



**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Diagnóstico y caracterización genética de  
*Campylobacter* en materia fecal de animales  
domésticos y silvestres de la región**

***Maila Sabrina Barcellos Coitiño***

*Orientadora: Dra. Lucía Calleros*

*Co-orientador: Dr. Ruben Pérez*

*Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias.  
Universidad de la República.*

*Montevideo*

*Abril, 2018*

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2-1 Clasificación taxonómica del género <i>Campylobacter</i> .....	2
2-2 Características fenotípicas del género <i>Campylobacter</i> .....	11
2-3 Características del genoma .....	12
2-4 Clasificación de especies bacterianas.....	13
2-5 Uso de materia fecal e identificación de especies de <i>Campylobacter</i> .....	14
2-6 Ecología, epidemiología e importancia sanitaria .....	17
3. OBJETIVOS .....	20
3-1 General.....	20
3-2 Específicos.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
4-1 Estrategia general.....	21
4-2 Muestras.....	21
4-3 Estandarización de metodologías .....	23
4-4 Aplicación de las herramientas moleculares en las muestras de campo.....	26
4-5 Secuenciación .....	26
4-6 Análisis bioinformáticos .....	27
5. RESULTADOS .....	29
5-1 Estandarización de metodologías .....	29
5-2 Aplicación de las herramientas moleculares en las muestras de campo.....	32
5-2-1 Control de integridad .....	32

5-2-2 Detección de bacterias del género <i>Campylobacter</i> .....	33
5-3 Análisis de secuencias.....	37
5-4 Análisis filogenéticos y distancias nucleotídicas .....	38
6. DISCUSIÓN.....	41
6-1 Estandarización de metodologías .....	41
6-2 Diagnóstico del género <i>Campylobacter</i> .....	42
6-3 Detección de especies del género <i>Campylobacter</i> .....	47
6-4 Animales domésticos y silvestres como hospederos del género <i>Campylobacter</i> y su rol zoonótico.....	49
7. CONCLUSIONES.....	51
8. PERSPECTIVAS .....	52
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXO A: Tabla de muestras de materia fecal de perros analizadas en este trabajo.....	67
ANEXO B: Tabla de muestras de materia fecal de reptiles analizadas en este trabajo.....	78
ANEXO C: Protocolos de extracción y purificación.....	81
ANEXO D: Condiciones de reacción y de ciclado para la amplificación del gen 16S de bacterias y arqueas.....	83
ANEXO E: Condiciones de reacción y de ciclado para la amplificación del gen 16S del género <i>Campylobacter</i> .....	84
ANEXO F: Secuencias obtenidas de la base de datos utilizadas en este trabajo.	86
ANEXO G: Alineamiento nucleotídico de un fragmento de 648 pb del gen 16S de <i>Campylobacter</i> de las 16 secuencias que agrupan junto a <i>C. avium</i> , <i>C.</i> <i>troglydytis</i> y <i>C. upsaliensis</i> .....	88

*A mis padres...*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi padre Valter, que ya no está, y a mi madre Gladys, por preocuparse por mí siempre, enseñarme sus valores, entenderme y apoyarme cuando cambié de carrera.

A los demás integrantes de mi familia, en especial a mi hermana Betty, y a mi sobrina Alexia, por estar al tanto de mis actividades y rezar por mí antes de los exámenes.

A mi novio y compañero Ismael por acompañarme en todo el camino, aguantar mi mal humor cuando las cosas no salían bien y festejar mis victorias.

A Lucía, por su propuesta de tesis, por orientarme en este trabajo, transmitirme sus conocimientos y por la paciencia infinita.

A Ruben Pérez, por permitirme realizar la pasantía en el laboratorio, ayudarme con la parte estadística del trabajo y por la corrección de la tesina.

A Yanina Panzera, por su crítica lectura de la tesina y sus pequeños cambios que hicieron grandes diferencias.

A Rafael Delpiazzo, por aceptar formar parte del tribunal y darnos su punto de vista veterinario a la corrección del trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Genética Evolutiva que forman un gran equipo, por el apoyo, el compañerismo y porque de cada uno aprendí algo.

A Nacho por recibirnos en su reptilario y permitirnos realizar el muestreo y a Melitta por la dedicación de tomar y guardarnos muestras de sus bichos.

A mis compañeras de la farmacia del hospital de la Fvet, Pili y Gabi, por escucharme, respetar el silencio cuando tenía que escribir y cubrirme cuando me pedía el día por estudio.

A todos mis amigos y compañeros de la facultad, quienes hicieron que este camino fuera una gran aventura.

A mis perritas y a los que ya tuve, porque sin saberlo son la alegría de mi vida y fueron mi inspiración en este trabajo.

Sin todos ellos, este trabajo hubiese sido imposible. MUCHAS GRACIAS!

## ABREVIATURAS

16S: ARN ribosomal 16S

°C: grados Celsius

atpA: Subunidad alfa de la ATP sintasa

ATPasa: Adenosintrifosfatasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

*C.*: *Campylobacter*

*cstA*: carbon starvation protein

CPV: Parvovirus canino

EF-Tu: Factor de elongación termosensible

Mb: megabases

mg: miligramos

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

μL: microlitros

## 1. RESUMEN

Las especies del género *Campylobacter* tienen gran importancia en la salud humana y animal, ya que son agentes de zoonosis por contacto con animales infectados o con su materia fecal, denominadas genéricamente como campylobacteriosis. En humanos, las especies más frecuentes son *C. coli* y *C. jejuni*. Con respecto a animales, los perros domésticos pueden portar varias especies de *Campylobacter* que incrementan su proliferación en casos de diarreas. En reptiles *Campylobacter fetus subsp. testudinum* es relevante por causar infecciones en humanos. En este trabajo se analizó la presencia de *Campylobacter* en materia fecal de perros y reptiles sudamericanos. Se estandarizó una PCR de control de integridad del ADN mediante amplificación de 507 pb del gen *16S* de bacterias y arqueas. Se puso a punto una metodología para el diagnóstico del género *Campylobacter* mediante la amplificación por PCR de 816 pb del gen *16S*. Los amplicones se secuenciaron para la identificación de especies. Se analizaron 211 muestras de perros sanos y enfermos y 78 de reptiles. En perros, se encontró una prevalencia del 38% en animales con diarrea causada por parvovirus canino (CPV), un 21% en casos de diarrea sin agente causante conocido y no se encontraron casos positivos en individuos sanos. De 18 amplicones secuenciados 16 correspondieron a *C. upsaliensis* (88,9%) y 2 se agrupan con *C. jejuni* y *C.coli* (11,1%). En reptiles sólo una muestra fue positiva y perteneció a *C. iguaniorum*. Estos resultados confirman la presencia de *Campylobacter* en estos reservorios y la necesidad de continuar con el análisis para aportar al conocimiento del género.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2-1 Clasificación taxonómica del género *Campylobacter*

El género *Campylobacter* es un grupo de bacterias gram negativas pertenecientes al filum *Proteobacteria* (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Campylobacter*.**

Dominio	Bacteria
Filum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Epsilonproteobacteria</i>
Orden	<i>Campylobacterales</i>
Familia	<i>Campylobacteraceae</i>
Género	<i>Campylobacter</i>

Dentro del dominio Bacteria, las proteobacterias son el grupo más grande y diverso. Son de gran importancia biológica ya que incluyen a la mayoría de las bacterias gram negativas de interés médico, veterinario, industrial y en la agricultura (Kersters et al. 2006). Varios representantes del filum juegan roles clave en los ciclos del carbono, azufre e hidrógeno. La definición de *Proteobacteria* como un linaje evolutivo separado se realizó mediante el análisis comparativo del gen 16S (Stackebrandt et al. 1988). Mediante el

análisis comparativo del gen 23S y marcadores filogenéticos alternativos, tales como los genes que codifican para el factor de alargamiento Tu (EF-Tu) y la ATPasa, se ha confirmado la agrupación de este filum en cinco clases: *alfa*, *beta*, *gama*, *delta* y *epsilon* (Ludwig et al., 1995; Ludwig y Schleifer, 1999; Ludwig y Klenk, 2001). Recientemente se ha descrito una sexta clase llamada *zetaproteobacteria* en base a análisis filogenéticos de los genes *16S*, *recA* y *gyrB* y datos fisiológicos (Emerson et al. 2007). A pesar de tener un origen común, las bacterias de este grupo son fenotípicamente muy diversas. La mayoría de las proteobacterias son mesófilas pero algunas son termófilas (por ejemplo *Thiomonas thermosulfata* y el género *Tepidomonas*) y se han descrito también psicrófilas (por ejemplo género *Polaromonas*). La mayor parte son de vida libre; algunos como los rizobios establecen relaciones simbióticas con leguminosas específicas donde fijan nitrógeno en las raíces o en nódulos del tallo. Otros viven como simbiontes intracelulares de protozoarios e invertebrados (mejillones, insectos y nemátodos), mientras que las *Rickettsias* son parásitos intracelulares obligados de mamíferos. La extrema diversidad de mecanismos de generación de energía es una característica bioquímica única en *Proteobacteria*, algunas son quimioorganotróficas (como *Escherichia coli*), otras son quimiolitotróficas (*Thiobacillus*, *Nitrosomonas*), o fototróficas (*Rhodospirillum*). Con respecto a su relación con el oxígeno, las proteobacterias incluyen especies estrictamente aerobias y anaerobias, así como aerobios facultativos y microaerófilos (Kersters et al. 2006).

La clase *epsilon* de las proteobacterias comprende una gran diversidad de especies con distintos estilos de vida, incluyendo de vida libre y asociados a hospederos vertebrados o pertenecientes a la fauna del fondo del mar (Campbell et al. 2006). Por lo general, los integrantes de esta clase son microaerofílicos, quimioorganotróficos, no sacarolíticos, de forma curvada, en espiral o helicoidal. Obtienen su energía principalmente de aminoácidos o de intermediarios del ciclo de Krebs (Kersters et al. 2006). Las epsilonproteobacterias de vida libre tienen un rol importante en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, azufre y carbono en ambientes marinos y terrestres (Campbell et al. 2006). La mayoría de las especies asociadas a vertebrados pertenecen a los géneros *Arcobacter*, *Campylobacter* y *Helicobacter*. Por otro lado, los integrantes de *Caminibacter*, *Nautilia*, y *Sulfurospirillum* han sido descritas en asociación con la fauna hidrotermal del fondo del mar (Waite et al. 2017).

La clase *Epsilonproteobacteria* se subdivide en dos órdenes: *Nautiliales* y *Campylobacterales* (Gupta, 2006). El orden *Nautiliales* tiene una única familia llamada *Nautiliaceae* que comprende los géneros *Caminibacter*, *Lebetimonas* y *Nautilia* (Nakagawa y Takai, 2014). El orden *Campylobacterales* presenta tres familias: *Helicobacteraceae*, *Campylobacteraceae* e *Hydrogenimonaceae* (Han et al. 2012).

La familia *Campylobacteraceae* es un diverso grupo de bacterias gram negativas patógenas, comensales y ambientales. Estas bacterias se encuentran en aguas superficiales y subterráneas, en animales destinados a consumo humano, como vacas, cerdos y ovejas, y en productos animales (por ejemplo, lácteos). Comprende actualmente los géneros *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Campylobacter* (Lastovica et al. 2014).

El género *Arcobacter* fue propuesto en 1991 por Vandamme et al. (1991) para agrupar a dos especies de *Campylobacter* aerotolerantes: *Campylobacter cryaerophila* (ahora *Arcobacter cryaerophilus*) y *Campylobacter nitrofigilis* (ahora *Arcobacter nitrofigilis*). Las bacterias de *Arcobacter* se diferencian de las de *Campylobacter* por su capacidad de crecer en medio aerobio y a bajas temperaturas, 15-30 °C. Las células son similares a las de *Campylobacter* y se mueven por la presencia de un flagelo en uno o en ambos polos celulares (Vandamme et al. 1992). En cuanto a la importancia clínica *A. butzleri* puede causar diarrea y tiene alta prevalencia en pacientes con apendicitis y gastroenteritis. Se piensa que el consumo de agua o alimentos contaminados y el contacto con gatos o con sus heces, son la vía de transmisión de enfermedades causadas por *Arcobacter* a animales y humanos. En la salud animal, *Arcobacter* puede causar abortos, mastitis, diarrea y enteritis en animales de granja como bovinos, ovinos, equinos, y suinos (Lastovica et al. 2014).

Las especies pertenecientes al género *Sulfurospirillum* son organismos reductores de azufre, de vida libre que habitan ambientes como barro anóxico y fuentes de agua dulce y subterráneas contaminadas. No se han encontrado en asociación con hospederos animales ni con ninguna enfermedad conocida. Algunas especies son capaces de crecer en condiciones microaerófilas mientras que *S. multivorans* es estrictamente anaerobio. La temperatura de crecimiento varía entre 8 y 40 °C. Las especies de este género se diferencian de *Arcobacter* y *Campylobacter* porque son capaces de crecer a 25 °C pero no con una concentración de oxígeno superior al 4% (Lastovica et al. 2014).

La primera bacteria perteneciente al género que hoy se conoce como *Campylobacter* fue aislada en 1906 por McFadyean y Stockman en el Reino Unido. Los mismos observaron un organismo muy móvil y con forma curvada en una muestra de mucus uterino de una oveja preñada de un rebaño con alto porcentaje de abortos (Skirrow, 2006). Esta bacteria fue también aislada en Estados Unidos por Smith y Taylor en 1919 y nombrada como *Vibrio fetus*, debido a su semejanza morfológica y de motilidad con ejemplares del género *Vibrio*. En 1963 Sébald y Véron propusieron que las especies *Vibrio fetus* y *Vibrio bubulus* debían incluirse en un nuevo género debido a sus diferencias en el contenido de bases GC y en el test de oxidación-fermentación (prueba de Hugh y Leifson) con respecto a otras especies del género *Vibrio* (Sébald y Véron, 1963). Este nuevo género fue llamado *Campylobacter* (del griego campy, que significa “curvo”) debido a su forma. En 1973 Véron y Chatelain

realizaron un estudio taxonómico del género *Campylobacter* en base a pruebas bioquímicas, serológicas y contenido GC abarcando en el mismo cuatro especies: *C. fetus*, con las subespecies *C. fetus fetus* y *C. fetus venerealis*, *C. jejuni*, *C. coli* y *C. sputorum*. Desde esa fecha hasta el momento ha aumentado el número de especies descritas dentro del género *Campylobacter* y actualmente cuenta con 33 especies y 11 subespecies (Tabla 2).

**Tabla 2. Especies de *Campylobacter* descritas hasta el momento ordenadas alfabéticamente.** Se indica la especie, la subespecie si corresponde, los principales hospederos en los cuales han sido aisladas, su origen clínico, los síntomas y la referencia bibliográfica correspondiente.

Espece	Subespece	Hospedero o fuente/origen clínico	Síntomas	Referencia
<i>C. avium</i>		Pollos y pavos/contenido cecal	Sanos	Rossi et al. 2009
<i>C. canadensis</i>		Grullas blancas y grullas Sandhill/cloaca	Sanos	Inglis et al. 2007
<i>C. coli</i>		Cerdos/Intestino y materia fecal	Disentería	Doyle, 1948; Véron y Chatelain, 1973
<i>C. concisus</i>		Humanos/cavidad bucal	Periodontitis y gingivitis	Tanner et al. 1981
<i>C. corcagiensis</i>		Macacos cola de león/materia fecal	Sanos	Koziel et al. 2014
<i>C. cuniculorum</i>		Conejos de campo/contenido cecal	Sanos	Zanoni et al. 2009
<i>C. curvus</i>		Bovinos/rumen	Sanos	Wolin et al. 1961
<i>C. faecalis</i>		Humanos/hisopado anal	SIDA	Kachler et al. 2000
<i>C. fetus</i>	<i>fetus</i>	Ovinos/aparato genital y fetos abortados	Abortos	McFadyean y Stockman, 1913; Smith y Taylor, 1919; Skirrow, 2006; Véron y Chatelain, 1973;
		Humanos/sangre	Bacteremia	
				King, 1957
	<i>testudinum</i>	Humanos/sangre, materia fecal, bilis, fluido pleural, hematoma	Bacteremia, hepatitis B, linfoma, diarrea, cáncer de hígado, asma	Gilbert et al. 2013; Tu et al. 2004
		Tortuga de caja común, esquinco de lengua azul y serpiente de hocico de cerdo/materia fecal	Sanos	
	<i>venerealis</i>	Bovinos/aparato genital	Abortos e infertilidad	Bryner et al. 1964; Florent, 1959; Véron y Chatelain, 1973
<i>C. geochelonis</i>		Tortuga mediterránea/hisopado cloacal	Sanos	Piccirillo et al. 2016

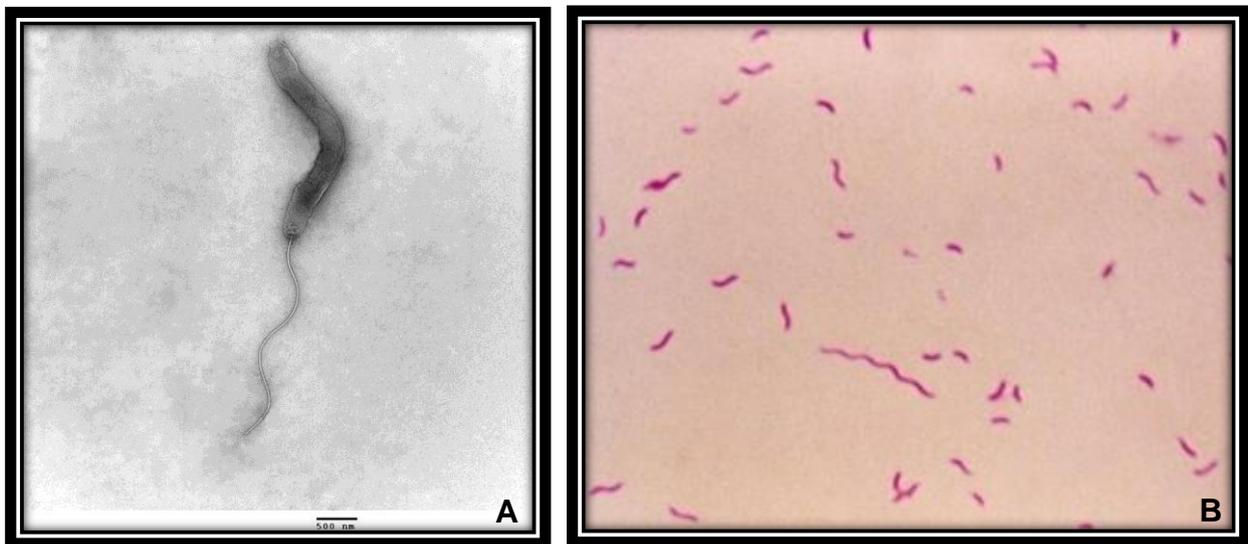
Especie	Subespecie	Hospedero o fuente/origen clínico	Síntomas	Referencia
<b><i>C. gracilis</i></b>		Humanos/cavidad bucal	Periodontitis	Tanner et al. 1981
<b><i>C. helveticus</i></b>		Perros y gatos/materia fecal	Diarrea	Stanley et al. 1992
<b><i>C. hepaticus</i></b>		Pollos/hígado	Enfermedad hepática irregular	Van et al. 2016
<b><i>C. hominis</i></b>		Humanos/materia fecal	Sanos	Lawson et al. 1998
		Cerdos/intestino	Enteropatía proliferativa	
<b><i>C. hyointestinalis</i></b>	<i>hyointestinalis</i>	Bovinos/materia fecal	Sanos	Gebhart et al. 1985
		Hámster/intestino	Enteritis	
<b><i>C. iguaniorum</i></b>	<i>lawsonii</i>	Cerdos/estómago	Sanos	On et al. 1995
<b><i>C. insulaenigrae</i></b>		Lagartijas y tortugas/hisopado cloacal	Sanos	Gilbert et al. 2015
		Focas y marsopas/hisopado anal	Sanos	Foster et al. 2004
<b><i>C. jejuni</i></b>	<i>doylei</i>	Humanos/biopsia de epitelio gástrico y materia fecal	Diarrea	Steele y Owen, 1988
	<i>jejuni</i>	Bovinos y ovinos/aparato digestivo	Disentería leve	Jones et al. 1931; Véron y Chatelain, 1973
<b><i>C. lanienae</i></b>		Humanos/materia fecal	Sanos	Logan et al. 2000
<b><i>C. lari</i></b>	<i>concheus</i>	Humanos/materia fecal	Sin determinar	Debruyne et al. 2009
		mariscos	Sin determinar	
		Gaviotas/hisopado cloacal	Sanos	
	<i>lari</i>	perros; mono, foca	Enteritis	Benjamin et al. 1983; Debruyne et al. 2009
		Bovinos, pato, equinos/intestino	Diarrea	
<b><i>C. lawrenceae</i></b>		Humanos/materia fecal	Sin determinar	
		Elefantes marinos/materia fecal	Varado, deshidratación	Foley et al. 2004
<b><i>C. mucosalis</i></b>		Cerdos/intestino	Adenomatosis intestinal	Lawson y Rowland, 1974; Lawson et al. 1981
<b><i>C. ornithocola</i></b>		Pájaros silvestres sin identificar/materia fecal	Sanos	Cáceres et al. 2017

