

# Análisis de la variabilidad genética en Campylobacter fetus

Tesis de doctorado

PEDECIBA. Área Biología. Subárea Genética

Mag. Lucía Calleros Basilio

Orientador: Dr. Ruben Pérez

Laboratorio de genética de microorganismos. Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias.

Montevideo, 2015



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



## Índice

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 <i>Campylobacter fetus</i>	3
1.1.1 Taxonomía	3
1.1.2 Características fenotípicas	6
1.1.3 Importancia sanitaria y económica de <i>Campylobacter fetus</i>	7
1.2 Identificación del género <i>Campylobacter</i> , la especie <i>Campylobacter fetus</i> , las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i> y el biovar <i>intermedius</i>	16
1.2.1 Aislamiento e identificación fenotípica y bioquímica del género <i>Campylobacter</i> , la especie <i>Campylobacter fetus</i> , las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i> y el biovar <i>intermedius</i>	16
1.2.2 Identificación genética del género <i>Campylobacter</i> , la especie <i>Campylobacter fetus</i> , las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i> , y el biovar <i>intermedius</i>	18
1.3 Metodologías de análisis de la variabilidad genética en bacterias y sus aplicaciones en <i>Campylobacter fetus</i>	20
1.3.1 <i>Multi locus sequence typing</i> (MLST)	20
1.3.2 Secuencias de los operones ribosomales	24
1.3.3 Análisis de genes de virulencia	25
1.3.4 Análisis de patrones de bandas	28
1.3.5 Análisis de genomas completos: identificación de variaciones genómicas	30
1.3.6 Análisis de CRISPRs	35
1.3.7 Análisis de la variación genética en <i>Campylobacter fetus</i>	39
2. Objetivos	41
2.1 Objetivos generales	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. Estrategia de investigación	42
4. Materiales y métodos	44
4.1 Cepas bacterianas	44
4.2 Métodos	47
4.2.1 Aislamiento e identificación fenotípica y bioquímica de <i>Campylobacter fetus</i> , de las subespecies <i>Cff</i> y <i>Cfv</i> , y del biovar <i>intermedius</i>	47
4.2.2 Identificación genética del género <i>Campylobacter</i> , la especie <i>Campylobacter fetus</i> y las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i> , y análisis de su variabilidad genética	48
4.2.2.1 Metodología general	48
4.2.2.1.1 Extracción de ADN	48
4.2.2.1.2 Amplificación y secuenciación	48
4.2.2.1.2.1 Diseño de cebadores	48
4.2.2.1.2.2 Puesta a punto de los protocolos de amplificación	49
4.2.2.1.2.3 Análisis de amplicones, purificación y secuenciación	49

4.2.2.1.2.4 Clonación de productos de PCR	49
4.2.2.1.3 Análisis de datos	50
4.2.2.2 Aplicación y evaluación de metodologías de identificación del género <i>Campylobacter</i> , la especie <i>Campylobacter fetus</i> y las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i>	51
4.2.2.2.1 Identificación del género <i>Campylobacter</i>	51
4.2.2.2.2 Identificación de la especie <i>Campylobacter fetus</i> y de las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i>	51
4.2.2.2.2.1 Múltiplex PCR A	52
4.2.2.2.2.2 Múltiplex PCR B	52
4.2.2.2.2.3 PCR en tiempo real	53
4.2.2.2.2.4 Detección del elemento de inserción ISCfe1	55
4.2.2.2.3 Identificación del biovar <i>intermedius</i>	55
4.2.2.3 Desarrollo y evaluación de metodologías de identificación del biovar <i>intermedius</i>	55
4.2.2.4 Análisis de la variabilidad genética en <i>Campylobacter fetus</i>	56
4.2.2.4.1 MLST	57
4.2.2.4.2 Secuenciación parcial del gen ribosomal 23S e identificación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)	57
4.2.2.4.3 Secuenciación parcial de la región espaciadora interna del tercer operón ribosomal (ISR3) e identificación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)	58
4.2.2.4.4 Análisis de la presencia de genes de virulencia	58
4.2.2.4.5 Análisis de patrones de bandas basados en secuencias repetidas REP, ERIC y BOX	59
4.2.2.4.6 Análisis de genomas completos: identificación de variaciones genómicas	59
4.2.2.4.6.1 Análisis <i>in silico</i>	59
4.2.2.4.6.2 Evaluación experimental de la presencia de variaciones genómicas	60
4.2.2.4.7 Análisis del cluster de genes <i>cas</i> , el gen <i>RAMP</i> y los loci CRISPR1 y CRISPR2	62
4.2.2.4.7.1 Evaluación de la presencia del cluster de genes <i>cas</i> y del gen <i>RAMP</i>	62
4.2.2.4.7.2 Secuenciación de los loci CRISPR1 y CRISPR2	62
5. Resultados	65
5.1 Aislamiento e identificación fenotípica y bioquímica de <i>Campylobacter fetus</i> , de las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i> y del biovar <i>intermedius</i>	65
5.2 Identificación genética del género <i>Campylobacter</i> , la especie <i>Campylobacter fetus</i> y las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i> , y análisis de su variabilidad genética	65
5.2.1 Aplicación y evaluación de metodologías de identificación del género <i>Campylobacter</i> , la especie <i>Campylobacter fetus</i> y las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i>	65
5.2.1.1 Identificación del género <i>Campylobacter</i>	65
5.2.1.2 Identificación de la especie <i>Campylobacter fetus</i> y de las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i>	70

5.2.1.2.1 Múltiplex PCR A	70
5.2.1.2.2 Múltiplex PCR B	70
5.2.1.2.3 PCR en tiempo real	72
5.2.1.2.4 Detección del elemento de inserción ISCfe1	72
5.2.1.3 Identificación del biovar intermedius	73
5.2.2 Desarrollo y evaluación de metodologías de identificación del biovar intermedius	73
5.2.3 Análisis de la variabilidad genética en <i>Campylobacter fetus</i>	76
5.2.3.1 MLST	76
5.2.3.2 Secuenciación parcial del gen ribosomal 23S y evaluación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)	80
5.2.3.3 Secuenciación parcial de la región espaciadora interna del tercer operón ribosomal (ISR3) e identificación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)	80
5.2.3.4 Análisis de la presencia de genes de virulencia	82
5.2.3.5 Análisis de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX	82
5.2.3.6 Análisis de genomas completos: identificación de variaciones genómicas	88
5.2.3.6.1 Análisis de genomas in silico	88
5.2.3.6.2 Evaluación experimental de la presencia de variaciones genómicas	92
5.2.3.7 Evaluación de la presencia del cluster de genes <i>cas</i> , el gen <i>cas1</i> y el gen <i>RAMP</i> y secuenciación de los loci CRISPR1 y CRISPR2	94
5.2.3.7.1 Evaluación de la presencia del cluster de genes <i>cas</i> , el gen <i>cas1</i> y el gen <i>RAMP</i>	94
5.2.3.7.2 Secuenciación de los loci CRISPR1 y CRISPR2	94
6. Discusión	104
6.1 Identificación fenotípica y bioquímica de los aislamientos	104
6.2 Identificación genética de los aislamientos	106
6.2.1 Identificación del género <i>Campylobacter</i>	106
6.2.2 Identificación de la especie <i>Campylobacter fetus</i>	107
6.2.3 Identificación de las subespecies <i>fetus</i> y <i>venerealis</i>	109
6.2.4 Identificación del biovar intermedius	113
6.3 Análisis de la variabilidad genética en <i>Campylobacter fetus</i>	114
6.3.1 MLST	115
6.3.2 Secuenciación parcial del gen ribosomal 23S y de la región espaciadora interna del tercer operón ribosomal (ISR3) e identificación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)	117
6.3.3 Análisis de la presencia de genes de virulencia	118
6.3.4 Análisis de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX	122
6.3.5 Análisis de genomas completos: identificación de variaciones genómicas	122
6.3.6 Evaluación de la presencia del cluster de genes <i>cas</i> , el gen <i>cas1</i> y el gen <i>RAMP</i>	126
6.3.7 Análisis de secuencias de los loci CRISPR1 y CRISPR2	131
6.4 Consideraciones finales	138
7. Conclusiones	141

8. Perspectivas	143
9. Referencias	146
10. Anexos	180
Anexo 1. Aislamiento y cultivo bacteriano y realización de pruebas bioquímicas	177
Anexo 2. Protocolos de extracción de ADN	179
Anexo3. Cebadores, sondas, ciclados y condiciones de reacción de PCR a tiempo final y real; purificación de productos de PCR	181
Anexo 4. Protocolos utilizados para la clonación de productos de PCR	187
Anexo 5. Cálculo de valores D	190
Anexo 6. Secuencias de los repetidos directos (DR) y de los líderes encontradas en los genomas completos y en los aislamientos analizados	194
Anexo 7. Secuencias de espaciadores encontradas en los loci CRISPR	195
Anexo 8. Publicaciones	201

## Índice de tablas, figuras y anexos

### Cuadros

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de <i>Campylobacter fetus</i>	3
--	---

### Figuras

Figura 1. Primer aislamiento de <i>C. fetus</i>	5
Figura 2. Distribución de la campilobacteriosis genital bovina	11
Figura 3. Relaciones entre los STs de <i>C. fetus</i>	23
Figura 4. Organización de los operones ribosomales en <i>C. fetus</i>	24
Figura 5. Plasticidad genómica en bacterias	32
Figura 6. Representación esquemática de las islas genómicas de <i>C. fetus</i>	34
Figura 7. Estructura de los sistemas CRISPR-cas	35
Figura 8. Estrategia de investigación	43
Figura 9. Alineamiento de secuencias parciales del gen 16S	54
Figura 10. Cebadores utilizados para el relevamiento de reordenamientos	61
Figura 11. Estructura del cluster de genes cas	63
Figura 12. Resultados de los métodos de identificación aplicados	68
Figura 13. Resultados de la identificación de C <sub>fv</sub> i	75
Figura 14. Árbol filogenético realizado con secuencias de STs	79
Figura 15. Secuencias del gen 23S y el ISR3	81
Figura 16. Patrones de bandas de REP, ERIC y BOX	86
Figura 17. Análisis de reordenamientos en los genomas de <i>C. fetus</i>	90
Figura 18. Amplificación del locus CRISPR1	96
Figura 19. Patrones de secuencia del locus CRISPR1	98

Figura 20. Árbol filogenético con patrones del locus CRISPR1	99
Figura 21. Red de haplotipos con patrones del locus CRISPR1	100
Figura 22. Patrones de secuencia del locus CRISPR2	103
Figura 23. Red de haplotipos con patrones del locus CRISPR2	103
Figura 24. Hipótesis sobre la evolución de los genes de virulencia	120
Figura 25. Hipótesis sobre la evolución de la presencia del cluster de genes cas y los loci CRISPR	129

## Tablas

Tabla 1. Aislamientos de <i>C. fetus</i> analizados	45
Tabla 2. Aislamientos de otras especies de <i>Campylobacter</i>	47
Tabla 3. Resultados de los métodos de identificación y tipificación genética	66
Tabla 4. Correspondencia entre los métodos de identificación	71
Tabla 5. Resultados de la identificación de <i>Cfvi</i>	74
Tabla 6. Resultados del MLST, el gen 23S y el ISR3, y la presencia de IVSs	77
Tabla 7. Resultados del tipo sap y de la presencia de genes de virulencia	83
Tabla 8. Patrones de bandas de REP, ERIC y BOX	84
Tabla 9. Resultados experimentales de la presencia de variaciones genómicas	93
Tabla 10. Resultados de la presencia de los genes cas y RAMP y de la secuenciación de los loci CRISPR	95

## Anexos

Anexo 1. Aislamiento, cultivo bacteriano y pruebas bioquímicas	177
Anexo 2. Protocolos de extracción de ADN	179
Anexo 3. Cebadores, sondas, y protocolos de PCR	181
Anexo 4. Protocolos de clonación de productos de PCR	187

Anexo 5. Cálculo de valores D	190
Anexo 6. Secuencias de los repetidos directos y de los líderes	194
Anexo 7. Secuencias de espaciadores encontradas en los loci CRISPR	195
Anexo 8. Publicaciones	201



## Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico  
AFLP: polimorfismo en el largo de fragmentos amplificados  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNt: ácido ribonucleico de transferencia  
BLAST: basic local alignment search tool  
BSA: sero-albúmina bovina  
CDT: cytolethal distending toxin  
Cff: *Campylobacter fetus* subespecie fetus  
Cft: *Campylobacter fetus* subespecie testudinum  
Cfv: *Campylobacter fetus* subespecie venerealis  
Cfvi: *Campylobacter fetus* subespecie venerealis biovar intermedius  
CGB: campylobacteriosis genital bovina  
crARN: ARN del CRISPR  
CRISPR: secuencias repetidas palindrómicas dispersas  
dNTPs: deoxyribonucleótidos  
DR: repetido directo  
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
ERIC: enterobacterial repetitive inter-genic consensus  
FIC: filamentation induced by cyclic AMP  
IS: secuencia de inserción  
ISR: región espaciadora interna  
IVS: secuencia interviniente  
LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucles  
LPSs: lipopolisacáridos  
Mpx-PCR: múltiplex PCR  
OIE: organización mundial de sanidad animal  
ORF: marco abierto de lectura  
PAM: proto-spacer adjacent motif  
pb: pares de bases  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis en campos pulsados

RAMP: repeat-associated mysterious proteins

RAPD: amplificación al azar de ADN polimórfico

REP: repetitive extragenic palindromic

SLPs: proteínas de la S-layer

SNP: polimorfismo de nucleótido simple

ST: sequence type

T4SS: sistema de secreción tipo IV

THG: transferencia horizontal de genes

TEM: transport enrichment medium

Tm: temperatura de desnaturalización

## Resumen

*Campylobacter fetus* (*Epsilonproteobacteria*) posee una gran importancia veterinaria y médica. Se divide en dos subespecies: *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv), y *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff), definidas por características ecológicas. Cfv está restringida al tracto genital bovino, y es el agente causante de la campylobacteriosis genital bovina, que causa infertilidad crónica y abortos. Cff se transmite por vía oral-fecal, y causa abortos principalmente en ovinos. Se encuentra en el tracto intestinal o la vesícula biliar en un amplio rango de hospederos, donde puede ser asintomática o causar una variedad de manifestaciones clínicas. Recientemente, se propuso la existencia de una tercera subespecie, en base a características genéticas: *C. fetus* subsp. *testudinum* (Cft), de origen reptiliano.

Uno de los principales problemas para la realización de estudios epidemiológicos y de control en *C. fetus* es la complejidad en su diagnóstico y en la diferenciación de Cff y Cfv. Los métodos fenotípicos son lentos y requieren personal especializado, ya que *C. fetus* es una bacteria difícil de cultivar en el laboratorio. Por este motivo, es importante complementar o sustituir el diagnóstico fenotípico con la identificación molecular.

La variación genética en *C. fetus* fue estudiada mediante MLST y técnicas basadas en patrones de bandas. Estos métodos no son útiles para la realización de análisis epidemiológicos, ya que presentan un grado de variabilidad muy escaso o una pobre reproducibilidad.

La hipótesis de trabajo de esta tesis es que existe diferenciación genética entre las cepas de *C. fetus* circulantes en la región, y que la misma puede ser relevada si se utilizan marcadores genéticos adecuados. El presente trabajo está enfocado en la búsqueda y aplicación de marcadores genéticos que nos permitan relevar la variabilidad intraespecífica en *C. fetus*, y asociarla con características de interés evolutivo y epidemiológico.

Se evaluaron varias metodologías de identificación genética del género *Campylobacter*, la especie *C. fetus*, las subespecies Cff y Cfv, y el biovar Cfvi. Se desarrollaron y evaluaron metodologías de análisis de la variabilidad genética para *C. fetus*: MLST, análisis de secuencias del gen 23S y el tercer espaciador ribosomal, análisis de la presencia de cuatro genes de virulencia y su relación con el tipo sap,

análisis de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX, análisis *in silico* y experimental de variaciones genómicas, evaluación de la presencia del *cluster* de genes *cas*, y secuenciación de los loci CRISPR1 y CRISPR2.

La identificación del género *Campylobacter* y de la especie *C. fetus* pueden realizarse correctamente con métodos moleculares basados en el gen 16S, utilizando técnicas de PCR a tiempo final y en tiempo real. Los métodos moleculares para diferenciar Cff y Cfv, en cambio, presentan discrepancias con los resultados de las pruebas bioquímicas, por lo que se sugiere una revisión de estas metodologías.

Las secuencias del locus CRISPR1 mostraron ser las más variables descritas hasta ahora en el genoma de *C. fetus*, y son una herramienta promisoría para la realización de estudios epidemiológicos. La variación en este locus sugiere una funcionalidad del mismo en los aislamientos de mamíferos.

Los estudios realizados sustentan el estatus taxonómico de la subespecie Cft, pero no se observa una asociación de la variación genética con la determinación bioquímica de las subespecies Cff y Cfv, por lo cual consideramos que esta clasificación debe ser revisada.

De acuerdo a nuestros resultados, una porción del genoma de *C. fetus* tiene una acumulación lenta de mutaciones puntuales (el genoma *core*). Hay otra porción del genoma que presenta una mayor variación, y evoluciona más rápidamente por transferencia horizontal de genes (el genoma accesorio). Esto tiene implicancias en el estudio de la patogenicidad de la especie, ya que la presencia de factores de virulencia, que frecuentemente son transmitidos por transferencia horizontal, tiene un grado relevante de variación, que podría aportar información valiosa sobre el desarrollo de las diversas patologías que la bacteria causa, tanto en humanos como en animales.

## 1. Introducción

### 1.1 *Campylobacter fetus*

#### 1.1.1 Taxonomía

*Campylobacter fetus* es una bacteria gram negativa que pertenece a la clase de las epsilon proteobacterias (Cuadro 1).

El phylum *Proteobacteria* constituye el linaje más numeroso y fenotípicamente diverso de todo el dominio *Bacteria*. Esta diversidad se observa tanto en la morfología como en la fisiología de las especies que lo componen. Las proteobacterias constituyen más del 40% de los géneros de procariotas, y abarcan la mayor parte de las bacterias gram negativas. Están divididas en cinco clases:

alfa, beta, gama, delta y epsilon proteobacterias. Tienen gran importancia biológica y ecológica, ya que incluyen a la mayoría de las bacterias de interés médico, veterinario e industrial, y juegan un rol importante en los ciclos del nitrógeno, azufre y carbono (Kerstens et al. 2006).

Las epsilon proteobacterias constituyen la clase más pequeña y menos diversa de proteobacterias. La mayoría de las especies son microaerófilas, quimioorganotrofas y con forma de espiral, y presentan motilidad por medio de flagelos polares. Obtienen su energía principalmente de aminoácidos o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Habitan una gran variedad de nichos ecológicos, que van desde el tracto gastrointestinal de los animales hasta los yacimientos petrolíferos o las fuentes hidrotermales (Eppinger et al. 2004, Gupta 2006). La mayoría de los linajes de epsilon proteobacterias no tienen representantes cultivables y son conocidos sólo por secuencias del gen ribosomal 16S, obtenidas de muestras ambientales de nichos microaerófilos o anaerobios, o de simbiosis con animales (Campbell et al. 2006). La

Dominio	<b>Bacteria</b>
Pylum	<b>Proteobacteria</b>
Clase	<b>Epsilon proteobacteria</b>
Orden	<b>Campylobacterales</b>
Familia	<b>Campylobacteraceae</b>
Género	<b>Campylobacter</b>
Especie	<b><i>Campylobacter fetus</i></b>

**Cuadro 1.** Ubicación taxonómica de la especie *Campylobacter fetus*.

clase *Epsilonproteobacteria* se subdivide en dos órdenes: *Nautiliales* y *Campylobacterales* (Gupta 2006).

El orden *Nautiliales* está compuesto por los géneros *Nautilia*, *Lebetimonas* y *Caminibacter* (Gupta 2006). El orden *Campylobacterales* tiene tres familias: *Helicobacteraceae*, *Hydro-genimonaceae* y *Campylobacteraceae*.

La familia *Campylobacteraceae* (Vandamme y De Ley 1991) incluye los géneros *Sulfurospirillum*, *Arcobacter* y *Campylobacter* (DSMZ-Bacterial Nomenclature Up-to-Date 2015).

El género *Sulfurospirillum* está compuesto por bacterias microaerófilas sulforeductoras que se encuentran en sedimentos marinos (Kerstens et al. 2006). Los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter* están asociados a un amplio rango de hospederos vertebrados y han sido aislados de aves, mamíferos y reptiles, donde la mayoría son patógenos (Gilbert et al. 2014, On 2013, Man 2011, Mshelia et al. 2010, Korczak et al. 2006, On et al. 2001). Las especies del género *Arcobacter* también pueden encontrarse en aguas residuales y algunos ambientes salinos.

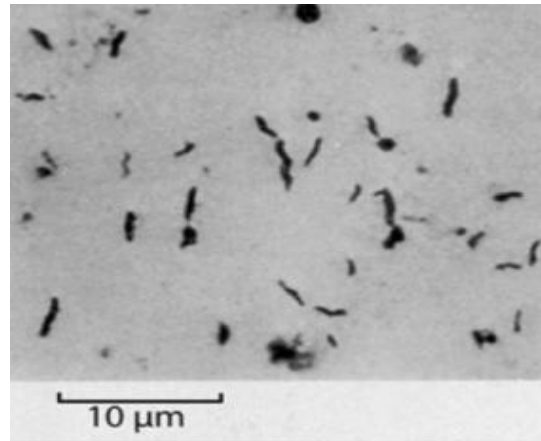
El género *Campylobacter* fue propuesto por Sébald y Veron en 1963 para separar a algunas especies del género *Vibrio*, basándose en diferencias en su contenido GC. El género está compuesto por bacterias con las siguientes características diagnósticas: gram negativas, con una forma alargada y curvada o en espiral que les da su nombre (del griego *campylo*: curvado), que son móviles gracias a la acción de uno o dos flagelos polares, con metabolismo respiratorio de aminoácidos e intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que no fermentan ni oxidan carbohidratos, y tienen un contenido GC entre 28 y 38%. La mayoría son microaerófilas, aunque el rango de concentración óptima de O<sub>2</sub> para su crecimiento es amplio. Sus temperaturas óptimas de crecimiento varían entre 25 y 42°C (Penner 1988). La mayor parte de los miembros del género presentan dificultades en su identificación por métodos bioquímicos, dada su poca reactividad bioquímica y su taxonomía compleja (On 2013, Penner 1988, Thompson et al. 1988).

En su origen, *Campylobacter* incluyó solamente a la especie tipo *C. fetus* y a *C. bubulus* (actualmente *C. sputorum*). En un trabajo posterior, Veron y Chatelain (1973) realizaron una revisión del género, basada en experimentos de hibridación ADN-ADN y en características serológicas y bioquímicas, e incluyeron a las especies *C. jejuni* y *C.*

*coli*. Actualmente el género comprende 33 especies y 14 subespecies (DSMZ-Bacterial Nomenclature Up-to-Date 2015).

*Campylobacter fetus* fue aislada por primera vez en 1906 por McFadyean y Stockman, a partir de una muestra de mucus de una oveja preñada que formaba parte de una majada donde se registraban abortos (Skirrow 2006). Esta bacteria fue incluida en el género *Vibrio* debido a su morfología con forma de coma o de S y su alta motilidad (Skirrow 2006; Fig. 1). En 1919, un organismo aparentemente idéntico fue aislado de un feto bovino abortado, y denominado *Vibrio fetus* (Smith y Taylor 1919). Esta especie fue incluida como especie tipo del género *Campylobacter* en su primera descripción (Veron y Chatelain 1973).

*Campylobacter fetus* se divide en dos subespecies: *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv), y *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff). Estas subespecies fueron definidas por características ecológicas (preferencias de nicho, hospedero y presentación clínica). Cfv causa infertilidad crónica y abortos, y se encuentra exclusivamente en el tracto genital bovino, siendo transmitida por vía venérea, y no pudiendo sobrevivir en el tracto digestivo (Bryner 1964). Cff causa



**Figura 1.** Primer aislamiento de *C. fetus*. Realizado por McFadyean y Stockman en 1906 a partir de un exudado vaginal de una oveja infectada. Tomado de Skirrow et al. 2006.

abortos esporádicos en bovinos y ovinos, y es transmitida por vía oral-fecal en un amplio rango de hospederos, aunque también puede habitar en el tracto genital y transmitirse esporádicamente por vía venérea (Veron y Chatelain 1973). La diferenciación de estas subespecies puede realizarse por características bioquímicas: tolerancia a 1% de glicina, donde Cff es positivo y Cfv negativo, y producción de H<sub>2</sub>S, donde Cff es positivo y Cfv negativo (Penner 1988). Dentro de Cfv, también se define el biovar *intermedius* (Cfvi) por características bioquímicas, siendo negativo para la tolerancia a 1% de glicina y positivo para la producción de H<sub>2</sub>S (Veron y Chatelain 1973).

Recientemente, se encontró una gran divergencia genética de algunas cepas aisladas de reptiles con respecto a Cff y Cfv. Esto llevó a proponer la existencia de una tercera subespecie: *C. fetus* subsp. *testudinum* (Cft), que además de estar presente en reptiles, es capaz de infectar humanos (Fitzgerald et al. 2014, Patrick et al. 2013, Dingle et al. 2010).

### 1.1.2 Características fenotípicas

*Campylobacter fetus* tiene forma alargada y curvada, mide 0,2 a 0,8 micras de ancho y 0,5 a 5 micras de largo, y luego de 72 horas en placas de agar-sangre forma pequeñas colonias, las cuales varían en color desde blanco brillante hasta marrón claro. Es microaerofílica, y necesita de una atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub> para su crecimiento (Alves et al. 2011, George et al. 1978, Kiggins y Plastringe 1958). En cultivos de más de 72 horas puede cambiar a una forma cocoide con mejor supervivencia. Esta bacteria crece más lentamente que el resto de las especies del género, y es capaz de hacerlo a 25°C, 37°C y 42°C, aunque su crecimiento es más lento a esta última temperatura, a diferencia de otras especies de *Campylobacter* (Aroori et al. 2013). Posee flagelos en uno o ambos extremos, que le confieren una alta motilidad. No forma esporas, no tiene actividad proteolítica, y no fermenta ni oxida carbohidratos (Kiggins y Plastringe 1958). Al igual que el resto de las especies del género, *C. fetus* produce catalasa y oxidasa y reduce el nitrato a nitrito (Hebert et al. 1982). Presenta dificultades para ser transportada y cultivada, puesto que es muy lábil y no resiste el calor, la desecación o la exposición al aire, y necesita de un medio especial para su traslado (medio TEM, *transport enrichment medium*) (Leaper y Owen 1981).

