5 control negativo. Carril 6, muestra dos fragmentos que corresponden a una reacción PCR-multiplex utilizando los iniciadores C-1 (160 pb) e iniciadores B04263 y B04264 (256 pb) (muestra 21).

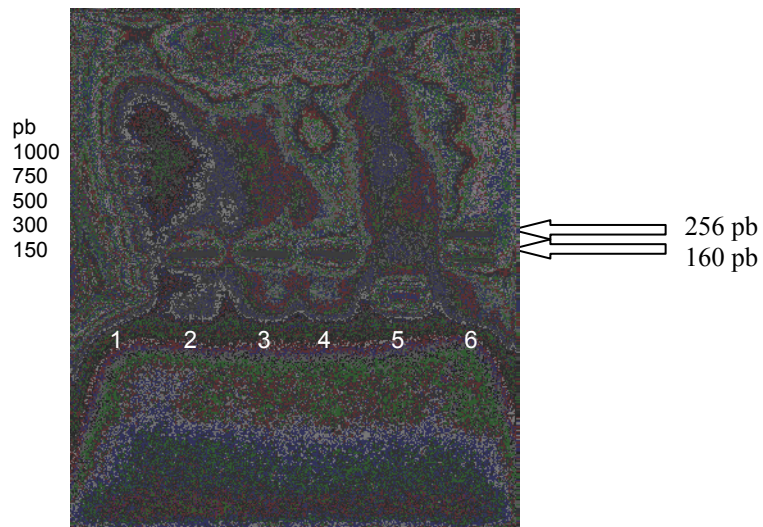


Figura 10. Electroforésis de productos amplificados por PCR utilizando un par de iniciadores C-1 de las muestras 22, 23 y 24 (carriles 2 a 4). Carril 1. marcador DNA de pBR322/*Msp* y carril 5 control negativo. Carril 6, muestra dos fragmentos que corresponden a una reacción PCR-multiplex utilizando los iniciadores C-1 (160 pb) e iniciadores B04263 y B04264 (256 pb) (muestra 30)

Para el par de iniciadores HIP400F y HIP1134R utilizando la misma cepa de referencia, no se logró obtener una amplificación específica ya que aparecieron simultáneamente otros fragmentos.

Zhao, *et. al.* (2001), determinaron la amplificación utilizando estos iniciadores en 60°C, sin embargo no se logró la amplificación con las temperaturas probadas incluyendo la mencionada (8.5.3). Otro estudio muestra la temperatura de anillamiento en 66°C (41)

Cabe señalar que los iniciadores BO4263 y BO4264 también son reportados por el mismo autor con una temperatura de anillamiento de 60°C y para esta investigación fue de 52°C (T_m teórica de 55.3) (Tabla 2).

9.4.2.3. Extracción de DNA de muestras de carne

El método de lisis celular (8.5.1.3) fue utilizado para lograr la detección de *C. jejuni*, con DNA extraído directamente de muestras de carne y determinar la presencia o ausencia de esta bacteria en este tipo de muestra.

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos del DNA obtenidos por lisis celular a partir de muestras de piezas de pollo.

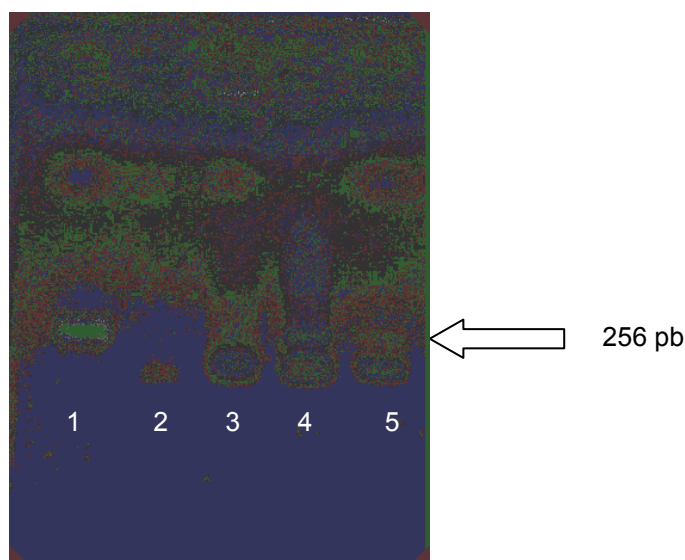


Figura 11. Electroforésis de los productos de PCR obtenidos con el par de iniciadores B04263 y B04264, utilizando DNA de muestras de carne de pollo por lisis celular. El carril 1 muestra un producto positivo (256 pb) de la cepa ATCC 33291 probada con el par de iniciadores B04263 y B04264. Carril 2 control negativo. La flecha indica el tamaño de producto esperado.

Las muestra 30 positiva por pruebas microbiológicas resulto negativa (Figura 11, carril 3) por la técnica de PCR, debido tal vez a la calidad del DNA obtenido (Figura 5). Del total de muestras obtenidas de carne, solo se logró un 10 % de muestras positivas por PCR y un 5% por pruebas microbiológicas, indicando una mayor sensibilidad en la prueba de PCR.

El tiempo utilizado para la realización de la técnica de PCR desde la extracción del DNA hasta la detección de la bacteria fue de dos días, pudiéndose reducir el tiempo a 24 horas dependiendo del periodo de incubación con la solución de DNA rehidratante, una hora a 65°C o toda la noche a 4°C.

Se lograron montar las técnicas de PCR y microbiológicas para la identificación de *C. jejuni* de heces y carne de pollo y de esta manera obtener aislados que permitieron comparar resultados de sensibilidad y tiempo.

Para la técnica microbiológica se determinaron las pruebas idóneas para el aislamiento (8.4.1), e identificación por pruebas morfológicas (8.4.2.1) y bioquímicas (8.4.2.2) de la bacteria.

La técnica de PCR utilizando los dos pares de iniciadores C-1, B04263, B04264, permitió la detección de *C. jejuni* de manera rápida y efectiva del DNA extraído de manera directa de la muestra, como se demostró con heces (8.5.1.1) y las muestras de carne obtenidas por lisis celular (8.5.1.3). Los resultados obtenidos de estas muestras fueron corroborados a través de los aislados identificados, los cuales fueron utilizados para la extracción de DNA a través de crecimiento masivo (8.5.1.2).

9.5. Sensibilidad de pruebas microbiológicas y PCR

Se realizaron estas pruebas para determinar la sensibilidad de la técnica microbiológica y compararla con la PCR-NMP.

9.5.1. Conteo celular por epifluorescencia

Se realizó conteo celular por epifluorescencia (8.6.1) para obtener el número de células bacterianas de la dilución 10^6 , como un método útil para determinar la sensibilidad de la técnica microbiológica y de PCR.

Aplicando la fórmula

Cepa ATCC 33591: $1N = 10 \times 10^6 \times 19580 \times 1/.5$

Cepa 1: $1N = 21.05 \times 10^6 \times 19580 \times 1/.5$

Tabla 10. Cuenta celular por epifluorescencia

	ATCC 33591 (cepa control)	<i>C. jejuni</i> (cepa aislada)
Conteo celular Directo (bacterias)	3.91 X 10 ¹¹	8.24 X10 ¹¹

9.5.2. Numeración bacteriana: El Número Mas Probable (NMP)

El método de número más probable (NMP) es una estrategia eficiente para estimar la densidad total de bacterias presentes en una muestra. Para la realización de este método se contaron las CFU (Tabla 11), considerándose como positivas todas aquellas cajas con conteos superiores a 30 colonias.

Los resultados son similares para las dos cepas utilizadas, siendo el límite de detección de CFU la dilución 10^{-6} .

Tabla 11. Determinación de la cuenta viable en placa

Diluciones	ATCC 33591 (cepa control)			<i>C. jejuni</i> (cepa aislada)		
10^{-1}	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	-	-	+	-	+
10^{-7}	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-

Nota: Se consideraron positivas las placas con 30 CFU o más.

Los resultados obtenidos se procesaron en el software MPN calculator (14) y el valor calculado para la cepa ATCC 33291 es de 460 000 bacterias por 100 μ l (cantidad utilizada de las diluciones para la siembra), lo que equivale a 4.6×10^6 bact/ml; y para la cepa de *C. jejuni* aislada de heces de pollo de 1 100 000 bacterias en 100 μ l, lo que equivale a 1.1×10^7 bact/ml.

9.5.3. Sensibilidad por PCR-NMP

Mediante un enfoque doble que permite aprovechar la capacidad de detección de la PCR y las posibilidades de cuantificación de la técnica del Número Mas Probable (NMP), se probó la sensibilidad de detección de esta técnica molecular, utilizando DNA extraído de suspensiones bacterianas que fueron valoradas por técnicas directas de conteo (microscopía de epifluorescencia) y por cuentas de microorganismos viables (NMP). La sensibilidad de la PCR se probó en reacciones por triplicado, sobre diluciones decimales del DNA extraído.

Las Figura 12 y 13 muestran los resultados obtenidos de las diluciones 10^{-3} has 10^{-7} de la cepa de referencia ATCC 33291 y de la muestra 1 (9.3), los cuales se muestran por triplicado.

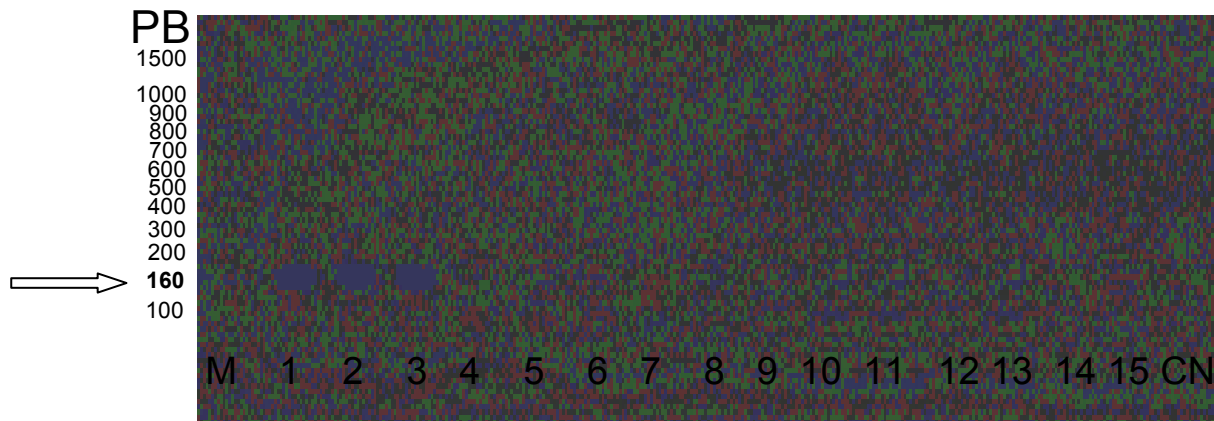


Figura 12. Electroforésis de los productos de PCR obtenidos con el par de iniciadores C-1 (160 pb), utilizando DNA de la cepa ATCC 33591. La flecha muestra la banda de interés.