Especie	Subespecie	Hospedero o fuente/origen clínico	Síntomas	Referencia
<b><i>C. peloridis</i></b>		Humanos/materia fecal y fluidos de diálisis	Insuficiencia renal	Debruyne et al. 2009
		Mariscos	Sin determinar	
<b><i>C. pinnipediorum</i></b>	<i>caledonicus</i>	Focas/abscesos y órganos internos	Sin determinar	Gilbert et al. 2017
	<i>pinnipediorum</i>	Otarios/abscesos y órganos internos	Sin determinar	Gilbert et al. 2017
<b><i>C. rectus</i></b>		Humanos/cavidad bucal	Periodontitis, periodontosis y gingivitis	Tanner et al. 1981
<b><i>C. showae</i></b>		Humanos/encías	Sanos	Etoh et al. 1993
<b><i>C. sputorum</i></b>		Humanos/cavidad bucal y esputo	Gingivitis y bronquitis	Mc Fadyean y Stockman, 1913; Tanner et al. 1981; Véron y Chatelain, 1973
		Ovinos/aparato genital y fetos	Abortos	
		Equinos y bovinos	Sin determinar	
<b><i>C. subantarcticus</i></b>		Focas, pingüinos gentú, pingüinos macaroni, albatros ceja negra, albatros de cabeza gris/hisopados fecales	Sanos	Debruyne et al. 2010a
<b><i>C. troglodytis</i></b>		Chimpancés/materia fecal	Sanos	Kaur et al. 2011
<b><i>C. upsaliensis</i></b>		Humanos y perros/materia fecal	Sanos	Sandstedt y Ursing 1991
<b><i>C. ureolyticus</i></b>		Humanos/Diversas secreciones, tejidos y lesiones de piel	Sin determinar	Eiken, 1958; Jackson y Goodman, 1978; Vandamme et al. 2010
<b><i>C. volucris</i></b>		Gaviotas reidoras/hisopado cloacal	Sanos	Debruyne et al. 2010b

## 2-2 Características fenotípicas del género *Campylobacter*

Las bacterias del género *Campylobacter* son bacilos gram negativos, con forma curvada, espiralada, en S o “forma de gaviota” (Figura 1). Las células de *C. showae* sin embargo presentan una forma de varilla más recta. En cultivos viejos o expuestos a estrés ambiental, las células pueden cambiar a formas esféricas. Las bacterias *Campylobacter* muestran un rápido movimiento como de “sacacorchos” debido a la existencia de 1 o 2 flagelos polares. Sin embargo pueden haber variaciones, *C. showae* presenta un manojo de flagelos en uno de sus polos mientras que *C. hominis* y *C. gracilis* no se mueven por carecer de flagelos (Vandamme y De Ley, 1991; Lawson et al. 2001). Todas las especies de *Campylobacter* reducen fumarato a succinato, no forman esporas, son oxidasa positiva (excepto por *C. gracilis*) e indol negativas. Pueden reducir nitratos (excepto por *C. jejuni subsp. doylei*), no hidrolizan almidón, gelatina o caseína y no presentan actividad lipasa ni lecitinasa. *C. fetus* y *C. rectus* poseen una microcápsula superficial a la pared celular bacteriana que está compuesta por proteínas paracristalinas de la capa superficial (*S-layer*). Todas las especies de *Campylobacter* son microaerófilas, siendo la concentración óptima de O<sub>2</sub> de 5-10% y de CO<sub>2</sub> de 3-5%. Algunas especies como *C. gracilis*, *C. hyointestinalis*, *C. showae* y *C. sputorum* bv. *faecalis* pueden crecer en condiciones anaerobias. *C. concisus*, *C. curvus*, *C. gracilis* y *C. rectus* requieren de H<sub>2</sub> o formiatos para crecer. La temperatura óptima de crecimiento varía entre 30 y 42 °C. Las colonias de *Campylobacter* en medio de cultivo agar

sangre son de forma circular, de 1-2 mm de diámetro, de color crema a grisáceo (Lastovica et al. 2014). Si bien se han desarrollado medios de cultivo específicos, algunas especies son fastidiosas y requieren medios particularmente exigentes. Por lo tanto, no existen condiciones óptimas comunes a todas las especies (Chaban et al. 2009).



**Figura 1. A.** Imagen de *Campylobacter troglodytis* obtenida por microscopio electrónico de transmisión. Se observa la forma curvada de la bacteria y la presencia de un flagelo polar. (Tomada de: Kaur et al. 2011). **B.** Tinción de Gram de un cultivo de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* (Tomada de CDC Public Health Image Library).

### 2-3 Características del genoma

*Campylobacter* presenta un único cromosoma circular y en algunas especies existen plásmidos que median principalmente la resistencia a antibióticos (Bradbury y Munroe, 1985). El genoma *core* para el género fue estimado en

669 genes. El pangenoma del género es más difícil de definir ya que se encuentra en continuo crecimiento a medida que se secuencian nuevos genomas (Iraola et al. 2014). El primer genoma de *Campylobacter* secuenciado, *C. jejuni* NCTC 11168 fue publicado en el año 2000 y re-anotado en 2007 (Gundogdu et al. 2007; Parkhill et al. 2000). Actualmente, está disponible en la base de datos del *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=campylobacter>) el genoma completo de 28 de las 33 especies descritas. Las especies del género *Campylobacter* presentan genomas pequeños en comparación con otras bacterias (Lastovica et al. 2014). El genoma más pequeño publicado hasta ahora es el de *C. insulaenigrae* que mide aproximadamente 1,47 Mb y el más largo es el de *C. rectus* con 2,51 Mb. El número de proteínas varía entre 1377 en *C. hepaticus* y 2254 en *C. rectus*. El contenido GC se encuentra entre 24,4% en *C. peloridis* y 45,4% en *C. showae* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=campylobacter>).

#### **2-4 Clasificación de especies bacterianas**

Las especies procariontas se clasifican en base a un criterio polifásico que incorpora propiedades genotípicas, fenotípicas y filogenéticas (Vandamme et al. 1996). Desde 1970 la similitud de secuencias de dos aislamientos se evalúa mediante el grado de hibridación de sus genomas en condiciones estándar, método conocido como hibridación de ADN-ADN. Además, actualmente se

acepta que el gen 16S es una herramienta universal para la identificación de bacterias ya que presenta regiones altamente conservadas, pero a su vez contiene regiones hipervariables que permiten la clasificación a nivel de género y especie (Clarridge, 2004). Una especie procariota es considerada como un grupo de cepas que se caracterizan por un cierto grado de consistencia fenotípica, un porcentaje de hibridación ADN-ADN de 70% y una identidad de secuencia del gen 16S > 98,7% (Vandamme et al. 1996; Stackebrandt y Ebers, 2006). Por lo tanto, organismos que presenten una identidad de secuencia del gen 16S  $\leq$  98,7% son siempre miembros de especies distintas porque estas diferencias en el rRNA se correlacionan con una similitud ADN-ADN < 70%. Sin embargo, lo contrario no siempre es cierto ya que existen cepas que comparten un porcentaje de re-asociación < 50% y, por lo tanto, son clasificadas como especies distintas, pero presentan una identidad del 99-100% a nivel del 16S. Estos valores son válidos para el gen 16S completo (Stackebrandt y Ebers, 2006).

## **2-5 Uso de materia fecal e identificación de especies de *Campylobacter***

Las muestras de materia fecal como fuente de ADN bacteriano son ampliamente utilizadas debido a que son fáciles de coleccionar y no invasivas (Waits y Paetkau, 2005). La identificación del género y de las diferentes especies de *Campylobacter* se puede realizar por varios métodos. La presencia de bacterias del género *Campylobacter* se puede establecer mediante la

observación directa al microscopio de campo oscuro o contraste de fases, utilizando una tinción simple como Gram. Este análisis se realiza dentro de las 2 horas de evacuación. Deben encontrarse bacilos curvos, gram negativos, con gran motilidad, característicos del género, la mayoría acompañados por eritrocitos y neutrófilos (Malbrán, 2001). Para la atención primaria de la salud se han desarrollado pruebas rápidas para la detección cualitativa de antígenos de *Campylobacter spp* en materia fecal de humanos (Kawatsu et al. 2008). Las mismas presentan alta especificidad y sensibilidad (Gómez et al. 2014, Liébana et al. 2014). Por otro lado, el análisis clásico por métodos bioquímicos es muy sensible pero está limitado por varios factores. En primer lugar depende, en muchos casos, de la obtención del cultivo de los microorganismos, que es muy laboriosa para la mayoría de las especies. Además el transporte de la muestra es un paso crucial para aumentar el éxito del aislamiento, debido al carácter microaerófilo de las especies. En segundo lugar, los resultados obtenidos no son del todo concluyentes (Chaban et. al. 2009), mostrando algunas especies características bioquímicas similares (Figura et. al. 1993, Lastovica et. al. 1993, Lastovica et. al. 1994). Otro método que depende de la obtención del cultivo es la espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight) que se utiliza para la identificación de especies de *Campylobacter*, siendo altamente eficiente, aunque en ocasiones no es capaz de distinguir entre dos especies presentes simultáneamente (Bessède et al. 2011). Por todo esto, es importante complementar o sustituir el diagnóstico con la identificación molecular. Para la identificación de las

diferentes especies de *Campylobacter* están disponibles técnicas como el análisis de restricción del genoma completo por electroforesis de campo pulsado (PFGE), o el análisis de un locus específico por polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), por polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), o por la tipificación multilocus de secuencias (MLST) (Laturnus y Wieler, 2007). Estas técnicas son útiles para estudios epidemiológicos a largo plazo pero requieren mano de obra entrenada para lograr resultados reproducibles (Chaban et al. 2009). Por otro lado se han diseñado varias técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que logran identificar especies o grupos de especies de *Campylobacter* (Chaban et al. 2009; Lübeck et al. 2003). Existe una PCR que genera un amplicón de 816 pb del gen *16S* únicamente en especies del género *Campylobacter* (Linton et al. 1996). Mediante secuenciación directa de los amplicones obtenidos es posible caracterizar la especie presente de forma mayoritaria. La materia fecal contiene inhibidores de la PCR y por tal motivo, para asegurar la calidad, pureza y cantidad de ADN es necesario evaluar, compararar y estandarizar los protocolos de extracción que garanticen amplificaciones óptimas (Bhagavatula y Singh, 2006).

## 2-6 Ecología, epidemiología e importancia sanitaria

Las bacterias del género *Campylobacter* son ubicuas en el ambiente y existen varios reservorios naturales de este género: animales domésticos, de granja y silvestres (Skirrow, 1991), mariscos (Lastovica et al. 2014), carne (Moore et al. 2006) y leche sin pasteurizar (Koziel et al. 2012). En vertebrados, la mayoría de las especies han sido aisladas del tracto digestivo y reproductor. Muchas especies son comensales y forman parte de la flora normal del intestino, mientras que otras han sido asociadas a enfermedades entéricas y su patogenicidad varía en humanos y animales según la cepa o especie (Gilbert, 2015). En humanos, la campylobacteriosis es una zoonosis cuyos factores de riesgo más conocidos son los productos alimenticios contaminados y el contacto directo o indirecto con animales infectados o con su materia fecal (Fullerton et al. 2007). *Campylobacter fetus* es considerado un patógeno oportunista que provoca infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. Además se han reportado numerosos casos de contagio de *C. fetus* provenientes de reptiles (Tu et al. 2004; Wang et al. 2013). *Campylobacter coli* y *C. jejuni* fueron caracterizadas como causantes directos de enteritis. Otras especies menos frecuentes como *C. upsaliensis*, *C. concisus*, *C. gracilis*, *C. rectus* y *C. showae* tendrían un papel relevante en enfermedades similares (Lastovica y Allos, 2008).

Existen numerosos estudios en Norteamérica, Europa, Asia y Oceanía que analizan la prevalencia del género *Campylobacter* en materia fecal de perros

domésticos (*Canis lupus familiaris*) (Carbonero et al. 2012; Chaban et al. 2010; Engvall et al. 2003; Hald et al. 2004; Holmberg et al. 2015; Koene et al. 2004; Malayeri et al. 2014; Parsons et al. 2010; Procter et al. 2014; Rahimi et al. 2012; Rossi et al. 2008; Sandstedt y Wierup, 1981; Tsai et al. 2007). En estos estudios se demuestra que los perros sanos portan varias especies de *Campylobacter* de forma natural, siendo las más prevalentes *C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. coli* y *C. helveticus* (Begum et al. 2015; Holmberg et al. 2015; Parsons et al. 2010; Rahimi et al. 2012). En algunos perros se demostró la coinfección con dos o más especies de *Campylobacter* (Himsworth et al. 2010). Se ha indicado además que los perros con diarrea presentan un enriquecimiento global de estas especies y además la presencia de otras no encontradas en perros sanos, como *C. concisus*, *C. gracilis*, *C. lari* y *C. mucosalis* (Chaban et al. 2010). Las causas de estas diarreas pueden o no ser conocidas. Uno de los principales agentes que causa diarrea en perros jóvenes es el parvovirus canino (CPV) (Appel et al. 1979) el cual se ha reportado en casos de co-infección con *Campylobacter* (Sandstedt y Wierup, 1981). El significado clínico de la presencia de *Campylobacter* no está claro y parece estar asociado con distintos factores, incluida la presencia de diarreas. Los cachorros menores a 2 años de edad y perros ancianos presentan mayor prevalencia de *Campylobacter* que los perros adultos (Engvall et al. 2003; Malayeri et al. 2014; Parsons et al. 2010; Procter et al. 2014). En Sudamérica son escasos los estudios publicados de la prevalencia de *Campylobacter* en

perros, existiendo datos de Argentina (López et al. 2003) y Brasil (Rodrigues et al. 2015).

El género *Campylobacter*, que está asociado principalmente a vertebrados endotérmicos, se encuentra también en reptiles, que son vertebrados ectotérmicos poiquiloterms. Por lo tanto las especies de *Campylobacter* presentes en reptiles se deben adaptar a un rango mayor de temperatura y con medias de 20 a 35°C, inferiores a la de los mamíferos homeotermos (37 a 39°C) (Gilbert, 2015). Sin embargo hasta el momento no se han reportado en estos animales casos de enfermedades causadas por *Campylobacter* (Gilbert et al. 2014a). Se han aislado *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* (Gilbert et al. 2013), *Campylobacter hyointestinalis* (Gilbert, 2015); y dos especies recientemente descritas: *Campylobacter iguaniorum* (Gilbert et al. 2014b) y *Campylobacter geocheilonis* (Piccirillo et al. 2016) que están genéticamente relacionadas a *C. fetus* y a *C. hyointestinalis*.

En este trabajo se inició un estudio del género *Campylobacter* en animales hospederos (perros y reptiles) de la región mediante la estandarización de protocolos de extracción y métodos moleculares. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de la ecología y evolución del género.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3-1 General**

-Detectar y caracterizar genéticamente bacterias del género *Campylobacter* presentes en materia fecal de perros y reptiles de la región.

#### **3-2 Específicos**

-Evaluar y comparar diversos métodos de extracción de ADN de materia fecal.

-Poner a punto un control interno de la extracción mediante la amplificación del gen 16S de bacterias y arqueas en general.

-Poner a punto una PCR basada en el gen 16S para la identificación del género *Campylobacter* a partir de materia fecal.

-Identificar las especies presentes en las muestras positivas mediante el análisis de secuencias del gen 16S.

- Realizar análisis filogenéticos para determinar la relación de las variantes de *Campylobacter* encontradas con el resto de las cepas del género.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4-1 Estrategia general

La estrategia de este trabajo consistió en la detección y caracterización molecular de bacterias del género *Campylobacter*. Para ello, en primer lugar se puso a punto la extracción de ADN de muestras de materia fecal provenientes de perros y reptiles de la región. Se estandarizó una PCR de control de integridad del ADN extraído mediante la amplificación de un fragmento del gen 16S de bacterias y arqueas en general. Luego se puso a punto una metodología de diagnóstico basada en PCR para amplificar un fragmento del gen 16S del género *Campylobacter*. Estos últimos amplicones fueron enviados a secuenciar para realizar la caracterización genética (identificación de especies de *Campylobacter*). Se realizó la edición y ensamblado de las secuencias mediante herramientas informáticas. Se compararon entre sí y con secuencias existentes en las bases de datos mediante análisis filogenéticos.

### 4-2 Muestras

Se analizaron 211 muestras de materia fecal provenientes de perros, comprendidas en tres grupos en base a los antecedentes clínicos (Anexo A):

- A. 163 muestras de diarrea con diagnóstico molecular positivo para parvovirus canino (CPV).
- B. 30 muestras de diarrea con diagnóstico molecular negativo para parvovirus canino (CPV).
- C. 18 muestras de perros sanos.

Las muestras de los grupos A y B son parte del stock de nuestro laboratorio. Se utilizaron las extracciones de ADN que se encuentran almacenadas a -20 °C. Estas muestras fueron brindadas por diferentes laboratorios y veterinarias de Uruguay, Brasil, Argentina, Paraguay y Ecuador con los cuales nuestro grupo mantiene colaboraciones. Cada muestra ingresó acompañada por su ficha técnica correspondiente. Las muestras del grupo C fueron tomadas en el contexto del presente trabajo con el consentimiento de los dueños de las mascotas y acompañadas por su ficha técnica correspondiente, siendo todas de Uruguay.

Se analizaron 78 muestras de materia fecal de reptiles sanos autóctonos y exóticos (Anexo B). Las mismas fueron brindadas por dos reptilarios Uruguayos: el “Bioterio de Animales Ponzofiosos (Serpentario)” ubicado en el Instituto de Higiene (Facultad de Medicina - UdelaR) en Montevideo y el Criadero de Reptiles “Alternatus Uruguay” ubicado en Piriápolis, Maldonado.