Los estudios ultraestructurales con microscopía electrónica muestran que la bacteria posee una doble capa exterior de subunidades proteicas hexagonales (*S-layer*, del inglés *surface-layer*, capa superficial), y una pared celular con tres capas, una externa de lipoproteínas, una media de lipopolisacáridos y una interna de mucopéptidos (Blaser y Gotschlich 1990, Smibert 1978). Las *S-layers* están formadas por proteínas denominadas SLPs (del inglés *surface layer proteins*), que se autoensamblan para formar una estructura regular alrededor de la superficie de la



célula. Las *S-layers* son estructuras cristalinas de dos dimensiones que cubren toda la célula, y tienen importantes funciones, como la adhesión celular, la protección contra la ingestión por protozoos o fagocitos, propiedades antigénicas, ser el lugar de anclaje de enzimas hidrolíticas o un receptor para fagos, entre otros (Fagan y Fairweather 2014, Beveridge et al. 1997). Se encuentran tanto en bacterias gram positivas como gram negativas y en la gran mayoría de las archaea. Las *S-layers* están usualmente compuestas por una sola proteína SLP. Hay una amplia variedad de SLPs tanto en su función como en su genética, a pesar de su convergencia en la formación de una capa bidimensional alrededor de la célula, a cuya pared están asociadas mediante interacciones no covalentes. En el caso de las bacterias gram negativas, estas interacciones se establecen con los lipopolisacáridos (LPS) (Fagan y Fairweather 2014). Los LPS son un antígeno de superficie (el antígeno O) de las bacterias que los poseen y son potentes toxinas (Moran et al. 1994). En *C. fetus*, el gen que codifica la SLP está repetido ocho veces y este conjunto de genes está ligado a genes de componentes de las vías secretoras (Fagan y Fairweather 2014).

### **1.1.3 Importancia sanitaria y económica de *Campylobacter fetus***

Los miembros del género *Campylobacter* colonizan las mucosas del tracto intestinal, la cavidad oral y el tracto urogenital de diversos vertebrados, y pueden encontrarse tanto en individuos sanos como enfermos. *Campylobacter jejuni* y *C. coli* son la principal causa de diarrea infecciosa en humanos (Meinersmann et al. 2002). Otras especies de *Campylobacter* y *Arcobacter* están implicadas en episodios de aborto e infertilidad en diversos animales, y se asocian con enteritis, artritis y otras patologías (Meinersmann et al. 2002).

*Campylobacter fetus* posee una gran importancia veterinaria y médica por ser uno de los agentes causantes de la campylobacteriosis bovina y ovina, y por infectar ocasionalmente a los humanos.

Las dos subespecies de *C. fetus* tienen importantes diferencias epidemiológicas. *Campylobacter fetus fetus* se transmite por vía oral-fecal. Se encuentra predominantemente en ovinos, donde causa abortos que generan pérdidas de hasta un 50% de las majadas (García et al. 1983), pero se aísla del tracto intestinal o la

vesícula biliar de individuos tanto sanos como enfermos. Tiene un amplio rango de hospederos que incluyen humanos, bovinos, caprinos, porcinos, equinos, monos, aves de corral y reptiles (Clemmons et al. 2014, Tu et al. 2004, Garcia et al. 1983). Se considera un patógeno emergente en humanos, donde genera infecciones muy invasivas que pueden ser letales (Wagenaar et al. 2014).

En algunos de estos hospederos, como en equinos, Cff puede ser causa de diarrea (Hurcombe et al. 2009). La infección por Cff también puede ser responsable de abortos esporádicos de fetos bovinos de hasta siete meses de gestación (Campero et al. 2003, Campero 2002). Esta subespecie se aloja en el intestino, pero su persistencia causa infecciones generalizadas, llegando al útero a través del sistema placentario o ascendiendo por el tracto genital. Una vez en el útero infecta el feto causando el aborto (van Bergen et al. 2005b, Campero 2002).

*Campylobacter fetus venerealis* está restringida al tracto genital bovino, y es el agente causante de la campylobacteriosis genital bovina (CGB).

En los toros, Cfv coloniza los epitelios superficiales del pene y las criptas prepuciales, convirtiéndolos en portadores asintomáticos por largos períodos. Generalmente, los toros de mayor edad son más propensos a estar infectados ya que sus mucosas peneanas se vuelven más irregulares y las criptas prepuciales se hacen más profundas, lo que favorece el establecimiento y persistencia de *C. fetus* (Mai et al. 2013b, Mshelia et al. 2012, Cobo et al. 2011).

En el sistema reproductor de las vacas, Cfv causa una infección crónica que conduce a un cuadro de disminución de la fertilidad con la muerte temprana del embrión, repetición de celos, períodos largos entre celos y abortos esporádicos, y también se manifiesta como endometritis y salpingitis (Alves et al. 2011). Las hembras más susceptibles a la infección son las vaquillonas o las vacas de más edad, por sus bajos niveles de inmunidad (Jimenez et al. 2011). La bacteria se aloja en la vagina y cuello uterino, donde se multiplica y luego invade el útero, provocando fallas en el implante del embrión (Groff 2005, Smibert 1978). La infertilidad suele asociarse con la fase aguda de la enfermedad, y el aborto con la fase crónica (Groff 2005). Los abortos pueden producirse en todas las etapas de la gestación, pero son más comunes entre el tercer y el sexto mes. Las causas del aborto pueden ser hipoxia del embrión o daños en la barrera placentaria con colonización del mismo (Jimenez et al. 2011, Groff 2005). La

mayoría de las hembras se curan de la infección mediante su sistema inmune, pero algunas mantienen los microorganismos hasta dos años en su aparato genital, lo cual puede generar fallas reproductivas y constituir un riesgo de infección continuo para todo el rodeo (van Bergen et al. 2005b). La infección vaginal puede persistir durante la gestación, con escasa o nula respuesta inmune a nivel sistémico y del tracto reproductivo. Esta persistencia puede deberse a variaciones antigénicas de la superficie bacteriana debido a cambios en la expresión de sus SLPs. Hasta un 11% de los animales pueden permanecer infértiles durante el resto de su vida (Mai et al. 2013b).

La CGB se transmite por vía venérea, y la transmisión se efectúa en casi el 100% de los casos donde uno de los animales está infectado (Stynen et al. 2011, Groff 2005). El toro infectado es el principal dispersor de la enfermedad, tanto por servicio natural como por inseminación artificial (Molina et al. 2013, Alves et al. 2011, Mshelia et al. 2010b, Groff 2005). El comportamiento homosexual en los toros también es una vía de dispersión del patógeno (Truyers et al. 2014, Alves et al. 2011, Groff 2005).

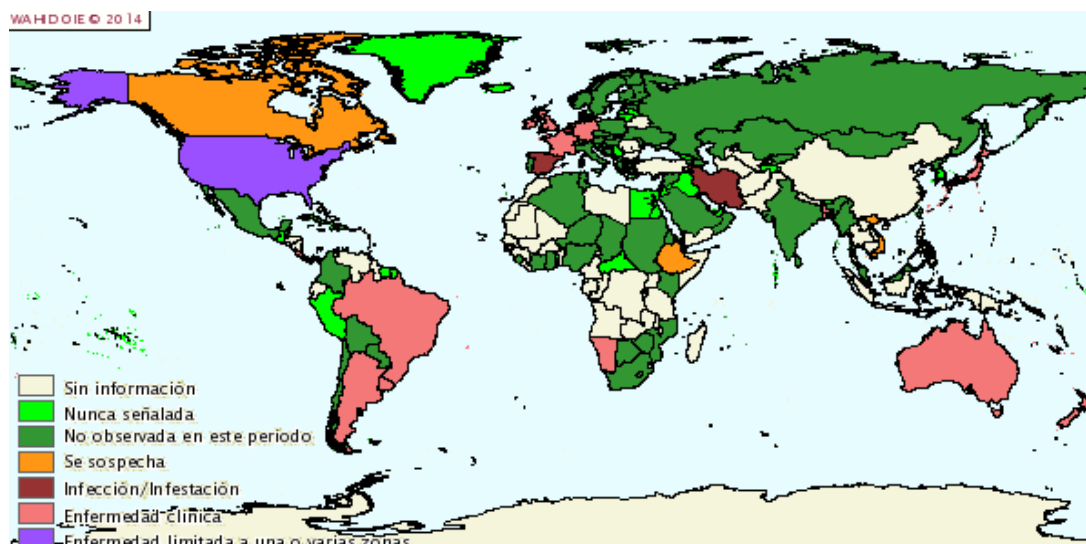
Los principales factores de riesgo para la transmisión de la CGB son el empleo de toros adultos mayores de 4 años, compartir el pastoreo con otros rodeos, el préstamo o alquiler de toros, la compra de vacas de descarte o vacías, malos alambrados y toros saltadores (Truyers et al. 2014, Alves et al. 2011, Jimenez et al. 2011, Rocha et al. 2009, Fóscolo et al. 2005, Campero 2002). Los rumiantes que conviven con el ganado pueden actuar como reservorio de *C. fetus*, constituyendo una fuente adicional de infección. En este sentido, son muy importantes los ovinos, ya que suelen tener una alta incidencia de infección con Cff (Mai et al. 2013a). La vía mecánica durante el control ginecológico y mediante camas o instrumentos veterinarios contaminados es otra fuente de transmisión (Mai et al. 2013a, Alves et al. 2011, Groff 2005).

En los establecimientos con buenas prácticas sanitarias (controles periódicos del estado de salud del ganado, desparasitación y vacunación contra otras enfermedades, etc.) la incidencia de la CGB es menor, probablemente debido a un estado general e inmunológico adecuado tanto de los machos como de las hembras, que les permite combatir naturalmente la infección (Mai et al. 2013a, Molina et al. 2013, Jimenez et al. 2011). Se ha propuesto que la presencia de otras enfermedades reproductivas como brucelosis o tricomoniasis, está asociada con la presencia de CGB, ya que comparten

los mismos factores de riesgo, y la presencia de una de las enfermedades puede comprometer el sistema inmune y hacer al individuo susceptible al resto (Mai et al. 2013b, Cobo et al. 2011, Jimenez et al. 2011).

El tratamiento de la infección en general se realiza solamente en los toros, utilizando antibióticos, o vacunas que también tienen carácter curativo (Fóscolo et al. 2005). La vacunación está recomendada también para las hembras, aunque raramente se aplica (Fóscolo et al. 2005, Campero 2002). Sin embargo, hay heterogeneidad en la sensibilidad a antibióticos de las diferentes cepas, por lo que los tratamientos no siempre son efectivos (Jimenez et al. 2011, Gallay et al. 2007). El tratamiento es costoso y no impide la reinfección. A esto se suma un escaso control de los reproductores, ya que los toros se compran, alquilan o prestan libremente (Jimenez et al. 2011, Repiso et al. 2005). Ha sido sugerido que las vacunas elaboradas con cepas foráneas o muy antiguas aportan escasa protección contra este patógeno (Jimenez et al. 2011, Fóscolo et al. 2005, Cobo et al. 2003, Corbeil et al. 2003). Esta baja efectividad puede deberse a diferencias entre las cepas circulantes en diferentes regiones, pero también a cambios antigénicos de las SLPs de la bacteria durante el curso de la infección (Cobo et al. 2003). También es importante incluir cepas de ambas subespecies y del biovar *intermedius* en la formulación de las vacunas (Cobo et al. 2004). En Uruguay, si bien existen vacunas nacionales e importadas para la profilaxis de la campylobacteriosis, la información sobre la eficiencia de estas vacunas a campo es escasa. No hay un relevamiento previo de la variación de las cepas que circulan en el país que permita determinar cuál vacuna es la más adecuada para combatir a esta bacteria.

Según la organización mundial de sanidad animal (OIE, del francés *Office International des Épizooties*), la CGB es una enfermedad distribuida mundialmente, que abarca un rango de prevalencia de 10 a 40% dependiendo de la región (Fig. 2). Esta organización colocó a la CGB en su lista de reporte obligatorio, que contiene enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel nacional, y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y sus productos son considerables. La enfermedad causa grandes pérdidas económicas en todos los países que tienen una población grande de ganado bovino, y es más prevalente en sistemas de ganadería extensiva con



**Figura 2.** Distribución de la campilobacteriosis genital bovina. Datos del año 2013.

Tomado de la base de datos estadísticos de la OIE

(WAHID, [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home))

reproducción por servicio natural como el uruguayo. Estas pérdidas se deben no sólo a la reducción en las tasas de procreo sino a la necesidad de descartar animales y a las reducciones en la producción de leche, lo cual disminuye severamente la rentabilidad de los sistemas de producción (Molina et al. 2013, Fóscolo et al. 2005, Campero et al. 2003, 2005, Campero 2002). Estos problemas se acentúan en los países del Tercer Mundo, donde las tecnologías y servicios adecuados para la correcta identificación del problema e implementación de planes de control son escasos y de difícil acceso (Mshelia et al. 2010b, 2012, Mai et al. 2013b).

La CGB impone restricciones al comercio internacional de productos bovinos (van Bergen et al. 2005b). Otra actividad económica que se ve afectada es la exportación de genética bovina en forma de semen y toros reproductores, un mercado global de importancia creciente, en el que Uruguay incursiona con creciente interés.

Históricamente la economía de Uruguay se ha basado en la exportación de productos agropecuarios, especialmente de carne bovina y sus derivados. En el año 2011, nuestro país se ubicó en el puesto 20 entre los principales productores mundiales de carne vacuna, y ocupó el cuarto lugar entre los países sudamericanos. La producción bovina en su conjunto generó 2.373 millones de dólares americanos. Esto representa un 26% de la producción agropecuaria total del país en ese año. Un 93% de

esta producción fue exportada (FAOSTAT 2013; DIEA 2012). Por lo tanto, puede considerarse a la producción bovina como uno de los pilares de la economía nacional.

Entre las causas que influyen en el comportamiento reproductivo hay múltiples factores; entre otros, los nutricionales y de manejo (Quintans 2013) y los infecciosos, como la CGB, a los cuales se les puede atribuir más de un 50% de las fallas reproductivas (Campero 2002). Los rodeos infectados presentan disminución de la tasa de preñez en el orden del 20 al 25%, y también en la tasa de procreo debido a los abortos, que alcanzan hasta un 10% (Mai et al. 2013b, Quintans 2013, Bondurant 2007, van Bergen et al. 2005b).

En Uruguay la campylobacteriosis genital bovina tiene estatus de enfermedad clínica (OIE 2014), e influye notoriamente en las tasas reproductivas observadas en nuestro país. La tasa de preñez promedio en Uruguay en el año 2011 fue de 72.3%, mientras que la tasa de procreo se ubicó en 68% (DIEA 2012). Por esta razón, es esencial vigilar y controlar la enfermedad de forma permanente. El diagnóstico clínico de la enfermedad es difícil, puesto que sus síntomas se solapan con los de varios factores, y las bajas tasas de preñez pueden atribuirse a diversas causas (Gädicke y Monti 2012, Repiso et al. 2005). Esta enfermedad fue detectada por primera vez en Uruguay en rodeos de leche a fines de la década de 1960 (Repiso et al. 2005). Las medidas de control en la cuenca lechera se basaron en medidas de manejo (inseminación artificial, separación de animales por categorías, eliminación de toros positivos y vacunaciones sistemáticas).

A partir de la década de 1980 se comenzaron a realizar diagnósticos rutinarios de campylobacteriosis y se implementaron planes de control de dicha enfermedad en los rodeos de carne a nivel de los toros inseminadores, los cuales lograron disminuir la prevalencia de la enfermedad, con un aumento de las tasas de preñez en un 5 a 10% (Bove et al. 2013, Carretto, com. pers.). El último relevamiento estadístico realizado en Uruguay para evaluar la incidencia de *C. fetus* fue realizado en 2005 por la División de Laboratorios Veterinarios M.C. Rubino del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Los resultados indicaron que la prevalencia de *C. fetus* en toros era del 28%, mientras que la prevalencia por establecimiento alcanzaba el 37%. En cuanto a las medidas de control, los establecimientos que realizan exámenes de control en toros previo al servicio son alrededor del 2%, los que realizan inseminación artificial un 6%, y la

vacunación sólo se implementa en un 4% de los rodeos (Repiso et al. 2005), a pesar de que ha sido planteado que la relación costo-beneficio de la vacunación es muy buena, puesto que las pérdidas económicas debidas a la repetición de celo son 18 veces más grandes que el costo de la vacunación (Alves et al. 2011).

En nuestro país existe una reglamentación que indica que todos los toros que se comercialicen o se alquilen como reproductores, deben tener un certificado sanitario que los acredite como libres de *C. fetus*. Esta reglamentación es sólo parcialmente respetada, lo cual facilita el ingreso de la enfermedad a los establecimientos. Además, es muy frecuente la práctica de repaso (entore adicional de las vacas que no quedan preñadas), el cual aumenta el riesgo de transmisión de la enfermedad (Alves et al. 2011, Cobo et al. 2003). Situaciones similares parecen ser muy comunes en los países miembros de la OIE, ya que en un relevamiento de las medidas de manejo a nivel global realizado en 2005, sólo 26 de 166 países contestaron el formulario. Se registró una gran heterogeneidad en las respuestas en cuanto a los métodos de detección y las medidas de control utilizadas en diferentes países (van Bergen et al. 2005b). La detección y caracterización del patógeno son factores clave para la implementación de medidas de control. Las medidas regulatorias internacionales para el comercio de toros, embriones y semen están regidas por las metodologías aceptadas internacionalmente, descritas en el manual y el código de Animales Terrestres de la OIE (OIE 2014, van Bergen et al. 2005b). Muchos países reportan la utilización de métodos no incluidos en el manual de la OIE, complicando la comparación de resultados en diferentes países y la visualización de la verdadera dimensión del problema (van Bergen et al. 2005b).

Como se mencionó previamente, *C. fetus* se considera un patógeno emergente en la especie humana (Wagenaar et al. 2014). La mayoría de los países incluyen a *C. fetus* en el grupo de riesgo 2 para la salud humana, el cual según la Organización Mundial de la Salud, implica un riesgo moderado para los individuos, y bajo para la comunidad (ABSA 2015). Este grupo incluye patógenos que pueden causar enfermedad en humanos o animales, pero es improbable que sean una amenaza seria para la comunidad, el ganado o el medio ambiente. Exposiciones en laboratorio pueden implicar infecciones serias, pero existen tratamientos adecuados y el riesgo de que se disemine la infección es limitado.

La primera descripción de una infección con *C. fetus* en humanos se realizó en 1947, y estuvo asociada con la ingestión de leche sin pasteurizar (Blaser 1998). Desde entonces, se han reportado una gran serie de casos. La identificación de subespecies no suele realizarse en los laboratorios clínicos, pero ha sido planteado que la misma sería necesaria para entender mejor la epidemiología de la enfermedad (Wagenaar et al. 2014). En la mayoría de los casos en que se determina la subespecie implicada, las infecciones son debidas a Cff, aunque existen algunos casos de infección con Cfv o con la recientemente descrita Cft (Fitzgerald et al. 2014, Benejat et al. 2013, Patrick et al. 2013, Tu et al. 2004).

A pesar de ser un problema de salud pública importante dado que los casos son difíciles de tratar, muchas veces fatales y cada vez más frecuentes, las rutas de transmisión y los factores de riesgo de contraer esta infección para los humanos son poco conocidos (Wagenaar et al. 2014, Decousser et al. 2007). La mayoría de las infecciones son esporádicas, pero se han encontrado también algunos brotes (Wagenaar et al. 2014, Blaser 1998). Hubo dos brotes en unidades de cuidado neonatal, luego del nacimiento de niños infectados, lo que sugiere una posible vía de contagio entre personas (Wagenaar et al. 2014). En una colonia huterita hubo un caso de sepsis en una niña de 4 meses, y se detectaron casos de diarrea en varios miembros de la comunidad. Los perfiles de PFGE (del inglés *pulsed field gel electrophoresis*, electroforesis en campos pulsados) de los aislamientos de *C. fetus* obtenidos de las distintas personas eran idénticos, sugiriendo que formaban parte de un mismo brote (Rennie et al. 1994).

Muchos investigadores consideran que *C. fetus* es un patógeno oportunista (Ledina et al. 2012, Shimizu et al. 2012, Tremblay et al. 2003). Los pacientes que se ven más frecuentemente afectados son los inmunocomprometidos por diversas causas, como haber recibido transplantes o tener el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, pacientes con graves problemas cardiovasculares o hepáticos, con diabetes o que recibieron el implante de prótesis o marcapasos, o que se someten a hemodiálisis (Shimizu et al. 2012). Otros grupos de riesgo los constituyen las mujeres embarazadas y los ancianos (Wagenaar et al. 2014, Louwen et al. 2012, Pacanowski et al. 2008). Si bien en la mayoría de los casos los pacientes padecen alguna enfermedad previa a la infección, se han descrito casos de pacientes aparentemente sanos, que generalmente



se han asociado a riesgos ocupacionales por contacto frecuente con ganado (Wagenaar et al. 2014, Salihu et al. 2009).

Uno de los factores que más se asocia con infecciones por *C. fetus* es el consumo de productos bovinos u ovinos (carne, leche, y especialmente hígado) crudos o mal cocinados, asociado a un estado vulnerable del individuo (Wagenaar et al. 2014, Man 2011). La participación de los productos alimenticios aviares en la transmisión de *C. fetus* es controversial (Aroori et al. 2013, Suy et al. 2013, Man 2011). Los animales domésticos, como perros, también podrían actuar de reservorio del patógeno, contagiando a los humanos, y también pueden desarrollar síntomas de diarrea (Chaban et al. 2012).

Las infecciones por *C. fetus* en humanos se consideran subdiagnosticadas. Esto se debe a varias causas, entre las cuales se encuentra la presentación clínica muy diversa, que suele solaparse con los síntomas de otras infecciones más comunes (Tanaka et al. 2012). También influyen las dificultades en su aislamiento, sobretodo en el ámbito de la microbiología clínica, donde los cultivos suelen realizarse en condiciones aerobias o completamente anaerobias, en las cuales el microorganismo no sobrevive mucho tiempo, y en medios de cultivo selectivos con antibióticos a los cuales *C. fetus* es sensible (Blaser 1998). Estos problemas podrían evitarse por la utilización de métodos moleculares, pero en este tipo de laboratorios no suelen utilizarse métodos específicos para la detección de *C. fetus* (Decousser et al. 2007).

*Campylobacter fetus* es la especie más frecuente en casos de bacteremia, de los cuales alrededor de un 14% tienen un desenlace fatal (Wagenaar et al. 2014). La infección suele comenzar con la ingestión de la bacteria, seguida por la colonización del intestino, provocando diarrea en alrededor del 30% de los casos (Wagenaar et al. 2014). La presentación clínica de la infección va desde diarrea aguda y gastroenteritis (Man 2011) a una infección sistémica que puede variar en gravedad dependiendo del estado del paciente y de los órganos afectados (Louwen et al. 2012a). La septicemia ocurre en alrededor de un 40% de los casos (Wagenaar et al. 2014). Otras manifestaciones pueden ser infecciones neurológicas como meningitis o abscesos cerebrales (Suy et al. 2013), o infecciones en otros órganos incluyendo huesos y pulmones o pleuritis (Tanaka et al. 2012, Decousser et al. 2007), celulitis (Ledina et al. 2012, Briedis et al. 2002, Ichiyama et al. 1998), artritis o infecciones perinatales

(Wagenaar et al. 2014, Louwen et al. 2012a). También puede causar patologías vasculares, como aneurismas y peri o endocarditis (Louwen et al. 2012a). En mujeres embarazadas, se han encontrado infecciones en todas las etapas del embarazo. Los síntomas clínicos de la madre son fiebre y algunas veces diarrea, pero en ciertos casos se reportan abortos espontáneos que están acompañados o no de otros síntomas. En los casos en que se lleva a término el embarazo, el bebé puede sufrir de sepsis, que frecuentemente lleva a un cuadro de meningitis con alta mortalidad (Wagenaar et al. 2014, Nakajima-Kawakami et al. 2010, Fujihara et al. 2006).

El tratamiento de estas infecciones es difícil, sobre todo debido a la heterogeneidad en la sensibilidad a antibióticos de las diferentes cepas, a la adquisición de resistencias a lo largo del tiempo, y a la dificultad de los antibióticos para penetrar en algunos tejidos que la bacteria coloniza (Tanaka et al. 2012, Pacanowski et al. 2008, Gallay et al. 2007, Fujihara et al. 2006, Tremblay et al. 2003, Blaser 1998). Por este motivo, se han reportado numerosos casos de infecciones recurrentes, muchas veces con un desenlace fatal, aún en casos donde se administraron los antibióticos adecuados (Wagenaar et al. 2014, Ledina et al. 2012, Decousser et al. 2007, Tremblay et al. 2003).

## **1.2 Identificación del género *Campylobacter*, la especie *Campylobacter fetus*, las subespecies *fetus* y *venerealis* y el biovar *intermedius***

### **1.2.1 Aislamiento e identificación fenotípica y bioquímica del género *Campylobacter*, la especie *Campylobacter fetus*, las subespecies *fetus* y *venerealis* y el biovar *intermedius***

Para la detección de *C. fetus* mediante métodos bacteriológicos, el transporte de la muestra es un paso crítico, ya que debido a su carácter microaerófilico, la bacteria debe ser transportada refrigerada en un medio especial (medio TEM) que garantice su viabilidad (Alves et al. 2011). Además de la utilización de un medio de cultivo selectivo (medio Skirrow o agar-sangre con sulfato de polimixina B, trimetoprima, vancomicina y cicloheximida), y el cultivo en atmósfera microaerófila, la identificación de *C. fetus* se realiza a través de la morfología de la colonia, la tinción de Gram y la morfología

microscópica, donde se observan las formas espiraladas características del género (Alves et al. 2011).