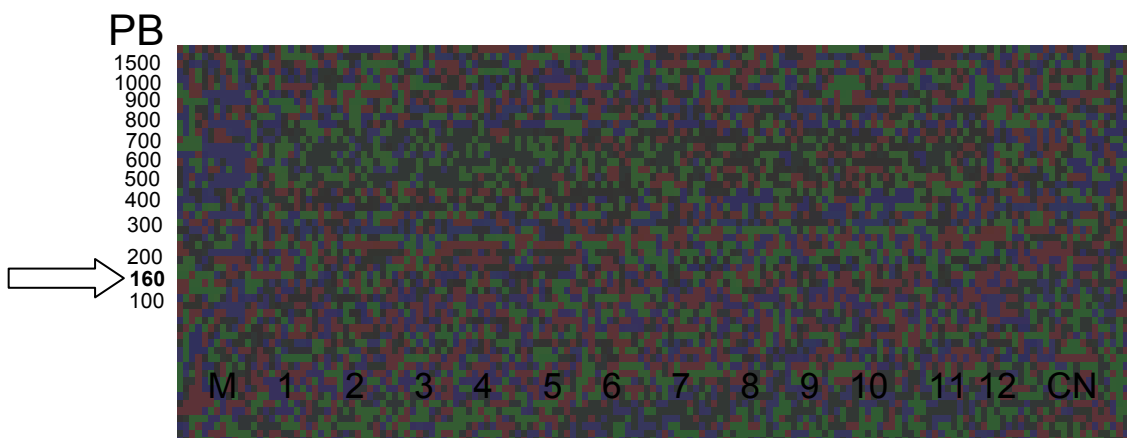


Figura 13. Electroforésis de los productos de PCR obtenidos con el par de iniciadores C-1 (160 pb), utilizando DNA de la muestra 1. La flecha muestra la banda de interés.

Los resultados de PCR-NMP para dos cepas de *Campylobacter* se muestran en la Tabla 12, se consideraba positiva (+) aquella reacción que produjera una banda del tamaño adecuado, vista en electroforésis en gel de agarosa (Figura 12).

Los resultados obtenidos se procesaron en el software NMP calculator (14) considerando la última dilución que produjo resultados positivos, y que se usaron .5µl de DNA en cada reacción de PCR, los valores de NMP-PCR obtenidos para la cepa ATCC 33291 y cepa de *C. jejuni* obtenida de heces fueron de 2.2×10^{10} unidades genómicas/ml, en ambas cepas.

Tabla 12. Prueba de sensibilidad utilizando la técnica de PCR-NMP

Diluciones	ATCC 33591 (cepa control)			<i>C. jejuni</i> (cepa aislada)		
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁷	+		+	+	+	-
10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁹	-	-	-	-	-	-

Comparando los tres resultados de cuantificación obtenidos (Tabla 13) y considerando que con el método de conteo por epifluorescencia se estarían contando todas las bacterias, con NMP solo aquellas capaces de crecer en el medio de cultivo utilizado y con PCR-NMP las unidades genómicas de todas las bacterias, que sean factibles de dar una reacción positiva en la reacción de PCR, el conteo directo por microscopía de epifluorescencia, fue la técnica que rindió los valores de detección más altos. Sin embargo, por las características propias de la técnica, no puede ser utilizada para realizar conteos específicos a partir de muestras complejas como las heces, o de muestras con poca carga como la carne de pollo. Su utilización en este caso, nos permitió tener un acercamiento a la cuenta total de bacterias presentes en nuestras suspensiones bacterianas.

Tabla 13. Cuantificación obtenida

Cepa	Conteo por epifluorescencia	Enumeración bacteriana (NMP)	PCR-NMP
ATCC 33291	3.91 X 10 ¹¹ bact/ml	4.6 x 10 ⁶ bact/ml	2.2 X 10 ¹⁰ unidades genómicas/ml
Muestra 1	8.24 X10 ¹¹ bact/ml	1.1 x 10 ⁷ bact/ml	2.2 X 10 ¹⁰ unidades genómicas/ml

De las dos técnicas que se pueden utilizar para detectar específicamente este grupo bacteriano, la técnica de PCR mostró una mayor capacidad de detección sobre las técnicas microbiológicas, mostrando una sensibilidad aproximadamente 500 veces superior.

Estas diferencias confirman la importancia de la técnica de PCR como una herramienta que facilita la detección de bacterias patógenas en alimentos, como *C. jejuni* que puede encontrarse en un bajo número, ya que ofrece la forma de demostrar la presencia de bacterias que por otras técnicas como la microbiológica, podrían no demostrarse, esto debido a las características presentes en este agente etiológico (3.2).

Se han realizado estudios cuantitativos para la detección de *C. jejuni* a través de la técnica de PCR, detectando hasta 1 célula bacteriana por ml de muestra (24, 51,78), utilizando iniciadores altamente específicos (24), incluso la detección de la bacteria puede realizarse en 3 horas (51).

En este estudio se mostró la eficiencia del uso de la técnica de PCR para identificar a *C. jejuni* de DNA obtenido directamente de muestras de heces y carne de pollo. Utilizando la técnica de PCR inmunocaptura se detectó a *C. jejuni* directamente de los alimentos sin necesidad de aislar al microorganismo (78).

La técnica de PCR permite complementar o remplazar los métodos de identificación fenotípica de especies de *Campylobacter*. Aunado a esto, esta técnica diferencia especies de *Campylobacter*, cepas de *C. jejuni* y también permite la detección de características propias de la especie como toxicidad y resistencia a antibióticos entre otras (45,91).

El presente estudio compara la sensibilidad de detección de *Campylobacter* a través de la técnica de PCR y las técnicas microbiológicas convencionales, podemos observar que si existen diferencias entre ambas técnicas, ya que de las 26 muestras analizadas de heces la sensibilidad de PCR fue del doble, con una concordancia del 90%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Vanniasinkam, et al. (1999), utilizando el análisis de prueba exacta de Fisher (X^2 Chi cuadrada), la cual estima los valores de PCR a través del uso de las técnicas tradicionales.

Es importante señalar que no es un objetivo de esta tesis, estandarizar los modelos de detección, ya que esto hubiera representado plantear inicialmente un análisis estadístico preliminar en el que se calcule el tamaño (número) de muestras mínimas necesarias a estudiar, que garanticen que los parámetros estadísticos permitan estandarizar diferentes modelos de detección.

9.6. Análisis de ácidos grasos

A un total de 10 cepas se les realizó la extracción de lípidos de pared celular. Dos eran cepas de referencia; ATCC 33291 y ATCC 5791, y 8 cepas aisladas de heces de pollo previamente identificadas utilizando pruebas bioquímicas.

Las cepas de referencia muestran un perfil de ácidos grasos similar como se muestra en los cromatogramas de las Figuras 1 y 2, exceptuando por la aparición de un ácido graso diferente para cada una. La cepa ATCC 33291 muestra un 27.82% (P/P) de C15:1, ausente en la cepa ATCC 5791 que a su vez muestra un 31.55% de C16:0,

ausente también en la cepa ATCC 33291. Los porcentajes para cada ácido graso son similares para las dos cepas.

El perfil de ácidos grasos para cada cepa aislada esta caracterizado por la presencia de C15:1 o de C16:0 y los 3 ácidos grasos C14:0, C18:1n9c y C18:2n6c presentes en las cepas de referencia ATCC 33291 y ATCC 5791.

La cepa identificada por pruebas bioquímicas y moleculares como *Campylobacter coli* muestra el C16:0 en cantidad mayor a las cepas de *C. jejuni* (58%). Otra característica especial es que esta cepa no presenta el C18:1n9c presente en un 19% en las otras cepas.

Todos los resultados anteriores se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Perfil de ácidos grasos

Organismo	No. de cepa	C12:O	C14:0	C15:1	C16:0	C16:1	C18:1n9c	C18:2n6c
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33291		9.73%		31.55%	8.54%	16.70%	28.63%
<i>C. jejuni</i>	ATCC 5791	2.31%	11.24%	27.82%		9.98%	17.15%	28.95%
<i>C. jejuni</i>	1		9.46%		34.88%	4.95%	16.41%	26.77%
<i>C. jejuni</i>	2		7.98%	32.57%			13.18%	37.33%
<i>C. coli</i>	4		9.22%		58.00%			28.51%
<i>C. jejuni</i>	11		12.17%		37.74%		25.04%	21.13%
<i>C. jejuni</i>	17		10.75%		35.57%	7.82%	22.39%	20.72%
<i>C. jejuni</i>	21		12.06%		31.39%	10.00%	16.23%	27.53%
<i>C. jejuni</i>	22		13.26%	30.08%		9.38%	16.94%	26.56%
<i>C. jejuni</i>	24		14.96%	34.21%		8.11%	24.20%	16.55%

Las áreas menores a 2% no son mencionadas

Las Figuras 1 a 10 que se encuentran en el anexo, muestran los cromatogramas de los resultados mencionados en la Tabla 14.

Esta prueba fue utilizada como criterio adicional para la caracterización de *C. jejuni*. Blaser, *et. al.* (1980) determinaron la composición de ácidos grasos celulares de *C. jejuni* como sigue 12 % de 14:0, 7 % de 3-OH 14:0, 13 % de 16:1, 29 % de 18:1 y 14 % de 19:0 Δ.

La cepa de referencia ATCC 5791 muestras patrones similares del ácido graso 14:0, al igual que las cepas 11 y 2. Las cepas restantes muestran una diferencia promedio de 2.4%.

El ácido graso C16:1 de las cepas no muestra semejanza con el obtenido por Blaser, *et al.* (1980), mostrando una diferencia de 4.6%.

No se pueden comparar los ácidos grasos restantes (3-OH 14:0, 18:1 y 19:0 Δ) (6) con los obtenidos en esta investigación ya que el patrón de ácidos grasos utilizado (FAME37) no contiene tales.

10. CONCLUSIONES

Campylobacter jejuni es una de las causas más importantes de gastroenteritis, la campylobacteriosis ocurre en todo el mundo y su incidencia parece estar en aumento. El reservorio principal son las aves domésticas y, la contaminación del alimento por este patógeno ocurre en diferentes pasos de la cadena de transformación: producción, procesamiento, distribución, venta y manejo o preparación. El uso extensivo de bajas temperaturas para la conservación y manejo de alimentos, aumenta la importancia de estos como vehículos de *C. jejuni*. La mejor forma de prevención radica en la manipulación de los alimentos evitando las prácticas que favorezcan la contaminación cruzada.

Hoy día es una de las causas más importantes de diarrea de origen bacteriano, con niveles de incidencia mayores a otras bacterias como *Salmonella*. Esta enfermedad es subvalorada debido a que aparece en casos esporádicos, y rara vez en brotes epidémicos. Se ha demostrado que la carne de pollo es la principal fuente de infección, debido a que *Campylobacter jejuni*, una vez en la explotación se disemina y coloniza rápidamente el intestino de pollos y debido al contacto con las heces durante el sacrificio, existe el riesgo de contaminación superficial.

El aislamiento de *C. jejuni* de los alimentos es difícil y muy laborioso debido a varios factores que a continuación se numeran:

- a) Requiere de generadores de microaerobiosis, los cuales deben ser usados en jarras anaerobias, esto dificulta el número de muestras que pueden procesarse, además del costo del material utilizado. Otra manera de generar la atmósfera microaerobia es utilizando la mezcla de gases (CO_2 , N y O_2) dentro de una incubadora, que de igual manera resulta costoso.
- b) El crecimiento puede tardar de 48 a 72 horas.
- c) Requiere de medios especiales con adición de antibióticos que inhiban la microbiota entérica competidora lo que posiblemente enmascara las colonias de *Campylobacter spp.*, el uso de antibióticos puede sustituirse con el uso de filtros, los cuales resultan efectivos y reducen el costo.

La técnica de filtración tiene como beneficios:

- a) Sustituye a los antibióticos y por lo tanto reduce el costo.
- b) Reduce la contaminación del medio con bacterias competidoras, facilitando el aislamiento de *C. jejuni*.

Es necesario desarrollar técnicas para la identificación y detección de *C. jejuni* en alimentos de manera efectiva y rápida ya que la falta de métodos de análisis eficaces y la gran ubicuidad explican la enorme distribución y presencia de *C. jejuni*.