Para la estandarización de las metodologías se utilizaron dos muestras como controles positivos, la denominada 97384 que es un aislamiento obtenido de abomaso fetal y caracterizada previamente como *Campylobacter fetus venerealis intermedius* (Cfvi) (Calleros, 2015) y la llamada 11427 que es un aislamiento obtenido de mucus vaginal vacuno y previamente caracterizada como *Campylobacter fetus venerealis* (Cfv) (Calleros et al. 2016).

#### **4-3 Estandarización de metodologías**

Se emplearon y evaluaron dos métodos de extracción de ADN, uno comercial y especialmente diseñado para extracciones de ADN a partir de materia fecal (“QIAamp DNA Stool Mini Kit” de Qiagen), y otro no comercial descrito por Schunck et al. (1995) denominado “*Fast Boiling Preparation*”. Se tomaron dos muestras de materia fecal de perros con síntomas clínicos de CPV, que ya habían sido diagnosticadas como positivas por métodos moleculares e identificadas como CPV 426 y CPV 463. Las mismas fueron procesadas mediante el método del kit comercial siguiendo el protocolo de “Extracción de ADN de materia fecal para detección de patógenos” (Anexo C) y mediante la variante del método “*Fast Boiling Preparation*” (Anexo C). Luego se realizó el diagnóstico habitual para CPV mediante PCR (Pérez et al. 2012). Por otro lado se tomó una muestra de reptil llamada UyN210R\_2013 y se le aplicaron ambos protocolos de extracción de ADN a la muestra pura y a la misma muestra contaminada con un cultivo de *Campylobacter fetus* (97384).

Posteriormente, con el fin de comparar las diferentes extracciones en función de la integridad del ADN bacteriano extraído y descartar la presencia de inhibidores que impidiesen la amplificación, se puso a punto una PCR para amplificar un fragmento del gen *16S* de bacterias y arqueas en general utilizando todas las extracciones mencionadas arriba. Para la estandarización se probaron dos combinaciones de tres primers tomados individualmente de diferentes fuentes bibliográficas, un *forward*: Bac27F, y dos *reverse*: 534R Univ1492R (Tabla 3). Estos primers hibridan en regiones del gen *16S* conservadas cuyas secuencias son comunes a todas las especies conocidas de bacterias y arqueas (DeLong, 1992; Jiang et al. 2006; Lane et al. 1985; Ott et al. 2004; Weisburg et al. 1991).

Por último, se estandarizó una PCR para la detección del género *Campylobacter* en la muestra UyN210R\_2013 contaminada. En la misma se utilizaron los primers C412F y C1228R (Tabla 3), que amplifican específicamente una región de 816 pb del gen *16S* del género (Linton et al. 1996).

Para todos los protocolos de PCR las concentraciones de los reactivos y condiciones de ciclado utilizadas fueron puestas a punto. Se utilizaron tres tipos de Taq polimerasa diferentes. Se ajustaron las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, seroalbúmina bovina (BSA), deoxyribonucleótidos (dNTPs) y ADN molde hasta obtener una amplificación satisfactoria. Se varió también la temperatura de

hibridación de los primers y los tiempos de extensión. Las reacciones se realizaron en un termociclador con gradiente de temperatura CG1-96 (Corbett Research).

**Tabla 3. Primers utilizados en los ensayos de PCR.** Se indica su secuencia, la especificidad y la referencia bibliográfica.

Primers	Secuencia(5´-3´)	Especificidad	Referencia
Bac27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Bacterias y arqueas en general	Ott et al. 2004
534R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Bacterias y arqueas en general	Lane et al. 1985
Univ1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT	Bacterias y arqueas en general	Jiang et al. 2006; Weisburg et al. 1991
C412F	GGATGACACTTTTCGGAGC	Género <i>Campylobacter</i>	Linton et al. 1996
C1228R	CATTGTAGCACGTGTGTC	Género <i>Campylobacter</i>	Linton et al. 1996

#### **4-4 Aplicación de las herramientas moleculares en las muestras de campo**

Luego de estandarizadas, las metodologías fueron aplicadas a las 211 muestras de perros y 78 muestras de reptiles.

A los resultados de prevalencia de *Campylobacter* obtenidos se aplicó el Test de  $\chi^2$ , para evaluar si existe una diferencia estadísticamente significativa en la presencia de *Campylobacter* entre los distintos grupos de datos.

#### **4-5 Secuenciación**

Los amplicones se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer 1X TAE (Tris, Acetato, EDTA) teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 90 volts y 150 mA durante 15-20 minutos y visualización en un transiluminador con luz UV. Se seleccionaron 22 amplicones de 816 pb correspondientes al gen *16S* representantes de todos los grupos estudiados y se los purificó utilizando el kit Zymo DNA Clean & Concentrator<sup>TM-5</sup>, según las instrucciones del fabricante (Anexo C). Luego se cuantificaron los productos obtenidos en un espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo) y se enviaron a secuenciar en un solo sentido por el método de Sanger al servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo o a Macrogen Korea.

#### 4-6 Análisis bioinformáticos

Las secuencias del gen 16S obtenidas por secuenciación fueron editadas, ensambladas y corregidas mediante el programa SeqMan, del paquete Lasergene 7.0 (DNASTAR).

Se realizó una búsqueda en la base de datos de Taxonomía del GenBank (National Center for Biotechnology Information, ncbi.nlm.nih.gov) de todas las secuencias de 16S de *Campylobacter* disponibles activando el filtro: "rRNA". Se obtuvieron así 115 secuencias y 2170 genomas completos del género *Campylobacter*, de los cuales se seleccionaron los fragmentos pertenecientes al gen 16S.

Mediante el programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013) se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas en este trabajo junto a las obtenidas de la base de datos utilizando el algoritmo ClustalW. Se excluyeron las secuencias que presentaron muchas bases no definidas ("N"). Se seleccionaron las secuencias no redundantes (86) del género y junto a las obtenidas en este trabajo se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud. Como grupo externo se utilizó una secuencia de *Arcobacter cryaerophilus* (Número de acceso: KT225286.1) y una de *Sulfurospirillum deleyianum* (Número de acceso: NR\_074378.1). El modelo de sustitución que mejor se ajustó al conjunto de datos fue Kimura 2-parámetros con distribución gamma y sitios invariantes

(K2+G+I). Para el cálculo del soporte estadístico se utilizaron 1000 réplicas de *bootstrap*. Para visualizar el árbol se utilizaron los programas FigTree 1.4.3 (Rambaut, 2014) e Inkscape 0.92.

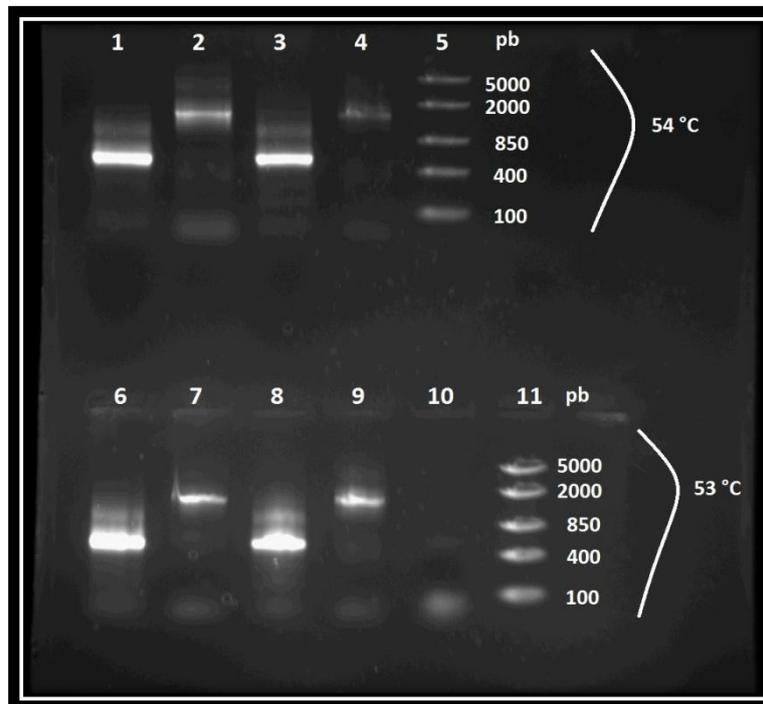
Mediante el programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013), utilizando el modelo de sustitución p- distance, se calcularon y analizaron las distancias nucleotídicas intra y entre los diferentes grupos.

## 5. RESULTADOS

### 5-1 Estandarización de metodologías

En primer lugar se llevó a cabo la evaluación y comparación de dos métodos de extracción de ADN, uno comercial (Kit Qiagen) y otro no comercial (variante de “*Fast Boiling Preparation*”). Se tomaron dos muestras de materia fecal de perros con síntomas clínicos de CPV y diagnosticados previamente como positivos por métodos moleculares. Al aplicarse ambos métodos de extracción y luego realizar el diagnóstico habitual para CPV los dos protocolos resultaron igualmente eficientes y en ambas muestras se detectó el genoma viral. Luego se aplicaron ambos protocolos de extracción a una muestra de materia fecal de reptil pura y a la misma muestra contaminada con un cultivo de *Campylobacter*.

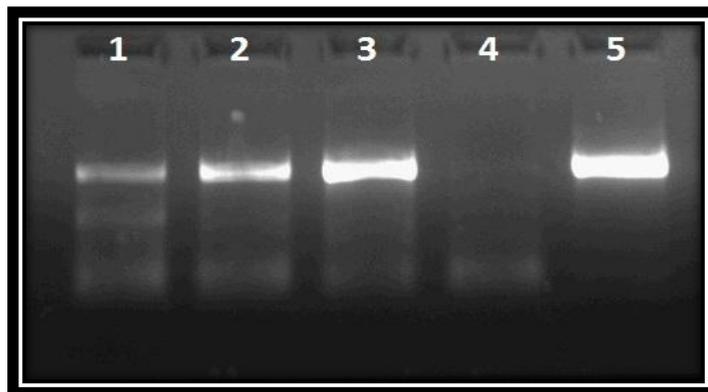
Posteriormente se estandarizó la PCR de control de integridad del ADN en todas las muestras mencionadas. El par de primers Bac27F/524R amplificó un fragmento de 507 pb del gen *16S* de bacterias y arqueas, mientras que el par Bac27F/Univ1492R amplificó un fragmento de 1500 pb del mismo gen (Figura 2). Los resultados obtenidos con ambos protocolos de extracción mostraron un producto de amplificación específico.



**Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% al utilizar los primers que amplifican el gen 16S de bacterias y arqueas.** Se muestran los amplicones de 507 pb y 1500 pb obtenidos por PCR al combinar los distintos juegos de primers. Carriles 1, 2, 6 y 7: muestra CPV426; Carriles 3, 4, 8 y 9 muestra UyN210R\_2013 contaminada; carril 10: Blanco. Carriles 5 y 11: marcador de peso molecular. En el peine superior se muestran los resultados con una temperatura de hibridación de 54 °C y en el peine inferior cuando ésta fue de 53 °C.

Para continuar con la aplicación de las metodologías en todas las muestras analizadas, se optó por utilizar el método de extracción de ADN no comercial por ser más económico y para la aplicación de la PCR de control de integridad se escogió el juego de primers formado por Bac27F (Ott et al. 2004) y 534R (Lane et al. 1985) que juntos amplifican el fragmento de menor tamaño. El protocolo usado en esta PCR se indica en el Anexo D.

Por último, se estandarizaron las condiciones de reacción necesarias para amplificar el fragmento de 816 pb del gen *16S* de *Campylobacter* en la muestra contaminada. Se aplicó la PCR descrita por Linton et al. (1996) pero no se obtuvieron resultados positivos. Por ese motivo se probaron varios protocolos con variaciones en la temperatura de hibridación. Se obtuvieron los mejores resultados al realizar 15 ciclos a 53°C, 15 ciclos a 52°C y 15 ciclos a 51°C de temperatura de hibridación (Figura 3). El protocolo usado finalmente se indica en el Anexo E.



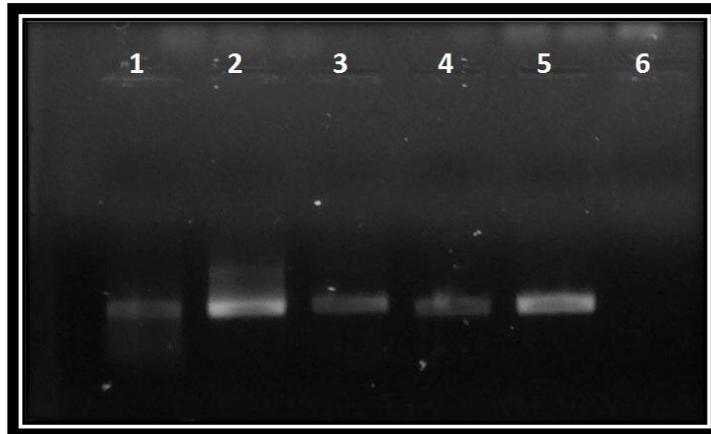
**Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% al estandarizar la PCR que amplifica el gen *16S* de *Campylobacter* en la muestra UyN210R\_2013 contaminada.** Se muestran los amplicones de 816 pb al probar distintos gradientes de temperaturas de hibridación. Carril 1: (15 ciclos a 52, 51, y 50°C); Carril 2: (15 ciclos a 53, 52, y 51°C); Carril 3: Control positivo; Carril 4: Blanco; Carril 5: Marcador de peso molecular de 816 pb.

## **5-2 Aplicación de las herramientas moleculares en las muestras de campo**

Se analizaron en total 211 muestras de materia fecal de perros y 78 muestras de materia fecal de reptiles que fueron sometidas a extracción de ADN por *fast boiling*, control de integridad del ADN extraído, y amplificación del gen 16S mediante la metodología de PCR estandarizada para el diagnóstico del género *Campylobacter*.

### **5-2-1 Control de integridad**

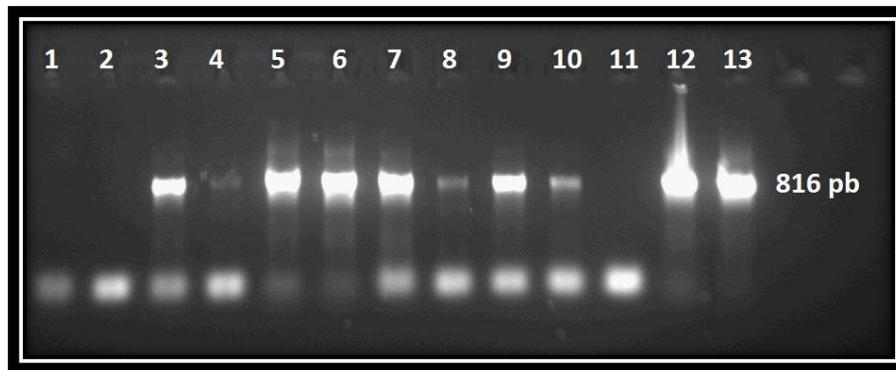
Las muestras fueron sometidas a la PCR estandarizada para corroborar la integridad del ADN total extraído. Se observó una banda de amplificación de 507 pb en todas las muestras. Estos resultados se obtuvieron tanto en muestras de perros como de reptiles (Figura 4).



**Figura 4:** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% al aplicar la metodología estandarizada de control de integridad en muestras de campo. Carril 1: UyN315R\_2015; carril 2: UyYR\_2015; carril 3: Uy455P\_2013; carril 4: Uy466P\_2013; carril 5: Control positivo (usado como marcador de peso molecular); carril 6: Blanco.

#### **5-2-2 Detección de bacterias del género *Campylobacter***

En las muestras caninas, se detectó la presencia de bacterias del género *Campylobacter*, por la obtención de un amplicón de 816 pb (Figura 5), en 68 de las 211 muestras analizadas, lo que representa el 32,2% del total (Anexo A).

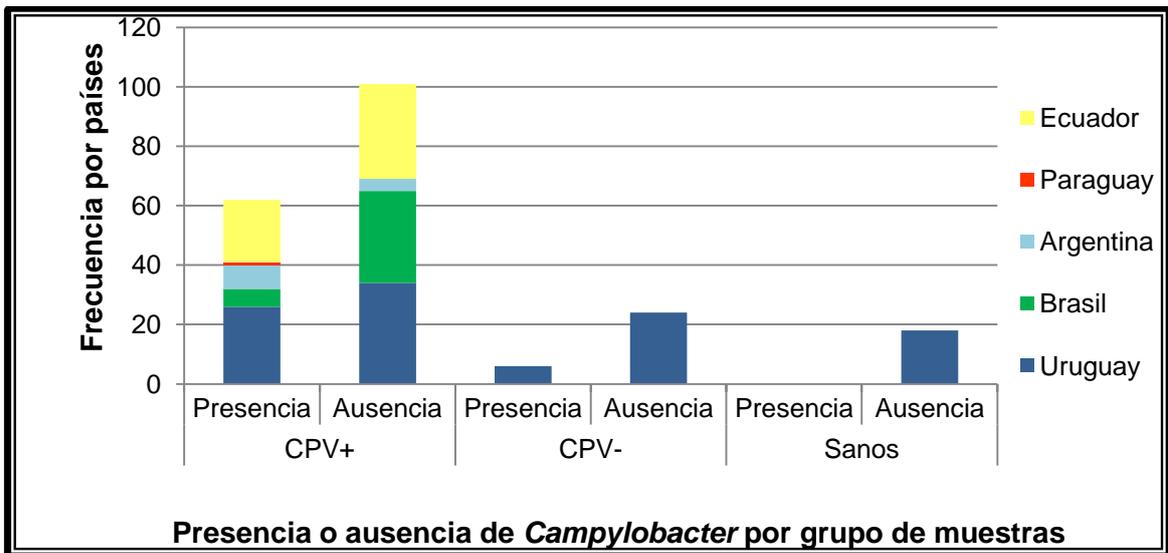


**Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de amplicones del gen 16S del género *Campylobacter* obtenidos de muestras de perros.** Uy514P\_2014 (carril 1: pura, carril 2: dilución 1/10); Uy515P\_2014 (carril 3: pura, carril 4: dilución 1/10); Uy516P\_2014 (carril 5: pura, carril 6: dilución 1/10); Uy396P\_2012 (carril 7: pura); Uy503P\_2014 (carril 8: pura); Uy383P\_2012 (carril 9: dilución 1/5); Uy499P\_2014 (carril 10: pura); Blanco (carril 11); Control positivo (carril 12); Amplicón de muestra positiva usado como marcador de peso molecular de 816 pb (carril 13).

De las muestras positivas, 32 provienen de Uruguay, 6 de Brasil, 8 de Argentina, 1 de Paraguay y 21 de Ecuador. La edad de los perros positivos para el género varía entre 1 mes y 7 años de edad (media  $\pm$  desviación estándar;  $6,8 \pm 15,3$  meses). Veintitrés muestras provienen de perros cruzados, 26 de perros de raza (Cocker, Terranova, Pit bull, Caniche, Mastín, Labrador, Golden retriever, Mastín napolitano, Schnauzer, Husky siberiano, Pastor alemán y Boyero de Berna) y 19 muestras no presentan este dato.