*Campylobacter fetus* también puede ser identificada por inmunofluorescencia directa, que es un método rápido de detección, aunque con una sensibilidad menor, y que no permite diferenciar las subespecies (Alves et al. 2011). Otra prueba serológica que se puede aplicar al diagnóstico de *C. fetus* es el ensayo inmunoenzimático ELISA, que detecta anticuerpos IgA en el mucus vaginal de hembras bovinas presuntamente infectadas (Alves et al. 2011, Mshelia et al. 2010a). Sin embargo, algunos autores reportan la presencia de falsos positivos y falsos negativos (Mcmillen et al. 2006). Otro ensayo ELISA utiliza cuatro anticuerpos monoclonales contra las variantes A y B del lipopolisacárido (LPS), y fue utilizado en muestras de mucus y raspajes prepuciales en medio TEM (Devenish et al. 2005, Brooks et al. 2004). También se desarrolló un método basado en técnicas inmunohistoquímicas, que es útil para el relevamiento de la presencia de *Campylobacter* spp. en tejidos conservados en formol (Campero et al. 2005).

Para la diferenciación de Cff y Cfv, el ensayo actualmente aceptado por la OIE (2014) es el ensayo de tolerancia a 1% de glicina (Cff es positivo y Cfv negativo). Otra prueba bioquímica aceptada es la producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), para la cual Cff es positivo y Cfv negativo. En base a esta última prueba, se define Cfv biovar intermedius, que es negativo para la tolerancia a 1% de glicina y positivo para la producción de H<sub>2</sub>S (Veron y Chatelain 1973). Para la diferenciación de Cff y Cfv, han sido probados varios ensayos adicionales, incluyendo pruebas de resistencia a diversos antibióticos, tasa de crecimiento, tamaño y tipo de espiral, tolerancia al oxígeno y crecimiento a 25°C y 42°C (Schulze et al. 2006), pero ninguno de ellos da resultados concluyentes, ya que existen incongruencias en los resultados obtenidos con los diferentes ensayos.

### **1.2.2 Identificación genética del género *Campylobacter*, la especie *Campylobacter fetus*, las subespecies *fetus* y *venerealis*, y el biovar *intermedius***

El género *Campylobacter* se puede identificar mediante la amplificación de un fragmento del gen 16S con cebadores que hibridan en regiones con secuencias exclusivas del género (Linton et al. 1996).

Existen varios métodos para la identificación de la especie *C. fetus*. El método molecular más empleado para la identificación de la especie utiliza el gen *cstA* (*carbon starvation protein gene*) como blanco de PCR y se basa en la presencia/ausencia de amplicón, y es el más frecuentemente utilizado. Este método es el recomendado para la identificación de especie por la OIE, en su manual de diagnóstico de enfermedades de animales terrestres (OIE 2014).

Otros métodos incluyen la amplificación y/o secuenciación de diferentes fragmentos del gen 16S, que ha sido planteada para identificar a la mayoría de las especies del género *Campylobacter* (Gorkiewicz et al. 2003, Oyarzabal et al. 1997, Linton et al. 1996). Otros autores proponen utilizar cebadores que amplifican un fragmento del gen 23S en un PCR convencional (Bastyns et al. 1995), o mediante un *nested*-PCR (Inglis y Kalischuk 2003). Se han propuesto métodos basados en *Southern Blot* que emplean sondas específicas del gen 16S (Blom et al. 1995).

En años recientes, se desarrollaron métodos basados en PCR en tiempo real (Chaban et al. 2009, Mcmillen et al. 2006). Se desarrolló un método de identificación de la especie basado en el gen *cpn60*, que codifica para una chaperonina de 60 kDa, utilizando SYBR Green (Chaban et al. 2009). Otro método utiliza sondas de hidrólisis (TaqMan) y tiene como blanco el gen *nahE* (Selim et al. 2014, van der Graaf-van Bloois et al. 2013).

También se propuso un método de identificación de *C. fetus* (Yamazaki et al. 2009) basado en la técnica LAMP (del inglés *loop-mediated isothermal amplification*, amplificación isotérmica mediada por bucles), pero esta metodología no fue aplicada con posterioridad a su descripción.

El método recomendado por la OIE para diferenciar Cff de Cfv está incluido en un múltiplex PCR que también se utiliza para identificar la especie. La caracterización se realiza mediante la amplificación de un fragmento del gen *parA* (*plasmid partition*

*protein gene*), que fue descrito como característico de la subespecie Cfv (Hum et al. 1997).

La OIE recomienda varios métodos moleculares adicionales para la diferenciación de Cff y Cfv, aunque se advierte que dan resultados dispares (OIE 2014). Estos métodos incluyen PFGE (van Bergen et al. 2006, On et al. 2001, Salama et al. 1992), RAPD (del inglés *random amplified polymorphic DNA*, amplificación al azar de ADN polimórfico) (Tu et al. 2005a), y MLST (del inglés *multi locus sequence typing*) (Van Bergen et al. 2005a). Otros métodos están basados en PCR, apuntando a distintas regiones genómicas (Moolhuijzen et al. 2009, Abril et al. 2007, Schulze et al. 2006, Wang et al. 2002, Hum et al. 1997). También se han realizado estudios basados en la técnica de AFLP (del inglés *amplified fragment length polymorphism*, polimorfismo en el largo de fragmentos amplificados; van Bergen et al. 2005c, Duim et al. 2001, Wagenaar et al. 2001). El método descrito por Abril et al. (2007) está basado en la presencia de un elemento genético móvil, denominado ISCfe1, que se encontró en las cepas de Cfv pero no en las de Cff. Otro método propuesto para identificar Cfv está basado en la técnica LAMP (Yamazaki et al. 2010). También se diseñaron otros métodos de discriminación entre Cff y Cfv basados en curvas de disociación (*melting*) con SYBR Green, pero los mismos mostraron una alta tasa de discrepancia con los resultados de los métodos bioquímicos (McGoldrick et al. 2013). Otros métodos utilizan una sonda TaqMan o el agente intercalante SYBR green, basados en el gen *parA* (McGoldrick et al. 2013, Chaban et al. 2012, Mcmillen et al. 2006), pero se ha cuestionado su especificidad (ocurrencia de falsos positivos; Spence et al. 2011).

Se describió un método basado en la secuencia del gen *sapB2* para identificar positivamente a la subespecie Cff (Wang et al. 2002), pero parece mostrar una sensibilidad (capacidad para detectar una muestra que se sabe positiva) muy baja (Willoughby et al. 2005).

Para la identificación del biovar *intermedius*, existe un método basado en PCR que amplifica una variante del gen *VirB11*, que los autores encontraron en una cepa de Cfvi utilizada en su estudio, pero este método no fue probado en otras cepas (Moolhuijzen et al. 2009).

### 1.3 Metodologías de análisis de la variabilidad genética en bacterias y sus aplicaciones en *Campylobacter fetus*

El estudio de los patrones de variación de los patógenos es esencial para investigar los riesgos epidemiológicos asociados a las variantes, y para rastrear la transmisión de las mismas de una región a otra, entre hospederos o a través del tiempo (Li et al. 2009). La identificación de variantes entre cepas estrechamente relacionadas es una herramienta esencial para diagnosticar y monitorear infecciones y brotes epidemiológicos en patógenos, tanto animales como humanos.

Hay numerosas metodologías que permiten caracterizar a los diferentes patógenos. Para que las mismas sean eficaces, deben cumplir con una serie de requisitos, dentro de los cuales los más importantes son su poder de discriminación, su reproducibilidad a lo largo del tiempo y en diferentes laboratorios, y la facilidad en su aplicación por parte de personal técnico (Li et al. 2009). Otros factores como el costo y la rapidez, también deben considerarse cuando se requiere el análisis de un gran número de muestras o una respuesta rápida a una situación epidemiológica crítica (Taboada et al. 2013). La elección de las metodologías depende de si el estudio se realiza a nivel local o global, y del grado de variación que presenta el genoma del patógeno estudiado (Taboada et al. 2013, Maiden et al. 1998).

A continuación se describen algunos métodos de análisis de la variabilidad que han sido exitosos en diferentes grupos de bacterias, poniendo especial énfasis en los antecedentes en el género *Campylobacter* y en la especie *C. fetus*.

#### 1.3.1 *Multi locus sequence typing (MLST)*

La variación en la secuencia de determinados genes se usa para elaborar esquemas de caracterización que permiten realizar estudios epidemiológicos y evolutivos. Un método muy utilizado es el MLST, el cual implica obtener secuencias parciales de siete genes *housekeeping* (genes requeridos para realizar las funciones celulares básicas) y emplear genotipos combinados, denominados STs (del inglés *sequence types*) para diferenciar cepas (Maiden et al. 1998). Los genes *housekeeping* se utilizan porque suelen estar presentes en todos los aislamientos de una especie, y

tener un nivel de variación que garantiza la existencia de alelos diferentes en las diversas cepas (Foley et al. 2009, Maiden et al. 1998). Esta aproximación ha sido utilizada para caracterizar un gran número de especies bacterianas (Lowder et al. 2009, Dingle et al. 2001, Enright y Spratt 1998). Una gran ventaja del MLST con respecto a otros métodos de caracterización es su portabilidad, es decir la facilidad en la comparación de resultados entre laboratorios, y la elaboración de bases de datos públicas, además de ser más variable que los métodos fenotípicos como la serotipificación (Taboada et al. 2013, Dingle et al. 2001). En las especies que tienen varios alelos por cada locus, es altamente improbable que los aislamientos compartan su ST a menos que estén estrechamente relacionados (Lin et al. 2014). La información contenida en estas secuencias de ADN también es útil para responder preguntas como los límites entre las especies, las dinámicas poblacionales y las relaciones evolutivas entre especies o poblaciones bacterianas (Pérez-Losada et al. 2013).

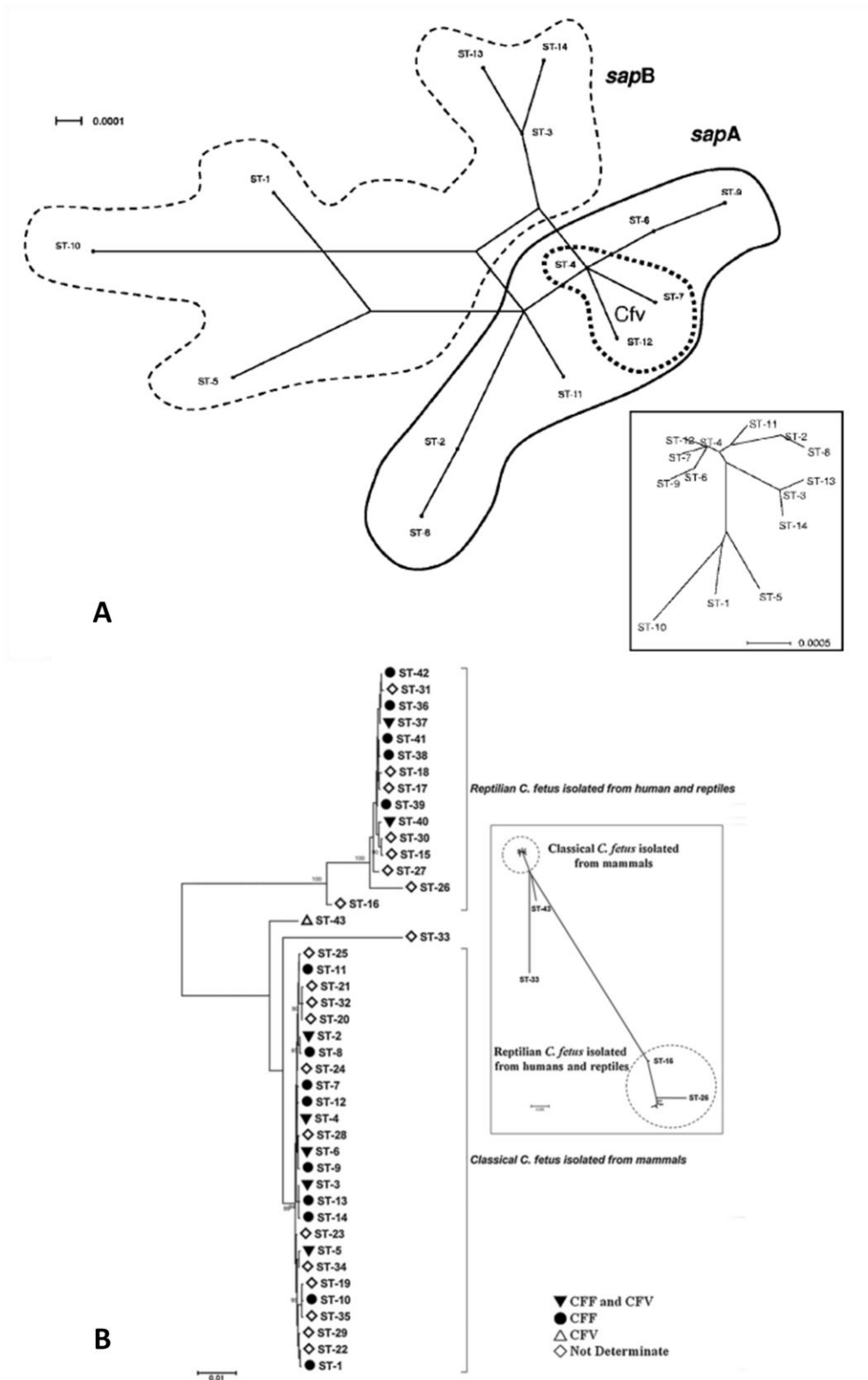
El MLST se ha desarrollado para varias especies del género *Campylobacter* (Miller et al. 2012, 2005, Van Bergen et al. 2005a), y para géneros relacionados como *Arcobacter* (Miller et al. 2009). Este método es especialmente útil para la caracterización de *C. jejuni* y *C. coli* (Colles y Maiden 2012, Dingle et al. 2001). El análisis de grandes colecciones de aislamientos de diversas fuentes ha llevado a una comprensión de la epidemiología, evolución y estructura poblacional de estos patógenos, que tienen distribución mundial y una gran diversidad genética (Sheppard et al. 2010, Colles y Maiden 2012). Así, se pudo establecer la presencia de complejos clonales o linajes de STs relacionados (en los cuales coinciden al menos cuatro de los siete alelos; Feil y Enright 2004). Estos linajes se relacionan con características como la capacidad de infectar ciertas especies de animales o el serotipo, lo que permite identificar las fuentes de infecciones en humanos e implementar planes de control (Taboada et al. 2013, Colles y Maiden 2012, Colles et al. 2009, Sheppard et al. 2009, Dingle et al. 2001). En estos estudios también se determinó que la transferencia horizontal de genes (THG) y la recombinación intra e interespecie son procesos frecuentes en el género, por lo que las poblaciones de estas especies se consideran panmícticas (Schouls et al. 2003). En conjunto, estos resultados llevaron a establecer al MLST como la técnica de referencia ("*gold-standard*"), para la caracterización de la mayoría de las especies del género (On 2013).

El MLST es el único método basado en secuencias de ADN empleado hasta ahora para el estudio de la variabilidad en *C. fetus*. El esquema de MLST desarrollado para *C. fetus* se basa en la secuenciación de fragmentos de siete genes (Van Bergen et al. 2005a).

La variabilidad genética de *C. fetus* evidenciada por el esquema de MLST es escasa en los aislamientos de mamíferos (Van Bergen et al. 2005a). En base a estos resultados, se propuso que la especie *C. fetus* tiene una estructura poblacional clonal. Se considera a la subespecie Cfv como un clon bovino dentro de la especie (Van Bergen et al. 2005a), el cual se diferencia de Cff ya que los STs presentes en Cfv son exclusivos de bovinos, y están estrechamente relacionados entre sí (Van Bergen et al. 2005a). También se observa una correlación de los STs con el serotipo (o tipo sap, ver más adelante) de las cepas (Fig. 3A).

Los aislamientos de *C. fetus* obtenidos de reptiles son más variables, y presentan una marcada diferenciación de las cepas de mamífero (Fig. 3B) (Wang et al. 2013, Dingle et al. 2010, Gorkiewicz et al. 2010, Van Bergen et al. 2005a).





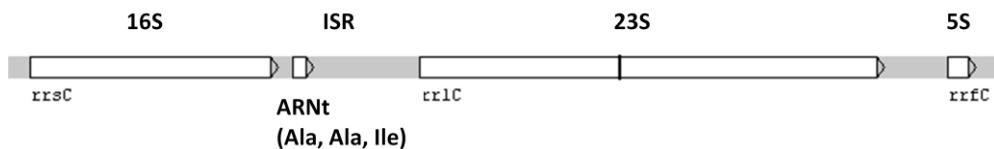
**Figura 3.** Relaciones entre los STs encontrados en *C. fetus* y características de las cepas. **A.** Red realizada con el método *neighbor-joining*, mostrando el tipo *sap* y la subespecie de los aislamientos. Tomado de Van Bergen et al. 2005a. **B.** Árbol filogenético realizado con el método de *neighbor-joining*, mostrando el origen animal de las cepas. Tomado de Wang et al. 2013.

### 1.3.2 Secuencias de los operones ribosomales

La estructura de los ribosomas, las maquinarias ribonucleoproteicas encargadas de sintetizar las proteínas, está muy conservada en los tres dominios de la vida. En procariotas, el ribosoma está compuesto por dos subunidades: la 50S, que incluye los ARNs 23S y 5S y más de 30 proteínas, y la 30S, compuesta por el ARN 16S y 20 proteínas. Las restricciones estructurales del ensamblaje del ribosoma hacen que los genes del ARN ribosomal sean muy conservados a lo largo de la evolución (Pei et al. 2009). En la mayoría de los procariotas, los genes ribosomales están organizados en un operón en el orden 16S-23S-5S, y son transcritos en un ARN policistrónico que se procesa para dar las formas maduras que conformarán el ribosoma (Condon et al. 1992). El número de operones presente en los distintos genomas bacterianos varía entre 1 y 15 (Rastogi et al. 2009), y el género *Campylobacter* se caracteriza por tener 3 copias de los mismos (Gurtler y Stanisich 1996) (Fig. 4).

En muchas especies de bacterias se utilizaron diversas regiones de los operones del ADN ribosomal para realizar análisis de variabilidad genética, con un grado de éxito variable según el modelo (Lee et al. 2009, Bouchet et al. 2008).

Una de las regiones más empleadas es el gen 16S. La caracterización del gen 16S es un método estándar para la identificación de especies, géneros y familias de bacterias (Gurtler y Stanisich 1996, Woese 1987), y se utiliza habitualmente para la realización de análisis metagenómicos (Amir et al. 2013). La escasa variabilidad de este gen, sin embargo, lo hace apto para diferenciar especies pero no para evaluar la variabilidad intraespecífica (Gorkiewicz et al. 2003).



**Figura 4.** Organización de los operones ribosomales en *C. fetus*. Cada operón está compuesto por los tres genes que codifican los ARNs estructurales del ribosoma, separados por espaciadores. El espaciador entre el gen 16S y 23S se denomina ISR. Cada genoma contiene tres copias del operón, que varían en el ARNt codificado dentro del ISR (los ARNt para la Alanina están presentes en la primera y segunda copia, mientras que la tercera codifica el ARNt de la Isoleucina).

Otra secuencia de los operones ribosomales que es utilizada con éxito para relevar variabilidad inter e intraespecífica en el género *Campylobacter*, es la de una región variable del gen 23S, que corresponde a las hélices 43 a 69 de la estructura secundaria del ARN 23S (Meinersmann et al. 2009, Iriarte y Owen 1996, Bastyns et al. 1994, Eysers et al. 1994, Trust et al. 1994, Van Camp et al. 1993).

El espaciador que se encuentra entre los genes 16S y 23S se denomina región espaciadora interna (ISR, del inglés *internal spacer region*). Es la zona más variable del operón, tanto en largo como en secuencia, y se utiliza para relevar variabilidad inter e intraespecífica en varios taxa, incluyendo al género *Campylobacter* (Man et al. 2010, Cao et al. 2009, Tazumi et al. 2009, Khan y Edge 2007, Christensen et al. 1999, Pérez Luz et al. 1998, Gurtler y Stanisich 1996, Jensen et al. 1993, Barry et al. 1991). En muchas bacterias gram negativas, estos espaciadores contienen, además de zonas variables, genes que codifican para ARNs de transferencia (ARNt). En *C. fetus*, el único estudio que hasta ahora incluye secuencias de los ISR utiliza secuencias extraídas del genoma completo de la cepa Cff 82-40 para compararlo con los de otras especies (Man et al. 2010).

En muchas especies de bacterias se han encontrado secuencias intervinientes (IVSs, del inglés *intervening sequences*) tanto en el gen 16S como en el 23S y en el ISR. Las IVSs son inserciones, variables en secuencia, ubicación y largo, que suelen estar presentes sólo en una parte de las cepas de cada especie (Nakajima et al. 2013, Liguori et al. 2011, Man et al. 2010, Meinersmann et al. 2009, Linton et al. 1994, Jensen et al. 1993). En el género *Campylobacter* se describió la presencia de IVSs en el gen 23S en varias de sus especies, incluyendo a *C. fetus*, donde algunas cepas presentan una secuencia más larga que el resto (Tazumi et al. 2009, Chan et al. 2007, Trust et al. 1994, Van Camp et al. 1993). La presencia de una IVS de 156 pb en el ISR fue descrita en *C. lari* (Hayashi et al. 2012).

### **1.3.3 Análisis de genes de virulencia**

El contenido génico de muchos microorganismos es variable, aun dentro de una misma especie. La presencia o ausencia de determinados genes se puede evaluar por medio de su amplificación con cebadores específicos (Foley et al. 2009) o de su

secuenciación (Cody et al. 2009, Chen et al. 2007, Lacher et al. 2007). Para estos análisis se utilizan con frecuencia múltiples genes, incluyendo factores de virulencia o genes que participan en la utilización de los nutrientes y en la resistencia a antibióticos (Taboada et al. 2013, Foley et al. 2009). Los factores de virulencia son aquellos genes que participan en el relacionamiento con el hospedero, provocándole una enfermedad. Estos genes codifican para diversas proteínas, como las estructurales (proteínas capsulares, de membrana y SLPs) y las que intervienen en las vías de glicosilación, la transferencia de plásmidos, la invasión, la quimiotaxis, la adhesión, la motilidad, la comunicación célula-célula (*quorum sensing*), toxinas como las CDT (del inglés *cytolethal distending toxin*) y los sistemas de secreción (Ho Sui et al. 2009), aunque muchos de estos genes también están presentes en bacterias comensales, por lo que algunos autores los llaman con el nombre más general de factores de interacción con el hospedero (Ho Sui et al. 2009, Pallen y Wren 2007, Holden et al. 2004).

En estudios genómicos realizados en el género *Campylobacter*, se encontraron múltiples genes asociados a la patogenicidad, como los que participan en el metabolismo de los LPS, los genes de las flagelinas, genes de adherencia y de resistencia a antibióticos, genes que codifican diversas toxinas, y el sistema de secreción tipo IV (Fouts et al. 2005, Eppinger et al. 2004). Algunos de estos genes son compartidos entre todas o varias de las especies, y otros son exclusivos de algunas especies o de algunas cepas, lo cual se relaciona con sus diferencias en virulencia y patogenicidad (Fouts et al. 2005, Eppinger et al. 2004).

En *C. fetus*, uno de los principales factores de virulencia son las *S-layers*, que muestran variación en la expresión de sus SLPs (Tu et al. 2003). Esta especie se clasifica en dos serotipos (A y B), basándose en la composición del LPS de la membrana externa de la bacteria (Moran et al. 1994, Perez-Perez et al. 1986). Cff presenta ambos serotipos, y ocasionalmente el serotipo combinado AB, mientras que Cfv presenta sólo el serotipo A (Tu y Dewhirst 2001, Alves et al. 2011). En las cepas del serotipo A, el genoma contiene ocho homólogos del gen *sapA*, (del inglés SAP: *surface array protein*) y en las de serotipo B, del gen *sapB*. Las proteínas que codifican estos genes se asocian alternativamente a los LPS tipo A o B, puesto que su extremo amino terminal, aunque similar en estructura secundaria, es diferente en secuencia y es capaz de asociarse

específicamente a una u otra variante del LPS (Dworkin 1995, Dworkin et al. 1995, Yang et al. 1992). Por lo tanto, hay una correlación directa entre el tipo de SLP (A o B) y el serotipo, existiendo cepas que poseen ambos conjuntos de homólogos (*sapA* y *sapB*) y ambos tipos de LPS (serotipo AB) (Messner et al. 2010, Dworkin 1995, Moran et al. 1994, Dubreuil et al. 1990). Los genes de un mismo tipo difieren entre sí en su extremo 3' y por lo tanto codifican diferentes variantes de la SLP (Bahl et al. 1997, Dworkin 1995, Tummuru y Blaser 1992). Estos genes se encuentran juntos en la isla genómica *sap*, y se expresan alternativamente a través de su asociación con un único promotor, mediante rearrreglos que ocurren con alta frecuencia y que implican recombinación e inversión de la región donde se encuentra el promotor, de manera que un solo gen se está expresando a la vez. Esta región que se invierte puede también incluir a alguno de los genes del conjunto de homólogos. Este proceso es conservativo, ya que los genes cambian de orden pero no se pierden ni se crean nuevas variantes. La ocurrencia de estos reordenamientos hace variar la SLP que rodea a la bacteria provocando diferencias antigénicas dependiendo de las circunstancias (Dworkin y Blaser 1997a, 1997b, Dworkin 1995, Tummuru y Blaser 1993), pudiendo cambiar durante el curso de una infección (Tu et al. 2005). Este proceso le permite a la bacteria evadir el sistema inmune del hospedero, por lo que la *S-layer* juega un papel preponderante en la colonización (Grogono-Thomas et al. 2000, Garcia et al. 1995, Wang et al. 1993). La *S-layer* es crucial para la patogénesis, ya que los mutantes defectivos de la misma no causan enfermedad y son sensibles a la fagocitosis y a la muerte por el complemento sérico C3b del hospedero (Blaser et al. 1987).