Las recomendaciones para la disminución de la incidencia de esta bacteria serían; no romper la cadena de frío y evitar prácticas que promuevan la contaminación cruzada. El establecimiento de un método oficial o de referencia para su detección y aislamiento., El control y vigilancia en los establecimientos que elaboran, manipulan y distribuyen los alimentos, y educación sanitaria en general, para disminuir lo más posible, la población de *C. jejuni* en la carne de pollo.

La campylobacteriosis es un problema de salud pública mundial, hace falta identificar bien los reservorios en el medio ambiente y a su vez relacionarlos con la incidencia de la enfermedad, además de que la industria alimentaria debe realizar los esfuerzos necesarios para eliminar esta bacteria de la cadena alimentaria.

La metodología presentada en este documento fue desarrollada como una alternativa que permita detectar eficientemente *C. jejuni*, partiendo de muestras de distintos orígenes. La detección mediante métodos moleculares, ha probado ser sencilla, rápida y presentar mayor sensibilidad comparada con los métodos microbiológicos convencionales.

La técnica de PCR es una excelente opción para la detección de bacterias patógenas en los alimentos. Comparada con los métodos microbiológicos, resulta más rápida al proporcionar resultados en 2 días, contra 8 días con la metodología tradicional. Además de poseer una mayor sensibilidad, permitiendo la detección de *C. jejuni* aún cuando se encuentre en baja cantidad. Conviene recordar que la dosis infectiva para el humano es de 500 a 800 bacterias, siendo este número detectable por la técnica. Con la aplicación de estas tecnologías modernas, se proporciona mayor seguridad en el consumo de alimentos cárnicos como es pollo, que frecuentemente están contaminados con este patógeno.

En cuanto a la identificación de la composición de ácidos grasos de *C. jejuni*, es necesario realizar más investigaciones con el patrón FAME37 o incluir dentro de este patrón, el ácido graso C19:0. Sin embargo, se deben realizar más pruebas comparativas, con otros géneros bacterianos y otras especies de *Campylobacter*.

11. REFERENCIAS

1. Allen KJ, Griffiths MW. Use of luminescent *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 to assess eggshell colonization and penetration in fresh and retail eggs. *J Food Protect* 2001;64(12):2058-2062.
2. Ang CW, De Klerk MA, Endtz HP, Jacobs BC, Laman JD, van der Meche FG, et al. Guillain-Barré syndrome- and Miller Fisher syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti-GM1 and anti-GQ1b antibodies in rabbits. *Infect Immun* 2001;69(4):2462-9.
3. Aquino MH, Carvalho AC, Tibana A, R. FM. *Campylobacter jejuni/coli*: Methodology of isolation and possible interfering factors in primary culture. *J Food Protect* 1996;59(4):429-432.
4. Baillon ML, van Vliet AH, Ketley JM, Constantinidou C, Penn CW. An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 1999;181(16):4798-4804.
5. Berrang ME, Buhr RJ, Cason JA, Dickens JA. Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. *J Food Protect* 2001;64(12):2063-2066.
6. Blaser MJ, Moss CN, Weaver RE. Cellular fatty acid composition of *Campylobacter fetus*. *J Clin Microbiol* 1980;11(5):448-451.
7. Bolton FJ, Sails AD, Fox AJ, Wareing DR, Greenway DL. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods by enrichment culture and polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay. *J Food Protect* 2002;65(5):760-767.
8. Broman T, Bergstrom S, On SL, Palmgren H, McCafferty DJ, Sellin M, et al. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from macaroni penguins (*Eudyptes chrysolophus*) in the subantarctic region. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(1):449-452.
9. Buswell CM, Herlihy YM, Lawrence LM, Mcguiggan JTM, Marsh PD, Keevil CW, et al. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(2):733-741.
10. Cappelier JM, Minet J, Magras C, Colwell RR, Federighi M. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(11):5154-5157.
11. Carvalho AC, Ruiz-Palacios GM, Ramos-Cervantes P, Cervantes LE, Jiang X, Pickering LK. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1353-1359.
12. Cloak OM, Fratamico PM. A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistance profiles. *J Food Protect* 2002;65(2):266-273.
13. Collins E, Glennon M, Hanley S, Murray AM, Cormican M, Smith T, et al. Evaluation of a PCR/DNA probe colorimetric membrane assay for identification of *Campylobacter* spp. in human stool specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39(11):4163-4165.
14. Curiale, M. <http://member.ync.net/mcuriale/mpn/index.html>. 03 de noviembre de 2006, 10:00 hrs.
15. Chan KF, Le Tran H, Kanenaka RY, Kathariou S. Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4°C). *Appl Environ Microbiol* 2001;67(9):4186-4191.
16. Damborg P, Katharina EPO, Møller NE, Guardabassi L. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *J Clin Microbiol*, 2004;42 3):1363-1364.

17. Dattilio FM, Castaldo JE. Differentiating symptoms of panic from relapse of Guillain Barré Syndrome. *Harvard Rev. Psychiatry* 2001;9(5):260-265.
18. Day WA, Jr., Sajecki JL, Pitts TM, Joens LA. Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival. *Infect Immun* 2000;68(11):6337-6345.
19. Desmonts MH, Dufour-Gesbert F, Avrain L, Kempf I. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from french broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. *J Antimicrob Chemoth* 2004;54(6):1025–1030
20. Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2001;39(1):14-23.
21. Dingle KE, Van Den Braak N, Colles FM, Price LJ, Woodward DL, Rodgers FG, et al. Sequence typing confirms that *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillain-Barré and Miller-Fisher syndromes are of diverse genetic lineage, serotype, and flagella type. *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3346-3349.
22. Eyigor A, Dawson KA, Langlois BE, Pickett CL. Cytolethal distending toxin genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates: detection and analysis by PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1646-1650.
23. Eyigor A, Dawson KA, Langlois BE, Pickett CL. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolated from chicken carcasses. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(4):1501-1505.
24. Fermer C, Engvall EO. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3370-3373
25. Fernández H, Farace MI. Manual de procedimientos. Diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas y de alimentos. Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. www.panalimentos.org/salmsarv/docs/manual/Manual/%20Campylobacter.pdf. 20 de octubre de 2006, 10:00 hrs.
26. Fry BN, Feng S, Chen YY, Newell DG, Coloe PJ, Korolik V. The *galE* gene of *Campylobacter jejuni* is involved in lipopolysaccharide synthesis and virulence. *Infect Immun* 2000;68(5):2594-2601.
27. Gaudreau C, Gilbert H. Antimicrobial resistance of clinical strains of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from 1985 to 1997 in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Ch* 1998;42(8):2106–2108.
28. Gibreel A, Kos VN, Keelan M, Trieber CA, Levesque S, Michaud S, et al. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents CH* 2005;49(7):2753–2759.
29. Gibreel A, Skold O. Sulfonamide resistance in clinical isolates of *Campylobacter jejuni*: mutational changes in the chromosomal dihydropteroate synthase. *Antimicrob Agents Ch* 1999;43(9):2156-2160.
30. Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA, Michielutti RE, Bixby A, Carroll SA, et al. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2000;68(12):6535-6541.
31. Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. Use of Nuclepore Filters for Counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* 1977;33(5):1225-1228.
32. Hopkins KL, Desai M, Frost JA, Stanley J, Logan JMJ. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing. *J Clin Microbiol* 2004;42(1):229–235.
33. IPGRI y Cornell University, 2003. www.ipgri.cgiar.org/training/Unit10-1/MolMarkers_es/PDF/VOL1/IV.3.pdf

34. Karlyshev AV, Everest P, Linton D, Cawthraw S, Newell DG, Wren BW. The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology* 2004;(150):1957–1964
35. Keramas G, Bang DD, Lund M, Madsen M, Bunkenborg H, Telleman P, Bo Voøge CC. Use of culture, PCR analysis, and DNA microarrays for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from chicken feces. *J Clin Microbiol* 2004;42(9):3985–3991.
36. Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PML, Horn ST, et al. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J Clin Microbiol* 2004;42(12): 5549–5557.
37. Konkel ME, Kim BJ, Klena JD, Young CR, Ziprin R. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1998;66(8):3666–3672.
38. Leonard EE, Tompkins LS, Falkow S, Nachamkin I. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates implicated in Guillain-Barre Syndrome and strains that cause enteritis by a DNA microarray. *Infect Immun* 2004;72(2): 1199–1203.
39. Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Melby KK, Kapperud G. Comparative fingerprinting analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains by amplified-fragment length polymorphism genotyping. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3379–3387.
40. Line JE, Stern NJ, Lattuada CP, Benson ST. Comparison of methods for recovery and enumeration of *Campylobacter* from freshly processed broilers. *J Food Prot* 2001;64(7):982–986.
41. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol* 1997;35(10):2568–2572.
42. Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. Comparison of broth microdilution, e test, and agar dilution. methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol*, 2003;41(3):1062–1068.
43. Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42, (11):5125–5132.
44. Michaud S, Me´nard S, Arbeit RD. Role of real-time molecular typing in the surveillance of *Campylobacter* enteritis and comparison of pulsed-field gel electrophoresis profiles from chicken and human isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43(3):1105–1111.
45. Misawa N, Mishu AB, Blaser MJ. Differentiation of *Campylobacter jejuni* serotype O19 strains from non-o19 strains by PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36(12):3567–3573.
46. Moen B, Oust A, Langsrud O, Dorrell N, Marsden GL, Hinds J, et al. Explorative multifactor approach for investigating global survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* under environmental conditions. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(4):2086–2094.
47. Morales EMR, Delgado SG, Cravioto A. El uso de microarreglos para estudiar la patogénesis de *Helicobacter pylori*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2003;45(1-2):24–29.
48. Nadeau E, Messier S, Quessy S. Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *J Food Protect* 2002;65(1):73–78.
49. Nakari UM, Laaksonen K, Korkeila M, Siitonen A. Comparative typing of *Campylobacter jejuni* by heat-stable serotyping and PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2005;43(3):1166–1170 .
50. NCBI. National Center for Biotechnology Information. [HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/taxonomy/wgetorg](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/taxonomy/wgetorg) 2001.
51. Nogva HK, Bergh A, Holck A, Rudi K. Application of the 59-nuclease pcr assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(9):4029–4036.