Las muestras además se pueden dividir en tres grupos: 163 provienen de perros con síntomas de diarrea, con diagnóstico molecular positivo para CPV que concuerda con la clínica, de las cuales 62 resultaron positivas para *Campylobacter* (38%); 30 heces fueron obtenidas de perros que presentaban

diarrea pero de etiología desconocida y cuyo diagnóstico molecular fue negativo para CPV, siendo 6 las positivas para el género *Campylobacter* (21%); y por último 18 materias fecales fueron obtenidas de perros clínicamente sanos; todas resultaron negativas para *Campylobacter* (0%) (Figura 6). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la presencia de *Campylobacter* entre los perros con diarrea (CPV+, CPV-) y sanos:  $\chi^2$  (1, N=211) = 7,81;  $p < 0,01$ . Sin embargo, la diferencia en la frecuencia del género no fue significativa entre los grupos con diarrea por CPV y con diarrea sin CPV:  $\chi^2$  (1, N=193) = 3,84;  $0,05 < p < 0,1$ . Al comparar los datos según el país de procedencia, se agruparon en dos clases. La primera corresponde a muestras de países que comparten frontera entre sí (Uruguay, Brasil, Argentina y Paraguay) y la segunda corresponde a muestras de Ecuador, país que no presenta frontera con los demás. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las dos clases:  $\chi^2$  (1, N=163) = 0,08;  $0,1 < p < 0,9$ .



**Figura 6. Frecuencia del género *Campylobacter* en muestras de materia fecal de perros.** Se indican los resultados según el país de procedencia y el grupo de muestra al cual pertenecen.

Por otra parte, se analizaron 78 muestras de materia fecal de reptiles. Se muestrearon 13 especies distintas de serpientes (Serpentes) y 5 de lagartos (Lacertilia) (Anexo B). Como resultado se obtuvo que 1 de las 78 muestras analizadas (1,3%) fue positiva para el género *Campylobacter* y provenía de una iguana (*Iguana iguana*) macho en cautiverio (Figura 7).



**Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% al utilizar los primers que amplifican el gen 16S del género *Campylobacter*, en muestras de reptiles.** UyYR\_2015 (1- Muestra pura, 2- dilución 1/5, 3- dilución 1/20); UyFCDHR\_2015 (4- Muestra pura, 5- dilución 1/5, 6- dilución 1/20); UyDBMAR\_2015 (7- Muestra pura, 8- dilución 1/5, 9- dilución 1/20); UyAlbinR\_2015 (10- Muestra pura, 11- dilución 1/5, 12- dilución 1/20); Control positivo usado como marcador de peso molecular (13); Blanco (14).

### 5-3 Análisis de secuencias

Se enviaron a secuenciar 22 amplicones de 816 pb del gen 16S en un solo sentido con los primers 16SF o 16SR para obtener las secuencias de las especies presentes de forma mayoritaria. Se obtuvieron secuencias limpias en 19 de ellos: 18 obtenidos de muestras caninas y 1 obtenido de una muestra de reptil. De los 18 amplicones de materia fecal de perros, 1 (Uy396P\_2012) proviene de muestras de diarrea sin causa conocida (CPV-) y 17 de canes con parvovirus (CPV+). Los 19 cromatogramas correspondientes fueron editados con el programa Seqman del paquete Lasergene 7.0 (DNASTAR). Las secuencias finales obtenidas fueron de 648 pb. En 3 secuencias provenientes de materia fecal de perros se obtuvieron picos superpuestos en el cromatograma (datos no mostrados), lo cual es un indicativo de una posible co-infección con más de una especie o cepa de *Campylobacter*. Estos resultados

no se incluyen en este trabajo ya que requieren un análisis más detallado para determinar su causa.

#### **5-4 Análisis filogenéticos y distancias nucleotídicas**

Se realizó un análisis filogenético de máxima verosimilitud que incluyó un total de 107 secuencias del gen 16S, de las cuales 86 se obtuvieron de la base de datos (Anexo F) y son representantes de 32 de las 33 especies de *Campylobacter* descritas hasta el momento. No se incluyó la única secuencia de *C. lawrenceae* submitida por encontrarse incompleta. Se incluyeron las 19 secuencias obtenidas en este trabajo y 2 utilizadas como grupo externo pertenecientes a los géneros *Arcobacter* y *Sulfurospirillum* (Figura 8).



Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia parcial del gen 16S del género *Campylobacter*. En azul se indican las secuencias obtenidas a partir de materia fecal de perros y en rojo la obtenida de reptil. En verde, amarillo y rosado se muestran los diferentes clados en los cuales se agrupan dichas secuencias. Los números en los nodos indican los soportes estadísticos obtenidos mediante *bootstrap* (1000 réplicas) y expresados como porcentaje.

En el análisis se observa un clado formado por 16 secuencias obtenidas de materia fecal de perros (9 de Uruguay, 4 de Ecuador y 3 de Brasil), y

secuencias de *C. avium*, *C. troglodytis* y *C. upsaliensis* con un soporte estadístico del 96% (sombreado en verde en la figura 8). Dentro de este clado las 16 secuencias caninas presentaron mayor similitud con *C. upsaliensis* siendo la distancia nucleotídica interna con la especie de 0,4% y la distancia nucleotídica media con las otras dos especies 2,6%. Se realizó un alineamiento de estas 16 secuencias (Anexo G). El análisis reveló que en los 648 nucleótidos alineados existen en total 18 cambios nucleotídicos entre las secuencias. De las mismas, 9 (6 de Uruguay, 1 de Brasil y 2 de Ecuador) presentan una identidad nucleotídica del 100% entre sí. La identidad nucleotídica varía en un rango de 99,4% a 99,8% entre las 9 secuencias anteriores y el resto. Las dos secuencias más divergentes del grupo son EcE48P\_2011 y EcE50P\_2011 con una identidad nucleotídica de 98,9% entre sí (Anexo G).

Por otra parte, se observa que la secuencias EcE39P\_2011 y BrAthenaP\_2014 se agrupan junto a secuencias de *C. coli* y *C. jejuni* con un 83% de soporte estadístico. Este clado (sombreado en amarillo) presentó una distancia nucleotídica interna del 0,1%.

Por último, la secuencia obtenida de iguana UyAlbinR\_2015 se agrupa con *C. iguaniorum* con un soporte estadístico del 99% (sombreado en rosado). La distancia nucleotídica dentro de este grupo fue de 0%.

## 6. DISCUSIÓN

### 6-1 Estandarización de metodologías

La estandarización de los métodos de extracción de ADN y de los protocolos de PCR es importante para lograr una correcta amplificación. La materia fecal, además de contener el ADN de interés presenta el ADN hospedero, alimentos no digeridos y moco (Albaugh et al. 1992). Estos ingredientes tienen sustancias que son inhibitorias de la PCR como polisacáridos, clorofila de hierbas y vegetales, sales biliares, urea, glicolípidos, hemoglobina y heparina (Lantz et al. 1997; Monteiro et al. 1997; Pontiroli et al. 2011). La estandarización de la extracción garantiza la eliminación de estos inhibidores (Bhagavatula y Singh, 2006). En este trabajo se diseñó un experimento que incluyó dos muestras de materia fecal de perros previamente diagnosticados como positivos para CPV, una muestra proveniente de reptil y la misma muestra contaminada con un cultivo de *Campylobacter*. Al evaluar los dos métodos de extracción de ADN se comprobó que ambos fueron igualmente eficientes y por lo tanto se optó por aplicar, en las muestras de campo, el método no comercial debido a que es más económico. Para evaluar la integridad del ADN extraído se puso a punto una PCR que amplifica fragmentos conservados del gen 16S de bacterias y arqueas presentes en las muestras anteriores. Se probaron dos combinaciones de primers y en ambos casos se obtuvo el fragmento del tamaño esperado. Se

eligió la combinación que genera el fragmento menor para ser aplicado en las muestras problema. Por último fue necesario estandarizar la PCR descrita por Linton et al. (1996) debido a que no se obtuvo amplificación al probar el protocolo original. Al probar y aplicar un ciclado en el cual se baja la temperatura de hibridación gradualmente en tres tiempos (15 ciclos a 53°C, 15 ciclos a 52°C y 15 ciclos a 51°C) fue posible la amplificación del fragmento esperado. Se optó por este protocolo para ser aplicado tanto en muestras de campo de perros como de reptiles.

## **6-2 Diagnóstico del género *Campylobacter***

El diagnóstico clásico del género se realiza mediante pruebas bioquímicas que son muy sensibles pero están limitadas por la dependencia de la obtención del cultivo de los microorganismos, además de que algunas especies han mostrado características bioquímicas similares (Figura et. al. 1993, Lastovica et. al. 1993, 1994). Por lo tanto, es importante complementar o sustituir el diagnóstico bioquímico clásico con técnicas moleculares. En este trabajo se logró diagnosticar la presencia del género *Campylobacter* en 69 de 289 muestras de materia fecal analizadas mediante la estandarización de la metodología de PCR descrita por Linton et al. (1996), mediante la cual fue posible amplificar un fragmento de 816 pb del gen *16S*.

En este trabajo la prevalencia de *Campylobacter* en perros sanos fue nula, datos que concuerdan con Ogden et al. 2009 cuya prevalencia hallada en perros sanos de Escocia fue menor al 5%. Sin embargo existen numerosos trabajos en los que se encuentran prevalencias que varían entre 14% y 76,2% (Begum et al. 2015; Burnens et al. 1992; Chaban et al. 2010; Engvall et al. 2003; Gras et al. 2013; Hald et al. 2004; Himsforth et al. 2010; Holmberg et al. 2015; López et al. 2003; Malayeri et al. 2014; Parsons et al. 2010; Parsons et al. 2011; Pintar et al. 2015; Procter et al. 2014; Rodrigues et al. 2015; Sandstedt y Wierup, 1981). Esta discordancia entre los valores de perros sanos puede deberse a la existencia de variabilidad en la prevalencia de *Campylobacter* en los diferentes países, dependiendo de las medidas higiénicas seguidas y de las distintas realidades sociales (Begun et al. 2015). Todos los perros considerados sanos muestreados en este trabajo pertenecen a un entorno urbano y con un plan de sanidad conocido (carnet de vacunas, desparasitación, alimentación). En cambio, en la mayoría de los trabajos publicados anteriormente, con altas tasas de prevalencia de *Campylobacter* en perros sanos, las muestras provienen de perros de perreras (Parsons et al. 2011), de clínicas veterinarias (Parsons et al. 2010) y de parques (Procter et al. 2014), que podrían ser ambientes más propicios para la permanencia de *Campylobacter* por contaminación ambiental (Tsai et al. 2007).

Por otra parte el 38% de las muestras infectadas con parvovirus canino fueron positivas para el género *Campylobacter*. Este dato es inferior, pero igualmente

significativo, al reportado en 1981 por Sandstedt y Wierup en Suecia, quienes encontraron una frecuencia de co-infección del 47% entre ambos microorganismos. Por otro lado se detectó la presencia del genoma de *Campylobacter* en 21% de las muestras de diarrea sin causa conocida. Este dato es inferior a los reportados por Malayeri et al. 2014 (64%); Burnens et al. 1992 (44%) y Chaban et al. 2010 (97%). Sin embargo, si se toma en cuenta que estos autores no reportan cuál fue la causa de diarrea observada, no se puede descartar que en algunos casos se deba al virus CPV. Si se suman los resultados totales obtenidos en este trabajo de muestras con diarrea (CPV positivo más CPV negativo) se llega a un porcentaje de ocurrencia de *Campylobacter* del 35,6%. Este resultado se aproxima más a los reportados anteriormente.

Nuestros resultados indican que la prevalencia de *Campylobacter* en perros es variable y depende del estado sanitario de los animales. Es posible que *Campylobacter* no esté presente en perros sanos del entorno urbano como se encontró en este trabajo, o por lo contrario que forme parte de la flora normal del intestino como comensales, como se ha reportado en trabajos anteriores (Begum et al. 2015; Holmberg et al. 2015; Parsons et al. 2010; Rahimi et al. 2012; Workman et al. 2005). En casos de diarrea son posibles varios escenarios. Si la misma no tiene causa conocida se discute si *Campylobacter* es el agente etiológico aunque no se ha encontrado evidencia (Burnens et al. 1992, Chaban et al. 2010). En casos de diarrea con agentes causales

conocidos, puede ocurrir que la presencia de *Campylobacter* haga que el medio sea susceptible para la infección por otros microorganismos o que tengan un efecto sinérgico (Sandstedt y Wierup, 1981). Sin embargo, en este trabajo no se encontró diferencia significativa entre los perros con diarrea causada por CPV y sin causa conocida. En algunos trabajos se ha encontrado un aumento de la prevalencia de *Campylobacter* en casos de diarrea, como lo han reportado Burnens et al. (1992) en Suiza, por Carbonero et al. (2012) en España, por Chaban et al. (2010) en Canadá y por Malayeri et al. (2014) en Irán. Nuestros resultados concuerdan con estos hallazgos. También es posible que los cambios ambientales consistentes con la condición de diarrea (aumento de volumen y peso de materia fecal), ya sea causada por agentes conocidos o no, sean favorables para el desarrollo de *Campylobacter* en el contexto de la microbiota intestinal (Chaban et al. 2010). El motivo y el mecanismo por el cual se produce este aumento no son claros (Chaban et al. 2010; Malayeri et al. 2014; Rossi et al. 2008). Por otro lado, en otros trabajos de Irán y de Italia no se ha encontrado evidencia de asociación estadística entre la presencia de *Campylobacter* y diarrea (Rahimi et al. 2012; Rossi et al. 2008), por lo que el aumento de la prevalencia no siempre es uniforme en perros con este síntoma (Chaban et al. 2010). En este trabajo no fue posible hacer un estudio de la prevalencia de *Campylobacter* comparando perros sanos y con diarrea según el país de procedencia debido a que las muestras extranjeras analizadas provienen únicamente de perros con diarrea causada por CPV. La comparación de la frecuencia del género *Campylobacter* en perros

con CPV entre los países analizados no mostró resultados estadísticamente significativos aún cuando una de las clases comparadas correspondía a un país sin frontera con los demás. No se realizó un análisis estadístico de la frecuencia de *Campylobacter* según la edad de los perros debido a que no se contó con la información de este dato para todas las muestras y además en el caso de perros con CPV estos pertenecen en su mayoría a cachorros (Anexo A).

En cuanto a la ocurrencia del género *Campylobacter* en reptiles sanos, Gilbert et al. (2015) realizaron un estudio de 444 reptiles de varias especies en Nueva Zelanda. En el mismo se encontró una prevalencia del género del 44,8%. En el presente trabajo se detectó el genoma del género *Campylobacter* en 1 de 78 muestras de reptiles (1,3%). Esta baja frecuencia puede deberse a varios motivos. En primer lugar porque se muestrearon únicamente dos tipos de reptiles: Serpentes (serpientes) y Lacertilia (lagartos). Esto puede ser significativo si se toma en cuenta que en su trabajo Gilbert et al. (2015) además muestrearon ejemplares de tortugas, siendo éstas las que presentaron mayor prevalencia para el género (60,4%) frente a 38% en lagartos y 32% en serpientes. En segundo lugar porque se contó únicamente con una muestra de *Iguana iguana*, que fue la especie de reptil positiva para el género en este trabajo, en el mencionado trabajo se muestrearon 19 iguanas que explican un 10,9% de los positivos dentro del grupo de lagartos.

### 6-3 Detección de especies del género *Campylobacter*

Mediante la secuenciación de los amplicones de 816 pb del gen 16S de *Campylobacter* obtenidos por PCR fue posible la identificación de las especies encontradas. En perros, de las 18 secuencias obtenidas, (todas de casos de diarrea), 16 corresponden a *C. upsaliensis* (88,9%). Las otras 2 corresponden a *C. jejuni* o *C. coli* (11,1%). Según la filogenia obtenida y la similitud de secuencia con las presentes en la base de datos no fue posible dilucidar si estas últimas son *C. jejuni* o *C. coli*. Estas dos especies presentan similitud muy alta en el loci 16S y con frecuencia son indistinguibles (On, 2005). Para poder determinarlas se podría amplificar y secuenciar otras regiones del genoma como el gen *atpA* (Miller et al. 2014). Según algunos trabajos anteriores, las especies encontradas son las más prevalentes en perros, tanto sanos como con diarrea. En casos de diarrea, la prevalencia de *C. upsaliensis* varía entre 0% (Rahimi et al. 2012) y 84,6% (Chaban et al. 2010) entre las muestras positivas. Por otro lado *C. jejuni* varía entre 7% (Burnens et al. 1992) y 62,5% (Malayeri et al. 2014). Por último, la prevalencia de *C. coli* varía entre 8,3% (Rahimi et al. 2012) y 24,6% (Chaban et al. 2010). Las diferencias encontradas en las prevalencias pueden deberse a las distintas metodologías utilizadas. Los trabajos anteriores estuvieron centrados en la detección de ciertas especies de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* y *C. lari*). En algunos casos se emplearon únicamente técnicas de PCR que identifican una especie o un grupo de especies de *Campylobacter* (Chaban et al. 2010;

Himsworth et al. 2010), y en otros trabajos se utilizaron estas técnicas combinadas con la obtención del cultivo (Carbonero et al. 2012; Tsai et al. 2007). Como no existen condiciones de crecimiento óptimas comunes a todas las especies estos estudios se limitan a aquellas que sí son capaces de crecer en los medios seleccionados. En este trabajo se emplearon herramientas moleculares que son independientes de cultivo, presentan alta sensibilidad (Platts-Mills et al. 2014) y son capaces de detectar cualquier especie conocida de *Campylobacter* presente en la muestra mediante secuenciación del gen 16S del género.

En reptiles la especie encontrada en este trabajo, *C. iguaniorum*, fue reportada también en una iguana, en varias especies de serpientes y de tortugas, entre ellas una tortuga leopardo enferma (Benejat et al. 2014). En el año 2014 se obtuvo el primer genoma completo, proveniente de un dragón barbudo (Gilbert et al. 2014b). El rol del género *Campylobacter* en la patogenia de reptiles es discutible porque ninguna especie se ha asociado directamente a una enfermedad. La especie *C. iguaniorum* ha sido aislada tanto de reptiles sanos como de enfermos, aunque no se la ha vinculado directamente como el agente etiológico (Benejat et al. 2014).