Además del operón *sap*, los factores de virulencia que se consideran más importantes en *C. fetus* son la CDT, la cual se piensa que es importante para la colonización de las células del hospedero, induciendo su apoptosis (Man 2011), y el sistema de secreción tipo IV (T4SS), que participa en la citotoxicidad (Man 2011). Los T4SS son maquinarias complejas asociadas evolutivamente a los sistemas de conjugación, que median la THG de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos, entre otras secuencias (de la Cruz et al. 2010, Wallden et al. 2010, Christie et al. 2005). También han sido frecuentemente asociados a la capacidad de colonización de tejidos y a la transferencia de moléculas efectoras a la célula eucariota en bacterias patogénicas (Gorkiewicz et al. 2010, Christie et al. 2005, Cascales y Christie 2003). El

sistema T4SS está implicado en la capacidad de *C. fetus* para la transferencia de plásmidos conjugativos, que ocurre naturalmente, y está involucrado en la invasión y mortalidad de células humanas *in vitro* (Kienesberger et al. 2011). Este sistema está asociado a dos proteínas con dominios FIC (del inglés *filamentation induced by cyclic AMP*), que son efectores citotóxicos hipotéticos, aunque no se ha evidenciado su transporte por medio del T4SS (Kienesberger et al. 2011). El involucramiento de este sistema en la patogenicidad de Cfv se demostró por ensayos de mutagénesis (Gorkiewicz et al. 2010). Otros genes relacionados con la patogenicidad que se han encontrado en *C. fetus*, y algunos de los cuales no están presentes en todas las cepas, son los relacionados con la movilidad, como los genes flagelares, con la adherencia y con la quimiotaxis (Fahmy et al. 2012; Moolhuijzen et al. 2009; Ali et al. 2012; Krause 2008; Asakura et al. 2007; McCoy et al. 1976).

### **1.3.4 Análisis de patrones de bandas**

En múltiples patógenos, como por ejemplo los pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Yersinia* y *Vibrio*, y la especie *Escherichia coli*, el análisis de los patrones de bandas generados mediante PFGE se utiliza como técnica de referencia para la caracterización (Foley et al. 2009, Mellmann et al. 2004). La técnica está basada en la digestión del genoma con enzimas de restricción de corte poco frecuente, seguida de una electroforesis en gel de agarosa utilizando campos pulsados para la separación de los fragmentos. Los patrones de electroforesis generados de esta forma se denominan pulsotipos. La interpretación de los geles puede ser difícil debido al amplio rango de tamaños de los fragmentos generados, y a variaciones en el equipo utilizado, las condiciones de digestión y el estado de la muestra de partida, que debe necesariamente tratarse de un cultivo fresco (Fujita et al. 1995). Este fue uno de los primeros métodos basados en ADN utilizados para caracterizar especies del género *Campylobacter*, especialmente en *C. jejuni*, donde es de utilidad para el rastreo de este patógeno en la cadena de producción aviar (Taboada et al. 2013, Foley et al. 2009, Mellmann et al. 2004).

En *C. fetus*, los primeros estudios de variabilidad genética utilizaron la técnica de PFGE (van Bergen et al. 2006, Vargas et al. 2003, Fujita et al. 1995, Rennie et al. 1994,

Salama et al. 1992a). Los resultados sugirieron la existencia de distintos clones de *C. fetus* en diferentes regiones geográficas (Vargas et al. 2003, On et al. 2001, Tibayrenc 1996, Fujita et al. 1995). Esta técnica ha tenido un éxito relativo, probando ser útil para identificar brotes en estaciones de inseminación artificial (van Bergen et al. 2006), para diferenciar subespecies y distinguir las cepas originarias de mamíferos de los aislamientos realizados a partir de reptiles (Tu et al. 2005, Fujita et al. 1995, Salama et al. 1992a). Debido a que tiene un poder de discriminación muy alto, suele ser útil más que nada para diferenciar cepas estrechamente relacionadas (Taboada et al. 2013). Sin embargo, su utilidad es cuestionable cuando se trata de patógenos altamente clonales (Taboada et al. 2013), como es el caso de *C. fetus*.

Otra técnica que ha sido utilizada para analizar la variabilidad en *C. fetus* es el AFLP (van Bergen et al. 2005c). Esta técnica consiste en digerir el genoma con una enzima de corte frecuente, generando una gran cantidad de fragmentos, y luego adicionarles secuencias adaptadoras en los extremos, que son utilizadas como sitio de hibridación de cebadores en una reacción de PCR. Los amplicones resultantes se separan por electroforesis para generar un perfil que se utiliza para comparar las cepas. Si se utilizan cebadores marcados con fluorescencia, esta técnica se puede automatizar con un secuenciador. El poder de discriminación de esta técnica es similar al de la técnica de PFGE (Wagenaar et al. 2001). En *C. fetus*, los resultados de la aplicación de esta técnica indican que la variación genética de la especie es muy limitada, aunque sería útil para diferenciar las subespecies Cff y Cfv (van Bergen et al. 2005c, Wagenaar et al. 2001). A pesar de esto, esta técnica tiene un uso restringido debido a su escasa reproducibilidad (On 2013).

La metodología denominada Rep-PCR se basa en la presencia de secuencias repetidas dispersas con bajo número de copias, de las cuales los genomas bacterianos contienen una gran variedad, como diversos elementos o secuencias de inserción (IS), los operones del ARN ribosomal y los genes de los ARNt (Lupski y Weinstock 1992). Se utilizan cebadores que hibridan con la secuencia del repetido, de manera de amplificar las regiones que flanquean los mismos. Cuando dos elementos están lo suficientemente cercanos entre sí, se producirá amplificación (Versalovic et al. 1991). Los amplicones luego se separan por electroforesis y se comparan los patrones de bandas, que varían en función de la cantidad y posición de repetidos que tenga el

genoma de la cepa. Las secuencias más usadas para la realización de esta técnica son las secuencias ERIC (del inglés *enterobacterial repetitive inter-genic consensus*), REP (*repetitive extragenic palindromic*) y BOX. Las secuencias ERIC son motivos conservados de 126 pb que se encuentran en muchas especies de enterobacterias (Versalovic et al. 1991), y han sido utilizadas con éxito en varios patógenos. Sin embargo, su poder de discriminación suele ser más bajo que el de la técnica de PFGE (Foley et al. 2009). En *C. fetus*, los cebadores basados en las secuencias ERIC fueron utilizados para hacer un estudio epidemiológico de varias cepas de origen mamífero y reptil, permitiendo diferenciar las subespecies Cff y Cfv, los serotipos A y B, y los aislamientos mamíferos de los reptilianos (Tu et al. 2005a). Los elementos REP tienen un repetido invertido con un largo aproximado de 38 pb, con una secuencia altamente conservada. Los elementos BOX son repetidos invertidos con una estructura modular, que se encuentran cercanos a los genes y pueden transcribirse (Versalovic et al. 1994).

El mayor problema de este tipo de técnica es la reproducibilidad, aunque para algunos patógenos se han podido desarrollar sistemas automatizados con buenos resultados, y con un poder de discriminación superior al de las metodologías de MLST y PFGE (Pasanen et al. 2014, Bourdon et al. 2011).

### **1.3.5 Análisis de genomas completos: identificación de variaciones genómicas**

La variación en los genomas bacterianos se genera mediante tres procesos: las mutaciones, la THG, y los reordenamientos genómicos provocados por la recombinación y la actividad de fagos, plásmidos y transposones (Ahmed et al. 2008, Pallen y Wren 2007) (Fig. 5). Además de los genes que cumplen funciones metabólicas esenciales, que conforman el genoma *core*, los genomas bacterianos también poseen un genoma accesorio adquirido mediante THG, compuesto por genes que les aportan características diferenciales y les confieren ventajas selectivas en diferentes ambientes (Juhas et al. 2009).

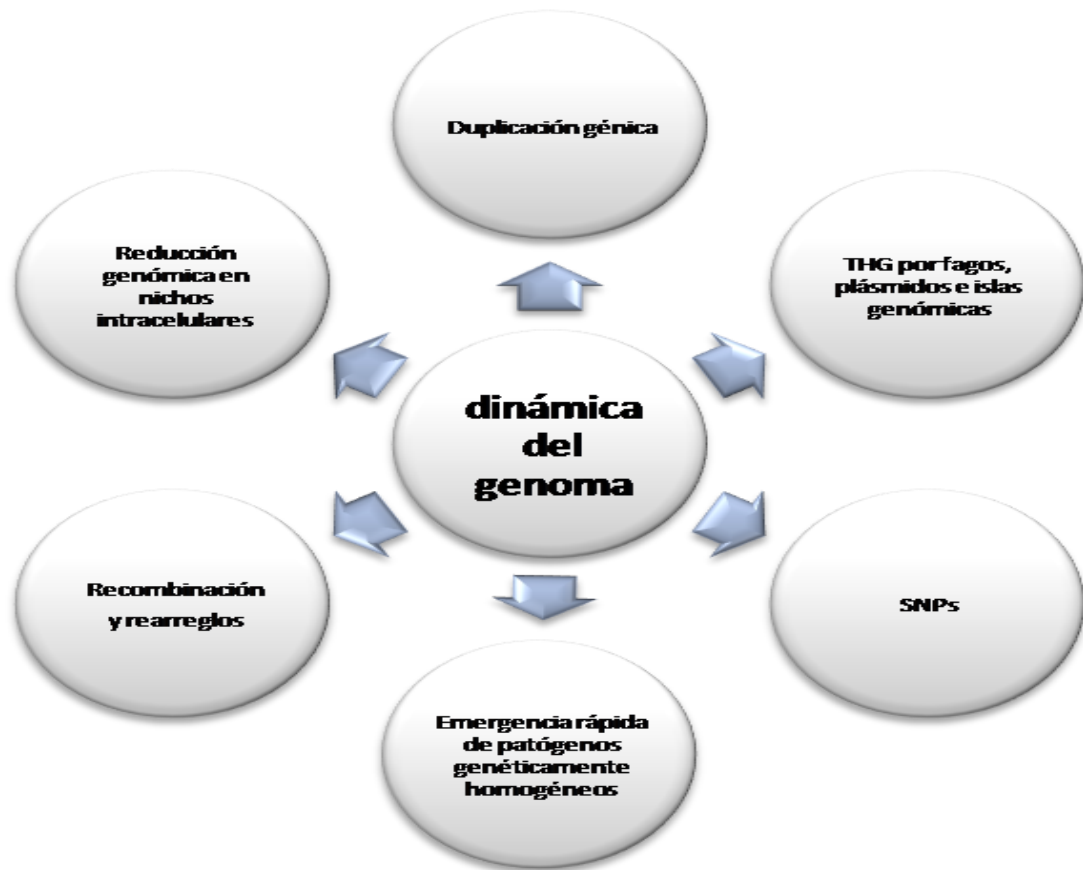
Desde el comienzo de los estudios genéticos en bacterias, se han descrito genomas muy estables y otros con una gran plasticidad (Belda et al. 2005, Mira et al. 2002). La gran cantidad de genomas bacterianos completos que se secuenciaron en los últimos años revelaron una gran plasticidad estructural, y la ocurrencia de



reordenamientos genómicos que incluyen translocaciones, inversiones y deleciones/inserciones, además de identificarse la adquisición y pérdida de regiones genómicas por THG, incluyendo variación en la presencia de elementos extracromosómicos (Xie et al. 2014). Algunos ejemplos de bacterias con genomas muy plásticos son el patógeno gástrico humano *Helicobacter pylori* (Fischer et al. 2014), el probiótico *Lactobacillus salivarius* (Raftis et al. 2014), el patógeno intestinal de ungulados *Chlamydia pecorum* (Sait et al. 2014), el género *Salmonella* y la especie modelo *E. coli* (Touchon et al. 2009, Liu y Sanderson 1996). En epsilon proteobacteria, la presencia de numerosos reordenamientos a lo largo de todo el genoma, llevó a plantear la hipótesis de que la recombinación es una de las principales fuerzas evolutivas que rigen la especiación en este grupo (Eppinger et al. 2004).

Uno de los mecanismos moleculares subyacentes a la generación de reordenamientos es la recombinación homóloga entre secuencias repetidas, que genera inversiones de grandes porciones del genoma, las cuales combinadas dan lugar a translocaciones. También se ha sugerido que las horquillas de replicación pueden estar implicadas en la generación de reordenamientos, ya que en varias especies se observó que las translocaciones son simétricas respecto al origen de replicación (Tillier y Collins 2000).

La THG contribuye a la diversificación de los microorganismos, y tiene un gran impacto en la plasticidad genómica. La mayoría de los eventos de THG ocurren a través del intercambio de islas genómicas, que son grandes regiones (entre 10 y 500 kb) que están en la enorme mayoría de los genomas bacterianos. Contribuyen a la rápida evolución y adaptación al hospedero en bacterias comensales o patogénicas, ya que pueden contener genes de resistencia a antibióticos, factores asociados con la simbiosis, o enzimas del metabolismo que les permiten sobrevivir en diversos ambientes (Miyazaki et al. 2013, van Essen-Zandbergen et al. 2007). Las islas genómicas son capaces de integrarse y escindirarse del genoma, y de transferirse a otras bacterias por transformación, conjugación o transducción (Juhas et al. 2009). Las islas genómicas que contienen factores de virulencia, y por lo tanto son responsables de la adaptación de los patógenos al hospedero, son denominadas islas de patogenicidad (Ali et al. 2012, Hsiao et al. 2005).



**Figura 5.** Plasticidad genómica en bacterias. Hay tres fuerzas que moldean los genomas bacterianos: las mutaciones, la THG, y los reordenamientos genómicos provocados por la recombinación y la actividad de fagos, plásmidos y transposones. Algunas modificaciones surgen de la interacción de estos procesos. Modificado de Pallen y Wren 2007.

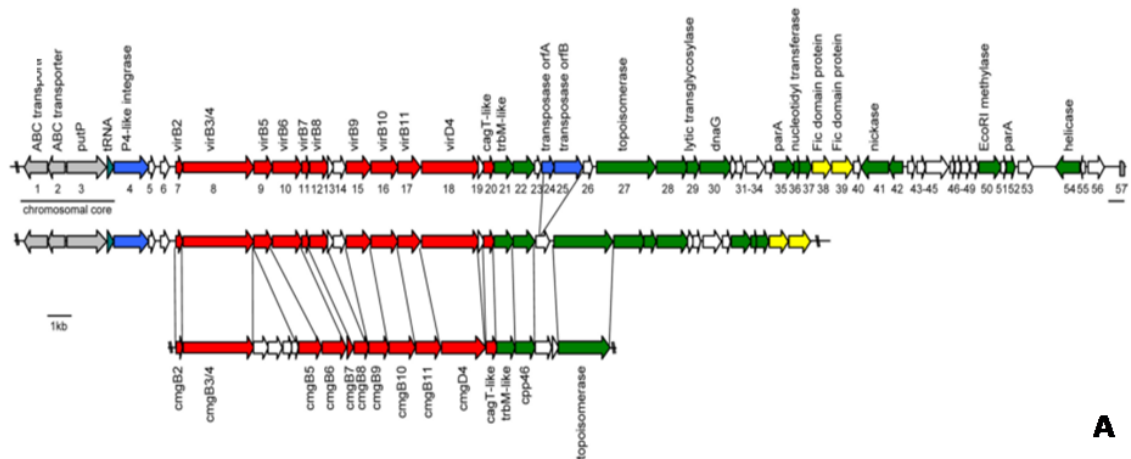
Una gran fuente de variabilidad genómica la constituyen los plásmidos, que pueden estar presentes sólo en algunas cepas de una especie, y transmitirse tanto entre cepas de una especie como entre especies filogenéticamente distantes que comparten un determinado hábitat. Los plásmidos suelen ser portadores de factores de virulencia, sistemas de secreción y genes de resistencia a antibióticos (Batchelor et al. 2004). Existen métodos basados en la variación en el contenido de plásmidos de las cepas, denominados *plasmid profiling*, en los cuales se evalúa el contenido de plásmidos de una cepa a través de una extracción de ADN diferencial y posterior electroforesis, o análisis de restricción de los mismos. Estas metodologías se han utilizado en patógenos como *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter*, y *Shigella* (Foley et al. 2009).

Los genomas de las especies que componen el género *Campylobacter* han sufrido un proceso de reducción, evidenciado por su pequeño tamaño (1.5 a 2.5 x 10<sup>6</sup> bases), con una ausencia casi completa de secuencias no codificantes, y la pérdida de genes metabólicos a lo largo de la evolución, características consistentes con su adaptación a nichos específicos (Gorkiewicz et al. 2010, Hofreuter et al. 2008).

Los genomas de *C. fetus* tienen un largo que va desde 1.77 a 1.94 x 10<sup>6</sup> bases, y su contenido GC se mantiene entre 33 y 33.3%. Se ha encontrado una asociación, aunque no completa, entre el tamaño genómico y las subespecies. Los genomas de Cfv y Cfvi serían alrededor de un 10% más largos que los de Cff (Salama et al. 1992a). La cantidad de genes que contienen estos genomas es de entre 1707 y 2421. El genoma *core* de la especie, estimado mediante la comparación de los genomas disponibles, es de 1509 genes (van der Graaf-van Bloois et al. 2014b). Los genes accesorios de la especie, que difieren entre las cepas estudiadas, pertenecen en su mayoría a los *clusters* de genes *sap*, secuencias de inserción, islas genómicas, sistemas de restricción-modificación tipo I y profagos.

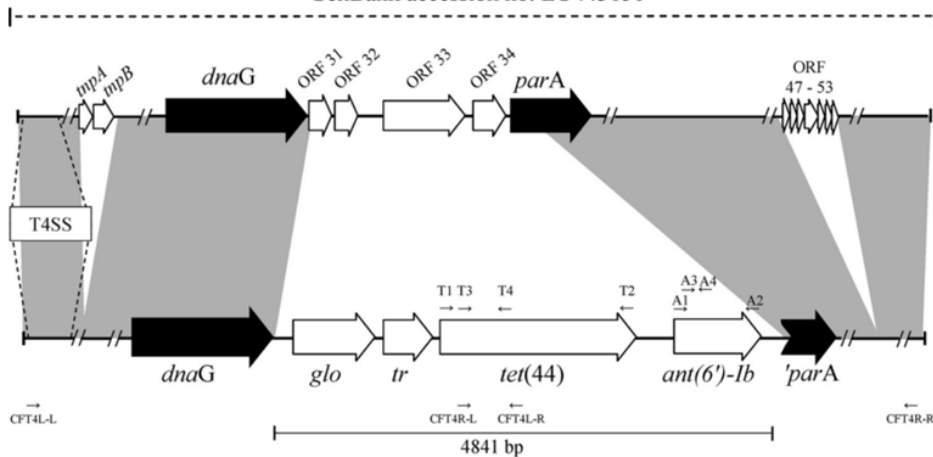
En los genomas de *C. fetus* se identifican varias islas genómicas, las cuales constituyen la mayor variación genómica encontrada hasta ahora en la especie (Kienesberger et al. 2014, Ali et al. 2012). La isla genómica mejor descrita es una isla de patogenicidad de alrededor de 45 Kb, que está presente en la mayoría de los genomas de Cfv o Cfvi, pero estaría ausente de los genomas de las cepas de las subespecies Cff y Cft (Gorkiewicz et al. 2010, Moolhuijzen et al. 2009). Esta isla contiene los genes de un T4SS y genes asociados a la movilidad (ISs, transposasas e integrasas de fagos) (Ali et al. 2012, Gorkiewicz et al. 2010). Esta isla comparte homología con los plásmidos de resistencia pCC31 y pTet encontrados en *C. coli* y *C. jejuni*, respectivamente, tanto en su organización como en su secuencia (Gorkiewicz et al. 2010) (Fig. 6A). En algunas cepas de Cff se encontró una copia de esta isla con algunas modificaciones (Abril et al. 2010) (Fig 6B).

La cepa Cfv 84-112 porta un plásmido denominado ICE\_84112, que posee genes de transferencia (genes *tra*). Este plásmido contiene dos genes que tienen dominios FIC (*Fic3* y *Fic4*), los cuales presumiblemente cumplan alguna función en la patogenicidad (Kienesberger et al. 2014).



**A**

Genomic island (41485 bp) of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* strain ATCC 19438  
GenBank accession no. EU443150



Genomic island (39175 bp) of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* strain IMD 523-06  
GenBank accession no. FN594949

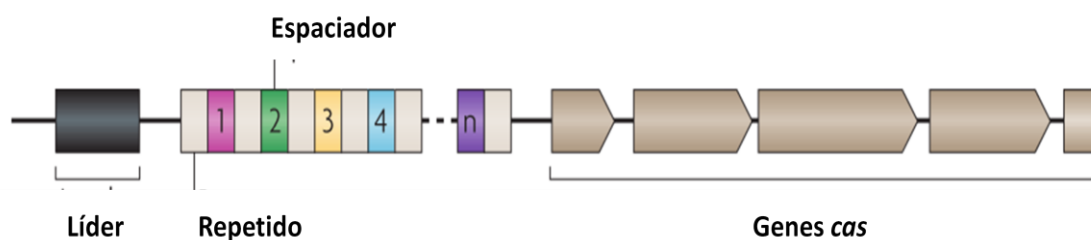
**B**

**Figura 6.** Representación esquemática de las islas genómicas de *C. fetus*. **A.** Arriba: isla genómica de la cepa Cfv ATCC 19438. Centro: secuencia parcial de la isla en la cepa Cfv 84-112. Abajo: plásmido pCC31 de *C. coli*. **B.** Comparación de la isla genómica de Cfv con la de Cff. Tomado de Abril et al. 2010.

### 1.3.6 Análisis de CRISPRs

Las secuencias repetidas palindrómicas dispersas llamadas CRISPR (del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) están presentes en el 45% de los genomas bacterianos, y en el 84% de los genomas de archaea (Barrangou y Marraffini 2014, Grissa et al. 2007; <http://crispr.u-psud.fr/>). Los loci CRISPR consisten en conjuntos formados por repetidos directos (DRs) de 21 a 48 pb de largo, separados por espaciadores de similar longitud y secuencia variable. El número de unidades DR-espaciador que contiene el locus varía entre las cepas de una especie. La secuencia del DR es característica del locus y generalmente varía entre especies. Las secuencias de los espaciadores suelen tener identidad con elementos móviles como profagos y plásmidos (Bolotin et al. 2005, Mojica et al. 2005, Pourcel et al. 2005). Los repetidos y espaciadores están precedidos por una secuencia líder que cumple funciones regulatorias de la expresión (Marraffini y Sontheimer 2010; Fig. 7).

Asociados a las secuencias CRISPR se pueden encontrar *clusters* de genes llamados *cas* (del inglés *CRISPR-associated sequences*), que son los responsables del funcionamiento de estos loci (Makarova et al. 2006, Haft et al. 2005, Jansen et al. 2002). Al conjunto que comprende al locus CRISPR propiamente dicho, incluyendo las unidades DR-espaciador y la secuencia líder, y a los genes *cas*, se le denomina sistema CRISPR-*cas*. Los genes *cas* son muy variables tanto en secuencia como en funcionalidad, cumpliendo varias funciones bioquímicas (Barrangou y Marraffini 2014). Muchas de las familias de proteínas *cas* tienen dominios de interacción con los ácidos



**Figura 7.** Estructura de los sistemas CRISPR-*cas*. Los loci CRISPR están formados por repetidos espaciados regularmente por secuencias no repetidas, y precedidos por una secuencia líder. El número de repetidos puede tener una amplia variación. Hay varios genes *cas* en la cercanía del locus. Tomado de Marraffini y Sontheimer 2010.

nucleicos, como motivos de unión al ADN y ARN, polimerasas, helicasas y nucleasas (Barrangou y Marraffini 2014, Makarova et al. 2002, 2006, 2011a, 2011b, 2013, Haft et al. 2005). La organización de estos genes en operones es muy variable tanto en el orden como en el número de genes presentes. Esta variación ocurre tanto en diferentes especies como en cepas de la misma especie, por lo que se sugirió que el análisis de estos genes puede aportar información sobre la evolución intraespecífica en algunos modelos (Cao et al. 2013, Makarova et al. 2011a, 2011b, 2013).

Generalmente, los sistemas CRISPR-*cas* y sus elementos son muy variables, y difieren enormemente en términos de su presencia y cantidad de loci, genes que lo componen, secuencia y largo de los DRs y espaciadores, y número de unidades repetidas. Estas diferencias ocurren tanto dentro de una especie como entre especies (Barrangou y Marraffini 2014). Cada genoma bacteriano puede tener múltiples loci CRISPR, que pueden pertenecer a distintas familias, y presentar diferentes secuencias del DR y el líder, e incluso estar asociados a diferentes *clusters* de genes *cas* (Barrangou y Horvath 2012, Cady et al. 2011, Touchon et al. 2011). Los CRISPR pueden ubicarse en islas genómicas, y tienen una alta movilidad, transmitiéndose entre cepas y especies por THG (Makarova et al. 2011, Ho Sui et al. 2009).