52. Oyarzabal OA, Macklin KS, Barbaree JM, Miller RS. Evaluation of agar plates for direct enumeration of *Campylobacter spp.* from poultry carcass rinses. *Appl Environ Microbiol*, 2005;71(6):3351–3354.
53. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 2000;403(6770):665-668.
54. Pearson AD, Greenwood MH, Donaldson J, Healing TD, Jones DM, Shahamat M, et al. Continuous source outbreak of campylobacteriosis traced to chicken. *J Food Protect* 2000;63(3):309-314.
55. PHLS. Public Health Laboratory Service (PHLS). (2001):[HTTP://www.phls.co.uk/facts/index.htm](http://www.phls.co.uk/facts/index.htm).
56. Poly F, Threadgill D, Stintzi A. Genomic diversity in *Campylobacter jejuni*: identification of *C. jejuni* 81-176-specific genes. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5): 2330–2338.
57. Purdy D, Cawthraw S, Dickinson JH, Newel DG, Park SF. Generation of a superoxide dismutase (SOD)-deficient mutant of *Campylobacter coli*: evidence for the significance of SOD in *Campylobacter* survival and colonization. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(6):2540–2546.
58. Quinones-Ramirez EI, Vazquez-Salinas C, Rodas-Suarez OR, Ramos-Flores MO, Rodríguez-Montano R. Frequency of isolation of *Campylobacter* from roasted chicken samples from México City. *J Food Protect* 2000;63(1):117-119.
59. Ramírez-Saad H, Akkermans WL, Akkermans ADL (1997). DNA Extraction from Actinorhizal Nodules. En: *Molecular Microbial Ecology Manual*, Chapter 1.4.4, pp 1-11. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
60. Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br Med J* 1981;(282):1584.
61. Rodríguez PM, Flores L, González A. Algunos aspectos de la epidemiología del síndrome de Guillain-Barré. *Acta Pediatr Mex* 1996;17(5):275.
62. Rudi K, Høidal HK, Katla T, Johansen BK, Nordal J, Jakobsen KS. Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(2):790–797.
63. Sahin O, Zhang Q, Meitzler JC, Harr BS, Morishita TY, Mohan R. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(9):3951-3957.
64. Sails AD, Fox AJ, Bolton FJ, Wareing DRA, Greenway DLA. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(3):1383–1390.
65. Salyers AA, Whitt DD. *Microbiology: diversity, disease and the environment*. 2ª. E.U. Ed. Offices. Fitzgerald Science Press Inc 2001
66. Sánchez MD, Busquet-García CM, Quirós-Viqueira O, Fernández. RD. Síndrome de Guillain-Barré: patogenia, diagnóstico y cuidados críticos en pediatría. *Rev Cubana Pediatr* 2001;73(2):95-105.
67. Smith JL. *Campylobacter jejuni* infection during pregnancy: long-term consequences of associated bacteremia, Guillain-Barré syndrome, and reactive arthritis. *J Food Protect* 2002;65(4):696-708.
68. Steele M, Marcone M, Gyles C, Chan VL, Odumeru J. Enzymatic activity of *Campylobacter jejuni* hippurate hydrolase. *Protein Eng* 2006;19(1):17–25.
69. Stern NJ, Fedorka-Cray P, Bailey JS, Cox NA, Craven SE, Hiatt KL, et al. Distribution of *Campylobacter spp.* in selected U.S. poultry production and processing operations. *J Food Protect* 2001;64(11):1705-1710.

70. Stintzi A, Marlow D, Palyada K, Naikare H, Panciera R, Whitworth L, et al. Use of genome-wide expression profiling and mutagenesis to study the intestinal lifestyle of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 2005;73(3):1797–1810.
71. Takahashi M, Koga M, Yokoyama K, Yuki N. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barre´ and Fisher Syndromes in Japan. *J Clin Microbiol* 2005;43(1):335–339.
72. Tenover FC, Fennell CL. The genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Ballows A, Schlegel HG editors. *The Prokaryotes*, New York, Ed. Springer-Verlag, 1991:3488-3511.
73. Thies FL, Karch H, Hartung HP, Giegerich G. Cloning and expression of the dnaK gene of *Campylobacter jejuni* and antigenicity of heat shock protein 70. *Infect Immun* 1999;67(3):1194-1200.
74. Thunberg RL, Tran TT, Walderhaug MO. Detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in blood-free enriched samples of inoculated foods by the polymerase chain reaction. *J Food Protect* 2000;63(3):299-303.
75. Trudy MW. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(3):466–476.
76. Trudy MW, Newell DG. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(1):1–9.
77. Vanniasinkam T, Lanser JA, Barton MD. PCR for the detection of *Campylobacter* spp. in clinical specimens. *Letters Appl Microbiol* 1999(28):52-56.
78. Waage AS, Vardund T, Lund V, Kapperud G. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(4):1636–1643.
79. Wallace DJ, Van-Gilder T, Shallow S, Fiorentino T, Segler SD, Smith KE, et al. Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. FoodNet Working Group. *J Food Protect* 2000;63(6):807-809.
80. Waller DF, Ogata SA. Quantitative immunocapture PCR assay for detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(9):4115–4118.
81. Wang H, Boyle E, Farber J. Rapid and specific enzyme immunoassay on hydrophobic grid membrane filter for detection and enumeration of thermophilic *Campylobacter* spp. from milk and chicken rinses. *J Food Protect* 2000;63(4):489-494.
82. Weinberg ED. Re: Incidence of Guillain-Barre syndrome following infection with *Campylobacter jejuni*. *Am J Epidemiol* 2001;154(6):590.
83. Wesley IV, Wells SJ, Harmon KM, Green A, Schroeder-Tucker L, Glover M, et al. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(5):1994-2000.
84. Willis WL, Murray AM. *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. *Poultry Sci* 1997;(76):314-317.
85. Wilson DL, Abner SR, Newman TC, Mansfield LS, Linz JE. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):3971-3978.
86. Wolffs P, Norling B, Hoorfar J, Griffiths M, Rådström P. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken rinse samples by using flotation prior to real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(10):5759–5764.
87. Workman NS, Mathison GE, Lavoie MC. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. *J Clin Microbiol* 2005; 43(6):2642–2650.
88. Yang-Chih SD. Isolation and identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from chicken samples in Taipei. *J Food Protect* 2000;63(3):304-308.
89. Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka Y, Hirata Y, et al. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre´ syndrome. *Immunology* 2004;101(31):11405-11409.

90. Zhao C, Ge B, De Villena J, Sudler R, Yeh E, Zhao S, et al. 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* 2001;67(12):5431-5436.
91. Zirnstein G, Li Y, Swaminathan B, Angulo F. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3276–3280.
92. G. Díaz-González, R. Gutiérrez, N. Pérez, S. Vega y León, M. González, G. Prado, G. Urbán, A. Ramírez y M. Pinto. Detección de adulteraciones en la grasa de leche Pasteurizada Mexicana. *Revista de Salud Animal* 2004;24(1):54-59.

12. ANEXO

12.1. Preparación de medios de cultivo

Agar campylobacter libre de sangre.

	g/l
Caldo nutritivo	225.0
Carbón bacteriológico	4.0
Hidrolizado de caseína	3.0
Desoxicolato sódico	1.0
Sulfato ferroso	0.25
Piruvato sódico	0.25
Agar	12.0
pH	7.4

Suspender 22.75 g de agar base *Campylobacter* sin sangre en 500 ml de agua destilada, llevar a ebullición hasta disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar asépticamente un vial de CCDA suplemento selectivo (SR-155) previamente reconstituido con 2 ml de agua destilada estéril.

Agar de hierro y triple azúcar (TSI)

	g/l
Mezcla de peptonas	20.0
Cloruro de sodio	3.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Dextrosa	1.0
Sulfato de amonio férrico	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Rojo fenol	0.025
Agar	13.0
pH final	7.3

Suspender 59.4 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2.0 cm.

Agar sangre

	g/l
Infusión de músculo cardíaco	2.0
Caseína digerida por enzimas	

pancreáticas	13.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH	7.3

Suspender 40 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar reposar entre 5 y 10 minutos. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 20 minutos. Enfriar a 45°C y adicionar 10% de sangre de carnero desfibrinada estéril.

Agar Campylobacter con 10% de sangre de carnero y 5 antibióticos (BD-BBL)

Fórmula por 1,000 ml de agua destilada	
Peptona de caseína	10.0 g
Peptona de carne	10.0 g
Dextrosa	1.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Bisulfito de sodio	0.1 g
Agar	15.0 mg
Amfotericina B	2.0 mg
Cafalotina	15.0 mg
Trimetropin	5.0 mg
Vancomicina	10.0 mg
Polimixina B	2,500 U
Sangre de carnero	100 ml

Caldo de infusión de cerebro y corazón

	g/l
Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión de corazón de res	250.0
Mezcla de peptonas	10.0
Fosfato dipotásico	2.5
Cloruro de sodio	5.0
Dextrosa	2.0

Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos.

Medio para tolerancia de cloruro de sodio al 3.5%

	g/l
Infusión de músculo cardíaco	2.0
Caseína digerida por enzimas pancreáticas	13.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH	7.3

Suspender 40 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar reposar entre 5 y 10 minutos. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 20 minutos. Enfriar a 45°C, adicionar 10% de sangre de carnero estéril y adicionar 3.5% de NaCl por litro de agar sangre.

Medio para tolerancia en 2,3,5 cloruro trifeniltetrazolium (TTC)

	g/l
Infusión de músculo cardíaco	2.0
Caseína digerida por enzimas pancreáticas	13.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH	7.3

Suspender 40 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar reposar entre 5 y 10 minutos. Hervir durante un minuto. Adicionar 0.4 g de TTC por litro de agar sangre. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 20 minutos. Enfriar a 45°C y adicionar 10% de sangre de carnero estéril.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *C. jejuni*

Medio de cultivo	Composición para 1000 ml
Campy-Bap (Blaser)	Agar Brucella (43 g). Sangre 50 ml Vancomicina (10 mg), trimetopim (5 mg) y polimixina B 2500 U. I., anfotericina 2 mg, cefalotina 15 mg.
Medio de Skirrow	Agar Brucella (43 g) Vancomicina (10 mg), trimetopim (5 mg) y polimixina B 2500 U. I.
Medio de Skirrow modificado	Agar Brucella (43g), suplemento FBP: sulfato ferroso (0.5 g), metabisulfito de Na (0.5 g), piruvato de sodio (0.5 g), Sangre (50 ml). Vancomicina (10 mg), trimetopim (5 mg) y polimixina B 2500 U. I., cefalotina 10 mg
Medio Butzler	Caldo tioglicolato (30 g), agar base (12 g). Sangre (150 g) Bacitracina 25000 U.I., novobiocina (5 mg), cicloheximina (50 mg), colistina 10000 U.I.
Medio Campy-Cefex	Agar Brucella (43 g), sulfato ferroso (0.5 g), bisulfito de sodio (0.2 g), piruvato de sodio (0.5 g), agua desionizada (1) Sangre de caballo (50 ml) Cefoperazona (33 mg), cicloheximida (0.2 g)
mCampy-Cefex	Agar Brucella (43g), sulfato ferroso (0.5 g), bisulfito de sodio (0.2 g), piruvato de sodio (0.5 g). Sangre de caballo lisada (50 ml) Cefoperazona (33 mg), Amfotericina B (2 mg)
Agar cerebro corazón	Infusión de cerebro y corazón con o sin sangre de carnero (10%)
CAMPY	Agar Brucella (43 g), sulfato ferroso (0.25 g), piruvato de sodio (0.25 g), metabisulfito de sodio (0.25 g). Sangre de caballo lisada (70 ml) Polimixina B sulfato (1 mg), trimetoprim (0.01g), vancomicina (0.01 g), anfotericina B (2 mg), novobiocina (0.05 g), (0.25 g), sulfato ferroso (0.25 g)
MCCDA,	Caldo nutritivo No. 2 (25 g), carbón bacteriológico (4g), caseína

Medio CDC (Agar libre de sangre)	hidrolizada (3 g), desoxicolato de sodio (1 g), sulfato ferroso (0.25 g), piruvato de sodio (0.25 g), agar (12 g). Cefoperazona (32 mg), anfotericina B (10 mg).
Karmali	Agar base columbia (39 g), carbón activado (4 g), hemin (0.032 g), piruvato de sodio (100 mg). Cefoperazona (32 mg), vancomicin (20 mg), cicloheximida (100 mg).
Campy-Line	Agar Brucella (43 g), sulfato ferroso (0.5 g), Bisulfito de sodio (0.2 g), piruvato de sodio (0.5 g), alfa-ácido cetoglutarico (1 g), carbonato de sodio (0.6 g), Hemin (10 mg). Sulfato de polimixina B (0.35 mg), trimetoprima (5 mg), vancomicin (10 mg), cicloheximida (100 mg), cefoperazona (33 mg), cloruro de trifeniltetrazolium (200 mg)
Preston	Caldo nutritivo No. 2 2.5 g, agar base 12 g. Sangre 50 ml. Polimixina B 2500 U.I., trimetroprim 10 mg, actidiona 100 mg, rimfampicina 10 mg,

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la técnica RAPD

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Gran poder de resolución ✓ Los cebadores arbitrarios se adquieren fácilmente, y no requieren de información inicial de tipo genético o genómico ✓ Se requieren cantidades diminutas del DNA patrón ✓ Los costos unitarios por ensayo son bajos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Falta de conocimiento sobre la identidad de los productos de la amplificación ✓ Problemas de reproducibilidad ✓ Problemas por co-migración

Tomado de IPGRI y Cornell University, 2003

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la técnica AFLP

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Permite una exploración rápida de los polimorfismos del genoma entero. ✓ Son altamente reproducibles ✓ No se necesita información previa de las secuencias ni hay que generar sondas de hibridación. ✓ Es una técnica muy útil para crear mapas genéticos en forma rápida. ✓ Permiten la generación de “perfiles de transcripción”. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Los AFLP generan cantidades enormes de información, por lo que puede requerir un análisis automatizado y, por consiguiente, tecnología de computación adecuada. ✓ Son laboriosos en el laboratorio y, especialmente, en el análisis de los datos.