#### **6-4 Animales domésticos y silvestres como hospederos del género *Campylobacter* y su rol zoonótico**

El interés creciente en *Campylobacter* radica en el rol que desempeña en la patogenia de diversas enfermedades y en el ambiente (Lastovica et al. 2014). Los animales domésticos, de granja y salvajes son reservorios naturales de las bacterias del género *Campylobacter*, donde éstas se encuentran como comensales en el intestino (Skirrow, 1991). La prevalencia de *Campylobacter* es mayor en animales de granja, seguido por mascotas y después animales salvajes (Pintar et al. 2015). Se excretan en las heces y pasan al ambiente encontrándose en el agua, el suelo y las playas (Ogden et al. 2009). Varias especies de *Campylobacter* fueron descritas como causantes de enfermedades en humanos y animales (Lastovica y Allos, 2008). La campylobacteriosis es una enfermedad zoonótica y una de las principales causas de gastroenteritis bacteriana en humanos (Olson et al. 2008; Chaban et al. 2010) causada principalmente por *C. coli* y *C. jejuni*, y en menor medida por *C. upsaliensis*, *C. concisus*, *C. gracilis*, *C. rectus* y *C. showae* (Lastovica y Allos, 2008). Las rutas de contagio más conocidas son dos: por medio de la ingestión de alimentos contaminados (principalmente los de origen animal) y por medio de rutas ambientales (ingesta de agua contaminada y contacto directo con animales o con sus heces) (Fullerton et al. 2007). El contacto de humanos con perros debido a la convivencia y compañía mutua existente hace miles de años supone un riesgo importante (Grześkowiak et al. 2015). Se reporta que el 6% de las gastroenteritis causadas por *Campylobacter* en humanos son

transmitidas por mascotas (Tenkate y Stafford, 2001). El hecho de que los perros sean portadores de *C. coli* y *C. jejuni*, como pudimos confirmar en nuestro trabajo, enfatiza este riesgo. Los reptiles son considerados reservorios naturales de *Campylobacter* (Gilbert et al. 2014b). En Europa y América del Norte estos animales son adquiridos como mascotas y en Asia como fuente de alimento (Gilbert et al. 2015). En países de la región, como Uruguay, los reptiles no tienen un rol relevante como mascotas convencionales, pero los que son autóctonos y conviven en zonas cercanas a establecimientos de campo podrían tener un rol importante en el contagio inter-especie con animales y humanos. De las cuatro especies encontradas en estos animales, *C. fetus testudinum*, *C. hyointestinalis*, *C. iguaniorum* y *C. geocheilonis*, las dos primeras son consideradas agentes patógenos en humanos (Lastovica et al. 2014; Tu et al. 2004). Las otras dos fueron recientemente descritas y su posible rol zoonótico aún no se ha investigado (Gilbert et al. 2015, Piccirillo et al. 2016). Por estos motivos es importante continuar con el relevamiento de *Campylobacter* en estos reservorios. Esto contribuye a ampliar el conocimiento de la filogenia y epidemiología del género.

## 7. CONCLUSIONES

- Se compararon dos metodologías de extracción de ADN que resultaron tener un desempeño similar.
- Se estandarizó una metodología basada en PCR para la amplificación de un fragmento de 507 pb del gen 16S de bacterias y arqueas utilizada como control de integridad del ADN extraído.
- Se estandarizó una PCR para la amplificación de un fragmento de 816 pb del gen 16S del género *Campylobacter* en muestras de materia fecal de perros y reptiles.
- En perros se encontró una prevalencia del género *Campylobacter* del 35,6 % en animales con diarrea. No se encontraron casos positivos en perros sanos.
- El 88,9% de los amplicones obtenidos en perros correspondieron a *C. upsaliensis* y el 11,1% a *C. jejuni* o *C. coli*.
- En reptiles se detectó la presencia de *Campylobacter* en una muestra (1,3%) que corresponde a la especie *C. iguaniorum*.
- Todos estos resultados reafirman la importancia de la vigilancia epidemiológica del género en animales domésticos y silvestres por el rol que estos desempeñan como reservorio natural.

## 8. PERSPECTIVAS

- Continuar con el relevamiento del género *Campylobacter* en animales de compañía de la región. Esto permitiría analizar la frecuencia por edad y en base al estado clínico del animal.
- Ampliar el muestreo a otras especies tanto de reptiles como de mamíferos.
- Amplificar el gen 16S completo y otras regiones del genoma de las dos secuencias obtenidas que se agrupan con *C. coli* y *C. jejuni* para dilucidar a cuál o cuáles de estas especies corresponden.
- Aislar las especies presentes en perros, secuenciar su genoma y compararlas con las que se encuentran en humanos.
- Aislar la cepa de *Campylobacter iguaniorum* encontrada en la muestra de reptil Uy\_AlbinR\_2015 para luego secuenciar el genoma completo y compararlo con los presentes en la base de datos.
- Analizar las secuencias obtenidas con picos superpuestos con mayor profundidad mediante secuenciación profunda o clonación para determinar, en caso de co-infección, las especies presentes.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albaugh, G., Iyengar, V., y Lohani, A. (1992). Isolation of exfoliated colonic epithelial cell a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *International Journal of Cancer*, 52, 347-350.

Appel, M., Scott, F., Carmichael, L., (1979). Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105 (8), 156-159.

Begum, S., Sekar, M., Gunaseelan, L., Gawande, M., Suganya, G., Malar, P., et al. (2015). Molecular identification of *Campylobacter jejuni* and *coli* from chicken, calves and dogs to determine its potential threat on human being. *Veterinary World* 8 (12), 1420-1423.

Benejat, L., Gravet A., Sifré, E., Ben Amor S., Quintard B., Mégraud, F., y Lehours, P. (2014). Characterization of a *Campylobacter fetus*-like strain isolated from the faeces of a sick leopard tortoise (*Stigmochelys pardalis*) using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight as an alternative to bacterial 16S rDNA phylogeny. *Lett. Appl. Microbiol.* 58 (4), 338-343.

Benjamin, J., Leaper, S., Owen, R., y Skirrow, M. (1983). Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. *Curr. Microbiol.* 8, 231-238.

Bessède, E., Solecki, O., Sifré, E., Labadi, L., y Mégraud, F. (2011). Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17 (11), 1735–1739.

Bhagavatula, J., y Singh, L. (2006). Genotyping faecal samples of Bengal tiger *Panthera tigris* for population estimation: A pilot study. *BMC Genetics*, 48 (7), 1-12.

Bradbury, W., y Munroe, D.. (1985). Occurrence of plasmids and antibiotic resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy and diarrheic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 22 (3), 339–346.

Bryner, J., O'Berry, P., y Frank, A. (1964). *Vibrio* infection of the digestive organs of cattle. *Amer. J. Vet. Res.* 25, 1048-1050.

Burnens, A., Angéloz-Wick B., y Nicolet, J. (1992). Comparision of Campylobacter carriage rates in diarrheic and healthy pet animals. *J. Vet. Med. B.* 39, 175-180.

Cáceres, A., Munoz, I., Iraola, G., Diaz-Viraque, F., y Collado, L. (2017). Campylobacter ornithocola sp. nov., a novel member of the Campylobacter lari group isolated from wild bird faecal samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67 (6). 1643-1649.

Calleros, L. 2015. Análisis de la variabilidad genética en Campylobacter fetus (Tesis de doctorado). PEDECIBA. Área Biología. Subárea Genética. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Calleros, L., Betancor, L., Iraola, G., Méndez, A., Morsella, C., Paolicchi, et al. (2016). Assessing the intra-species genetic variability in the clonal pathogen Campylobacter fetus: CRISPRs are highly polymorphic DNA markers. *Journal of Microbiological Methods*. Available online.

Campbell, B., Engel, A., Porter, M., y Takai, K. (2006). The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (6), 458–468.

Carbonero, A., Torralbo, A., Borge, C., Garcia-Bocanegra I., Arenas, A., Perea, A. (2012). Campylobacter spp., C. jejuni and C. upsaliensis infection-associated factors in healthy and ill dogs from clinics in Cordoba, Spain. Screening tests for antimicrobial susceptibility. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 35 (6), 505–512.

Chaban, B., Musil, K., Himsforth, C., y Hill J. (2009). Development of cpn60-based real-time quantitative PCR assays for the detection of 14 Campylobacter species and application to screening of canine fecal samples. *Appl Environ Microbiol*, 75 (10), 3055-3061.

Chaban, B., Ngeleka, M., y Hill, J. (2010). Detection and quantification of 14 Campylobacter species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiol.* 10, 73.

Clarridge, J. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 840 – 862.

Debruyne, L., Broman, T., Bergstrom, S., Olsen, B., On, S., y Vandamme, P. (2010a). Campylobacter subantarcticus sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 (4), 815-819.

- Debruyne, L., Broman, T., Bergstroem, S., Olsen, B., On, S., y Vandamme, P. (2010b). *Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 (8), 1870-1875.
- Debruyne, L., On, S., De Brandt, E., y Vandamme, P. (2009). Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 (5), 1126-1132.
- DeLong, E. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 5685-5689.
- Doyle, L. (1948). The etiology of swine dysentery. *Amer. J. Vet. Res.* 9, 50-51.
- Eiken, M. (1958). Studies on an anaerobic rod-shaped, gram negative microorganism: *Bacteroides corrodens* n. sp. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 43, 404-416.
- Emerson, D., Rentz, J., Lilburn, T., Davis, R., Aldrich, H., Chan, C. y Moyer, C. L. (2007). A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PLoS ONE*, 2 (8), e667.
- Engvall, EO., Brandstrom, B., Andersson, L., Baverud, V., Trowald-Wigh, G., Englund, L. (2003). Isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* species in faecal samples from Swedish dogs. *Scand. J. Infect. Dis.*, 35 (10), 713-718.
- Etoh, Y., Dewhirst, F., Paster, B., Yamamoto, A., y Goto, N. (1993). *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (4), 631-639.
- Figura, N., Guglielmetti, P., Zanchi, A., Partini N., Armellini, D., Bayeli, et al. (1993). Two cases of *Campylobacter mucosalis* enteritis in children. *J. Clin. Microbiol.* 31, 727-728.
- Florent, A. (1959). Les deux vibriosis genitales: la vibriose due a *V. fetus venerealis* et la vibriose d'origine intestinale due a *V. fetus intestinalis*. *Meded. Veeartesenijsch. Rijksuniv. Gent* 3, 1-60.
- Foley, J., Milan, J., Jang, S., Lawrence, J. y Gulland, F. (2004). *Campylobacter lawrenceae*, a new species isolated from northern elephant seals on the California coast. No publicado (a partir de 30 Noviembre 2004).
- Foster, G., Holmes, B., Steigerwalt, A., Lawson, P., Thorne, P., Byrer, D., Ross, H., Xerry, J., Thompson, P., y Collins, D. (2004). *Campylobacter insulaenigrae*

sp. nov., isolated from marine mammals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (6), 2369-2373.

Fullerton, K., Ingram, A., Jones, T., Anderson, E., McCarthy, P., Hurd, S. et al., (2007). Sporadic *Campylobacter* infection in infants: a population-based surveillance case-control study. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 26, 19–24.

Gebhart, C., Edmonds, P., Ward, G., Kurtz, H., y Brenner D. (1985). '*Campylobacter hyointestinalis*' sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J. Clin. Microbiol.* 21 (5), 715-720.

Gilbert, M., Kik, M., Miller, W., Duim, B., y Wagenaar, J. (2015). *Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 (3), 975-982.

Gilbert M., Kik M., Timmerman A., Severs T., Kusters J., Duim B., et al. (2014a). Occurrence, diversity, and host association of intestinal *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* in reptiles. *PLoS One*, 9 (7), e101599.

Gilbert, M., Miller, W., St. Leger, J., Chapman, M., Timmerman, A., Foster, G. y Wagenaar, J. (2017). *Campylobacter pinnipediorum* sp. nov., isolated from pinnipeds, comprising *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *pinnipediorum* subsp. nov. and *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *caledonicus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67 (6), 1961-1968.

Gilbert, M., Miller, W., Yee, E., Blaser, M., Wagenaar, J., y Duim, B. (2013). Complete genome sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* strain 03-427T. *Genome Announc.* 1 (6), e01002-13.

Gilbert, M., Miller, W., Yee, E., Kik, M., Wagenaar, J., Duim B. (2014b). Complete Genome Sequence of *Campylobacter iguaniorum* Strain 1485ET Isolated from a Bearded Dragon (*Pogona vitticeps*). *Genome Announc.*, 2 (4), e00844-14.

Gilbert, M. (2015). Biodiversity, ecology, and evolution of *Campylobacter* in reptiles. Tesis doctoral. Utrecht University, Utrecht, Países Bajos.

Gómez, C., Gutiérrez, J., Rodríguez, J., Sampedro, A., Sorlózano, A., Navarro, J. (2014). Evaluation of the rapid RIDAQUICK *Campylobacter*® test in a general hospital. *Diagn Microbiol Infect. Dis.* 78 (2), 101–104.

Gras, L., Smid, J., Wagenaar, J., Koene M., Havelaar, A., Friesema, I., et al. (2013). Increased risk for *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infection of pet origin

in dog owners and evidence for genetic association between strains causing infection in humans and their pets. *Epidemiol. Infect.* 141, 2526–2535.

Grzeškowiak, L., Endo, A., Beasley, S. (2015). Salminen S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe* 34 (0),14–23.

Gundogdu, O., Bentley, S., Holden, M., Parkhill, J., Dorrell, N., Wren B. (2007). Re-annotation and re-analysis of the *Campylobacter jejuni* NCTC11168 genome sequence. *BMC Genomics* 8, 162.

Gupta, R. (2006). Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (Campylobacteriales). *BMC genomics*, 7, 167.

Hald, B., Pedersen, K., Waino, M., Jorgensen, J., Madsen, M. (2004). Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 42 (5), 2003-2012.

Han, C., Kotsyurbenko, O., Chertkov, O., Held, B., Lapidus, A., Nolan, M., et al. (2012). Complete genome sequence of the sulfur compounds oxidizing chemolithoautotroph *Sulfuricurvum kujiense* type strain (YK-1T). *Stand. Genomic Sci.*, 6 (1), 94–103.

Himsworth, C., Skinner, S., Chaban, B., Jenkins, E., Wagner, B., Harms, N., et al. (2010). Short Report : Multiple Zoonotic Pathogens Identified in Canine Feces Collected from a Remote Canadian Indigenous Community. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(2), 338–341.

Holmberg, M., Rosendal, T., Engvall, E., Ohlson, A., Lindberg, A. (2015). Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in Swedish dogs and characterization of *C. jejuni* isolates. *Acta Vet. Scand.*, 57, 19.

Inglis, G., Hoar, B., Whiteside, D., y Morck, D. (2007). *Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (11), 2636-2644.

Iraola, G., Pérez, R., Naya, H., Paolicchi, F., Pastor, E., Valenzuela, S., et al. (2014). Genomic evidences for the emergence and evolution of pathogenicity and niche preferences in the genus *Campylobacter*. *Genome biology and evolution* 6 (9): 2392–405.

Jackson, F., y Goodman, Y. (1978). *Bacteroides ureolyticus*, a new species to accomodate strains previously identified as '*Bacteroides corrodens*, anaerobic'. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28, 197-200.

- Jiang H., Dong H., Zhang G., Yu B., Chapman L. R., Fields M. W. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3832–3845.
- Jones, F., Orcutt, M., y Little, R. (1931). Vibrios (*Vibrio jejuni* N. SP.) associated with intestinal disorders of cows and calves. *J. Exp. Med.* 53, 853-863.
- Kachler, M., Wecke, J., Futh, U., Heise, W., Goebel, U., y Halle, E. (2000). *Campylobacter faecalis* sp. nov., isolated from stool of an AIDS patient with ulcerative colitis. No publicado (a partir de 21 March 2000).
- Kaur, T., Singh, J., Huffman, M., Petrzalkova, K., Taylor, N., Xu, S., et al. (2011). *Campylobacter troglodytis* - sp. nov., isolated from feces of human-habituated wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (7), 2366-2373.
- Kawatsu, K., Kumeda. Y., Taguchi M., Yamazaki-Matsune W., Kanki, M, Inoue K. (2008). Development and evaluation of immunochromatographic assay for simple and rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 46 (4), 1226–1231.
- Kerstens, K., Devos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P. and Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the Proteobacteria. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, K. y E. Stackebrandt, (Eds.). *The Prokaryotes*. (3-37). New York: A Handbook on the Biology of Bacteria. Springer.
- King, E. (1957). Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J. Infect. Dis.* 101, 119-128.
- Koene, M., Houwers, D., Dijkstra, J., Duim, B., Wagenaar, J., (2004). Simultaneous presence of multiple *Campylobacter* species in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 819–821.
- Koziel, M., Lucey, B., Bullman, S., Corcoran, G., Sleator, R. (2012). Molecular-based detection of the gastrointestinal pathogen *Campylobacter ureolyticus* in unpasteurized milk samples from two cattle farms in Ireland. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1876–1882.
- Koziel, M., O'Doherty, P., Vandamme, P., Corcoran, G., Sleator, R., y Lucey, B. (2014). *Campylobacter corcagiensis* sp. nov., isolated from faeces of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64 (8), 2878-2883.

- Lane, D., Pace, B., Olsen, G., Stahl, D., y Sogin, M. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6955-6959.
- Lantz, P., Matsson, M., Wadström, T. y Rådström, P. (1997). Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J. Microbiol Methods* 28, 159–167.
- Lastovica, A. y Allos, B. (2008). Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. En C. Nachamkin, M. Blaser, (Eds.). *Campylobacter*. (123-149) (3<sup>a</sup> ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Lastovica, A., Le Roux, E., Warren, R., y Klump, H. (1993). Clinical isolates of *Campylobacter mucosalis*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2835–2836.
- Lastovica, A., Le Roux, E., Warren, R., y Klump, H. (1994). Additional data on clinical isolates of *Campylobacter mucosalis*. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2338–2339.
- Lastovica, A., On, S. y Zhang, L. (2014). 'The family Campylobacteraceae'. En E. Rosenberg et al. (Eds.), *The Prokaryotes*, (307-335). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Laternus, C., y Wieler, L. (2007). Application of *Campylobacter* molecular classification and typing techniques in veterinary medicine: old-established methods and new perspectives. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 120 (7-8), 267–278.
- Lawson, G., Leaver, J., Pettigrew, G., y Rowland, A. (1981). Some features of *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis* subsp. nov., nom. rev. and their taxonomic significance. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31 (4), 385-391.
- Lawson, A., Linton, D., y Stanley, J. (1998). 16S rRNA gene sequences of 'Candidatus *Campylobacter hominis*', a novel uncultivated species, are found in the gastrointestinal tract of healthy humans. *Microbiology* 144 (8), 2063-2071.
- Lawson, A., On, S., Logan, J. y Stanley J. (2001). *Campylobacter hominis* sp. nov. from the human gastrointestinal tract. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(2), 651–660.
- Lawson, G., y Rowland, A. (1974). Intestinal adenomatosis in the pig: a bacteriological study. *Res. Vet. Sci.*, 17 (3), 331-336.
- Liébana, M., Gutierrez, J., Riazzo, C. y Navarro, J. (2014). Sensibilidad de tres test inmunocromatográficos para detección de *Campylobacter* y *Salmonella* en

heces en comparación con el cultivo. *Revista Española de Quimioterapia*, 27 (2), 102-105.

Linton, D., Owen, R., y Stanley, J. (1996). Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research in Microbiology* 147, 707-718.

Logan, J., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A., y Stanley, J. (2000). *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50 (2), 873-881.

López, C., Agostini, A., Giacoboni, G., Cornero, F., Tellechea, D. y Trinidad J. (2003). *Campylobacteriosis* in a low income community in Buenos Aires, Argentina. *Revta Scient. Technol.*, 22(3), 1013-1020.

Lübeck, P., Wolffs, P., On, S., Ahrens, P., Rådström, P. y Hoorfar, P. (2003). Toward an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant campylobacters: assay development and analytical validation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (9), 5664–5669.

Ludwig, W., R. Rossellomora, R. Aznar et al. (1995). Comparative sequence analysis of 23S ribosomal-RNA from proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 18 (2), 164–188.

Ludwig, W., y Schleifer, K. (1999). Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News*, 65 (11), 752–757.

Ludwig, W., y Klenk, H. (2001). Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. En G. Garrity (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (49-65) (2<sup>a</sup> ed) (1). Baltimore: Springer-Verlag.

Malayeri, H., Jamshidi, S., Salehi, T., Fasaie, B., y Tamaei, I. (2014). Identification of *Campylobacter* spp. with multiplex PCR assay in healthy and diarrheic dogs. *Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences*, 4 (9). 489-495.