En varias especies, cepas que son idénticas cuando se las analiza con métodos estándar como serotipificación, MLST o PFGE, se pueden diferenciar mediante las secuencias de CRISPRs (Touchon et al. 2014, Levin et al. 2013, Kunin et al. 2007, Bolotin et al. 2005, Pourcel et al. 2005). Estas secuencias han sido utilizadas con éxito para análisis epidemiológicos en varias especies de bacterias, incluyendo entre otros los patógenos humanos *Yersinia pestis* (Barros et al. 2014, Cui et al. 2008, Pourcel et al. 2005), *S. enterica* (Bachmann et al. 2014, Fabre et al. 2014, Pettengill et al. 2014, Shariat et al. 2013, Timme et al. 2013, Fabre et al. 2012, Fricke et al. 2011, Liu et al. 2011) y *Mycobacterium tuberculosis*, donde es uno de los métodos más utilizados para el relevamiento de la variabilidad (Cain y Boinett 2013, Barrangou y Horvath 2012, Achtman 2008, Sorek et al. 2008, van Belkum et al. 1998, 2007, Lupski y Weinstock 1992). También se utiliza para la caracterización de bacterias de importancia industrial, como *Lactobacillus* spp., dando información acerca de la evolución de la especie mediante la detección de espaciadores ancestrales compartidos (Barrangou y Horvath 2012), y para realizar investigaciones epidemiológicas en *Salmonella* y *E. coli* (Shariat et

al. 2013, Touchon et al. 2011, Díez-Villaseñor et al. 2010, Touchon y Rocha 2010). Recientemente, se ha propuesto que las secuencias de CRISPRs son una buena alternativa para la caracterización de varios taxa, que incluyen los patógenos humanos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* (Hauck et al. 2012), *Gardnerella vaginalis* (Pleckaityte et al. 2012), *P. aeruginosa* (Cady et al. 2011), *Streptococcus pyogenes* (Nozawa et al. 2011), *S. mutans* (van der Ploeg 2009), el patógeno de plantas *Erwinia amylovora* (McGhee y Sundin 2012, Rezzonico et al. 2011), la bacteria de importancia industrial *S. thermophilus* (Horvath et al. 2008), y el patógeno bovino *Mycobacterium bovis* (Smith et al. 2006).

La caracterización puede realizarse utilizando secuencias de ADN, o mediante el método de *spoligotyping* (del inglés *spacer oligonucleotide typing*) que consiste en una técnica de hibridación utilizando sondas complementarias a los espaciadores para detectar cuáles están presentes en una determinada cepa (Jonsson et al. 2014, Abadia et al. 2011, Zhang et al. 2010, Cui et al. 2008, Brudey et al. 2006, Smith et al. 2006, Pourcel et al. 2005, Kamerbeek et al. 1997).

Los CRISPRs les confieren a las células que los portan resistencia contra la infección por fagos y el ingreso de ADNs foráneos (Levin et al. 2013, Marraffini 2013, Almendros et al. 2012, Marraffini y Sontheimer 2010, Horvath et al. 2008, Sorek et al. 2008, Mojica et al. 2005, Mojica et al. 2000). El proceso que genera esta resistencia tiene tres etapas: la adaptación o adquisición, la expresión o biogénesis del crARN (ARN del CRISPR) y la interferencia o *targeting* (Makarova et al. 2011).

El proceso de adaptación consiste en la adquisición de fragmentos de ADNs foráneos que invaden la célula y su incorporación en el locus CRISPR en forma de espaciadores (Barrangou y Marraffini 2014). La secuencia en el ADN foráneo correspondiente al espaciador se llama protoespaciador, y está flanqueada por una secuencia denominada PAM (del inglés *proto-spacer adjacent motif*), que mide 2 a 5 pb y es altamente conservada y particular para cada sistema (Kupczok y Bollback 2014, Mojica et al. 2009). Esta secuencia participa en el proceso de adaptación, actuando como sitio de reconocimiento para la adquisición de los espaciadores, y determinando la orientación de los mismos, y luego en el de interferencia, donde participa en la diferenciación del ADN propio de la bacteria del foráneo (Barrangou y Marraffini 2014). Se ha observado que mutaciones en la secuencia PAM de los fagos les permiten

escapar al ataque por el sistema CRISPR-*cas*, generándose una “carrera armamentista” entre las secuencias invasoras y el sistema CRISPR-*cas* de la bacteria (Kupczok y Bollback 2014, Levin et al. 2013, Almendros et al. 2012).

La expresión o biogénesis del crARN consiste en la transcripción y procesamiento del locus para formar los pequeños crARN, que tienen una estructura secundaria en horquilla debida a la secuencia palindrómica del DR, y son los que reconocen el ADN o ARN foráneo (Barrangou y Marraffini 2014).

El proceso de interferencia está guiado por el crARN, y consiste en el reconocimiento del protoespaciador en el ADN o ARN foráneo, con el cual tiene complementariedad de secuencia, provocando su clivaje por medio de las nucleasas *cas* (Barrangou y Marraffini 2014, Hale et al. 2012, Marraffini y Sontheimer 2010).

La adquisición de regiones genómicas por THG está limitada por la actividad del sistema CRISPR-*cas*. Por ejemplo, en *Enterococcus faecalis*, las cepas que tienen inactivos sus sistemas CRISPR-*cas* tienen genomas significativamente mayores, y poseen una mayor cantidad de genes asociados con elementos móviles, como los genes de resistencia a antibióticos (Palmer y Gilmore 2010, 2014, Levin et al. 2013).

Además de la función canónica en la defensa de la célula contra los ácidos nucleicos foráneos, el sistema CRISPR-*cas* tiene funciones alternativas en varios aspectos de la fisiología bacteriana (Sampson y Weiss 2014, Bikard y Marraffini 2013). La endonucleasa *cas9* participa en el control de la expresión de algunos genes en el patógeno intracelular *Francisella novicida*. Asociada con pequeños ARNs, *cas9* altera la estabilidad del ARN mensajero que codifica una lipoproteína, reduciendo su expresión. La unión de *cas9* al mensajero está guiada por un crARN sintetizado a partir de un espaciador que tiene una secuencia idéntica a la de una región del gen a ser regulado (Bikard y Marraffini 2013). Esta regulación es esencial para la evasión de la respuesta inmune del hospedero en esta bacteria (Sampson y Weiss 2013, 2014). En *Neisseria meningitidis* y *C. jejuni*, *cas9* es esencial para la interacción con la superficie de las células epiteliales, y para la replicación dentro de las mismas, aunque no se conoce cuál es el mecanismo por el que esta proteína actúa como factor de virulencia en estos organismos (Sampson y Weiss 2013, Louwen et al. 2012). En *Legionella pneumophila*, la acción del sistema CRISPR-*cas*, y particularmente de *cas2*, es esencial para la sobrevivencia dentro de las amebas que actúan como vector en la infección a



humanos, aunque el mecanismo exacto no se conoce (Gunderson y Cianciotto 2013). En *Pseudomonas aeruginosa*, el sistema CRISPR-*cas* participa en la regulación de la formación de biofilms, aparentemente mediante la regulación de la expresión de profagos (Palmer y Whiteley 2011, Zegans et al. 2009). En *E. coli*, la proteína cas1 tiene un rol en los sistemas de reparación del ADN actuando como nucleasa del ADN simple cadena en los intermediarios de Holliday (Babu et al. 2011).

En algunos genomas que poseen sistemas CRISPR-*cas* hay también genes denominados *RAMP* (del inglés *repeat-associated mysterious proteins*), que pueden agruparse en módulos (Karginov y Hannon 2010). Los mismos pueden estar adyacentes a los loci CRISPR y a los *clusters* de genes *cas* o distantes en el cromosoma. Codifican para una superfamilia muy diversa de proteínas, con escasa identidad de secuencia, que son capaces de actuar en el mecanismo de interferencia o catalizando el clivaje de los transcritos primarios del CRISPR (Bikard y Marraffini 2013, Zhang et al. 2013, Makarova et al. 2002, 2006, 2013, Al-Attar et al. 2011, Terns y Terns 2011, Haft et al. 2005).

La diversidad funcional de los genes *cas* los hace útiles para una gran variedad de aplicaciones. Las endonucleasas *cas* se modifican y programan para su uso en ingeniería genética, y se utilizan para generar cambios dirigidos en los genomas (*genome editing*; Barrangou y Marraffini 2014, Bikard y Marraffini 2013). Otra aplicación biotecnológica de los sistemas CRISPR-*cas* es la generación de resistencia a fagos en cultivos industriales para la generación de lácteos o productos farmacéuticos (Barrangou y Marraffini 2014, Sapranauskas et al. 2011).

En *C. fetus*, en el genoma de la cepa Cff 82-40 hay dos loci CRISPR, y se encuentran secuencias de seis genes *cas* adyacentes a los mismos (<http://crispr.upsud.fr/cgi-bin/crispr/allcas.cgi>). La presencia de genes *RAMP* no ha sido descrita hasta ahora.

### **1.3.7 Análisis de la variación genética en *Campylobacter fetus***

A pesar de que a nivel mundial se ha dedicado un gran esfuerzo a estudiar la variabilidad en *C. fetus*, el conocimiento que se tiene de su evolución es relativamente escaso. Esto se debe principalmente a que no se han encontrado métodos adecuados

para la realización de análisis epidemiológicos y evolutivos, al menos en los aislamientos de mamíferos, los cuales presentan poca variabilidad (Van Bergen et al. 2005). La variación genética fue estudiada principalmente mediante el uso de MLST (Van Bergen et al. 2005) y técnicas basadas en patrones de bandas (van Bergen et al. 2006, 2005c, Duim et al. 2001, On et al. 2001, Wagenaar et al. 2001, Salama et al. 1992). La mayoría de los métodos de análisis de la variabilidad genética descritos hasta ahora provienen de trabajos que estuvieron enfocados en estandarizar y optimizar la diferenciación genética entre Cff y Cfv.

En particular en nuestro país, si bien se realiza el diagnóstico y control de la CGB desde hace décadas (Repiso et al. 2005), no se han realizado estudios de variabilidad genética, por lo que es necesario un relevamiento de la misma que aporte información para el desarrollo de estrategias de control.

Dada la diversidad de métodos disponibles para la identificación molecular de Cff y Cfv, y el hecho de que ninguno de los ensayos presenta una concordancia total con la determinación bioquímica de Cff y Cfv (Van der Graaf-van Bloois et al. 2013), se hace necesaria la evaluación de las metodologías de identificación previamente a la caracterización más detallada de las cepas.

La hipótesis de trabajo de esta tesis es que existe diferenciación genética entre las cepas de *C. fetus* circulantes en la región, y que la misma puede ser relevada si se utilizan marcadores genéticos adecuados. Postulamos que esta variación está relacionada con la procedencia geográfica del ganado que las porta, y que la presencia de determinadas variantes genéticas en las cepas de *C. fetus* está correlacionada con el hospedero del cual son aisladas.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos generales

1. Evaluar y desarrollar metodologías de identificación genética del género *Campylobacter*, la especie *C. fetus*, las subespecies Cff y Cfv, y el biovar Cfvi
2. Desarrollar y evaluar metodologías de análisis de la variabilidad genética para *C. fetus*.
3. Analizar la diversidad genética presente en los aislamientos de *C. fetus* en la región y su asociación con el hospedero o procedencia geográfica.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Identificar el género *Campylobacter*, la especie *C. fetus* y la subespecie Cfv a través de metodologías moleculares.
2. Evaluar la identificación del biovar intermedius mediante el uso de metodologías existentes y el desarrollo de nuevas metodologías basadas en secuencias específicas.
3. Analizar la variabilidad genética de *C. fetus* a través del análisis de secuencias de MLST y de los operones ribosomales (gen 23S e ISR), de la presencia de cuatro genes de virulencia y su relación con el tipo sap, de la amplificación de secuencias repetidas, del análisis de las variaciones genómicas mediante el estudio de los genomas totalmente secuenciados, de la presencia del locus CRISPR2 y de los genes *cas* y *RAMP*, y de secuencias del locus CRISPR1.
4. Comparar el poder de resolución de los distintos métodos de análisis de la variabilidad utilizados, y evaluar su utilidad para la realización de estudios epidemiológicos y evolutivos.
5. Establecer si los patrones de variabilidad genética se hallan relacionados con la diferenciación bioquímica de Cff y Cfv, con el hospedero y/o con la procedencia geográfica de los aislamientos.

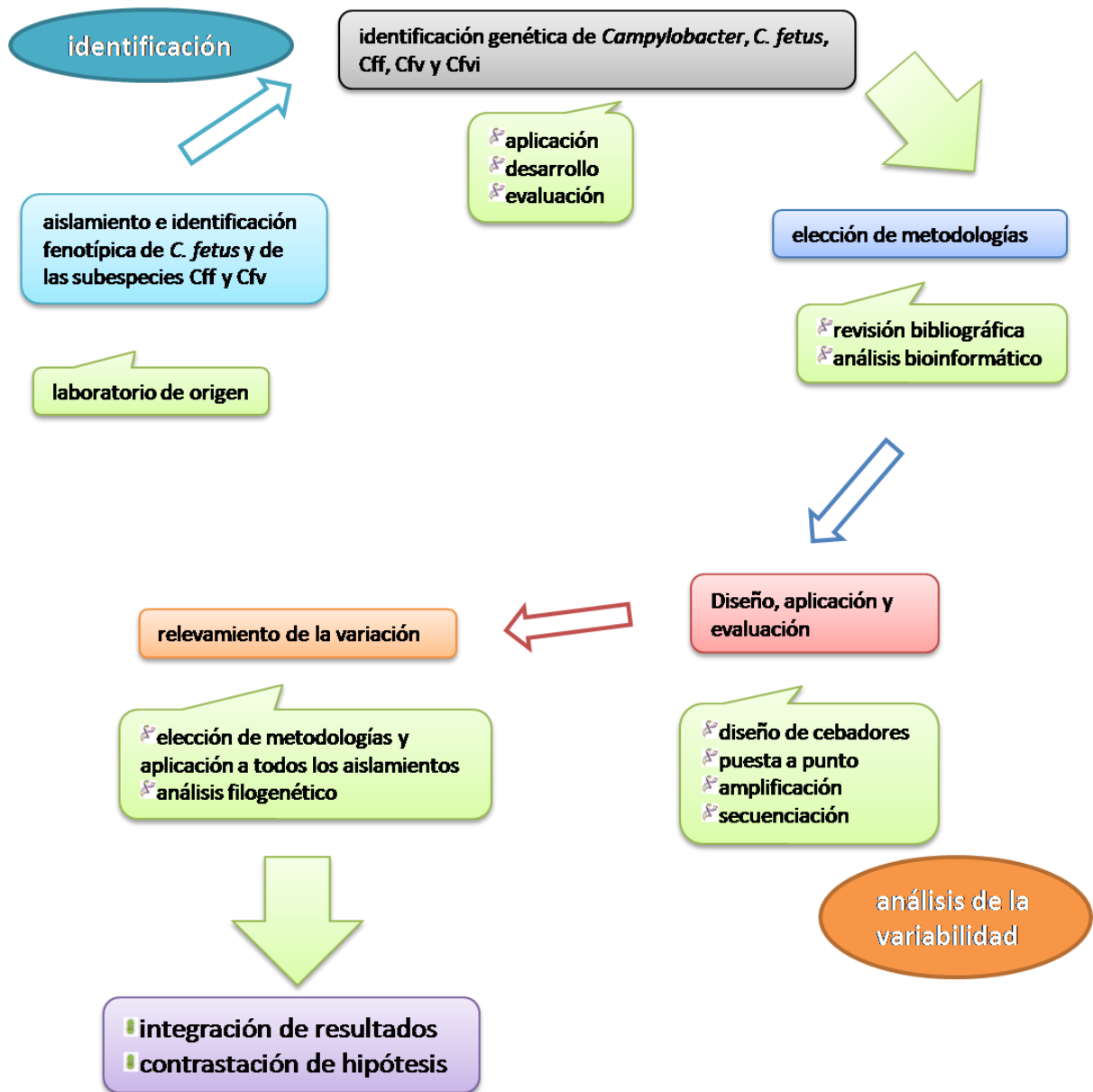
### 3. Estrategia de investigación

La estrategia de investigación adoptada en el trabajo de tesis consta de dos etapas. En la primera etapa se evaluaron diferentes metodologías para la identificación del género *Campylobacter*, la especie *C. fetus*, las subespecies Cff y Cfv y el biovar *intermedius*. En la segunda etapa se desarrollaron y evaluaron diversas metodologías de análisis de la variabilidad genética (Fig. 8). La variación genética encontrada con los diferentes marcadores fue relacionada con diversas características de los aislamientos: su pertenencia a las subespecies, determinada mediante características bioquímicas, su procedencia geográfica, y el hospedero del cual fueron obtenidos.

La pertenencia de los aislamientos al género *Campylobacter* fue verificada mediante la realización de una PCR con cebadores específicos. La identificación de la especie *C. fetus* y la diferenciación de sus subespecies se realizaron mediante dos metodologías de múltiple PCR a tiempo final y una en tiempo real. La identificación del biovar *intermedius* se realizó mediante la aplicación de una metodología previamente descrita, y tres metodologías desarrolladas durante el trabajo de tesis.

Para analizar la variabilidad genética, se evaluó el desempeño de siete metodologías aplicándolas en una parte de los aislamientos. La selección de técnicas se basó en diversos criterios como la factibilidad y el grado de variación encontrado en otras especies. El hecho de que los métodos hayan sido usados previamente en *C. fetus* también fue determinante, ya que permite la comparación de nuestros resultados con los encontrados anteriormente. Se utilizaron metodologías basadas en distintas regiones del genoma *core* y del genoma accesorio. Las metodologías evaluadas fueron: MLST, análisis de secuencias del gen 23S y el tercer espaciador ribosomal, análisis de la presencia de cuatro genes de virulencia y su relación con el tipo *sap*, análisis de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX, análisis *in silico* y experimental de variaciones genómicas, evaluación de la presencia del *cluster* de genes *cas*, y secuenciación de los loci CRISPR1 y CRISPR2. El poder de discriminación de estas metodologías se comparó utilizando el índice de diversidad de Simpson. Se seleccionó la metodología con mayor poder de discriminación para ser utilizada en el resto de los aislamientos disponibles, y se realizaron reconstrucciones filogenéticas a partir de los resultados.

La variación genética de la especie se analizó mediante la integración de los resultados y su correlación con las hipótesis vigentes acerca de la taxonomía y la evolución del genoma de *C. fetus*.



**Figura 8.** Estrategia de investigación. Se presenta la estrategia adoptada, la cual consta de dos etapas: la identificación del género, especie y subespecies, y el análisis de la variabilidad genética.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Cepas bacterianas

Se analizaron 59 aislamientos de *C. fetus*, de los cuales 55 son de origen bovino, y 4 de origen humano (Tabla 1). Dos aislamientos bovinos (CffAr029/CffAr030) y dos humanos (CfUy024/CfUy025) se obtuvieron a partir de diferentes tejidos del mismo individuo. Además, se incluyeron en los análisis cepas de otras especies del género: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. sputorum*, y *C. hyointestinalis* (Tabla 2).

Cuatro genomas completos disponibles en la base de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) fueron analizados *in silico*: la secuencia de la cepa humana Cff 82-40, de origen mamífero (Tu y Dewhirst 2001); de la cepa humana tipo reptiliana (“*reptil-like*”) Cft 03-427 (Gilbert et al. 2013); y las cepas bovinas Cfv 84-112 y Cfvi 03-293 (Kienesberger et al. 2014, van der Graaf-van Bloois 2014a) (Tabla 1). Las secuencias extraídas de estos genomas fueron incluidas en los alineamientos de las secuencias obtenidas de los aislamientos, o utilizadas para predecir el resultado de las diferentes metodologías basadas en la presencia de amplicones.

Los aislamientos bovinos de *C. fetus* uruguayos y australianos se obtuvieron de la colección de cultivos de la División de Laboratorios Veterinarios M.C. Rubino. Los aislamientos bovinos de origen argentino provienen del Laboratorio de Bacteriología de la Estación Experimental Balcarce del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Los aislamientos humanos se obtuvieron en el Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene (Facultad de Medicina).

**Tabla 1.** Aislamientos de *C. fetus* analizados, discriminados por el hospedero, órgano, país y año en el cual fueron aislados. Se incluye la subespecie a la cual pertenecen según lo determinado por pruebas bioquímicas. El nombre de los aislamientos fue designado en base a dicho fenotipo y su origen geográfico. Cft: *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum*. Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Cfvi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*. Cf: *Campylobacter fetus*. D: desconocido.

Aislamiento	Hospedero	Órgano	País	Año	Fenotipo
Cft 03-427 <sup>5</sup>	Humano	Sangre	Estados Unidos	2004	Cft <sup>4</sup>
Cff 8240 <sup>5</sup>	Humano	Sangre	Estados Unidos	1982	Cff <sup>1</sup>
CffAu002	Bovino	D	Australia	1978	Cff
CffUy001	Bovino	Prepucio	Uruguay	1980	Cff
CffUy008	Bovino	D	Uruguay	D	Cff
CffUy012	Bovino	D	Uruguay	D	Cff
CffUy016	Bovino	Abomaso fetal	Uruguay	1998	Cff
CffAr001	Bovino	Mucus vaginal	Argentina	1997	Cff
CffAr003	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2004	Cff
CffAr006	Bovino	Pulmón fetal	Argentina	1990	Cff
CffAr007	Bovino	Prepucio	Argentina	1989	Cff
CffAr012	Bovino	Mucus vaginal	Argentina	2001	Cff
CffAr013	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2012	Cff
CffAr016	Bovino	Prepucio	Argentina	1999	Cff
CffAr018	Bovino	Mucus vaginal	Argentina	2001	Cff
CffAr022	Bovino	Mucus vaginal	Argentina	2004	Cff
CffAr023	Bovino	Pulmón fetal	Argentina	2008	Cff
CffAr024	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2005	Cff
CffAr027	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2011	Cff
CffAr028	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2011	Cff
CffAr029 <sup>6</sup>	Bovino	Mucus vaginal	Argentina	2011	Cff
CffAr030 <sup>6</sup>	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2011	Cff
CffAr031	Bovino	D	Argentina	2011	Cff
CffAr032	Bovino	Mucus vaginal	Argentina	2011	Cff
CffAr033	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2011	Cff
CffAr034	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2011	Cff
CffAr035	Bovino	Pulmón fetal	Argentina	2011	Cff
Cfv 84-112 <sup>5</sup>	Bovino	Mucus vaginal	Estados Unidos	1984	Cfv <sup>3</sup>
NCTC10354 <sup>T</sup>	Bovino	D	Inglaterra	1962	Cfv
CfvAu001	Bovino	D	Australia	1978	Cfv
CfvUy002	Bovino	Abomaso fetal	Uruguay	2010	Cfv
CfvUy003	Bovino	Abomaso fetal	Uruguay	2010	Cfv

Aislamiento	Hospedero	Órgano	País	Año	Fenotipo
CfvUy004	Bovino	Abomaso fetal	Uruguay	2006	Cfv
CfvUy005	Bovino	Abomaso fetal	Uruguay	2006	Cfv
CfvUy006	Bovino	Prepucio	Uruguay	2009	Cfv
CfvUy007	Bovino	Abomaso fetal	Uruguay	2010	Cfv
CfvUy009	Bovino	D	Uruguay	D	Cfv
CfvUy010	Bovino	D	Uruguay	D	Cfv
CfvUy014	Bovino	D	Uruguay	2010	Cfv
CfvUy017	Bovino	Abomaso fetal	Uruguay	2011	Cfv
CfvUy018	Bovino	Abomaso fetal	Uruguay	2011	Cfv
CfvUy020	Bovino	Abomaso fetal	Uruguay	2011	Cfv
CfvAr002	Bovino	Placenta	Argentina	1997	Cfv
CfvAr004	Bovino	Mucus vaginal	Argentina	1983	Cfv
CfvAr008	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	1990	Cfv
CfvAr009	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2005	Cfv
CfvAr010	Bovino	Mucus vaginal	Argentina	1995	Cfv
CfvAr021	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2008	Cfv
Cfvi 03/293 <sup>5</sup>	Bovino	Pulmón fetal	Argentina	2003	Cfv <sup>2</sup>
CfviAu003	Bovino	D	Australia	1978	Cfvi
CfviAr005	Bovino	D	Argentina	1998	Cfvi
CfviAr011	Bovino	Prepucio	Argentina	1999	Cfvi
CfviAr014	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	1997	Cfvi
CfviAr015	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	1998	Cfvi
CfviAr017	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2000	Cfvi
CfviAr019	Bovino	Mucus vaginal	Argentina	2002	Cfvi
CfviAr020	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2003	Cfvi
CfviAr025	Bovino	Abomaso fetal	Argentina	2007	Cfvi
CfviAr026	Bovino	Pulmón fetal	Argentina	2006	Cfvi
CfUy022	Humano	Sangre	Uruguay	2013	Cf
CfUy023	Humano	Sangre	Uruguay	2014	Cf
CfUy024 <sup>6</sup>	Humano	Líquido céfalo- raquídeo	Uruguay	2014	Cf
CfUy025 <sup>6</sup>	Humano	Sangre	Uruguay	2014	Cf
<b>TOTAL</b>	<b>63</b>				

<sup>1</sup> cepa de referencia

<sup>1</sup>Blaser et al. 1987, Acc. Number NC008599 <sup>2</sup>Campero et al. 2003, Acc. Number CP006999

<sup>3</sup>Kienesberger et al. 2014, Acc. Number EMBL HG004426 <sup>4</sup>Tu et al. 2004, Fitzgerald et al. 2014. Acc. Number CP006833

<sup>5</sup> cepas cuyo genoma totalmente secuenciado y completamente ensamblado se encuentra en bases de datos. Todos los análisis consignados para estas cepas fueron realizados *in silico* (ver texto)

<sup>6</sup>pares de aislamientos (CffAr029/CffAr030 y CfUy024/CfUy025) realizados a partir de diferentes tejidos de un mismo individuo infectado



**Tabla 2.** Aislamientos de otras especies de *Campylobacter*, discriminados por especie, hospedero, país y año. D: desconocido.

Aislamiento	Especie	Hospedero	País	Año
Cb08209	<i>C. sputorum</i>	Humano	Argentina	2008
CcHB41	<i>C. coli</i>	Humano	Uruguay	2014
CjHB32	<i>C. jejuni</i>	Humano	Uruguay	2014
CjCP3	<i>C. jejuni</i>	Ave	Uruguay	2014
CcCP60	<i>C. coli</i>	Ave	Uruguay	2014
Ch99/243	<i>C. hyointestinalis</i>	D	Argentina	1999
NCTC 11562	<i>C. hyointestinalis</i>	Porcino	Inglaterra	1983
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>			

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Aislamiento e identificación fenotípica y bioquímica de *Campylobacter fetus*, de las subespecies Cff y Cfv, y del biovar intermedius

Los aislamientos bovinos fueron realizados en sus laboratorios de origen por técnicos especializados en el cultivo e identificación de *C. fetus* y sus subespecies, según el procedimiento detallado en el Anexo 1. Las bacterias fueron cultivadas en medio Skirrow o agar-sangre bajo condiciones de microaerofilia por 72 horas a 37°C. La diferenciación de subespecies se realizó mediante las metodologías estándar recomendadas por la OIE (2014). Las colonias presuntivas de *Campylobacter* se crecieron en medio agar-sangre con 1%, 1.3% y 1.9% de glicina, y sin glicina. Las colonias de la subespecie *fetus* son capaces de crecer en el medio con glicina y las de la subespecie *venerealis*, incluyendo el biovar *intermedius*, no sobreviven. La prueba de producción de H<sub>2</sub>S (positiva para Cff y Cfv, y negativa para Cfv) se realiza mediante crecimiento en medio sólido triple azúcar-hierro (medio TSI).