Tomado de IPGRI y Cornell University, 2003

Tabla 4. Ventajas y desventajas de la técnica RFLP

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Metodología sumamente sólida y muy transferible entre laboratorios. ✓ No se requiere información acerca de la secuencia del DNA. ✓ Muy recomendables para el análisis filogenético de especies emparentadas porque se basan en la homología de las secuencias. ✓ Adecuado para construir mapas de ligamiento genético. ✓ Poder discriminatorio: tanto a nivel de especie o de población (sondas de copia única) como a nivel de individuo (sondas de copia múltiple). ✓ Simplicidad: si se dispone de sondas adecuadas,. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Requiere cantidades muy grandes de DNA. ✓ No permite la automatización. ✓ Bajos niveles de polimorfismo en algunas especies. ✓ Se necesita disponer de una genoteca de sondas apropiadas. ✓ Lento, especialmente con sondas de copia única. ✓ Costoso. ✓ Requiere la distribución de sondas a los laboratorios colaboradores. ✓ Tiene exigencias técnicas moderadas, aun cuando se usen sondas radiactivas ✓ Pueden necesitar diferentes combinaciones de sonda/enzima.

Tomado de IPGRI y Cornell University, 2003

Tabla 5. Ventajas y desventajas de la técnica PCR

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se requiere de muestras muy pequeñas de DNA ✓ El producto se puede utilizar para clonar, secuenciar y análisis. ✓ Se puede amplificar DNA de cualquier organismo vivo o muerto. ✓ Sus aplicaciones son múltiples: medicina forense, diagnósticos, análisis prenatales, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se puede amplificar solamente partes del genoma de las que se conoce por lo menos una mínima secuencia de 20 – 40 pb. ✓ Se necesitan iniciadores específicos que sean complementarios al fragmento que se desea sintetizar. ✓ La polimerasa puede tener errores al amplificar el DNA ✓ Puede producir falsos positivos por DNA contaminante.

Tabla 6. Iniciadores utilizados para la identificación molecular de *C. jejuni*

Iniciadores	Especificidad	Secuencia	pb	Ref.
C-1	<i>Campylobacter jejuni</i> (gen desconocido)	5' CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT 3' 5' GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT 3'	160	12
B04263 BO4264	<i>Campylobacter</i> especies <i>jejuni</i> , <i>coli</i> y <i>upsaliensis</i>	5' AGAACACGCGGACCTATATA 3' 5' CGATGCATCCAGGAATGTAT 3'	256	90
HIP400F HIP1134R	<i>Campylobacter jejuni</i>	5' GAAGAGGGTTTGGGTGGTG 3' 5'AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG 3'	735	90
MW1 MW2	Gen 16SrRNA de <i>C.</i> <i>jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> y <i>C. upsaliensis</i>	5' ACACTGGAAGTGGAGACAC 3' 5' TCGAGTGAAATCAACTCC 3'	1.1 kb	75
galE1 wlaH3	Genes LOS de <i>C.</i> <i>jejuni</i>	5' GCGGTGGTGCAGGTTATATAGG3' 5' TCAGTTCTTGCCATTAATTTCTC3'	9.6 kb	50
CJ20 CJ21	Genes que codifican para proteínas L4 y L24	5' TCCGGTTTATATTAAGTAA 3' 5' CTTTAGTTGGAACCATCTTG 3'	800 600	28
CJ18 CJ19	Genes que codifican para proteínas L4 y L24	5' GAAGTTGTATCTTATGATGCTGAAAA 3' 5' TAACTACGACACCTTGCTCTTG 3'	800 600	28
CCJ609F CCJ1442R	Gen 16SrRNA de <i>C.</i> <i>jejuni</i> , <i>C. coli</i> ,	5' AATCTAATGGCTTAACCATTA 3' 5'GTAAGTAGTTTAGTATTCCGG 3'	854	41
CF03 CF02	Genes <i>flaA</i> y <i>flaB</i> de <i>C.</i> <i>jejuni</i>	5' GCTCAAAGTGGTCTTATGCATG 3' 5' AAGCAAGAA GTGTTCCAAGTTT 3'	180 a 220	78

Tabla 7. Composición de los componentes Supelco 37 FAME Mix

	Componentes (ésteres metílicos)	Peso (%)
1	C4:0 (Butírico)	4
2	C6:0 (Caproico)	4
3	C8:0 (Caprílico)	4
4	C10:0 (Cáprico)	4
5	C11:0 (Undecanoico)	2
6	C12:0 (Laurico)	4
7	C13:0 (Tridecanoico)	2
8	C14:0 (Mirístico)	4
9	C14:1 (Miristoleico)	2
10	C15:0 (Pentadecanoico)	2
11	C15:1 (cis-10-Pentadecenoico)	2
12	C16:0 (Palmítico)	6
13	C16:1 (Palmitoleico)	2
14	C17:0 (Heptadecanoico)	2
15	C17:1 (cis-10-Heptadecenoico)	2
16	C18:0 (Estearico)	4
17	C18:1n9c (Oleico)	4
18	C18:1n9t (Elaidico)	2
19	C18:2n6c (Linoleico)	2
20	C18:2n6t (Linolelaidico)	2
21	C18:3n6 (g-Linolenico)	2
22	C18:3n3 (a-Linolenico)	2
23	C20:0 (Araquidico)	4
24	C20:1n9 (cis-11-Eicosenoico)	2
25	C20:2 (cis-11,14-Eicosadienoico)	2
26	C20:3n6 (cis-8,11,14-Eicosatrienoico)	2
27	C20:3n3 (cis-11,14,17-Eicosatrienoico)	2
28	C20:4n6 (Araquidónico)	2
29	C20:5n3 (cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico)	2
30	C21:0 (Henicosanoico)	2
31	C22:0 (Behenico)	4
32	C22:1n9 (Erucico)	2
33	C22:2 (cis-13,16-Docosadienoico)	2
34	C22:6n3 (cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico)	2
35	C23:0 (Tricosanoico)	2
36	C24:0 (Lignocerico)	4
37	C24:1n9 (Nervonico)	2

Tabla 8. Pruebas bioquímicas y morfológicas para la identificación del género bacterian

	Catalasa	H ₂ S	Hidrólisis de hipurato	Ureasa	Reducción de nitrato	Tolerancia 25°C	Tolerancia 42°C	Tolerancia 1% glicina	Tolerancia 3.5% de NaCl
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	V	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. coli</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>C. laridi</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>C. upsaliensis</i>	-	-	-	-	+	-	+	V	-
<i>C. cinaedi</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>C. fenelliae</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	-	-	-	+	+	V	+	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>veneralis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	-	-	+	V	+	+	-
<i>C. concisus</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>C. mucosalis</i>	-	+	-	-	+	+	+	V	-
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>C. sputorum</i> Biovar <i>Bubulus</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>C. Sputorum</i> biovar <i>faecalis</i>	+	-	-	+	+	-	+	V	-

Ref. (72)

V= reacción variable. R= resistente. S= sensible. NR= no reportado. Nal 30= 30 µg de ácido nalidíxico. CF= 30