Malbrán, C. (2001). Manual de procedimientos *Campylobacter*. Ministerio de Salud. Subsecretaría de Investigación y Tecnología.. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Bacteriología. Buenos Aires Argentina. (1–29). Recuperado el 22 de noviembre del 2017, de: <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=Q0RBGlqsQOK%3D&tabid=120>.

McFadyean, J., y Stockman, S. (1913). Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III. Abortion in sheep. London: HMSO.

Miller, W., Yee, E., Jolley, K., y Chapman, M. (2014). Use of an improved atpA amplification and sequencing method to identify members of the Campylobacteraceae and Helicobacteraceae. *Lett Appl Microbiol* 58, 582–590.

Monteiro, L., Bonnemaison, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J. y Megraud, F. (1997) Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model. *J Clin Microbiol* 35, 995–998.

Moore, J., Barton, M., Blair, I., Corcoran, D., Dooley, J., Fanning, S., et al. (2006). The epidemiology of antibiotic resistance in Campylobacter. *Microbes Infect* 8 (7), 1955–1966.

Nakagawa, S. y Takai, K. (2014). “The family Nautiliaceae: the genera Caminibacter, Lebetimonas, and Nautilia”. En E. Rosenberg, E. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson, (Eds.), *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria* (393-399). Berlin: Springer.

Ogden, I., Dallas, J., MacRae, M., Rotariu, O., Reay, K., Malcolm, Leitch, M., et al. (2009). Campylobacter Excreted into the Environment by Animal Sources: Prevalence, Concentration Shed, and Host Association. *Foodborne Pathog Dis.* 6 (10), 1161–1170.

Olson, S., Ethelberg, S., van Pelt, W., y Tauxe, R. (2008). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialised nations. En I. Nachamkin, C. Szymanski y M. Blaser, (Eds.), *Campylobacter jejuni: Current and Future Trends* (163-190). Herndon, VA: ASM Press.

On, S. (2005) Taxonomy, phylogeny, and methods for the identification of Campylobacter species. En J. Ketley y M. Konkel, (Eds.), *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology* (13–42). Norfolk, UK: Horizon Scientific Press.

On, S., Bloch, B., Holmes, B., Hoste, B., y Vandamme, P. (1995). Campylobacter hyointestinalis subsp. lawsonii subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of Campylobacter hyointestinalis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (4), 767-774.

Ott, S., Musfeldt, M., Ullmann, U., Hampe, J., y Schreiber, S. (2004) Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (6), 2566–2572.

Parkhill, J., Wren, B., Mungall, K., Ketley J., Churcher, C., Basham, D., et al. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403 (6770), 665–668.

Parsons, B., Porter, C., Ryvar, R., Stavisky, J., Williams, N., Pinchbeck, G., et al. (2010). Prevalence of *Campylobacter* spp. in a cross-sectional study of dogs attending veterinary practices in the UK and risk indicators associated with shedding. *Veterinary J.*, 184 (1), 66–70.

Parsons, B., Williams, N., Pinchbeck, G., Christley, R., Hart, C., Gaskell, R. (2011). Prevalence and shedding patterns of *Campylobacter* spp. in longitudinal studies of kennelled dogs. *The Veterinary Journal*, 190, 249–254.

Pérez R., Bianchi P., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Maya, L., Panzera, Y., Sosa, K., Zoller, S. (2012). Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet. Microbiol* 155, 214–219.

Piccirillo, A., Niero, G., Calleros, L., Perez, R., Naya, H., et al. (2016). *Campylobacter geochelonis* sp. nov. isolated from the western Hermann's tortoise (*Testudo hermanni hermanni*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 (9), 3468–3476.

Pintar, K., Christidis, T., Thomas, M., Anderson, M., Nesbitt, A., Keithlin, J., et al. (2015) A Systematic Review and Meta-Analysis of the *Campylobacter* spp. Prevalence and Concentration in Household Pets and Petting Zoo Animals for Use in Exposure Assessments. *PLoS ONE* 10 (12), e0144976.

Platts-Mills, J., Liu, J., Gratz, J., Mduma, E., Amour, C., Swai, N., et al. (2014). Detection of *Campylobacter* in Stool and Determination of Significance by Culture, Enzyme Immunoassay, and PCR in Developing Countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1074–1080.

Pontiroli, A., Travis, E.R, Sweeney, F., Porter, D., Gaze, W., Mason, S. et al. (2011). Pathogen quantitation in complex matrices: a multioperator comparison of DNA extraction methods with a novel assessment of PCR inhibition. *PLoS ONE* 6, e17916.

Procter, T., Pearl, D., Finley, R., Leonard, E., Janecko, N., Reid-Smith R., et al. (2014). A Cross-Sectional study examining *Campylobacter* and other zoonotic enteric pathogens in dogs that frequent dog parks in three cities in South-Western Ontario and risk factors for shedding of *Campylobacter* spp. *Zoonoses Public Health*, 61(3), 208-218.

Rahimi, E., Chakeri, A., y Esmizadeh, A. (2012). Prevelence of Campylobacter species in fecal samples from cats and dogs in Iran. *Slov. Vet. Res.*, 49 (13), 117–122.

Rambaut, A. (2014). FigTree 1.4.2 software. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.

Rodrigues, C., Melo, R., Fonseca, B., Martins, P., Ferreira, F., Araújo, M., et al. (2015). Occurrence and characterization of Campylobacter spp. isolates in dogs, cats and children. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(4), 365-370.

Rossi, M., Debruyne, L., Zanoni, R.G., Manfreda, G., Revez, J., and Vandamme, P. (2009). Campylobacter avium sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 (9), 2364-2369.

Rossi, M., Hänninen, M., Revez, J., Hannula, M. y Zanoni, R. (2008). Occurrence and species level diagnostics of Campylobacter spp., enteric Helicobacter spp. and Anaerobiospirillum spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Veterinary Microbiology*, 129 (3-4): 304-314.

Sandstedt, K., y Ursing, J. (1991). Description of Campylobacter upsaliensis sp. nov. previously known as the CNW group. *Syst. Appl. Microbiol.* 14 (1), 39-45.

Sandstedt, K., y Wierup, M. (1981). Concomitant occurrence of Campylobacter and parvoviruses in dogs with gastroenteritis. *Vet. Res. Commun.*, 4 (4), 271-273.

Schunck, B., Kraft, W., y Truyen, U. (1995). A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J. Virol. Methods* 55, 427–33.

Sébald, M. y Véron M. (1963). Teneur en bases da l'ADN et classification des vibrions. *Ann Inst Pasteur*, 105, 897–910.

Skirrow, M. (1991). Epidemiology of Campylobacter enteritis. *Int J. Food Microbiol.*, 12 (1), 9-16.

Skirrow, M. (2006). John McFadyean and the centenary of the first isolation of Campylobacter species. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 43(9): 1213–1217.

Smith, T., y M. S. Taylor. (1919). Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, N. SP) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J. Exp. Med.* 30, 299-311.

Stackebrandt, E., y Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* 33, 152–155.

Stackebrandt, E., Murray, R., y Trüper H. (1988). Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives.” *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38 (2), 321–325.

Stanley, J., Burnens, A., Linton, D., On, S., Costas, M., y Owen, R. (1992). *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. *J. Gen. Microbiol.*, 138 (11), 2293-2303.

Steele, T., y Owen, R. (1988). *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov., a subspecies of nitrate-negative campylobacters isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38 (3), 316-318.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12), 2725-2729.

Tanner, A., Badger, S., Lai, C., Listgarten, M., Visconti, R., y Socransky, S. (1981). *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31 (4), 432-445.

Tenkate, T., Stafford, R., (2001). Risk factors for *Campylobacter* infection in infants and young children: a matched case-control study. *Epidemiol. Infect.*, 127 (3), 399–404.

Tsai, H., Huang, H., Lin, C., Lien, Y., y Chou, C. (2007). Salmonella and Campylobacters in household and stray dogs in Northern Taiwan. *Veterinary Research Communications*, 31 (8), 931–939.

Tu, Z., Zeitlin, G., Gagner, J., Keo, T., Hanna, B., y Blaser, M. (2004). *Campylobacter fetus* of reptile origin as a human pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (9), 4405–4407.

Van, T., Elshagmani, E., Gor, M., Scott, P., y Moore, R. (2016). *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66 (11), 4518–4524.

Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E., y Falsen, E. (2010). Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60 (9), 2016-2022.

- Vandamme, P., y De Ley, J. (1991). Proposal for a new family Campylobacteraceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 (3), 451–455.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., y De Ley, J. (1991). Revision of Campylobacter, Heliocobacter, and Wolinella taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of Arcobacter gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 (1), 88–103.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60 (2), 407–438.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., et al. (1992). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with Arcobacter butzleri in an Italian school. *J. Clin. Microbiol.*, 30 (9), 2335–2337.
- Véron, M., y Chatelain, R. (1973). Taxonomic study of the genus Campylobacter Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, Campylobacter fetus (Smith and Taylor). Sebald and Véron. *Int J Syst Bacteriol* 23, 122–134.
- Waite, D., Vanwonderghem, I., Rinke, C., Parks, D., Zhang, Y., Takai, K., et al. (2017). Comparative genomic analysis of the class Epsilonproteobacteria and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). *Front. Microbiol.* 8, 682.
- Waits, L. y Paetkau, D. (2005). Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal of Wildlife Management* 69 (4), 1419-1433.
- Wang, C., Shia, W., Jhou, Y. y Shyu, C. (2013). Occurrence and molecular characterization of reptilian Campylobacter fetus strains isolated in Taiwan. *Vet Microbiol* 164, 67-76.
- Weisburg, G., Barns, S., Pelletier, D., y Lane D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *RNAJ. Bacteriol.*, 173 (2), 697.
- Wolin, M., Wolin, E., y Jacobs, N. (1961). Cytochrome producing anaerobic vibrio, *Vibrio succinogenes* sp. n. *J. Bacteriol.*, 81 (6), 911-917.
- Workman, S., Mathison, G., y Lavoie, M. (2005). Pet Dogs and Chicken Meat as Reservoirs of Campylobacter spp. in Barbados. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (6), 2642–2650.

Zanoni, R., Debruyne, L., Rossi, M., Revez, J., y Vandamme, P. (2009). *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. *Int. J. Syts. Evol. Microbiol.*, 59 (7), 1666-1671.

## ANEXO A.

**Tabla de muestras de materia fecal de perros analizadas en este trabajo.** Se indica el año de colecta, la edad del animal, la raza, el sexo, los síntomas clínicos, el país de donde proviene, el resultado de la amplificación del gen *16S* de *Campylobacter* y el grupo al cual pertenecen las muestras (azul: CPV+, verde: CPV-, rosado: sanos).

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
Uy397P_2011	2011	8 meses	Sin datos	Macho	Vómitos, gastroenteritis, diarrea	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy383P_2012	2012	4 meses	Cruza	Hembra	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy384P_2012	2012	6 semanas	Cruza	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy385P_2012	2012	6 semanas	Dachshund	Hembra	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy386P_2012	2012	7 semanas	Bulldog francés	Macho	Fiebre, vómitos, piodermia abdominal, gastroenteritis, diarrea hemorrágica fétida, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy387P_2012	2012	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Uruguay	Negativo
Uy388P_2012	2012	5 meses	Labrador	Macho	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, depresión, decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy389P_2012	2012	6 meses	Labrador	Macho	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea	Uruguay	Negativo
Uy390P_2012	2012	8 meses	Cocker	Hembra	Fiebre, vómitos, anorexia, diarrea hemorrágica, depresión-decaimiento.	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy391P_2012	2012	3 meses	Caniche	Hembra	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy392P_2012	2012	5 meses	Bulldog francés	Hembra	Fiebre, vómitos, anorexia, diarrea hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy393P_2012	2012	Sin datos	Cruza	Macho	Sin datos	Uruguay	Negativo
Uy394P_2012	2012	4 meses	Rottweiler	Macho	Fiebre, gastroenteritis	Uruguay	Negativo
Uy395P_2012	2012	4 meses	Cruza	Hembra	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy472P_2013	2013	2 meses	Bulldog francés	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis muco-hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
Uy473P_2013	2013	2 meses	Terranova	Hembra	Fiebre, vómitos, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy475P_2013	2013	2 meses	Labrador	Hembra	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy476AP_2013	2013	2 meses	Bulldog inglés	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy476BP_2013	2013	2 meses	Bulldog inglés	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión	Uruguay	Negativo
Uy476CP_2013	2013	2 meses	Bulldog inglés	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión	Uruguay	Negativo
Uy476DP_2013	2013	2 meses	Bulldog inglés	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión	Uruguay	Negativo
Uy476EP_2013	2013	2 meses	Bulldog inglés	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión	Uruguay	Negativo
Uy477P_2013	2013	3 meses	Pit bull	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy478P_2014	2014	3 meses	Pit bull	Hembra	Vómitos, diarrea, depresión-decaimiento	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy479P_2014	2014	3 meses	Caniche	Hembra	Vómitos, diarrea, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy480P_2014	2014	2 meses	Pit bull	Hembra	Fiebre, diarrea hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy481P_2014	2014	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy483P_2014	2014	3 meses	Sin datos	Hembra	Vómitos, dolor abdominal, diarrea hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy484P_2014	2014	3 meses	Cruza	Hembra	Fiebre, anorexia, diarrea hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy485P_2014	2014	3 meses	Caniche	Hembra	Fiebre, hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy486P_2014	2014	6 semanas	Labrador	Hembra	Fiebre, vómitos, diarrea hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy487P_2014	2014	4 meses	Mastín	Macho	Fiebre, vómitos, diarrea hemorrágica, parásitos	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy488P_2014	2014	4 meses	Cruza	Macho	Anorexia, diarrea hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy489P_2014	2014	3 meses	Pit bull	Hembra	Vómitos, diarrea hemorrágica	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy490P_2014	2014	2 meses	Sin datos	Macho	Gastroenteritis	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy491P_2014	2014	3 meses	Dogo de Burdeos	Macho	No come, gastroenteritis	Uruguay	Negativo

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
Uy492P_2014	2014	4 meses	Labrador	Hembra	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Positivo
Uy493P_2014	2014	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Uruguay	Positivo
Uy494P_2014	2014	1 año y 1 mes	Cruza	Macho	Tos, estornudos, fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica, diarrea hemorrágica depresión-decaimiento, ictericia	Uruguay	Positivo
Uy495P_2014	2014	3 meses	Sin datos	Macho	Vómitos, diarrea hemorrágica	Uruguay	Positivo
Uy496P_2014	2014	5 meses	Cimarrón	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy497P_2014	2014	4 meses	Cruza	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy498P_2014	2014	2 meses	Golden retriever	Hembra	Vómitos, diarrea hemorrágica	Uruguay	Positivo
Uy499P_2014	2014	2 meses	Golden retriever	Sin datos	Vómitos, diarrea hemorrágica	Uruguay	Positivo
Uy500P_2014	2014	3 meses	Pit bull	Macho	Vómitos, diarrea hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy501P_2014	2014	8 meses	Cruza	Macho	Gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	Positivo
Uy502P_2014	2014	7 meses	Labrador	Macho	Fiebre, vómitos, anorexia, diarrea líquida marrón con restos de tejido mucoso, depresión-decaimiento	Uruguay	Positivo
Uy503P_2014	2014	5 meses	Sin datos	Hembra	Vómitos, diarrea hemorrágica	Uruguay	Positivo
Uy504P_2014	2014	70 días	Cruza	Macho	Diarrea muco-hemorrágica, Reflujo con salivación, dolor abdominal	Uruguay	Positivo
Uy505P_2014	2014	5 meses	Labrador	Macho	Gastroenteritis hemorrágica, vómitos, depresión	Uruguay	Positivo
Uy507P_2014	2014	7 años y 4 meses	Cocker	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy508P_2014	2014	2 meses	Cruza	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy509P_2014	2014	4 meses	Rottweiler	Hembra	Gastroenteritis, depresión	Uruguay	Negativo
Uy510P_2014	2014	3 años y 2 meses	Sin datos	Macho	Fiebre, gastroenteritis hemorrágica, depresión-decaimiento, dolor abdominal	Uruguay	Negativo