Los aislamientos humanos fueron identificados como *C. fetus* usando el sistema automatizado VITEK 2 (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) con la tarjeta *NH ID card*.

## **4.2.2 Identificación genética del género *Campylobacter*, la especie *Campylobacter fetus* y las subespecies *fetus* y *venerealis*, y análisis de su variabilidad genética**

### **4.2.2.1 Metodología general**

#### **4.2.2.1.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN bacteriano a partir de colonias crecidas en medio sólido y resuspendidas en PBS (pH = 7.4) se realizó con el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen Inc. (Valencia, CA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para cultivos bacterianos (Anexo 2). En los casos en que los cultivos llegaron al laboratorio en viales de congelación conteniendo glicerina, la extracción de ADN se realizó utilizando un protocolo de extracción con fenol-cloroformo (Anexo 2).

Las concentraciones de ADN fueron medidas en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La pureza de las extracciones obtenidas se evaluó mediante la tasa de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$ .

#### **4.2.2.1.2 Amplificación y secuenciación**

##### **4.2.2.1.2.1 Diseño de cebadores**

Para el diseño de cebadores se obtuvieron las secuencias de interés por descarga directa de la base de datos del *GenBank*, o extrayéndolas de los genomas completos mediante la utilización del programa Artemis (Rutherford et al. 2000). Las secuencias fueron visualizadas en el programa MEGA (Tamura et al. 2013). Se eligieron secuencias de alrededor de 20 pares de bases (pb) en base a su contenido GC y a la región donde se requería que hibridara el cebador. La potencial eficiencia de los cebadores se evaluó mediante el programa IDT DNA OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Se analizó la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ), intentando obtener la mayor  $T_m$  posible, y que las  $T_m$ s de los cebadores de una pareja no difiriera en más de 1°C. La energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de las posibles estructuras secundarias de los cebadores y de los dímeros que cada cebador puede formar consigo mismo y con su pareja fueron analizadas y se intentó que la  $\Delta G$  de las estructuras no fuera inferior al valor de -3. Se

probaron varias secuencias diferentes para cada cebador, y se eligió en cada caso la que se ajustó mejor a estos criterios. Los cebadores fueron enviados a sintetizar a IDT (Integrated DNA Technologies, EEUU).

#### 4.2.2.1.2.2 Puesta a punto de los protocolos de amplificación

Las amplificaciones mediante PCR se pusieron a punto en un termociclador Corbet Research CG1-96 con gradiente de temperatura. Se probaron al menos tres temperaturas de hibridación para cada juego de cebadores, y se modificaron los tiempos de extensión de acuerdo al largo de cada amplicón. Se utilizaron cuatro tipos de Taq polimerasas diferentes. Las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, sero-albúmina bovina (BSA), deoxyribonucleótidos (dNTPs) y ADN molde fueron ajustadas en los casos necesarios hasta obtener una eficiencia de reacción satisfactoria (Anexo 3). Luego de ajustadas las condiciones de ciclado, las amplificaciones se continuaron realizando en las condiciones optimizadas en el mismo termociclador o en un equipo Applied Biosystems 2720.

#### 4.2.2.1.2.3 Análisis de amplicones, purificación y secuenciación

Los productos de PCR fueron observados por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, durante 30-90 minutos a 80-90 V. Los amplicones se purificaron directamente o a partir de bandas en los geles utilizando *kits* comerciales (*ISOLATE PCR and gel kit*, Bioline e *Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit*, General Electric, respectivamente), siguiendo los protocolos de los fabricantes (Anexo 3). Los productos purificados se enviaron a secuenciar en ambas hebras al servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo (equipo ABI3130) o a Macrogen Korea (equipo ABI3730XL).

#### 4.2.2.1.2.4 Clonación de productos de PCR

En algunos casos en que la amplificación por PCR fue dificultosa o contenía productos adicionales inespecíficos, y en los que este problema no pudo ser solucionado mediante la purificación a partir de geles de agarosa, los productos fueron clonados antes de ser enviados a secuenciar. La clonación también se utilizó para

generar controles positivos de PCR en los casos en que se evaluó la presencia/ausencia de amplificación.

La clonación fue realizada mediante una ligación con el vector de clonación de extremos romos Pjet1.2/Blunt contenido en el kit *CloneJet PCR cloning kit* (Thermo Scientific). La transformación se realizó mediante electroporación utilizando células electrocompetentes *E. coli* XL-1 Blue. Las células transformadas fueron plaqueadas en LB agar con ampicilina a una concentración de 50 µg/mL. Al cultivar las células transformantes en un medio con ampicilina, sólo aquellas que adquirieron plásmidos sobreviven, puesto que las células XL-1 Blue son sensibles a la ampicilina, y el plásmido codifica para resistencia a ampicilina. El plásmido contiene además un gen letal, que se interrumpe cuando el inserto se liga al sitio de clonación. Como resultado, únicamente las células que contienen los plásmidos recombinantes son capaces de crecer. Se confirmó la presencia del inserto mediante PCR con cebadores específicos. Las colonias positivas para la presencia de inserto fueron cultivadas en LB líquido con ampicilina 50 µg/mL, y se realizó una extracción de plásmido con el *kit ISOLATE Plasmid Mini Kit* (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 4).

#### 4.2.2.1.3 Análisis de datos

Utilizando el programa Artemis (Rutherford et al. 2000), se extrajeron las secuencias correspondientes a todos los loci analizados de los genomas completos y cerrados disponibles en el GenBank (cepas Cff 82-40, Cft 03-427, Cfv 84-112 y Cfvi 03-293, Tabla 1). Estas secuencias fueron incluidas en los alineamientos de las secuencias obtenidas de los aislamientos, o utilizadas para predecir el resultado de las diferentes metodologías basadas en la presencia de amplicones.

En el caso de las metodologías basadas en secuencias de ADN, las mismas fueron ensambladas y editadas utilizando el programa SeqMan del paquete Lasergene (DNASar, Madison, WI). Posteriormente fueron alineadas con el programa MEGA (Tamura et al. 2013).

Las secuencias de los siete genes incluidos en el esquema de MLST fueron concatenadas para formar los STs de 3312 pb de largo. Los STs obtenidos fueron comparados con los presentes en la base de datos pública de MLST de *C. fetus* (<http://pubmlst.org/cfetus/>; Jolley y Maiden 2010). Utilizando el programa MEGA, se

determinó el modelo de sustitución TN93+G (Tamura y Nei 1993) como el que mejor se ajusta a los datos y se utilizó para reconstruir un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud.

Las secuencias de los loci CRISPR fueron transformadas a archivos binarios tomando en cuenta la presencia de cada secuencia espaciadora y su posición en el alineamiento, y luego utilizadas para la construcción de una red filogenética utilizando el programa Network (Bandelt et al. 1999; <http://www.fluxus-engineering.com>), con el algoritmo *median-joining*. Para el locus CRISPR1 se realizó un árbol filogenético con el método bayesiano implementado en el programa MrBayes (Ronquist et al. 2012), y se visualizó en el programa Mesquite (Maddison y Maddison 2014). Todas las secuencias de espaciadores encontradas fueron analizadas mediante BLASTn (*Basic local alignment search tool, nucleotide*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para evaluar su potencial similitud con secuencias presentes en la base de datos nucleotídica del NCBI.

El poder de discriminación de las diferentes metodologías se comparó utilizando el índice de diversidad de Simpson (valor D), calculado según Hunter y Gaston (1988; Anexo 5).

#### **4.2.2.2 Aplicación y evaluación de metodologías de identificación del género *Campylobacter*, la especie *Campylobacter fetus* y las subespecies *fetus* y *venerealis***

##### *4.2.2.2.1 Identificación del género *Campylobacter**

La pertenencia de los aislamientos al género *Campylobacter* fue verificada mediante PCR con los cebadores C412F y C1288F (Linton et al. 1996; Anexo 3). Estos cebadores amplifican un fragmento de 816 pares de bases (pb) del gen 16S sólo en el caso de que el aislamiento pertenezca al género *Campylobacter*. Si el aislamiento pertenece a cualquier otro género, no habrá amplificación.

##### *4.2.2.2.2 Identificación de la especie *Campylobacter fetus* y de las subespecies *fetus* y *venerealis**

Se utilizaron cuatro métodos moleculares para la identificación de la especie *C. fetus* y la diferenciación de sus subespecies. Tres de los métodos identifican la especie

y diferencian la subespecie Cff de Cfv mediante metodologías basadas en múltiplex PCR a tiempo final y PCR en tiempo real, que de ahora en más llamaremos respectivamente Múltiplex PCR A (Mpx-PCR A; Hum et al. 1997), Múltiplex PCR B (Mpx-PCR B; Iraola et al. 2012) y PCR en tiempo real. El cuarto método, la detección del elemento de inserción ISCfe1, identifica la subespecie Cfv mediante la presencia de un amplicón específico (Abril et al. 2007).

En todos los casos se utilizaron cepas de otras especies del género *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis* y *C. sputorum*, Tabla 2) como control negativo en las reacciones de PCR.

#### 4.2.2.2.1 Múltiplex PCR A

Este es el método molecular recomendado por la OIE (2014) para diferenciar subespecies y fue descrito por Hum *et al.* (1997). Se utilizan dos juegos de cebadores en simultáneo dentro de un mismo tubo. Los cebadores MG3F y MG4R amplifican una secuencia de 764 pb del gen *cstA*, que es un marcador genético de la especie *C. fetus*, y amplifica siempre que la especie esté presente. Los cebadores VenSF y VenSR amplifican un fragmento de 142 pb del gen *parA*, que se considera presente sólo en la subespecie Cfv. De esta forma, si el resultado es una banda de 764 pb, se trata de la especie *C. fetus*; se observa una banda adicional de 142 pb si la subespecie es Cfv y ninguna banda si se trata de otra especie. Las condiciones de amplificación y características de los cebadores se presentan en el Anexo 3.

#### 4.2.2.2.2 Múltiplex PCR B

Este método fue desarrollado en nuestro laboratorio (Iraola et al. 2012). Al igual que el anterior, utiliza dos juegos de cebadores en simultáneo. También se utilizan los cebadores MG3F y MG4R como marcador de especie. En cambio, se utilizan los cebadores nC1165g4F y nC1165g4R (Moolhuijzen et al. 2009; Anexo 3) que amplifican un fragmento de 233 pb del gen *VirB11*, presente en una isla de patogenicidad que se ha asociado a la subespecie Cfv (Gorkiewicz et al. 2010). De esta forma, al igual que en el método anterior, si se observan dos bandas se considera que la subespecie es Cfv, y si se observa una se considera Cff. Si se trata de otra especie, no se observará amplificación.

#### 4.2.2.2.3 PCR en tiempo real

El método de PCR en tiempo real fue desarrollado en el laboratorio de Genética de Microorganismos de la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias, y utiliza la tecnología de sondas TaqMan (manuscrito en preparación, Anexo 8). Estas sondas contienen un fluorocromo donador en 5' y uno aceptor o *quencher* en 3'. Por la cercanía entre uno y otro, la fluorescencia emitida por el fluorocromo donador es absorbida por el *quencher*, el cual emite fluorescencia con una longitud de onda diferente. Debido a la acción exonucleasa 5'→3' de la ADN polimerasa, la sonda es degradada en la etapa de polimerización, alejando el fluorocromo donador del *quencher* y emitiendo fluorescencia.

Se utilizan dos sondas con sus respectivos juegos de cebadores, que permiten identificar la especie *C. fetus* y la subespecie Cfv. Para la identificación de la especie se amplifica un fragmento de 76 pb del gen ribosomal 16S, con los cebadores 16SFw y 16S Rv; la sonda 16SP, marcada con el fluoróforo VIC, hibrida con una secuencia dentro del amplicón que es específica de *C. fetus* y permite distinguirla del resto de las especies del género *Campylobacter* y de las demás bacterias (Fig. 9). La sonda 16SP es una sonda TaqMan-MGB. La presencia de la molécula MGB en la sonda aumenta la afinidad de la misma en su unión al ADN, por lo que incrementa en varios grados la temperatura de hibridación de la sonda, lo cual aumenta la especificidad de la misma por su secuencia blanco, permitiendo el uso de sondas de longitud más corta. La sonda VIRb11/14P, marcada con el fluoróforo FAM, es una sonda de hidrólisis que está diseñada para discriminar entre Cff y Cfv, ya que hibrida con un fragmento de 98 pb del gen *VirB11*, que se considera específico del genoma de Cfv, amplificado con los cebadores VIRb11/14Fw y VIRb11/14Rv (Anexo 3). A diferencia de las sondas de hidrólisis estándar, la sonda empleada tiene una molécula *quencher* adicional, además de la normalmente encontrada en 3'. La presencia de un doble *quencher* aumenta la sensibilidad y disminuye la fluorescencia de fondo, mejorando el método.

<i>C. hominis</i>	GCACCTGTC <b>TTAACATTTCTGCAAGCAGACACTCTTCCATCTCTGGATGATTTGTTAGATATCAAGTCCGGGTAAGG</b>
<i>C. cuniculorum</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCCCATATCTCTATAGGGTTC <b>TTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. curvus</i>	GCACCTGTC <b>TTAACATTTCTGCAAGCAGACACTCTTCTATCTCTAGATGATTTGTTAGATATCAAGTCCGGGTAAGG</b>
<i>C. gracilis</i>	GCACCTGTC <b>TTAACATTTCTGCAAGCAGACACTCTTCCATCTCTGGATGATTTGTTAGATATCAAGTCCGGGTAAGG</b>
<i>C. helveticus</i>	GCACCTGTC <b>CTAACATTTCTAGCAAGCTAGCAC</b> TTCCGTATCTCTACAGAA <b>TTTGTGGATATCAAGCCTAGGTAAGG</b>
<i>C. hyointestinalis hyointestinalis</i>	GCACCTGTC <b>CTAACATTTCTAGCAAGCTAGCAC</b> CTCTTATCTCTAAGAGATTTG <b>TTGGATATCAAGCCTAGGTAAGG</b>
<i>C. hyointestinalis lawsonii</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>CTTATCTCTAAGAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. jejuni doylei</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>TCATATCTCTATAAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. jejuni jejuni</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>CTTATCTCTAAAAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. lanienael</i>	GCACCTGTC <b>CAC</b> TAA <b>GTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>CTTATCTCTAAGAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. lari lari</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>TCATATCTCTATAAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. lari concheus</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>CTTATCTCTAAAAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. mucosalis</i>	GCACCTGTC <b>CTCAACATTTCTAGCAAGCTAGCAC</b> TTCCGTATCTCTACAGAA <b>TTCTGGATATCAAGTCCGGGTAAGG</b>
<i>C. peloridis</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>TCATATCTCTATAAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. showae</i>	GCACCTGTC <b>TTAACATTTCTGCAAGCAGACACTCTTCCATCTCTGGATGATTTGTTAGATATCAAGTCCGGGTAAGG</b>
<i>C. sputorum</i>	GCACCTGTC <b>TTAACATTTCTGCAAGCAGACACTCTTCTATCTCTAGATGATTTGTTAGATATCAAGTCCGGGTAAGG</b>
<i>C. upsaliensis</i>	GCACCTGTC <b>CTCAACATTTCTAGCAAGCTAGCAC</b> TTCCGTATCTCTACAGAA <b>TTTGTGGATATCAAGCCTAGGTAAGG</b>
<i>C. canadensis</i>	GCACCTGTC <b>TTATGGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>CTTATCTCTAAAAGGTTCCATAGATATCAAGCCTAGGTAAGG</b>
<i>C. coli</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>CTTATCTCTAAGAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. concisus</i>	GCACCTGTC <b>TTAACATTTCTGCAAGCAGACACTCTTCTATCTCTAGATGATTTGTTAGATATCAAGTCCGGGTAAGG</b>
<i>C. rectus</i>	GCACCTGTC <b>TTAACATTTCTGCAAGCAGACACTCTTCCATCTCTGGATGATTTGTTAGATATCAAGTCCGGGTAAGG</b>
<i>C. insulaenigrae</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>TCATATCTCTATAAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. iguaniorum</i>	GCACCTGTC <b>CTAAGTTC</b> TAGCAAGCTAGCACCC <b>TCATATCTCTACAAGGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. fetus venerealis</i> NCTC 10354	GCACCTGTC <b>CTCAAC</b> TTTCTAGCAAGCTAGCAC <b>CTCTTATCTCTAAGAGATTAGTTGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. fetus venerealis</i> 84-112	GCACCTGTC <b>CTCAAC</b> TTTCTAGCAAGCTAGCAC <b>CTCTTATCTCTAAGAGATTAGTTGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. fetus fetus</i> 8240	GCACCTGTC <b>CTCAAC</b> TTTCTAGCAAGCTAGCAC <b>CTCTTATCTCTAAGAGATTAGTTGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. fetus testudinum</i> 03-427	GCACCTGTC <b>CTCAAC</b> TTTCTAGCAAGCTAGCAC <b>CTCTTATCTCTAAGAGATTAGTTGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. fetus testudinum</i> Pet-3	GCACCTGTC <b>CTCAAC</b> TTTCTAGCAAGCTAGCAC <b>CTCTTATCTCTAAGAGATTAGTTGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. fetus</i> CfvÜy006	GCACCTGTC <b>CTCAAC</b> TTTCTAGCAAGCTAGCAC <b>CTCTTATCTCTAAGAGATTAGTTGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>
<i>C. fetus</i> CffAr007	GCACCTGTC <b>CTCAAC</b> TTTCTAGCAAGCTAGCAC <b>CTCTTATCTCTAAGAGATTAGTTGGATATCAAGCCCAGGTAAGG</b>

**Figura 9.** Alineamiento de secuencias parciales del gen 16S obtenidas de las bases de datos. Se muestran secuencias de todas las especies del género de las que se dispone de información. Las secuencias de los cebadores y sonda utilizados en la metodología de PCR en tiempo real se presentan sombreadas.



#### 4.2.2.2.4 Detección del elemento de inserción ISCfe1

Este método fue descrito por Abril *et al.* (2007), y está basado en la presencia de un elemento genético móvil, denominado ISCfe1, que fue encontrado en las cepas de Cfv pero no en las de Cff. El método consiste en la amplificación de un fragmento de 233 pb de este elemento, para lo cual se utilizan los cebadores CVEN-L y CVEN-R2 (Anexo 3). Si se observa amplificación se considera que se trata de la subespecie Cfv, y el resultado negativo indica que la subespecie es Cff o el aislamiento pertenece a otra especie.

#### 4.2.2.2.3 Identificación del biovar *intermedius*

Para la identificación de Cfvi (diferenciación del biovar tanto de la subespecie Cff como del resto de los aislamientos Cfv) se utilizó un método descrito por Moolhuijzen *et al.* (2009), basado en una variante del gen *VirB11* que los autores encontraron exclusivamente en las cepas de Cfvi analizadas. El método consiste en la amplificación de un fragmento de 349 pb de este gen, para lo cual se utilizan los cebadores C1023G3F y 1023G3R (Anexo 3). Se observará amplificación si se trata del biovar Cfvi, y el resultado será negativo en cualquier otro caso.

#### **4.2.2.3 Desarrollo y evaluación de metodologías de identificación del biovar *intermedius***

En el año 2013, nuestro grupo secuenció completamente el genoma de una cepa de *C. fetus venerealis* biovar *intermedius* (aislamiento CfviAr011 o INTA 99/541, Accession number ASTK01000000; Iraola *et al.* 2013). A partir de la comparación de este genoma con los restantes borradores y genomas completos de *C. fetus* disponibles al momento, se identificaron varios ORFs (del inglés *open reading frame*, marco abierto de lectura) exclusivos de la cepa de Cfvi, además de un plásmido que no está descrito para ninguna cepa de Cff o Cfv. A partir de estas secuencias, se diseñaron tres juegos de cebadores que amplifican regiones genómicas exclusivas de esa cepa.

Los cebadores Cfvi162F y Cfvi162R amplifican una región de 296 pb de un ORF del cromosoma de Cfvi, que codifica una ATPasa AAA (del inglés *ATPases associated with diverse cellular activities*).

Los cebadores CfvirulF2 y CfvirulR1 amplifican una región de 198 pb de un ORF ubicado en el plásmido encontrado en el aislamiento de Cfvi, que codifica una proteína de la familia VapD (del inglés *virulence-associated protein D*), un factor de virulencia de función desconocida.

Los cebadores PlasmiF y PlasmiR amplifican un fragmento de 487 pb perteneciente a una región del plásmido encontrado en el aislamiento de Cfvi. Dicha región está conservada con respecto a los plásmidos pCC31 de *C. coli* y pTet de *C. jejuni*, con los cuales el plásmido de Cfvi tiene homología parcial, y codifica una proteína asociada con la recombinasa recA y con el sistema de secreción tipo IV.

Se pusieron a punto los protocolos de PCR utilizando el aislamiento CfviAr011 como control positivo y se evaluó el método aplicándolo a los 9 aislamientos caracterizados fenotípicamente como Cfvi, 5 aislamientos pertenecientes a Cfv, y 12 aislamientos bovinos y 3 humanos con fenotipo Cff.

Las condiciones de amplificación y características de los cebadores se presentan en el Anexo 3. En los tres casos, se espera ver amplificación sólo en los aislamientos que pertenecen a Cfvi.

La sensibilidad y especificidad de los métodos moleculares de identificación fue evaluada mediante el cálculo de la proporción de aislamientos en los cuales coincide el resultado de los métodos fenotípicos y cada método molecular.

#### **4.2.2.4 Análisis de la variabilidad genética en *Campylobacter fetus***

Las metodologías de análisis de la variabilidad empleadas incluyen: MLST, análisis de secuencias del gen 23S y el espaciador ribosomal, análisis de la presencia de cuatro genes de virulencia y su relación con el tipo sap, análisis de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX, análisis *in silico* y experimental de variaciones genómicas, evaluación de la presencia del *cluster* de genes *cas*, y secuenciación de los loci CRISPR1 y CRISPR2. El poder de discriminación de estas metodologías se comparó analizando una parte de los aislamientos y calculando el índice de diversidad de Simpson. Se seleccionó la metodología con mayor poder de discriminación para ser utilizada en el resto de los aislamientos disponibles.

#### 4.2.2.4.1 MLST

En 35 aislamientos se realizó la amplificación y secuenciación de fragmentos (aproximadamente 500 pb) de los genes que codifican para la aspartasa (*aspA*), la glutamina sintetasa (*glnA*), la citrato sintetasa I (*gltA*), la serin hidroximetil transferasa (*glyA*), la fosfoglucomutasa (*pgm*), la transcetolasa (*tkt*), y la subunidad alfa de la ATP sintetasa (*uncA*), correspondientes al esquema de MLST previamente desarrollado para *C. fetus*, utilizando los cebadores descritos en la bibliografía (Van Bergen et al. 2005a; Anexo 3).

#### 4.2.2.4.2 Secuenciación parcial del gen ribosomal 23S e identificación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)

Para la amplificación y secuenciación de un fragmento de 638 pb del gen ribosomal 23S se diseñaron un par de cebadores (23SF y 23SR, Anexo 3) usando como referencia el genoma de la cepa Cff 82-40. El amplicón abarca la región más variable de este gen, la cual codifica para las hélices 43 a 69 de la estructura secundaria del ARN 23S de *E. coli*, utilizado como referencia para nombrar las estructuras de los ARN ribosomales de *C. fetus* (Van Camp et al. 1993). Este fragmento fue amplificado en 32 aislamientos.

La posible presencia de secuencias intervinientes (Tazumi et al. 2008) se evaluó en 51 aislamientos. Mediante la comparación de secuencias extraídas de las bases de datos, se comprobó la presencia de la IVS en las secuencias de los genes 23S de *C. fetus*, con la única excepción de la secuencia de la cepa Cft 03-427. Tomando en cuenta esta información, se diseñaron un par de cebadores (IVSF e IVSR) que hibridan en la región flanqueante de la IVS, usando como referencia el genoma de la cepa Cff 82-40 (Anexo 3). Estos cebadores generan un amplicón de 485 pb en el caso de que la IVS esté presente, y uno de 351 pb en el caso de que no. Esta diferencia de tamaño permite evaluar la presencia de la IVS al observar los amplicones mediante electroforesis en geles de agarosa.

#### 4.2.2.4.3 *Secuenciación parcial de la región espaciadora interna del tercer operón ribosomal (ISR3) e identificación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)*

Debido a la posible presencia de diferencias intercistónicas en los ISR, fue necesario utilizar un diseño experimental que permitiera amplificar los operones de forma diferencial (Liguori et al. 2011, Meinersmann et al. 2009, Pei et al. 2009, Tazumi et al. 2009, Pérez Luz et al. 1998, Cilia et al. 1996, Condon et al. 1995, Sechi y Daneo-Moore 1993). Para esto, se diseñó un cebador (ISRF, Anexo 3) que hibrida en el gen del ARN de transferencia de la Isoleucina (tRNA<sup>Ile</sup>), el cual está presente sólo en el tercer operón del genoma de la cepa Cff 82-40 (Fig. 4). Junto con el cebador ISRR, que hibrida en el gen 23S adyacente, de secuencia idéntica en los tres operones, amplifican un fragmento de 772 pb. Este fragmento fue amplificado y secuenciado en 34 aislamientos.