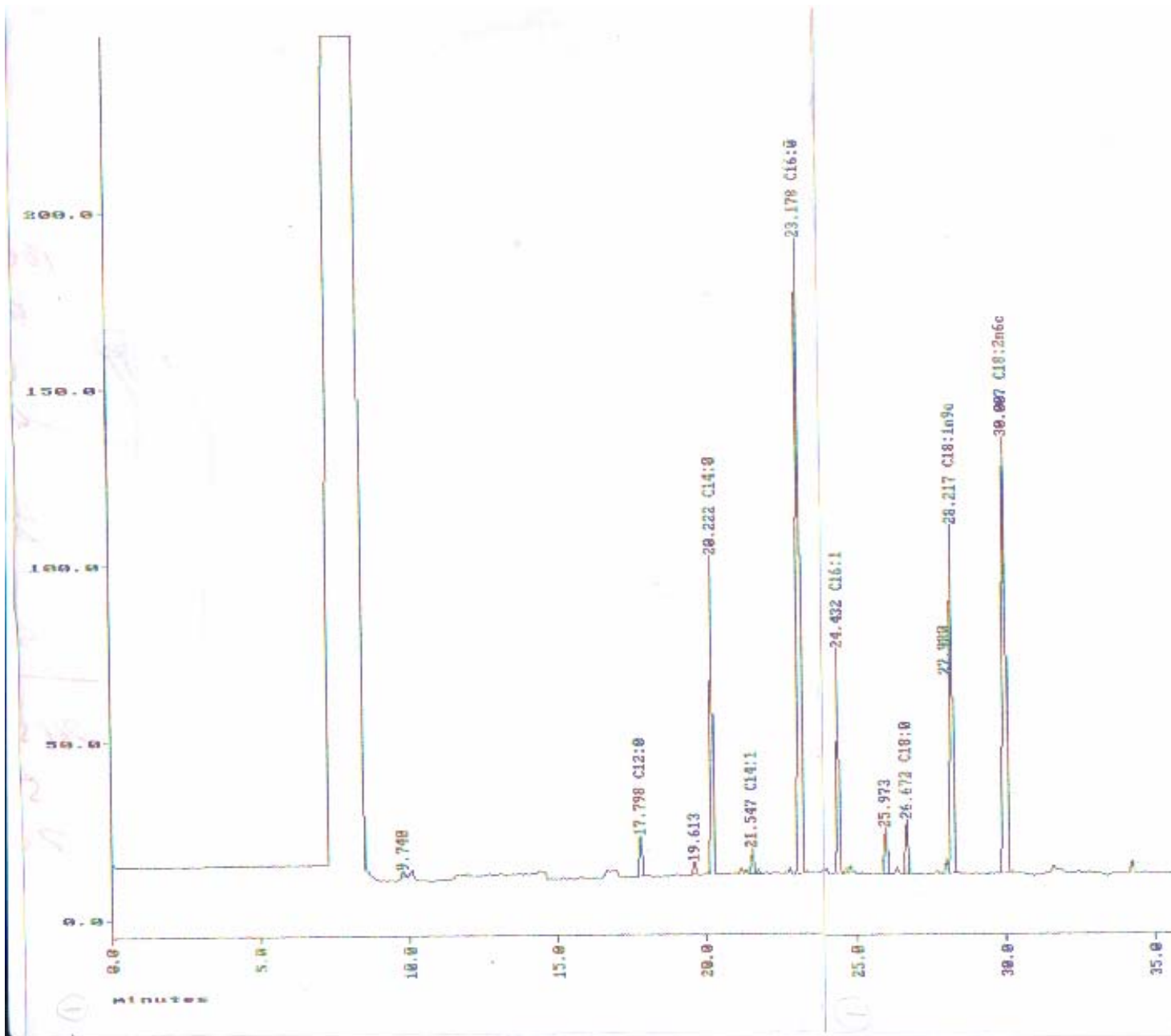


Figura 1. Cromatograma de los ácidos grasos de la cepa ATCC 33291

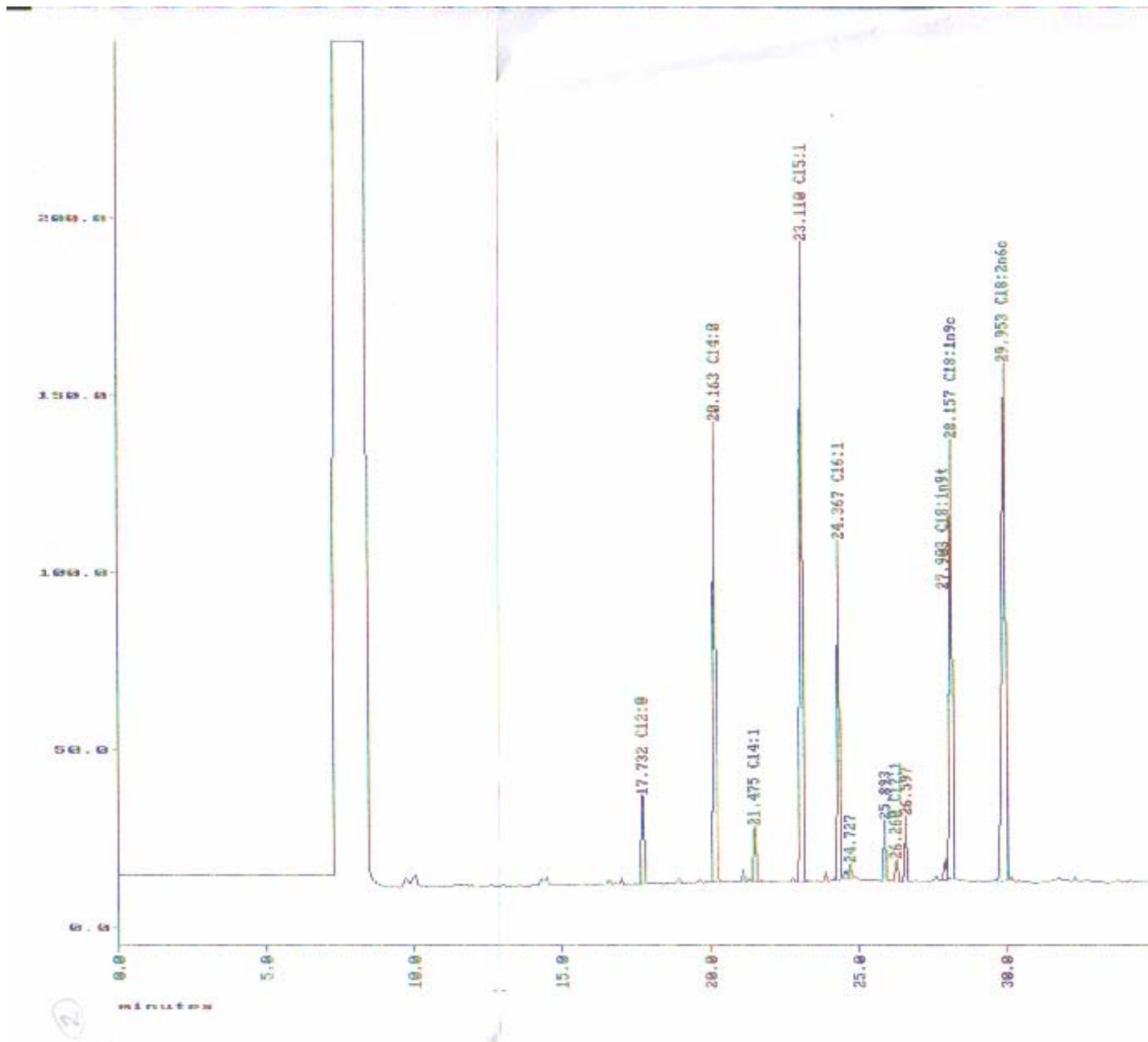


Figura 2. Cromatograma de los ácidos grasos de la Cepa ATCC 33291

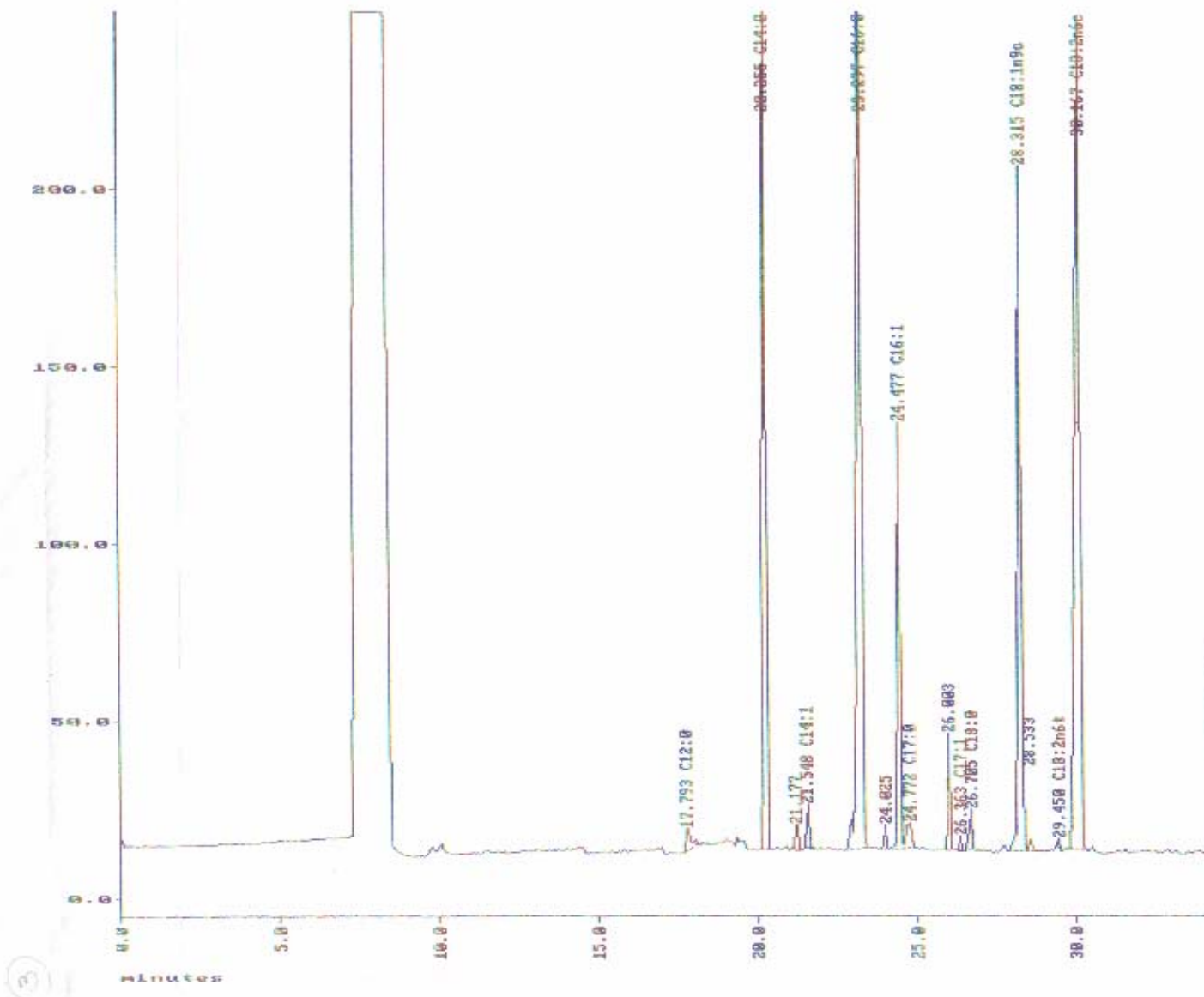


Figura 3. Cromatograma de los ácidos grasos de la Cepa 1

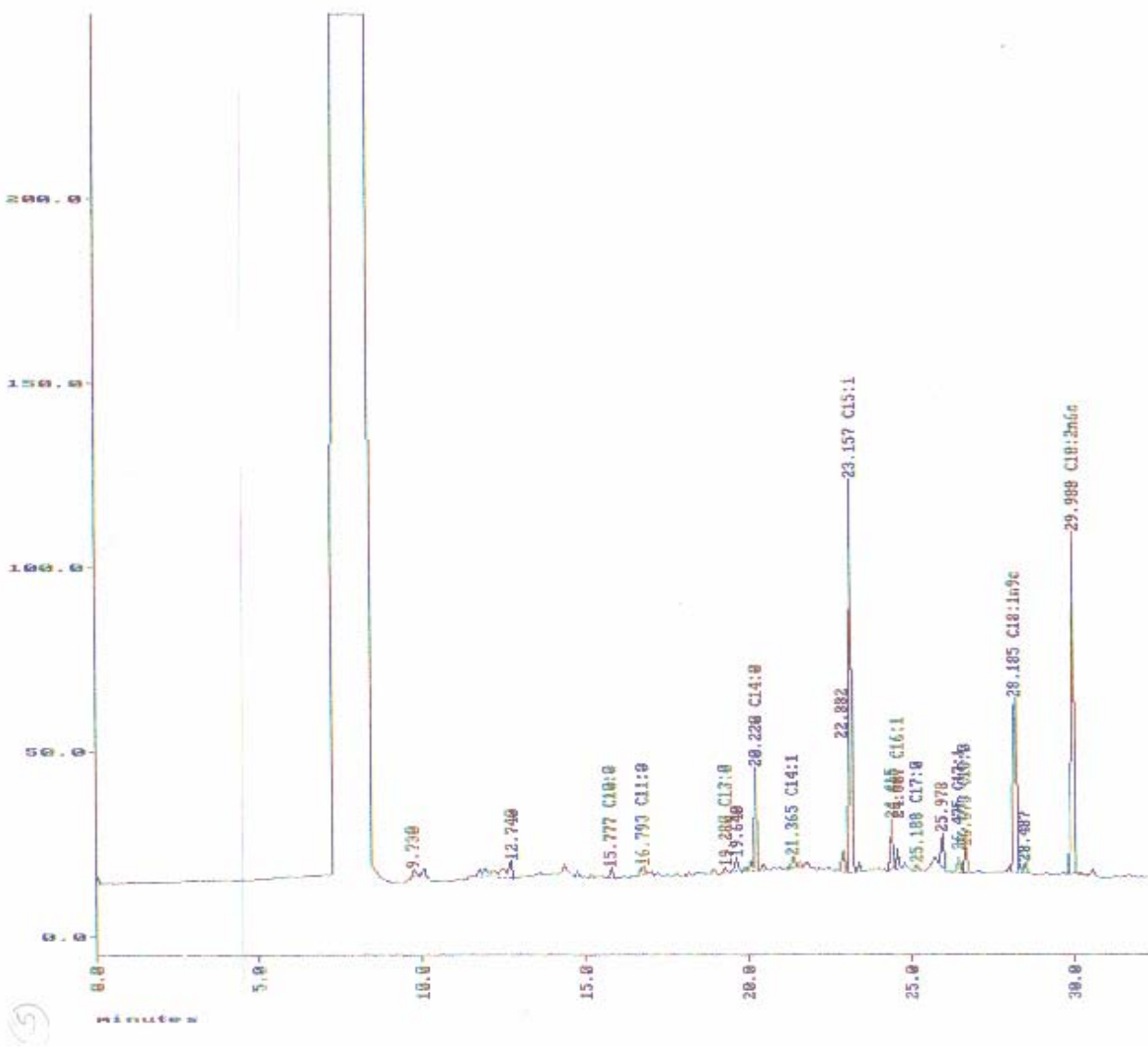