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
Uy511P_2014	2014	3 meses	Ovejero alemán	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea hemorrágica, convulsiones	Uruguay	Negativo
Uy512P_2014	2014	3 meses	Labrador	Hembra	Vómitos, diarrea hemorrágica	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy513P_2014	2014	1 mes	Cruza	Macho	Gastroenteritis hemorrágica, shock	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy514P_2014	2014	5 años y 2 meses	Cruza	Hembra	Anorexia, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy515P_2014	2014	7 meses	Labrador	Macho	Vómitos diarrea con sangre depresión-decaimiento, dolor abdominal	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy516P_2014	2014	4 meses	Mastín napolitano	Macho	Vómitos, diarrea hemorrágica	Uruguay	<b>Positivo</b>
EcE1P_2011	2011	4 meses	Caniche	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento, conjuntivitis	Ecuador	Negativo
EcE10P_2011	2011	3 meses	Pit Bull	Macho	Anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE12P_2011	2011	2 meses	Cruza	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE17P_2011	2011	5 meses	Cruza	Hembra	Fiebre, vómito, anorexia, gastroenteritis, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE20P_2011	2011	2 meses	Schnauzer	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis	Ecuador	Negativo
EcE6P_2011	2011	2 meses	Pastor alemán	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE2P_2011	2011	2 meses	Cruza	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE3P_2011	2011	3 meses	Cruza	Hembra	Vómitos, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE4P_2011	2011	6 meses	Cruza	Macho	Vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE5P_2011	2011	2 meses	Caniche	Hembra	Fiebre, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento, conjuntivitis	Ecuador	Negativo
EcE7P_2011	2011	3 meses	Husky siberiano	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE8P_2011	2011	5 meses	Cruza	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea	Ecuador	Negativo
EcE9P_2011	2011	4 meses y 2 semanas	Cocker	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
EcE11P_2011	2011	3 meses y 2 semanas	Pastor alemán	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE13P_2011	2011	2 meses	Cruza	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE14P_2011	2011	5 meses y 2 semanas	Cruza	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE15P_2011	2011	3 meses y 2 semanas	Caniche	hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE16P_2011	2011	3 meses y 2 semanas	Caniche	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE18P_2011	2011	4 meses	Caniche	Macho	Fiebre, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE19P_2011	2011	2 meses y 1 semana	Cruza	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE21P_2011	2011	2 meses	Dálmata	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE22P_2011	2011	4 meses y 1 semana	Cruza	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE23P_2011	2011	4 meses y 1 semana	Cruza	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE24P_2011	2011	4 meses y 1 semana	Cruza	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE25P_2011	2011	3 meses y 1 semana	Shar Pei	Macho	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE26P_2011	2011	3 meses y 2 semanas	Cruza	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE27P_2011	2011	3 meses y 3 semanas	Dachshund	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE28P_2011	2011	3 meses y 2 semanas	Golden retriever	Macho	Vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE29P_2011	2011	2 meses y 2 semanas	Cruza	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
EcE30P_2011	2011	1 mes	Cruza	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE31P_2011	2011	5 meses	Caniche	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE32P_2011	2011	4 meses y 2 semanas	Schnauzer	Macho	Vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE33P_2011	2011	2 meses	Cruza	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE34P_2011	2011	4 meses	Caniche	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE35P_2011	2011	2 meses	Cruza	Macho	Vómitos, diarrea	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE36P_2011	2011	3 meses	Cruza	Macho	Vómitos, anorexia, diarrea	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE37P_2011	2011	2 meses	Schnauzer	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE38P_2011	2011	2 meses	Cruza	Macho	Vómitos, anorexia, diarrea	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE39P_2011	2011	2 meses y 2 semanas	Husky siberiano	Hembra	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE40P_2011	2011	3 meses y 1 semana	Cruza	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE41P_2011	2011	3 meses	Cruza	Macho	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE42P_2011	2011	3 meses y 1 semana	Cruza	Macho	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE43P_2011	2011	2 meses y 2 semanas	Cruza	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, depresión-decaimiento	Ecuador	Negativo
EcE44P_2011	2011	2 meses y 3 semanas	Cruza	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, gastroenteritis, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE45P_2011	2011	2 meses y 2 semanas	Cruza	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE46P_2011	2011	3 meses y 1 semana	Cruza	Macho	Vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
EcE47P_2011	2011	2 meses y 2 semanas	Caniche	Hembra	Vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE48P_2011	2011	2 meses y 2 semanas	Cruza	Macho	Vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE49P_2011	2011	3 meses y 3 semanas	Cruza	Macho	Vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE50P_2011	2011	4 meses	Cruza	Hembra	Fiebre, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE51P_2011	2011	4 meses y 1 semana	Cruza	Hembra	Vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE52P_2012	2012	4 meses	Pastor alemán	Macho	Hipotermia, vómitos, anorexia, diarrea, depresión-decaimiento	Ecuador	<b>Positivo</b>
EcE53P_2012	2012	2 meses	Cruza	Hembra	Anorexia, diarrea	Ecuador	Negativo
BrLuckyP_2014	2014	3 meses	Cruza	Macho	Sin datos	Brasil	<b>Positivo</b>
BrPérolaP_2014	2014	4 meses	Labrador	Hembra	Sin datos	Brasil	Negativo
BrMeIP_2014	2014	Sin datos	Sin datos	Hembra	Sin datos	Brasil	Negativo
BrCindyP_2014	2014	Sin datos	Sin datos	Hembra	Sin datos	Brasil	Negativo
BrNeguinhoP_2013	2013	6 meses	Cruza	Macho	Sin datos	Brasil	Negativo
BrTedP_2014	2014	4 meses	Pastor alemán	Macho	Sin datos	Brasil	Negativo
BrChazánP_2014	2014	4 meses	Cruza	Macho	Sin datos	Brasil	Negativo
BrBetoP_2014	2014	3 meses	Cruza	Macho	Sin datos	Brasil	<b>Positivo</b>
BrAthenaP_2014	2014	4 meses	Boyero de Berna	Hembra	Sin datos	Brasil	<b>Positivo</b>
BrPB1P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB2P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB3P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB4P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB5P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB6P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB7P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
BrPB8P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	<b>Positivo</b>
BrPB10P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB11P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB12P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB14P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB15P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB16P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB18P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB19P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB20P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB21P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB22P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrSpakeP_2012	2012	Sin datos	Sin datos	Macho	Sin datos	Brasil	<b>Positivo</b>
BrA4P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrMeIP_2014	2014	Sin datos	Sin datos	Hembra	Sin datos	Brasil	Negativo
BrBillyP_2014	2014	Sin datos	Sin datos	Macho	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB9P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB13P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrPB17P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
BrD1P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	<b>Positivo</b>
BrD3P_2013	2013	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Brasil	Negativo
ArArg9P_2003	2003	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	<b>Positivo</b>
ArArg32P_2008	2008	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	Negativo
ArArg35P_2008	2008	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	<b>Positivo</b>
ArArg64P_2010	2010	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	<b>Positivo</b>
ArArg66P_2010	2010	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	<b>Positivo</b>
ArArg67P_2010	2010	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Paraguay	<b>Positivo</b>

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
ArArg26P_2008	2008	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	<b>Positivo</b>
ArArg33P_2008	2008	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	Negativo
ArArg50P_2009	2009	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	Negativo
ArArg71P_2010	2010	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	Negativo
ArArg72P_2010	2010	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	<b>Positivo</b>
ArArg68P_2010	2010	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	<b>Positivo</b>
PyPy1P_2009	2009	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Argentina	<b>Positivo</b>
Uy522P_2014	2014	4 meses	Pit bull	Macho	Vómitos, gastroenteritis, diarreas intermitentes	Uruguay	Negativo
Uy474P_2013	2013	3 meses	Labrador	Hembra	Hipotermia, Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, diarrea hemorrágica abundante, líquida, olor fétido, estado de shock	Uruguay	Negativo
Uy385P_2012	2012	6 semanas	Dachshund	Hembra	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy395P_2012	2012	4 meses	Cruza	Hembra	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy396P_2012	2012	7 años	Cruza	Macho	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, convulsiones, diarrea hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy398P_2011	2011	1 año y 6 meses	Sin datos	Macho	Fiebre, diarrea con sangre	Uruguay	Negativo
Uy401P_2012	2012	5 meses	Golden retriever	Hembra	Conjuntivitis, fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea líquida, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy411P_2012	2012	3 meses	Labrador	Hembra	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy413P_2012	2012	9 años	Yorkshire terrier	Hembra	Anorexia, hipotermia, gastroenteritis hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy415P_2012	2012	4 años	Husky siberiano	Hembra	Diarrea con sangre, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy429P_2012	2012	2 meses	Cruza	Hembra	Anorexia parcial, gastroenteritis, diarrea líquida con sangre y flemas, leve depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
Uy436P_2012	2012	4 meses	Sin datos	Sin datos	Vómitos, gastroenteritis hemorrágica, luego moquillo y estornudos	Uruguay	Negativo
UyH5P_2012	2012	2 meses	Cimarrón	Hembra	Vómitos, anorexia, diarrea líquida con sangre, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy455P_2013	2013	3 meses	Cimarrón	Macho	Vómitos, anorexia, gastroenteritis muco-hemorrágica, depresión-decaimiento, deshidratación, leucopenia.	Uruguay	Negativo
Uy466P_2013	2013	2 años	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Uruguay	Negativo
Uy366P_2011	2011	1 año	Labrador	Hembra	Sin datos	Uruguay	Negativo
Uy360P_2011	2011	9 meses	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Uruguay	Negativo
Uy359P_2011	2011	3 meses	Sin datos	Macho	Vómitos, diarrea hemorrágica	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy356P_2011	2011	Sin datos	Bulldog francés	Macho	Sin datos	Uruguay	Negativo
Uy355P_2011	2011	Sin datos	Pastor alemán	Macho	Sin datos	Uruguay	Negativo
Uy340P_2011	2011	Sin datos	Pastor alemán	Sin datos	Sin datos	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy325P_2011	2011	2 años y 5 meses	Cruza	Hembra	Gastroenteritis hemorrágica, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy314P_2011	2011	3 meses	Pit bull	Macho	Diarrea maloliente, hemorrágica	Uruguay	Negativo
Uy313P_2011	2011	3 meses y 2 semanas	Labrador	Macho	Fiebre, vómitos, anorexia, gastroenteritis, diarrea, depresión-decaimiento	Uruguay	Negativo
Uy309P_2011	2011	8 meses	Pastor alemán	Macho	Vómitos, diarrea con sangre, convulsiones	Uruguay	Negativo
Uy304P_2011	2011	Sin datos	Cruza	Macho	Sin datos	Uruguay	Negativo
Uy299P_2011	2011	2 meses	Labrador	Macho	Fiebre	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy278P_2010	2010	2 meses	Caniche	Hembra	Vómitos, anorexia, gastroenteritis hemorrágica, deshidratación	Uruguay	Negativo
Uy274P_2010	2010	8 meses	Golden retriever	Hembra	Vómitos, diarrea hemorrágica	Uruguay	<b>Positivo</b>
Uy273P_2010	2010	4 meses	Cimarrón	Macho	Materia fecal blanda, coma	Uruguay	Negativo
UySaraP_2015	2015	6 años y 6 meses	Cruza	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UyPelusaP_2015	2015	6 años	Cruza	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UyTheoP_2015	2015	2 meses	Cruza	Macho	Sano	Uruguay	Negativo
UyColoP_2015	2015	9 años	Cruza	Macho	Sano	Uruguay	Negativo
UyKimbaP_2015	2015	4 años	Cruza	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UYClementinaP_2015	2015	4 meses	Fox terrier	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo

Muestra	Año de colecta	Edad	Raza	Sexo	Síntomas	País	PCR <i>Campylobacter</i>
UyApoloP_2015	2015	9 años	Cruza	Macho	Sano	Uruguay	Negativo
UyMateoP_2016	2016	11 años y 4 meses	Labrador	Macho	Sano	Uruguay	Negativo
UyIndianaP_2016	2016	10 años y 5 meses	Cruza	Macho	Sano	Uruguay	Negativo
UyCatalinaP_2016	2016	11 años	Cruza	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UyRudolphP_2016	2016	9 años	Cruza	Macho	Sano	Uruguay	Negativo
UyLupiP_2016	2016	2 años y 6 meses	Cruza	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UyGitanaP_2016	2016	11 años y 4 meses	Gran danés	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UyLockyP_2016	2016	7 años y 2 meses	Cruza	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UyFatmagulP_2016	2016	8 meses	Cruza	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UyCelesteP_2016	2016	5 años y 7 meses	Weimaraner	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UyLolaP_2016	2016	12 años y 9 meses	Cruza	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo
UyNenaP_2016	2016	8 años	Cruza	Hembra	Sana	Uruguay	Negativo

## ANEXO B.

**Tabla de muestras de materia fecal de reptiles analizadas en este trabajo.** Se indica el año de colecta, el tipo de reptil, la especie, el nombre común, el resultado de la amplificación del gen 16S de *Campylobacter* y el reptilario del cual provienen las muestras (rosado: Bioterio de Animales Ponzosñosos (Serpentario), celeste: Criadero de Reptiles (“Alternatus Uruguay”).

Muestra	Año de colecta	Tipo de reptil	Especie	Nombre común	PCR <i>Campylobacter</i>
UyQC44AR_2013	2013	Serpiente	<i>Philodryas aestiva</i>	Culebra verde	Negativo
UyQA115R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyN279R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQA117R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyQC92R_2013	2013	Serpiente	<i>Lygophis anomalus</i>	Culebra de líneas amarillas	Negativo
UyQC72R_2013	2013	Serpiente	<i>Paraphimophis rustica</i>	Culebra marrón	Negativo
UyQC34R_2013	2013	Serpiente	<i>Paraphimophis rustica</i>	Culebra marrón	Negativo
UyQA116R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyN421R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyA400R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyQC130AR_2013	2013	Serpiente	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Parejera	Negativo
UyN462R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyA327R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyQA120R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyN427AR_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQN126R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQN127R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyA425R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyA418R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyN210R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyA377R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyA392R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyA416R_2014	2014	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyA454R_2014	2014	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyColoniaR_2014	2014	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo

Muestra	Año de colecta	Tipo de reptil	Especie	Nombre común	PCR <i>Campylobacter</i>
UyN281R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN314AR_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN422R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN424R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN427BR_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN427CR_2014	2014	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQN128AR_2014	2014	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQN128BR_2014	2014	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQN129R_2013	2013	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQN132R_2014	2014	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyA441R_2015	2015	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyN315R_2015	2015	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQA145R_2015	2015	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyQC44BR_2015	2015	Serpiente	<i>Philodryas aestiva</i>	Culebra verde	Negativo
UyN314BR_2015	2015	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQN140R_2015	2015	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQC130BR_2015	2015	Serpiente	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Parejera	Negativo
UyQA138R_2015	2015	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyN286R_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQA117CR_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyPHPR_2015	2015	Serpiente	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Parejera	Negativo
UyN281CR_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN353BR_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN208R_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyQC72BR_2016	2016	Serpiente	<i>Paraphimophis rustica</i>	Culebra marrón	Negativo
UyA348R_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyN315BR_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN281BR_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN322R_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyN462BR_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyA426R_2015	2015	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyN315CR_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyBoirunaR_2016	2016	Serpiente	<i>Boiruna maculata</i>	Musurana negra	Negativo
UyQA143R_2016	2016	Serpiente	<i>Bothrops alternatus</i>	Crucera	Negativo
UyQC130CR_2016	2016	Serpiente	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Parejera	Negativo

Muestra	Año de colecta	Tipo de reptil	Especie	Nombre común	PCR <i>Campylobacter</i>
UyBCER_2015	2015	Serpiente	<i>Boa constrictor imperator</i>	Boa constrictora emperador	Negativo
UySDMR_2015	2015	Serpiente	<i>Pantherophis guttatus</i>	Serpiente del maíz	Negativo
UyGSR_2015	2015	Lagarto	<i>Homonota fasciata</i>	Gecko salamanca	Negativo
UyGTR_2015	2015	Lagarto	<i>Gekko gekko</i>	Gecko Tokay	Negativo
Uy_DBCR_2015	2015	Lagarto	<i>Pogona vitticeps</i>	Dragón barbudo (siete crías juntas)	Negativo
UyDBHR_2015	2015	Lagarto	<i>Pogona vitticeps</i>	Dragón barbudo (hembra-madre)	Negativo
UyDBMAR_2015	2015	Lagarto	<i>Pogona vitticeps</i>	Dragón barbudo (macho)	Negativo
UySRMR_2015	2015	Serpiente	<i>Lampropeltis getula nigrata</i>	Serpiente rey mexicana	Negativo
UyVDCR_2015	2015	Serpiente	<i>Microrus altirostris</i>	Vívora de coral	Negativo
UyFCDAR_2015	2015	Serpiente	<i>Hydrodynastes gigas</i>	Falsa cobra de agua	Negativo
UyGLAR_2015	2015	Lagarto	<i>Eublepharis muscularius</i>	Gecko leopardo	Negativo
UyYR_2015	2015	Serpiente	<i>Bothrops pubescens</i>	Yara	Negativo
UyFCDHR_2015	2015	Serpiente	<i>Lampropeltis triangulum hondurensis</i>	Falsa coral de Honduras	Negativo
UyAlbinR_2015	2015	Lagarto	<i>Iguana iguana</i>	Iguana	<b>Positivo</b>
UyPRPBR_2016	2016	Serpiente	<i>Malayopython reticulatus</i> o <i>Python bivittatus</i>	Pitón reticulada o pitón birmana	Negativo
UyDBMBR_2016	2016	Lagarto	<i>Pogona vitticeps</i>	Dragón barbudo (macho)	Negativo
UyBAR_2016	2016	Serpiente	<i>Epicrates cenchria</i>	Boa arcoiris	Negativo
UyGLB_2016	2016	Lagarto	<i>Eublepharis muscularius</i>	Gecko leopardo	Negativo

## **ANEXO C.**

### **Protocolos de extracción y purificación**

#### **A. Protocolo de extracción de ADN con *kit* "QIAamp DNA Stool Mini Kit" (Procedimiento para extracción de patógenos en volúmenes grandes).**

- Tomar 200 mg de materia fecal y agregar 2 mL de Buffer ASL. Vortexear hasta homogeneizar.
- Calentar la suspensión por 5 min a 70 °C.
- Agitar en vortex por 15 s y centrifugar a 20000 g por 1 min.
- Transferir 1,2 mL del sobrenadante a un nuevo tubo de 2 mL y agregar 1 tableta InhibitEX. Vortexear hasta que se suspenda la tableta.
- Incubar la suspensión por 1 min para que los inhibidores se adsorban a la tableta.
- Centrifugar a 20000 g por 3 min.
- Transferir el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL. Centrifugar a 20000 g por 3 min.
- Preparar un tubo de 1,5 mL con 15 µl de proteinasa K.
- Transferir 200 µL del sobrenadante al tubo que contiene la proteinasa K.
- Agregar 200 µl de Buffer AL y vortexear por 15 s.
- Incubar a 70°C por 10 min.
- Agregar 200 µL de etanol absoluto al lisado, vortexear.
- Transferir la mezcla a una columna en un tubo colector y centrifugar a 20000 g por 1 min.
- Agregar 500 µL de Buffer AW1. Centrifugar a 20000 g por 1 min.
- Agregar 500 µL de Buffer AW2. Centrifugar a 20000 g por 3 min.
- Agregar 200 µL de Buffer AE, incubar por 1 min y centrifugar a 20000 g por 1 min.

### **B. Protocolo de extracción de ADN por “Fast Boiling”**

- Homogeneizar la muestra con PBS pH 7,5 en relación 1/10.
- Hervir durante 10 min a 100°C por 10 min.
- Enfriar el homogeneizado en hielo por 5 min.
- Centrifugar a 3000 g durante 20 min.
- Guardar el sobrenadante a -20 °C.

### **C. Protocolo de purificación de producto de PCR**

- En un tubo de 1,5 mL adicionar 5 volúmenes de buffer de unión por cada volumen de muestra de ADN.
- Transferir la mezcla a una columna Zymo-Spin en un tubo colector.
- Centrifugar por 30 seg a una velocidad  $\geq 10000$  g y descartar el filtrado.
- Agregar 200  $\mu$ L de buffer de lavado y centrifugar por 30 seg a una velocidad  $\geq 10000$  g. Repetir el paso de lavado.
- Pasar la columna a un nuevo tubo de 1,5 mL.
- Agregar 15  $\mu$ L de buffer de elución directamente a la columna e incubar a temperatura ambiente por 1 min.
- Centrifugar 30 seg para eluir el ADN.

## ANEXO D.

**Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen 16S de bacterias y arqueas en general.** Se indican las concentraciones iniciales ( $C_0$ ), concentraciones finales ( $C_f$ ) y volúmenes de los reactivos utilizados.

Reactivo	Concentración Stock ( $C_0$ )	Concentración de trabajo ( $C_f$ )	Volumen ( $\mu\text{L}/\text{tubo}$ )
Agua ultrapura	--	--	c.s.p. 10
PCR Buffer	10X	1X	1
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,5 mM	1
BSA	8 mg/mL	0,4 mg/mL	0,5
dNTP's	10 mM (2,5 mM c/u)	0,25 mM (0,0625 mM c/u)	0,25
Taq polimerasa	5 U/ $\mu\text{L}$	0,75 U	0,15
Primer Bac27F	10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,5
Primer 534R	10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,5
ADN	--	--	1

**Condiciones de ciclado para la amplificación del gen 16S de bacterias y arqueas en general.** Se indican la temperatura y el tiempo en cada ciclo de la PCR.

Etapa	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	94	3:00	
Desnaturalización	94	0:30	30 ciclos
Hibridación	54	0:45	
Extensión	72	1:30	
Extensión final	72	7:00	

## ANEXO E

**Condiciones de reacción de PCR para la identificación del género *Campylobacter*.** Se indican las concentraciones iniciales  $C_0$ , concentraciones finales  $C_f$  y volúmenes de los reactivos utilizados.