En 51 aislamientos se evaluó la posible presencia de secuencias intervinientes mediante la amplificación del espaciador completo, utilizando los cebadores C412F e ISRR. Con estos cebadores se amplifican los tres ISRs a la vez, ya que ambos cebadores hibridan en regiones conservadas de los operones (los genes 16S y 23S). El amplicón tendrá 2030 pb en el caso de que no haya IVSs en el espaciador. Si existe alguna IVS en los ISRs de *C. fetus*, el amplicón correspondiente tendrá un tamaño mayor a 2030 pb, y las diferencias de tamaño podrán ser observadas en geles de agarosa.

#### 4.2.2.4.4 *Análisis de la presencia de genes de virulencia*

Se determinó el tipo sap en 23 aislamientos, y se lo correlacionó con la presencia de cuatro genes de virulencia que han sido descritos como relacionados al mismo (Kienesberger et al. 2014).

El tipo sap se estableció mediante la amplificación de la región N-terminal de los genes sap, la cual difiere en su secuencia dependiendo del tipo de genes que tenga el aislamiento (tipo A o tipo B). Para esto se utilizó un juego de cebadores específico para cada tipo: SAF01/SAR01, que amplifican un fragmento de 531 pb sólo si el aislamiento contiene los genes *sapA*, y SBF01/SBR01, cuyo amplicón mide 505 pb en el caso de que el aislamiento sea tipo B (Tu y Dewhirst 2001; Anexo 3). Los aislamientos de tipo AB presentarán amplificación con ambos juegos de cebadores.

Se determinó la presencia de los genes de virulencia *glf*, que codifica una UDP-galactopyranosa mutasa, *wcbK*, que codifica una GDP-manosa 4,6-deshidratasa, *galE*, que codifica una UDP-glucosa 4-epimerasa, y *mat1*, que codifica una maltosa O-acetyltransferasa, mediante presencia o ausencia de un amplicón utilizando cebadores específicos (Kienesberger et al. 2014; Anexo 3). Para el gen *glf*, se utilizaron los cebadores *glf\_screen\_f* y *glf\_screen\_r*, que amplifican un fragmento de la región codificante del gen de 524 pb. Los cebadores *wcbK\_screen\_f* y *wcbK\_screen\_r* amplifican una región del gen *wcbK* de 731 pb. Con los cebadores *mat1\_screen\_f* y *mat1\_screen\_r* se evalúa la presencia del gen *mat1* amplificando una región de 409 pb. Los cebadores *galE\_BamHI\_fwd* y *galE\_PstI\_rev* amplifican una región de 992 pb del gen *galE*. En cada caso, se espera ver amplificación sólo en los aislamientos que tienen el gen correspondiente en su genoma.

#### 4.2.2.4.5 *Análisis de patrones de bandas basados en secuencias repetidas REP, ERIC y BOX*

En 37 aislamientos de *C. fetus* y 6 de otras especies del género se analizaron los patrones de bandas generados mediante la amplificación con cebadores descritos en la bibliografía: REP1R y REP2I, ERIC1R y ERIC2, y el cebador BOXA1R, que se utiliza solo ya que amplifica una secuencia palindrómica (Versalovic et al. 1991; Anexo 3). Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y los patrones de bandas fueron asignados mediante inspección visual. Se tomaron 14 aislamientos al azar para repetir la amplificación en las mismas condiciones y evaluar la reproducibilidad de los patrones de bandas.

#### 4.2.2.4.6 *Análisis de genomas completos: identificación de variaciones genómicas*

##### 4.2.2.4.6.1 *Análisis in silico*

Los genomas de las cepas Cff 82-40, Cfv 84-112, Cfvi 03-293 y Cft 03-427 y sus respectivos plásmidos se compararon mediante BLASTn utilizando el programa ACT (*artemis comparison tool*; Carver et al. 2005), o con el programa BRIG (*BLAST ring image generator*; Alikhan et al. 2011), para evaluar los reordenamientos presentes. La

región donde se ubican los loci CRISPR fue comparada mediante BLASTn utilizando el programa Easyfig (Sullivan et al. 2011).

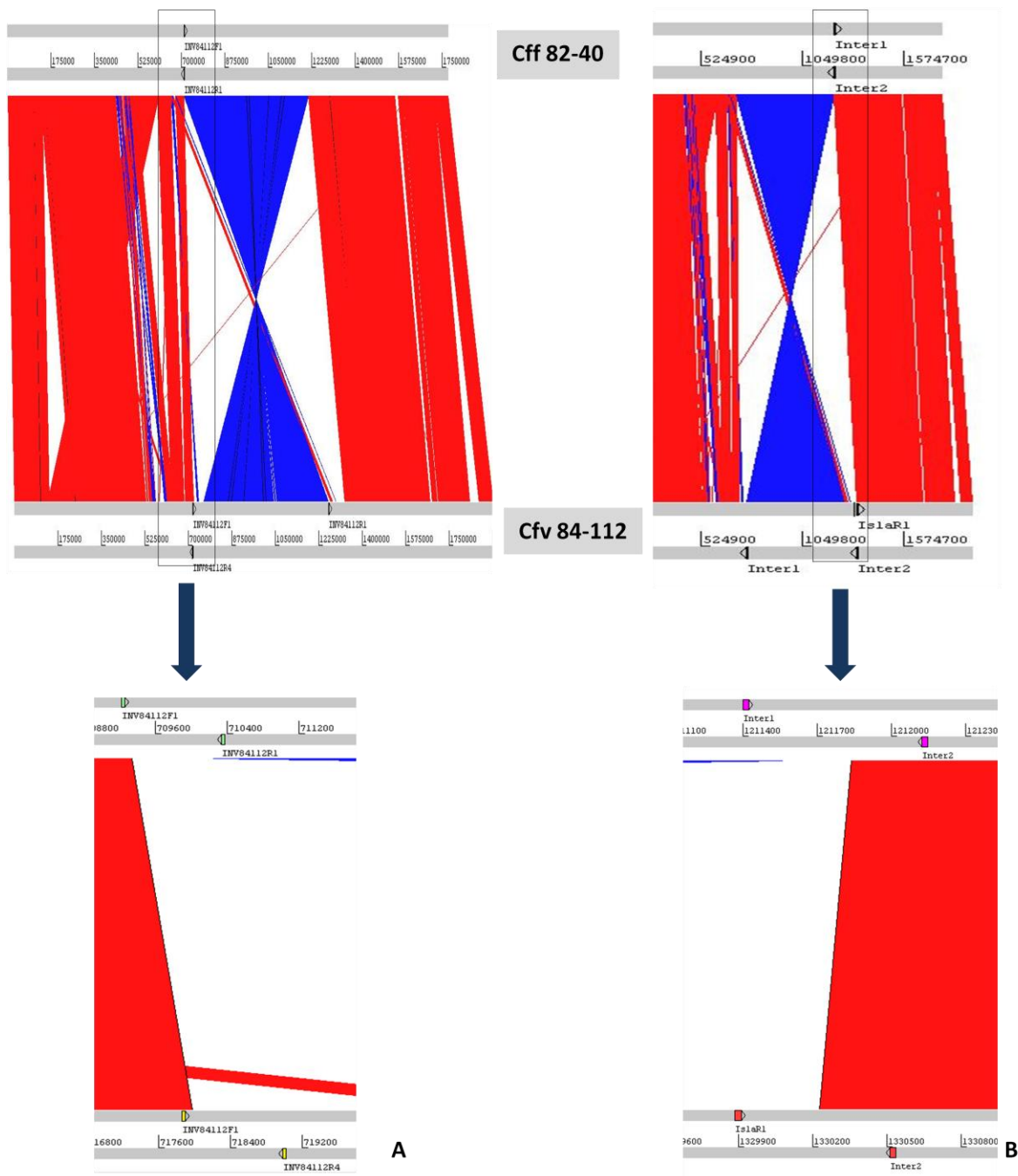
#### 4.2.2.4.6.2 Evaluación experimental de la presencia de variaciones genómicas

De las variaciones detectadas *in silico* se eligieron la presencia de una inversión en el genoma de la cepa Cfv 84-112 con respecto a Cff 82-40, la presencia del plásmido ICE\_84-112 encontrado en la cepa Cfv 84-112 y la presencia de una isla genómica característica de Cfv, para ser evaluados experimentalmente en 23 aislamientos.

Para relevar la presencia de la inversión encontrada en el genoma de la cepa Cfv 84-112 con respecto a Cff 82-40 en los genomas de los aislamientos, se diseñaron dos juegos de cebadores (Anexo 3). Los cebadores INV84112F1 e INV84112R4 amplifican un segmento de 1124 pb si la inversión está presente (si esa región genómica está orientada como en la cepa Cfv 84-112). Los cebadores INV84112F1 e INV84112R1 amplifican un segmento de 1121 pb si no hay inversión (si esa región genómica está orientada como en la cepa Cff 82-40, Fig. 10A).

Para evaluar si el plásmido ICE\_84-112 está presente en los aislamientos, se amplificó una región del gen *Fic4* contenido en el mismo, utilizando los cebadores Fic4\_KpnI\_F y Fic4\_Sall\_R (Kienesberger et al. 2014; Anexo 3). Se espera ver la amplificación de un fragmento de 1325 pb si el gen está presente, lo cual se toma como indicativo de la presencia del plásmido.

Para la evaluación de la presencia de la isla genómica se utilizaron dos aproximaciones. La primera consiste en amplificar la región donde está inserta la isla. Debido a su gran tamaño (45 kb aproximadamente), la presencia de la isla impide que esta región sea amplificada, ya que los cebadores empleados (Inter1 e Inter2, Anexo 3; Gorkiewicz et al. 2010) hibridan en las regiones flanqueantes del sitio de inserción (Fig. 10B). De esta forma, se espera ver amplificación de un fragmento de 721 pb, sólo en el caso de que la isla no esté presente. En la segunda aproximación, se utiliza el cebador Inter2 junto con un cebador diseñado para esta tesis (IslaR1, Anexo 3), que hibrida en el extremo de la propia isla, de forma que habrá amplificación de un fragmento de 724 pb sólo si la isla está presente (Fig. 10B).



**Figura 10.** Comparación de los genomas de las cepas Cff 82-40 y Cfv 84-112. Se muestra la ubicación de los cebadores utilizados para evaluar la presencia de reordenamientos en ambos genomas. **A.** Relevamiento de la presencia de la inversión encontrada en el genoma de la cepa Cfv 84-112 con respecto a Cff 82-40. **B.** Evaluación de la presencia de la isla genómica característica de Cfv. La figura fue generada con el programa ACT, a partir de anotaciones de los cebadores generadas en el archivo de comparación de genomas.

#### 4.2.2.4.7 Análisis del cluster de genes *cas*, el gen *RAMP* y los loci *CRISPR1* y *CRISPR2*

##### 4.2.2.4.7.1 Evaluación de la presencia del *cluster* de genes *cas* y del gen *RAMP*

La presencia del *cluster* de genes *cas* fue relevada en 53 aislamientos por medio de dos aproximaciones. En primer lugar, se amplificó un fragmento de 430 pb del gen *cas1*, utilizando los cebadores *cas1\_probe\_F* y *cas1\_probe\_R* (Kienesberger et al. 2014; Anexo 3). Se espera ver amplificación sólo en los aislamientos que tienen el gen *cas1* en su genoma. En segundo lugar, se amplificó una región de 5137 pb que comprende a cinco de los seis genes *cas* presentes en el genoma de la cepa Cff 82-40, para lo cual se diseñaron los cebadores *caslongR1* y *cas1a5F1* (Fig. 11), y se utilizó una mezcla comercial de enzimas de PCR optimizado para la amplificación de fragmentos de gran longitud (Anexo 3). Se espera ver amplificación sólo en los aislamientos que tienen el *cluster* de genes *cas* en su genoma. Se considera que un aislamiento posee el *cluster* de genes *cas* y el locus *CRISPR2* si hay amplificación tanto del fragmento del gen *cas1* como de la región que comprende a varios de los genes.

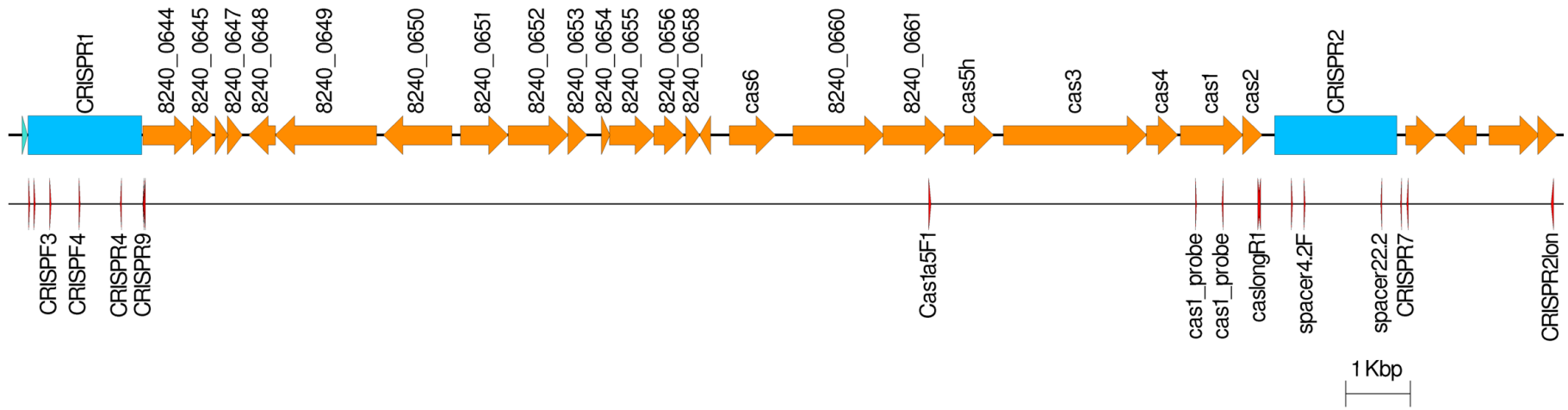
Para evaluar la presencia del gen *RAMP* se diseñaron los cebadores *RAMPF1* y *RAMPR1* (Anexo 3), que amplifican un fragmento de 1352 pb correspondiente a la secuencia codificante completa del gen. Se espera ver amplificación sólo en los aislamientos que tienen el gen *RAMP* en su genoma.

##### 4.2.2.4.7.2 Secuenciación de los loci *CRISPR1* y *CRISPR2*

Para la amplificación de los loci *CRISPR1* y *CRISPR2* se diseñaron cebadores utilizando como referencia la secuencia del genoma de la cepa Cff 82-40 (Fig. 11). Se amplificó y secuenció el locus *CRISPR1* en 53 aislamientos; el locus *CRISPR2* fue amplificado y secuenciado sólo en los casos en que se comprobó la presencia del *cluster* de genes *cas*.

Los cebadores *CRISPF6* o *CRISPF1* y *CRISPR9* amplifican el locus *CRISPR1* desde el líder hasta el final (Fig. 11, Anexo 3). La longitud del amplicón es variable, ya que depende de la cantidad de unidades DR-espaciador que contenga el locus en el aislamiento analizado. Por ejemplo, para la cepa Cff 82-40, la longitud del amplicón sería de 1727 pb.





**Figura 11.** Estructura del cluster de genes *cas*. Se muestran la ubicación de los cebadores utilizados para amplificar el gen *cas1*, una región del cluster de genes y los loci CRISPR1 y CRISPR2. Arriba: las flechas naranjas representan las secuencias codificantes, incluyendo los genes *cas*. Los rectángulos celestes representan los loci CRISPR. La flecha verde representa un gen de ARNt. Abajo: las flechas rojas representan los cebadores. La figura fue generada con el programa EasyFig (Alikan et al. 2011), a partir de anotaciones de los cebadores generadas con Artemis.

Los cebadores CRISPR2longF y CRISPR2longR3 amplifican una región que comprende el locus CRISPR2, de 2095 pb en Cff 82-40, y las regiones codificantes adyacentes, lo cual les da a los cebadores especificidad por este locus e impide amplificar simultáneamente ambos loci (Fig. 11, Anexo 3). Al igual que en el caso anterior, la longitud del amplicón es variable. Para la cepa Cff 82-40, la longitud del amplicón sería de 4577 pb. Para la amplificación de este locus se utilizó una mezcla comercial de enzimas de PCR optimizada para la amplificación de fragmentos de gran longitud (Anexo 3). Se diseñaron además cebadores que hibridan en regiones internas de ambos loci, para ser utilizados en la secuenciación (Fig. 11, Anexo 3).

## 5. Resultados

### 5.1 Aislamiento e identificación fenotípica y bioquímica de *Campylobacter fetus*, de las subespecies *fetus* y *venerealis* y del biovar *intermedius*

La identificación fenotípica y bioquímica de *C. fetus*, de las subespecies Cff y Cfv, y del biovar *intermedius*, se realizó mediante las metodologías estándar recomendadas por la OIE (Anexo 1). Los aislamientos humanos fueron caracterizados fenotípicamente a nivel de especie. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Los 59 aislamientos bovinos fueron clasificados como Cff (26), Cfv (23) o Cfvi (10).

### 5.2 Identificación genética del género *Campylobacter*, la especie *Campylobacter fetus* y las subespecies *fetus* y *venerealis*, y análisis de su variabilidad genética

#### 5.2.1 Aplicación y evaluación de metodologías de identificación del género *Campylobacter*, la especie *Campylobacter fetus* y las subespecies *fetus* y *venerealis*

##### 5.2.1.1 Identificación del género *Campylobacter*

La identificación de los aislamientos como pertenecientes a *Campylobacter* fue positiva en todos los casos, incluyendo los aislamientos del género que no pertenecen a la especie *C. fetus* (Tabla 3, Fig. 12A). Por lo tanto, la correspondencia entre la identificación fenotípica y la genética (calculada como la proporción de aislamientos que dan el mismo resultado con ambas metodologías) es 1.

**Tabla 3.** Resultados de los métodos de identificación y tipificación genética aplicados. Se muestra el fenotipo de cada aislamiento según los resultados de los análisis bioquímicos, y el resultado de los diferentes métodos de identificación genética. C: *Campylobacter*. Cf: *Campylobacter fetus*. Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Cfvi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius*. Cft: *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum*. +: positivo. -: negativo. I: inespecífico. ND: no determinado.

Aislamiento	Fenotipo	<i>Campylobacter</i>	Multiplex PCR A <sup>2</sup>	Multiplex PCR B <sup>3</sup>	ISCfe1 <sup>4</sup>	RealTime PCR	Cfvi <sup>5</sup>
Cft 03-427 <sup>1</sup>	Cft <sup>6</sup>	+	No Cf	No Cf	-	Cff	No Cfvi
Cff8240 <sup>1</sup>	Cff	+	Cff	Cff	-	Cff	No Cfvi
CffAu002	Cff	+	Cff	Cff	-	Cff	No Cfvi
CffUy001	Cff	+	Cff	Cff	I	Cff	No Cfvi
CffUy008	Cff	+	Cfv	Cff	-	Cff	No Cfvi
CffUy012	Cff	+	Cff	ND	-	Cfv	No Cfvi
CffUy016	Cff	+	Cff	Cff	-	Cfv	No Cfvi
CffAr001	Cff	+	Cff	Cff	I	Cff	No Cfvi
CffAr003	Cff	+	Cff	Cff	-	Cff	Cfvi
CffAr006	Cff	+	Cfv	Cfv	I	Cfv	Cfvi
CffAr007	Cff	+	Cfv <sup>6</sup>	Cfv <sup>6</sup>	I	Cfv	No Cfvi
CffAr012	Cff	+	Cff	Cff	-	Cff	Cfvi
CffAr013	Cff	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	Cfvi
CffAr016	Cff	+	Cff	Cff	I	Cff	No Cfvi
CffAr018	Cff	+	Cff	Cff	I	Cff	No Cfvi
CffAr022	Cff	+	Cff	Cff	-	Cff	No Cfvi
CffAr023	Cff	+	Cff	Cff	I	Cff	No Cfvi
CffAr024	Cff	+	Cff	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CffAr027	Cff	+	Cfv	Cfv	I	Cfv	No Cfvi
CffAr028	Cff	+	Cfv	Cfv	I	Cfv	No Cfvi
CffAr029	Cff	+	Cfv	Cff	I	Cff	No Cfvi
CffAr030	Cff	+	Cfv	Cff	I	Cff	No Cfvi
CffAr031	Cff	+	Cff	Cff	I	Cff	No Cfvi
CffAr032	Cff	+	Cff	Cff	-	Cff	No Cfvi
CffAr033	Cff	+	Cff	Cff	I	Cff	No Cfvi
CffAr034	Cff	+	Cff	Cfv	I	Cff	Cfvi
CffAr035	Cff	+	Cfv	Cfv	I	Cff	No Cfvi
Cfv 84-112 <sup>1</sup>	Cfv	+	Cfv	Cfv	Cfv	Cfv	No Cfvi
NCTC10354	Cfv	+	Cff	Cfv	I	Cff	No Cfvi
CfvAu001	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy002	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi

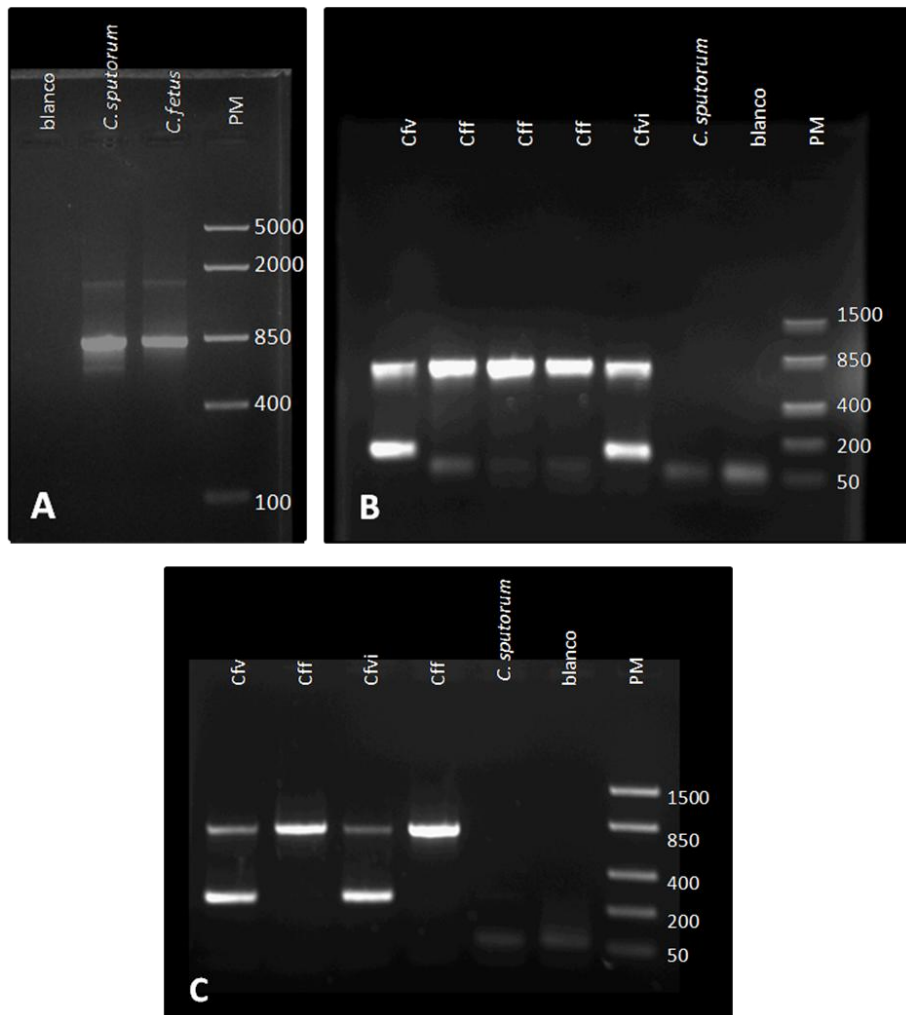
Aislamiento	Fenotipo	<i>Campylobacter</i>	Multiplex PCR A <sup>2</sup>	Multiplex PCR B <sup>3</sup>	ISCfe1 <sup>4</sup>	RealTime PCR	Cfvi <sup>5</sup>
CfvUy003	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy004	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy005	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy006	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	Cfvi
CfvUy007	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy009	Cfv	+	Cff	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy010	Cfv	+	Cff	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy014	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy017	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy018	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvUy020	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfvAr002	Cfv	+	Cfv	Cfv	I	Cfv	No Cfvi
CfvAr004	Cfv	+	Cfv	Cfv	I	Cfv	No Cfvi
CfvAr008	Cfv	+	Cff	Cfv	I	Cff	Cfvi
CfvAr009	Cfv	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	Cfvi
CfvAr010	Cfv	+	Cff	Cfv	I	Cff	No Cfvi
CfvAr021	Cfv	+	Cff	Cfv	-	Cfv	Cfvi
Cfvi 03/293 <sup>1</sup>	Cfvi	+	Cfv	Cfv	Cfv	Cfv	No Cfvi
CfviAu003	Cfvi	+	ND	ND	-	Cff	Cfvi
CfviAr005	Cfvi	+	Cfv	Cfv	I	Cfv	Cfvi
CfviAr011	Cfvi	+	Cff	Cfv	I	Cff	Cfvi
CfviAr014	Cfvi	+	Cff	Cfv	-	Cfv	Cfvi
CfviAr015	Cfvi	+	Cfv	Cfv	I	Cfv	Cfvi
CfviAr017	Cfvi	+	Cff	Cfv	I	Cfv	No Cfvi
CfviAr019	Cfvi	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	No Cfvi
CfviAr020	Cfvi	+	Cff	Cff	I	Cff	No Cfvi
CfviAr025	Cfvi	+	Cff	Cfv	I	Cfv	No Cfvi
CfviAr026	Cfvi	+	Cfv	Cfv	-	Cfv	Cfvi
CfUy022	Cf	+	Cff	Cff	-	Cff	No Cfvi
CfUy023	Cf	+	Cff	Cff	-	Cff	No Cfvi
CfUy024	Cf	+	Cff	Cff	-	Cff	No Cfvi
CfUy025	Cf	+	Cff	Cff	I	Cff	No Cfvi
Cb08209	C	+	No Cf	No Cf	-	No Cf	No Cfvi
CcHB41	C	+	No Cf	No Cf	-	No Cf	No Cfvi
CjHB32	C	+	No Cf	No Cf	-	No Cf	No Cfvi
CjCP3	C	+	No Cf	No Cf	-	No Cf	No Cfvi
CcCP60	C	+	No Cf	No Cf	-	No Cf	No Cfvi
Ch99/243	C	+	No Cf	No Cf	-	No Cf	No Cfvi