Figura 4. Cromatograma de los ácidos grasos de la Cepa 2

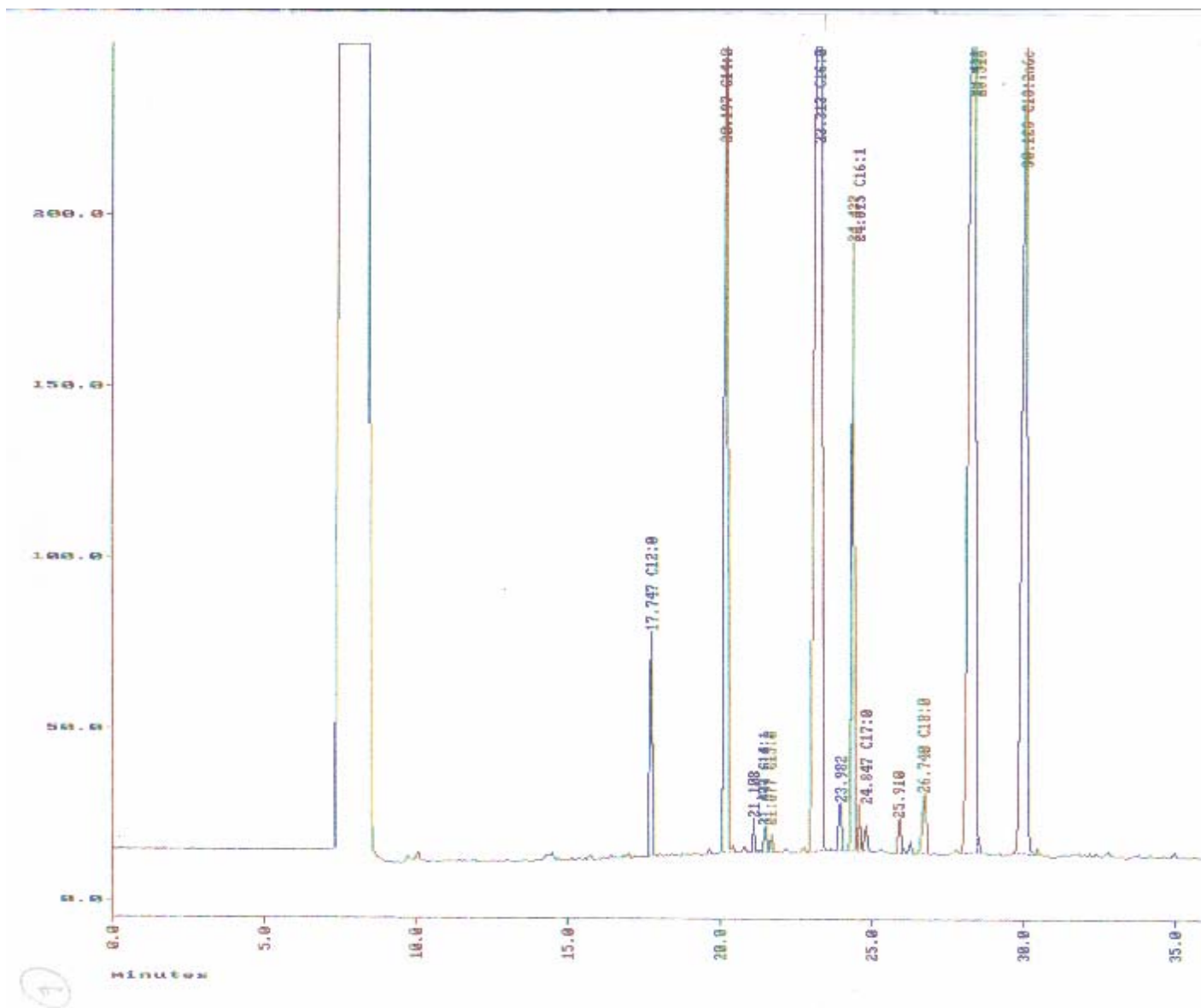


Figura 5. Cromatograma de los ácidos grasos de la Cepa 4

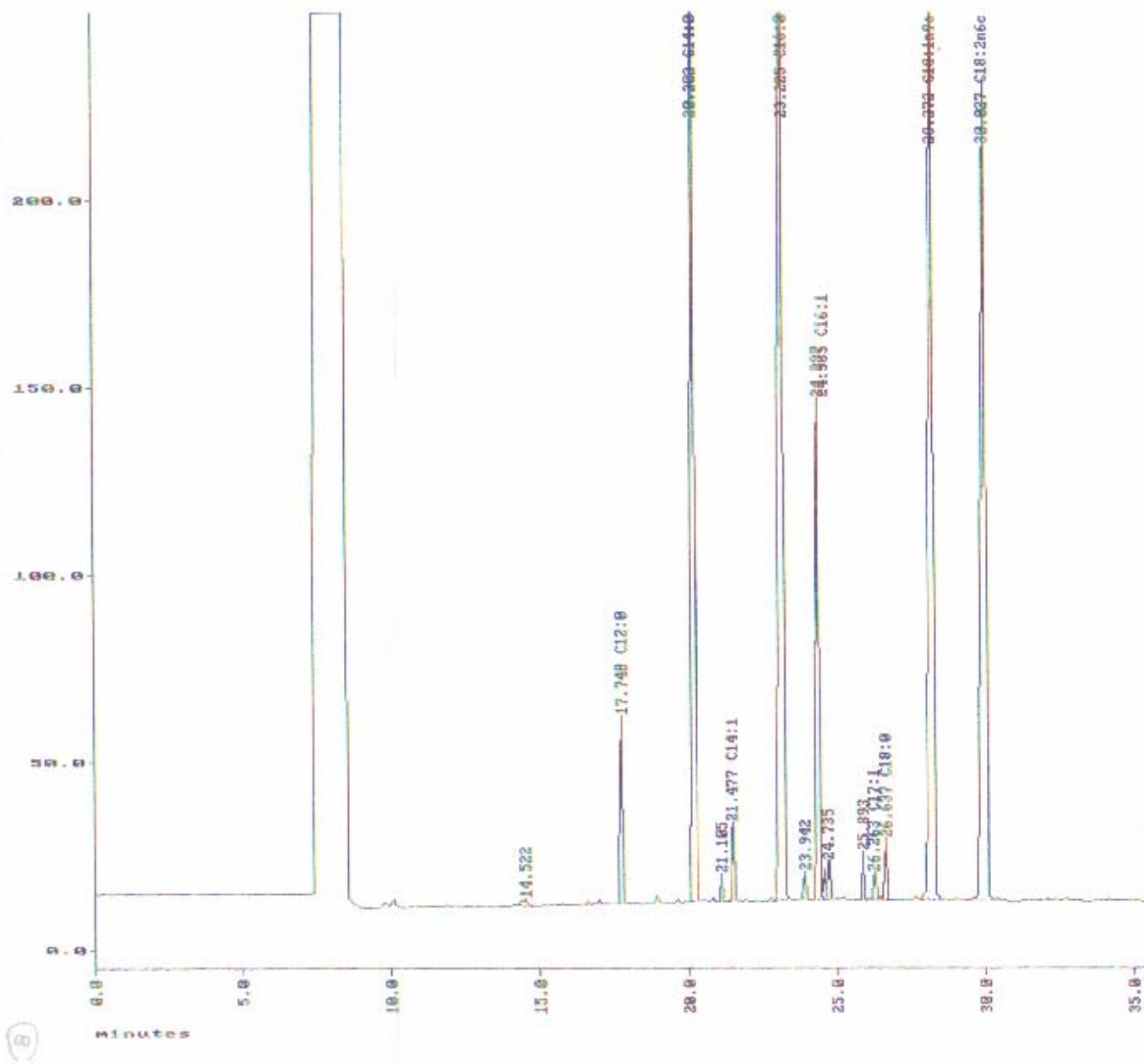


Figura 6. Cromatograma de los ácidos grasos de la Cepa 11

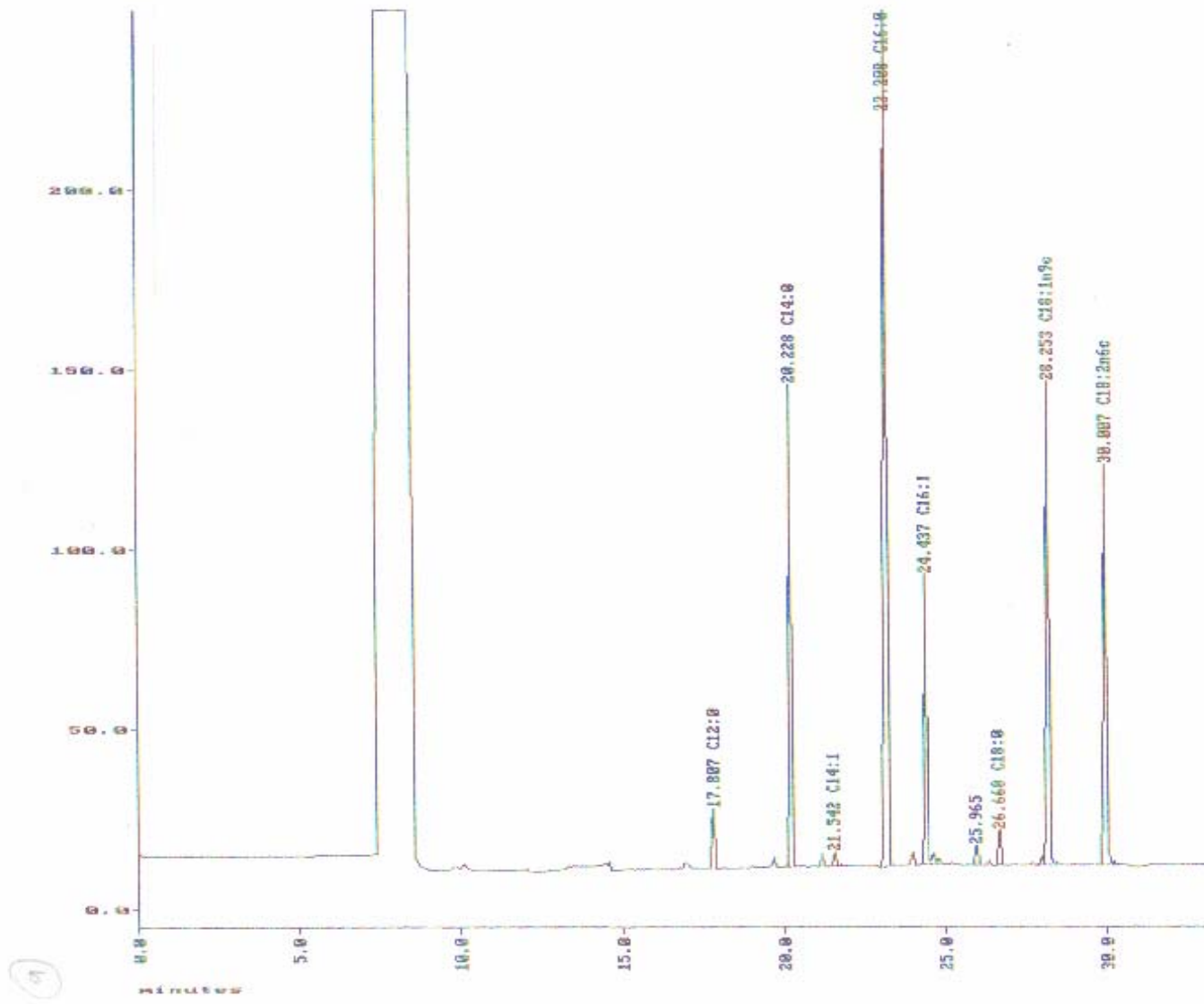