Reactivo	Concentración Stock ( $C_0$ )	Concentración de trabajo ( $C_f$ )	Volumen ( $\mu\text{L}$ /tubo)
Agua ultrapura	--	--	c.s.p. 10
PCR Buffer	10X	1X	1
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,5 mM	1
BSA	8 mg/mL	0,4 mg/mL	0,5
dNTP's	10 mM (2,5 mM c/u)	0,25 mM (0,0625 mM c/u)	0,25
Taq polimerasa	5 U/ $\mu\text{L}$	0,75 U	0,15
Primer C412F	10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,5
Primer C1228R	10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,5
ADN	--	--	1

**Condiciones de ciclado para la identificación del género *Campylobacter*.**  
Se indican la temperatura y el tiempo en cada ciclo de la PCR.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	2:00	
<b>Desnaturalización</b>	95	0:20	15 ciclos
<b>Hibridación</b>	53	0:20	
<b>Extensión</b>	72	1:00	
<b>Desnaturalización</b>	95	0:20	15 ciclos
<b>Hibridación</b>	52	0:20	
<b>Extensión</b>	72	1:00	
<b>Desnaturalización</b>	95	0:20	15 ciclos
<b>Hibridación</b>	51	0:20	
<b>Extensión</b>	72	1:00	
<b>Extensión final</b>	72	5:00	

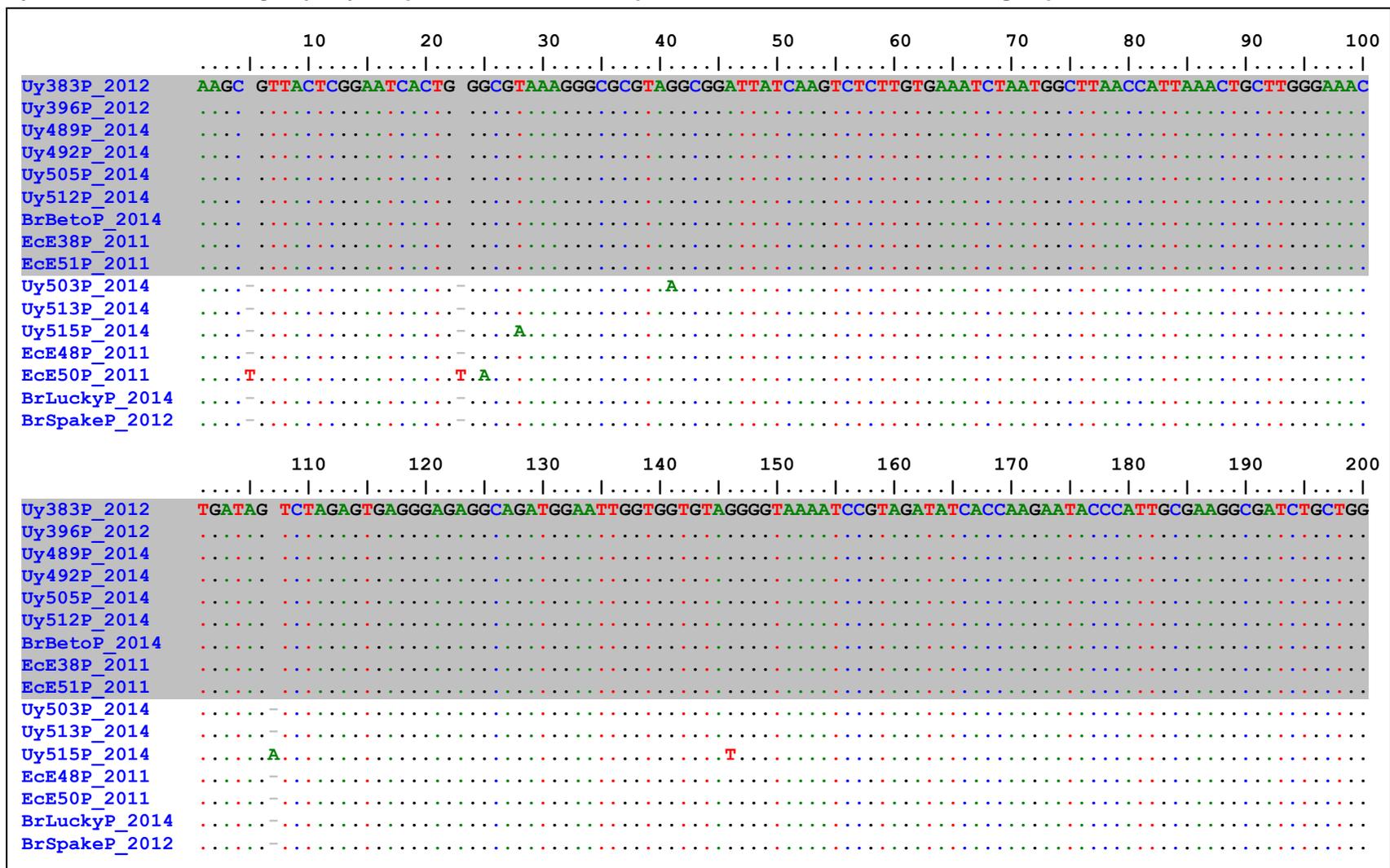
## ANEXO F

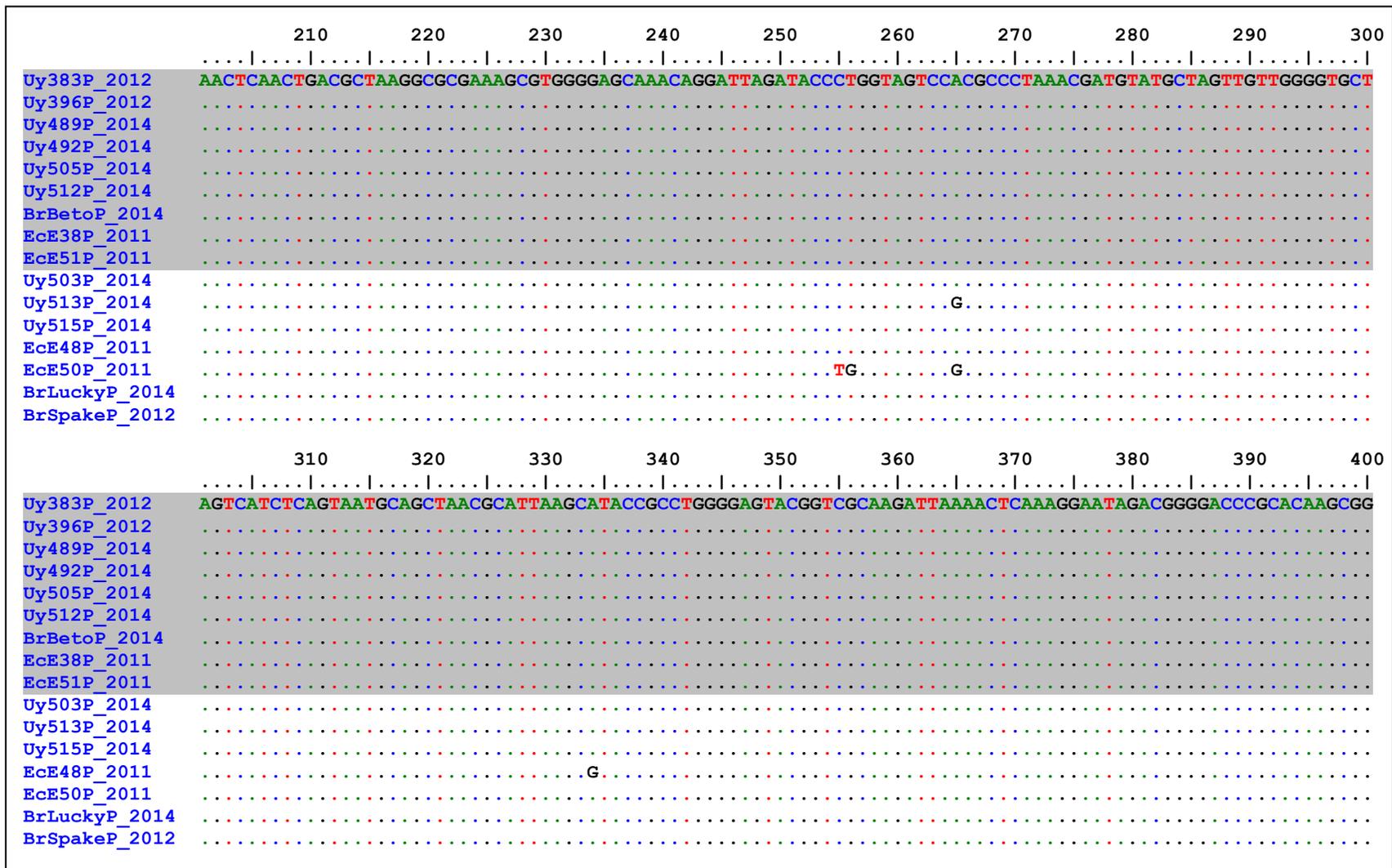
Secuencias obtenidas de la base de datos utilizadas en este trabajo. Se indica el nombre de la cepa y el número de acceso.

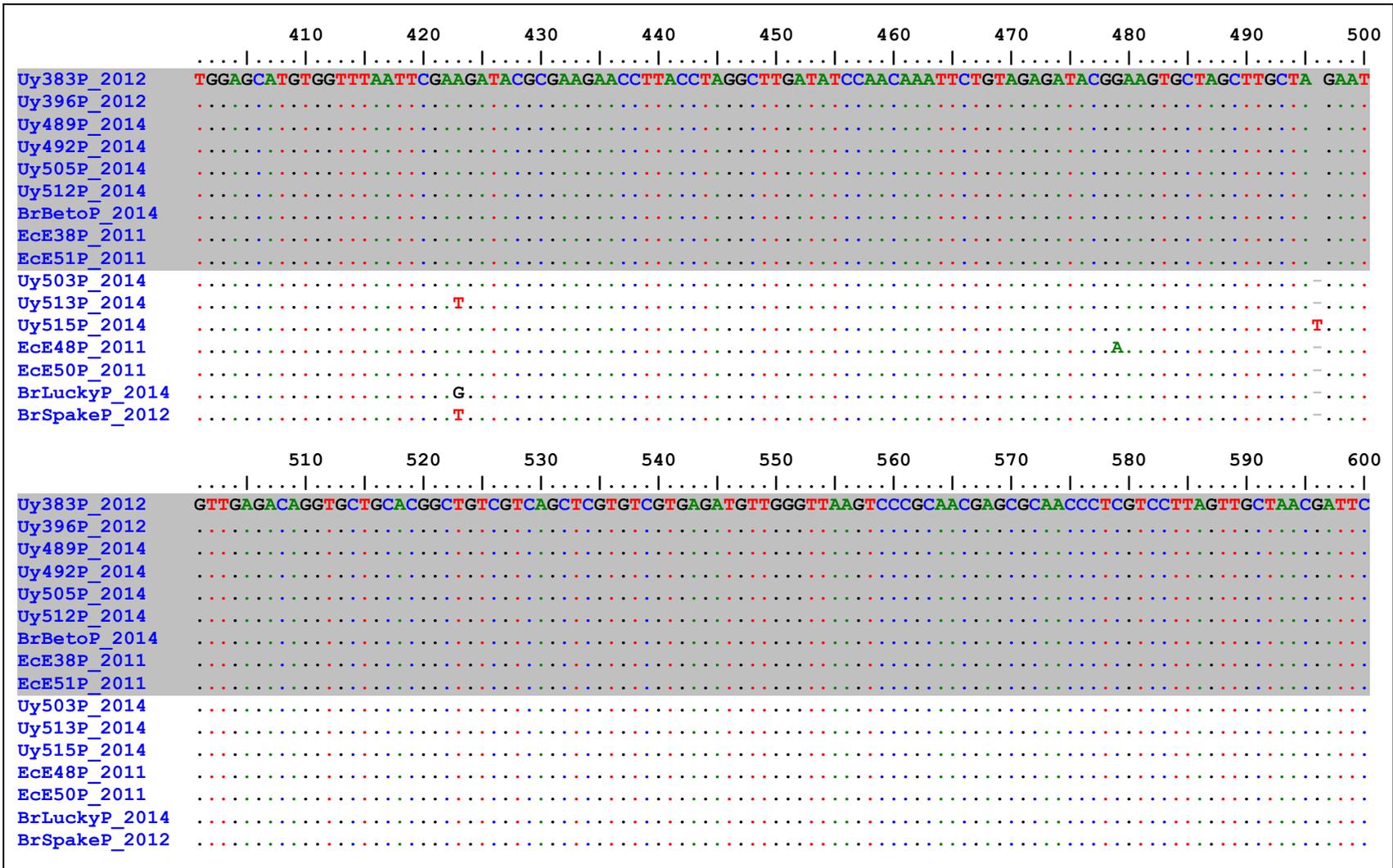
Nombre de la cepa	Número de acceso	Nombre de la cepa	Número de acceso
<i>Campylobacter avium</i> CCUG 56292	(NR_118510.1)	<i>Campylobacter geochelonis</i> RC20	(GCA_900063025.1)
<i>Campylobacter canadensis</i> L266	(NR_044319.1)	<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236	(NR_118516.1)
<i>Campylobacter coli</i>	(L19738.1)	<i>Campylobacter helveticus</i> ATCC 51209	(NR_118517.1)
<i>Campylobacter coli</i> strain ATCC 33559	(NR_117233.1)	<i>Campylobacter helveticus</i> NCTC 12470	(NR_115702.1)
<i>Campylobacter coli</i> BP3183	(NZ_CP017871.1)	<i>Campylobacter helveticus</i> D5248	(NR_025948.1)
<i>Campylobacter coli</i> OR12	(NZ_CP019977.1)	<i>Campylobacter hepaticus</i> HV10	(KU886019.1)
<i>Campylobacter concisus</i> ATCC 33237	(NR_118512.1)	<i>Campylobacter hominis</i> NCTC 13146	(NR_115705.1)
<i>Campylobacter concisus</i> 13826	(NC_009802.2)	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> ATCC 35217	(NR_118739.1)
<i>Campylobacter concisus</i>	(L06977.1)	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i> CCUG34538	(NR_115710.1)
<i>Campylobacter concisus</i>	(L04322.1)	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> ATCC 35217	(NR_118518.1)
<i>Campylobacter corcagiensis</i> CIT 045	(NR_133992.1)	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i> CHY5	(NR_024948.1)
<i>Campylobacter cuniculorum</i> strain 150B	(NR_043784.1)	<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	(M65009.1)
<i>Campylobacter curvus</i>	(L06976.1)	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i> LMG 15993	(NZ_CP015576.1)
<i>Campylobacter curvus</i> ATCC 35224	(NR_118513.1)	<i>Campylobacter iguaniorum</i> 1485E	(NZ_CP009043.1)
<i>Campylobacter curvus</i>	(L04313.1)	<i>Campylobacter iguaniorum</i> RM11343	(NZ_CP015577.1)
<i>Campylobacter curvus</i> 525.92	(NC_009715.2)	<i>Campylobacter insulaenigrae</i> NCTC_12927	(NR_114914.1)
<i>Campylobacter faecalis</i> 1433	(AJ276874.1)	<i>Campylobacter insulaenigrae</i> CCUG 48653	(NR_118519.1)
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>testudinum</i> strain 03-427	(NR_133993.1)	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560	(NR_118520.1)
<i>Campylobacter fetus</i> ATCC 27374	(NR_118514.1)	<i>Campylobacter jejuni</i>	(L14630.1)
<i>Campylobacter fetus fetus</i>	(M65012.1)	<i>Campylobacter jejuni</i> ZP3204	(CP017856.1)
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>testudinum</i> Sp3	(NZ_CP010953.1)	<i>Campylobacter jejuni</i> 81-176 G1 B0	(CP022440.1)
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 04/554	(NZ_CP008808.1)	<i>Campylobacter jejuni</i> CJ677CC047	(NZ_CP010459.1)
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354	(NR_043598.1)	<i>Campylobacter jejuni</i>	(M59298.1)

Nombre de la cepa	Número de acceso	Nombre de la cepa	Número de acceso
<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC12662	(NZ_CP019965.1)	<i>Campylobacter ureolyticus</i> ATCC 33387	(NR_118654.1)
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> LMG 8843	(NR_043599.1)	<i>Campylobacter ureolyticus</i> ACS-301-V-Sch3b acmbC-supercont1.1	(NZ_KE340326.1)
<i>Campylobacter jejuni</i> WP2202	(CP014742.1)	<i>Campylobacter ureolyticus</i> RIGS 9880	(NZ_CP012195.1)
<i>Campylobacter lanienae</i> CCUG 44467	(NR_118521.1)	<i>Campylobacter volucris</i> LMG 24379	(NZ_CP007774.1)
<i>Campylobacter lanienae</i> NCTC 13004	(NR_028698.1)	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> ERUVET-8	(KT225286.1)
<i>Campylobacter lari</i> ATCC 35221	(NR_118523.1)	<i>Sulfurospirillum deleyianum</i> DSM 6946	(NR_074378.1)
<i>Campylobacter lari</i> 35221	(NR_043034.1)		
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>concheus</i> CCUG 55786	(NR_118522.1)		
<i>Campylobacter lari</i> JCM2530	(NR_112241.1)		
<i>Campylobacter lari</i> NCTC 11845	(NZ_CP007775.1)		
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i> CCUG 23947	(L04316.1)		
<i>Campylobacter mucosalis</i>	(L06978.1)		
<i>Campylobacter mucosalis</i> ATCC 43264	(NR_118524.1)		
<i>Campylobacter mucosalis</i>	(L14629.1)		
<i>Campylobacter ornithocola</i> WBE38	(KX467974.1)		
<i>Campylobacter ornithocola</i> WBE215	(KX467977.1)		
<i>Campylobacter ornithocola</i> WBE241	(KX467978.1)		
<i>Campylobacter peloridis</i> LMG 23910	(NZ_CP007766.1)		
<i>Campylobacter pinnipediorum</i> subsp. <i>pinnipediorum</i> RM17260	(NZ_CP012546.1)		
<i>Campylobacter rectus</i>	(L04317.1)		
<i>Campylobacter rectus</i>	(L06973.1)		
<i>Campylobacter rectus</i> JCM 6301	(NR_113247.1)		
<i>Campylobacter showae</i> ATCC 51146	(NR_118151.1)		
<i>Campylobacter showae</i>	(L06974.1)		
<i>Campylobacter showae</i>	(L06975.1)		
<i>Campylobacter sputorum</i>	(L04319.1)		
<i>Campylobacter sputorum</i> RM8705	(NZ_CP019685.1)		
<i>Campylobacter sputorum</i> bv. <i>sputorum</i> RM3237	(NZ_CP019682.1)		
<i>Campylobacter subantarcticus</i> LMG 24374	(NZ_CP007772.1)		
<i>Campylobacter subantarcticus</i> LMG 24377	(NZ_CP007773.1)		
<i>Campylobacter troglodytis</i> MIT 05-9149	(NR_118085.1)		
<i>Campylobacter upsaliensis</i> ATCC 43954	(NR_115289.1)		
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	(L14628.1)		
<i>Campylobacter upsaliensis</i> RM3195	(NZ_AAFJ01000001.1)		
<i>Campylobacter upsaliensis</i> NCTC 11541	(NR_118528.1)		
<i>Campylobacter ureolyticus</i> DSM 20703	(NR_117766.1)		

**ANEXO G.** Alineamiento nucleotídico de un fragmento de 648 pb del gen *16S* de *Campylobacter* de las 16 secuencias que agrupan junto a *C. avium*, *C. troglodytis* y *C. upsaliensis*. Las nueve primeras secuencias resaltadas en gris presentan una identidad del 100%.







	610	620	630	640
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
Uy383P_2012	GGTCGAGCACTCTAAGGAGACTGCC	TTCGTAAGGAGGAGGAAGGTGGG		
Uy396P_2012	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
Uy489P_2014	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
Uy492P_2014	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
Uy505P_2014	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
Uy512P_2014	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
BrBetoP_2014	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
EcE38P_2011	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
EcE51P_2011	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
Uy503P_2014	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
Uy513P_2014	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
Uy515P_2014	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
EcE48P_2011	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	A		
EcE50P_2011	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
BrLuckyP_2014	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			
BrSpakeP_2012	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			