Figura 7. Cromatograma de los ácidos grasos de la Ceba 17

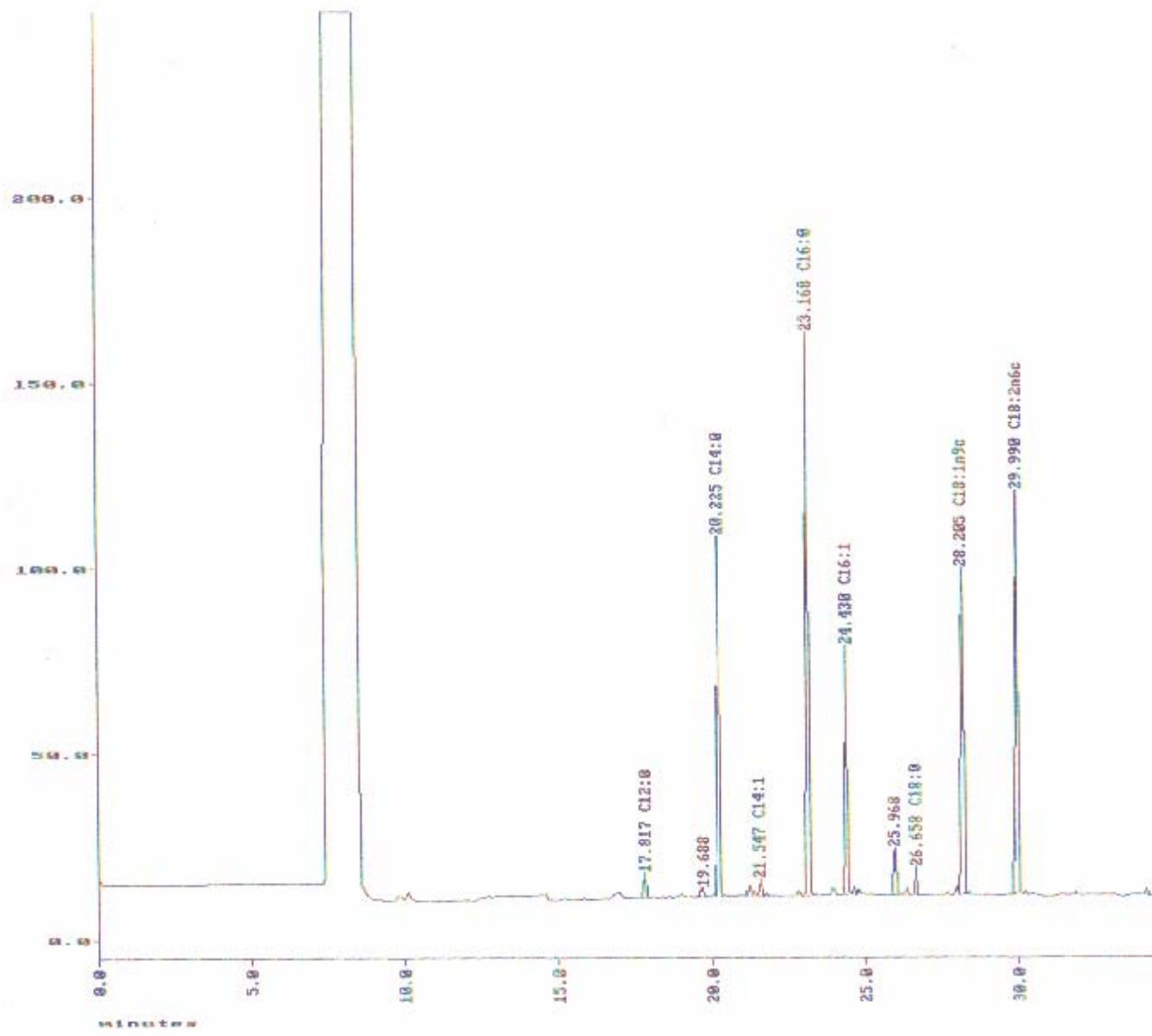


Figura 8. Cromatograma de los ácidos grasos de la Cepa 21

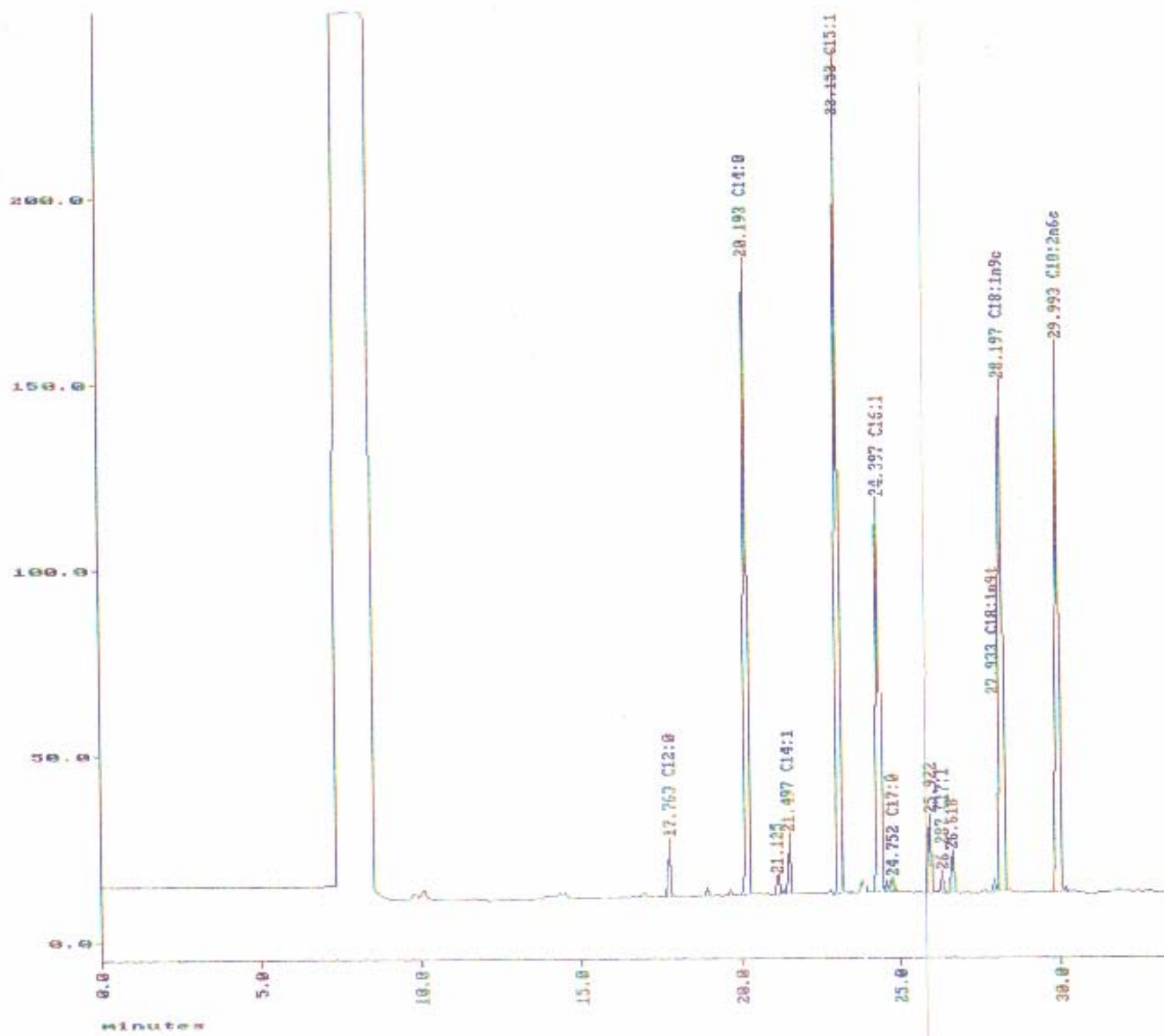


Figura 9. Cromatograma de los ácidos grasos de la Cepa 22

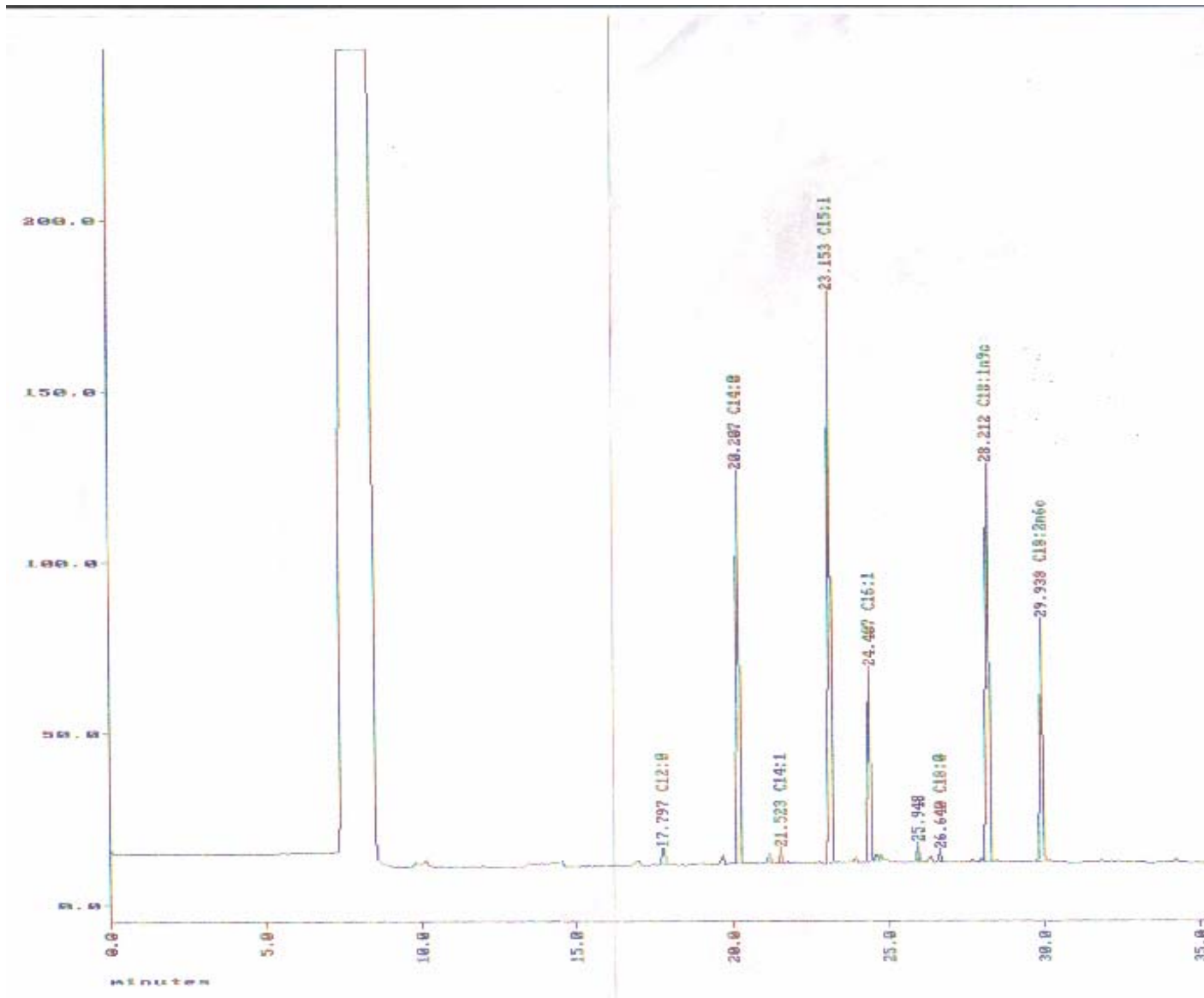


Figura 10. Cromatograma de los ácidos grasos de la Cepa 24