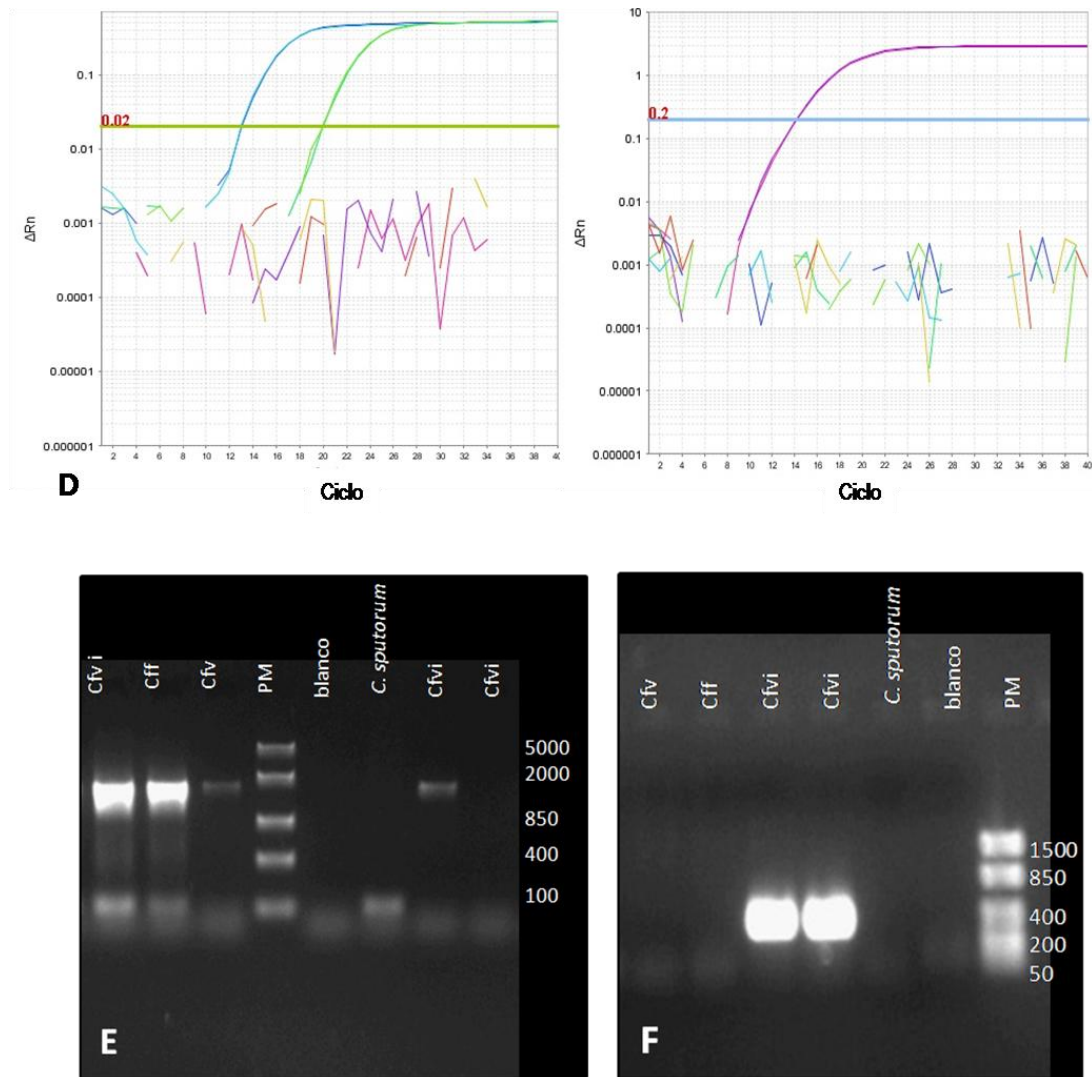
Aislamiento	Fenotipo	<i>Campylobacter</i>	Multiplex PCR A <sup>2</sup>	Multiplex PCR B <sup>3</sup>	ISCfe1 <sup>4</sup>	RealTime PCR	Cfvi <sup>5</sup>
NCTC 11562	C	+	No Cf	No Cf	-	No Cf	No Cfvi
<b>TOTAL <i>C. fetus</i></b>	<b>63</b>	<b>63</b>	<b>62</b>	<b>61</b>	<b>63</b>	<b>63</b>	<b>63</b>
<b>TOTAL Cff</b>	<b>26</b>	<b>-</b>	<b>33</b>	<b>23</b>	<b>-</b>	<b>28</b>	<b>-</b>
<b>TOTAL Cfv</b>	<b>23</b>	<b>-</b>	<b>29</b>	<b>38</b>	<b>-</b>	<b>35</b>	<b>-</b>
<b>TOTAL Cfvi</b>	<b>10</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>15</b>
<b>TOTAL</b>	<b>70</b>	<b>70</b>	<b>69</b>	<b>68</b>	<b>70</b>	<b>70</b>	<b>70</b>

<sup>1</sup>cepas cuyo genoma totalmente secuenciado y completamente ensamblado se encuentra en bases de datos. Todos los análisis para estas cepas fueron realizados *in silico* (ver texto)

<sup>2</sup>Hum et al. 1997. <sup>3</sup>Iraola et al. 2012. <sup>4</sup>Abril et al. 2007. <sup>5</sup>Moolhuijzen et al. 2009

<sup>6</sup>en la muestra CffAr007, no hay amplificación del marcador de especie en los Mpx-PCR A y B (fragmento del gen *cstA* en ambos casos)





**Figura 12.** Resultados de los métodos de identificación aplicados. **A-C** y **E-F**. Electroforesis en gel de agarosa. En la parte superior de los geles se indica el molde utilizado en cada reacción. PM: control de peso molecular. **A.** Identificación del género *Campylobacter*. **B.** Mpx-PCR A. **C.** Mpx-PCR B. **D.** Curvas de amplificación de PCR en tiempo real. Variación de fluorescencia emitida en función del ciclo de amplificación. La línea horizontal (verde o celeste) marca el umbral de fluorescencia para las muestras positivas. Izquierda: gen 16S, marcador de especie. Curvas verdes: réplicas de reacciones usando como molde un aislamiento Cff. Celeste y azul: Cfv. Violeta y rosado: *C. sputorum*. Amarillo y rojo: blanco de PCR. Derecha: amplificación del gen *VirB11*, marcador de la subespecie Cfv. Curvas verdes: réplicas de reacciones usando como molde un aislamiento Cff. Violeta y rosado: Cfv. Celeste y azul: *C. sputorum*. Amarillo y rojo: blanco de PCR. **E.** PCR ISCfe. **F.** PCR Cfv.

### **5.2.1.2 Identificación de la especie *Campylobacter fetus* y de las subespecies *fetus* y *venerealis***

#### **5.2.1.2.1 Múltiplex PCR A**

Se aplicó este método en 62 aislamientos que pertenecen a la especie *C. fetus* y 7 aislamientos de otras especies (Tabla 3). Para los aislamientos caracterizados fenotípicamente como *C. fetus*, la identificación genética de la especie *C. fetus* fue positiva en todos los casos excepto en el aislamiento CffAr007, donde no hay amplificación del marcador de especie (fragmento de 764 pb del gen *cstA*). Ninguno de los aislamientos de otras especies presentó amplificación. La pertenencia del aislamiento CffAr007 a la especie *C. fetus* fue corroborada mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento de 816 pb del gen 16S, amplificado con los cebadores C412F y C1288R (Linton et al. 1996; Fig. 9). De los 62 aislamientos analizados 33 presentaron amplificación del marcador de especie y no del de subespecie, por lo que fueron considerados como pertenecientes a la subespecie Cff, 28 presentaron amplificación de ambos marcadores, y el aislamiento CffAr007 presentó amplificación sólo del marcador de subespecie, por lo tanto 29 aislamientos fueron considerados como Cfv (Tabla 3, Fig. 12B). La correspondencia entre la identificación fenotípica y la genética (sin tomar en cuenta los aislamientos humanos uruguayos, cuya subespecie no fue determinada por métodos fenotípicos) es de 0,66 (Tabla 4).

#### **5.2.1.2.2 Múltiplex PCR B**

Se aplicó este método en 61 aislamientos que pertenecen a la especie *C. fetus* y 7 aislamientos de otras especies (Tabla 3). Para los aislamientos caracterizados fenotípicamente como *C. fetus*, la identificación genética de la especie fue positiva en todos los casos excepto en el aislamiento CffAr007, donde no hay amplificación del marcador de especie, al igual que en el método anterior. Ninguno de los aislamientos de otras especies presentó amplificación. De los 61 aislamientos analizados, 23 presentaron amplificación del marcador de especie y no del de subespecie, por lo que fueron considerados como pertenecientes a la subespecie Cff, y 38 (incluyendo el aislamiento CffAr007) presentaron amplificación del marcador de



**Tabla 4.** Correspondencia pareada entre los diferentes métodos empleados para identificar la especie *C. fetus*, las subespecies *fetus* y *venerealis* y el biovar *intermedius*. La correspondencia se indica en proporción de muestras analizadas con ambos métodos que presentan el mismo resultado. **Izquierda:** correspondencia entre los métodos empleados para diferenciar las subespecies *fetus* y *venerealis*. **Derecha:** correspondencia entre los métodos empleados para identificar el biovar *intermedius*.

Método	Fenotipo	Multiplex PCR A	Multiplex PCR B	RealTime PCR
Fenotipo	-	0.66	0.83	0.74
Multiplex PCR A		-	0.75	0.79
Multiplex PCR B			-	0.89
RealTime PCR				-

Método	Fenotipo	Cfvi	ORF 162	VapD	Plásmido
Fenotipo	-	0.74	0.68	0.73	0.69
Cfvi		-	0.67	0.73	0.76
ORF 162			-	0.76	0.73
VapD				-	0.97
Plásmido					-

subespecie, por lo tanto fueron identificados molecularmente como Cfv (Tabla 3, Fig. 12C). La correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética es de 0.83 (Tabla 4).

#### 5.2.1.2.3 PCR en tiempo real

La identificación de los aislamientos como *C. fetus* fue positiva en todos los casos. En el aislamiento CffAr007, el fragmento del gen 16S utilizado para detectar la especie presenta amplificación, al igual que el marcador de la subespecie Cfv. Ninguno de los aislamientos de otras especies presentó amplificación. De los 63 aislamientos analizados 28 presentaron amplificación del marcador de especie y no del de subespecie, por lo que fueron clasificados como pertenecientes a la subespecie Cff, y 35 presentaron amplificación de ambos marcadores, por lo tanto pertenecen a la subespecie Cfv (Tabla 3, Fig. 12D). La correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética es de 0.74 (Tabla 4).

#### 5.2.1.2.4 Detección del elemento de inserción ISCfe1

Se aplicó este método en 63 aislamientos que pertenecen a la especie *C. fetus* y 7 aislamientos de otras especies (Tabla 3). Este método, a diferencia de los anteriores, no incluye la identificación de la especie *C. fetus*, sino que solamente se observa amplificación en el caso de que el aislamiento pertenezca a la subespecie Cfv o al biovar Cfvi. Sin embargo, en ninguno de los aislamientos se logró obtener un resultado positivo, ya que en los 27 casos en que hubo amplificación, el amplicón tuvo un tamaño diferente del esperado (aprox. 1500 pb en lugar de 233 pb, Tabla 3, Fig. 12E). La correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética no fue analizada debido a la ausencia de resultados positivos.

El amplicón obtenido en uno de los aislamientos (CfvAr002) fue enviado a secuenciar y analizado mediante BLASTn. La secuencia amplificada comparte identidad con copias del elemento ISCfe1 presentes en tres regiones del genoma de la cepa Cfv 84-112, cuatro regiones del genoma de la cepa Cfvi 03-293, y una región del plásmido pCfviMP1. En estas regiones, los cebadores hibridan a una distancia aproximada de 1500 pb, que es el tamaño de banda que se observa en el gel de agarosa (Fig. 12E).

### **5.2.1.3 Identificación del biovar *intermedius***

A diferencia de los anteriores, este método no incluye la identificación de la especie *C. fetus* ni de las subespecies *Cff* y *Cfv*, sino que sólo habrá amplificación en el caso de que el aislamiento pertenezca al biovar *intermedius*. En 15 de los 63 aislamientos analizados hubo amplificación del fragmento específico del biovar *intermedius*, por lo cual esos aislamientos se consideran genéticamente *Cfvi* (Tabla 3, Fig. 12F). La correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética (proporción de aislamientos con fenotipo *Cfvi* que son positivos, más aislamientos con fenotipo *Cff* o *Cfv* que son negativos) es de 0.74 (Tabla 4).

### **5.2.2 Desarrollo y evaluación de metodologías de identificación del biovar *intermedius***

Se diseñaron y pusieron a punto tres métodos para la identificación del biovar *intermedius*. En todos los casos se utilizó como control positivo el aislamiento *CfviAr011* (INTA 99/541), cuyo genoma totalmente secuenciado se utilizó para el diseño de las metodologías.

La sensibilidad y especificidad de los métodos se evaluó aplicándolos a 9 aislamientos caracterizados fenotípicamente como *Cfvi* (incluyendo el control positivo), 5 aislamientos pertenecientes a *Cfv*, y 12 aislamientos bovinos con fenotipo *Cff* (Tabla 5).

Para la secuencia correspondiente al ORF 162, hubo amplificación en 10 de los 26 aislamientos analizados, incluyendo el control positivo (Tabla 5, Fig. 13A). La correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética es de 0.68 (Tabla 4).

Para el amplicón correspondiente al ORF *vapD*, hubo amplificación en 2 de los 26 aislamientos analizados: el control positivo y un aislamiento perteneciente a la subespecie *Cff* (Tabla 5, Fig. 13B). La correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética es de 0.73 (Tabla 4).

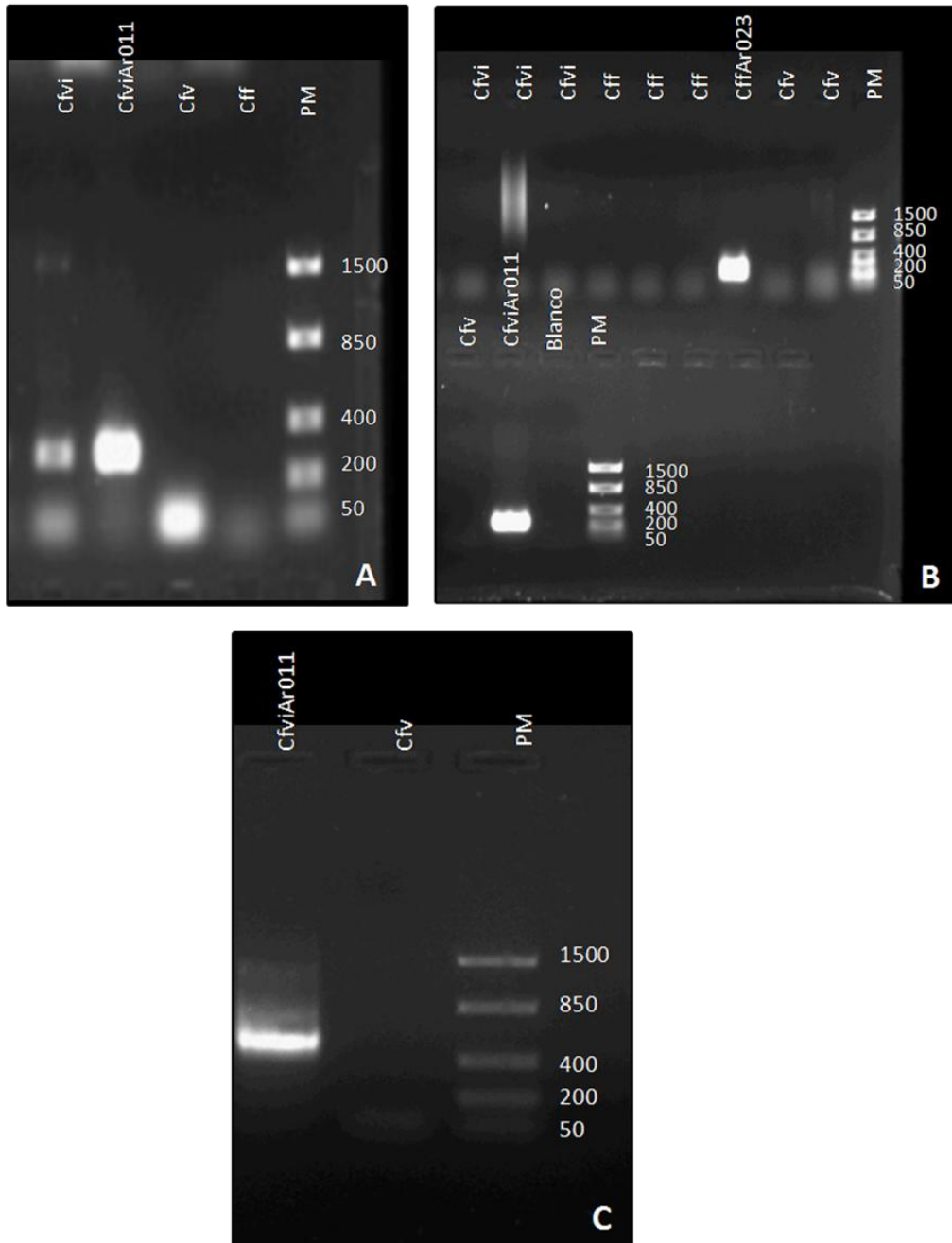
Para el amplicón correspondiente a la región conservada del plásmido presente en el aislamiento *CfviAr011*, hubo amplificación solamente en el control positivo (Tabla 5, Fig. 13C). La correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética es de 0.69 (Tabla 4).

**Tabla 5.** Resultados del desarrollo y evaluación de métodos para la identificación del biovar intermedius. Se presentan los aislamientos analizados según su fenotipo y el resultado de los tres métodos. El aislamiento CfvAr011 se usa como control positivo en todos los casos. Cff: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Cfv: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Cfvi: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* biovar intermedius. Cft: *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum*.

Aislamiento	Fenotipo	Cfvi <sup>2</sup>	Cfvi ORF 162	Cfvi VapD	Cfvi Plásmido
Cft 03-427 <sup>1</sup>	Cft	-	-	-	-
Cff8240 <sup>1</sup>	Cff	-	-	-	-
CffAu002	Cff	-	-	-	-
CffAr001	Cff	-	-	-	-
CffAr003	Cff	+	-	-	-
CffAr007	Cff	-	-	-	-
CffAr012	Cff	+	-	-	-
CffAr013	Cff	+	-	-	-
CffAr016	Cff	-	-	-	-
CffAr022	Cff	-	-	-	-
CffAr023	Cff	-	+	+	-
CffAr031	Cff	-	+	-	-
CffAr032	Cff	-	+	-	-
CffAr033	Cff	-	+	-	-
Cfv 84-112 <sup>1</sup>	Cfv	-	-	-	-
NCTC10354	Cfv	-	-	-	-
CfvUy003	Cfv	-	-	-	-
CfvUy005	Cfv	-	-	-	-
CfvUy014	Cfv	-	-	-	-
CfvAr010	Cfv	-	-	-	-
Cfvi 03/293 <sup>1</sup>	Cfvi	-	-	-	-
CfviAu003	Cfvi	+	-	-	-
CfviAr005	Cfvi	+	-	-	-
CfviAr014	Cfvi	+	+	-	-
CfviAr015	Cfvi	+	+	-	-
CfviAr017	Cfvi	-	+	-	-
CfviAr020	Cfvi	-	+	-	-
CfviAr025	Cfvi	-	-	-	-
CfviAr026	Cfvi	+	+	-	-
<b>CfviAr011</b>	<b>Cfvi</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>33</b>	<b>33</b>	<b>33</b>	<b>33</b>

<sup>1</sup> cepas cuyo genoma totalmente secuenciado y completamente ensamblado se encuentra en bases de datos. Todos los análisis para estas cepas fueron realizados *in silico* (ver texto).

<sup>2</sup>Moolhuijzen et al. 2009



**Figura 13.** Resultados del desarrollo y evaluación de métodos para la identificación de Cfv. Electroforesis en gel de agarosa. En la parte superior de los geles se indica el molde utilizado en cada reacción. PM: control de peso molecular. **A.** PCR ORF 162. **B.** PCR VapD. **C.** PCR Plásmido.

### 5.2.3 Análisis de la variabilidad genética en *Campylobacter fetus*

#### 5.2.3.1 MLST

Se obtuvieron las secuencias de los fragmentos de los siete genes *housekeeping* correspondientes al esquema de MLST de *C. fetus* en 39 aislamientos. Las secuencias fueron concatenadas para formar los STs de 3312 pb, y comparadas con los STs registrados en la base de datos pública de MLST (<http://pubmlst.org/cfetus/>; Jolley y Maiden, 2010). Se encontraron un total de cuatro STs que ya habían sido descritos previamente. El ST-4 estuvo presente en 34 aislamientos; los STs 5 y 6 en dos aislamientos cada uno, y el ST-12 en uno (Tabla 6). Las cepas bovinas Cfv 84-112 y Cfvi 03-293 tienen el ST-4, la cepa humana Cff 82-40 tiene el ST-6, y la cepa humana de origen reptiliano Cft 03-427 tiene el ST-15. El valor D para los resultados de MLST es de 0.16 (Anexo 5).

Hay 8 posiciones variables en el alineamiento de los cuatro STs presentes en los aislamientos y cepas de mamíferos. El ST-15 presenta un promedio de 258 diferencias nucleotídicas con los otros cuatro STs. Las secuencias de los 44 STs descritos para *C. fetus* fueron obtenidas de la base de datos y se utilizaron para realizar una reconstrucción filogenética con el método de máxima verosimilitud con el modelo de sustitución TN93+G (Fig. 14).

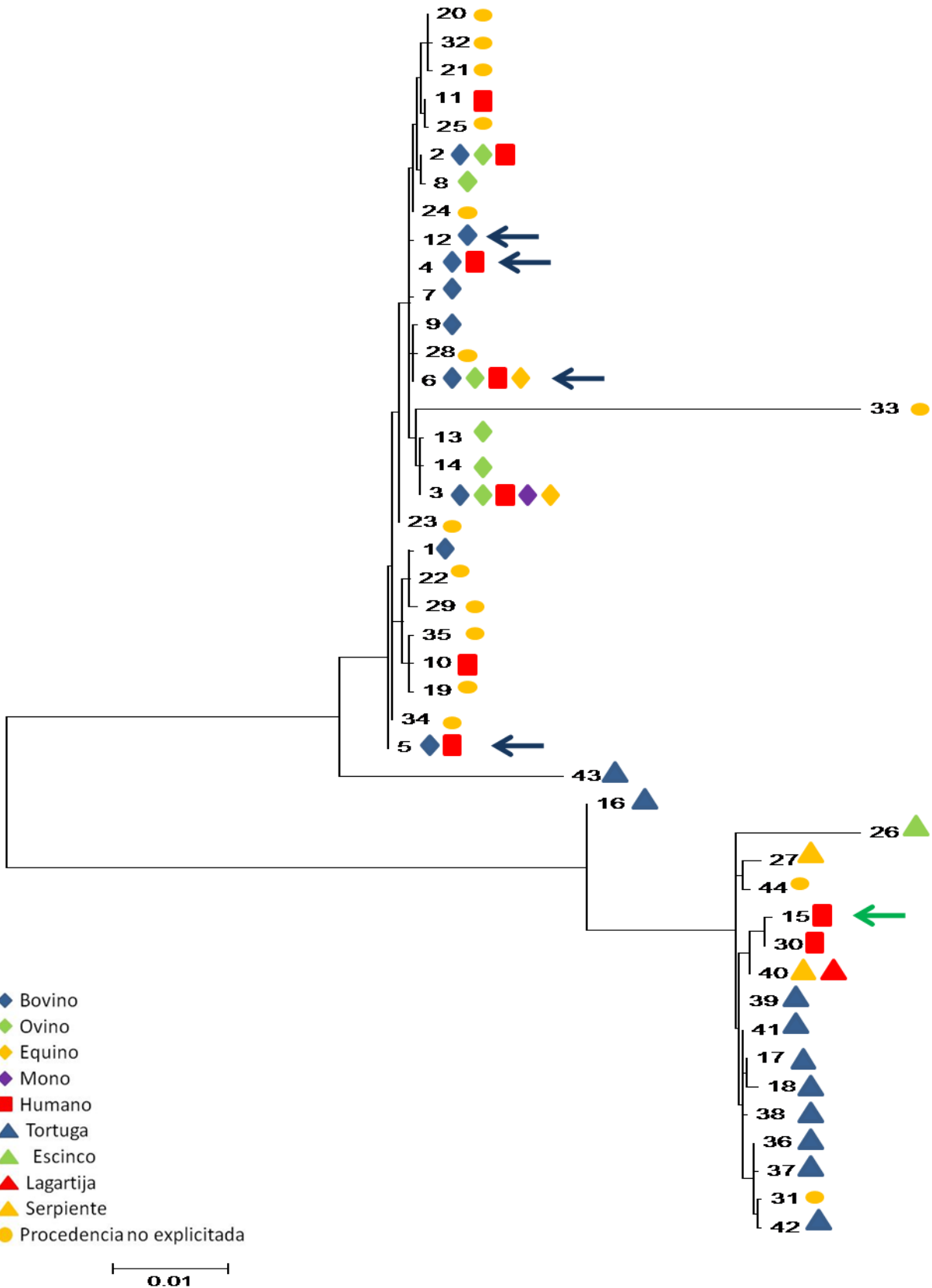
**Tabla 6.** Resultados del esquema MLST, la secuenciación parcial del gen 23S y del ISR3, y evaluación de la presencia de IVSs. ST: *sequence type*. +: resultado positivo (presencia de IVS). -: resultado negativo (ausencia de IVS). ND: no determinado.

Aislamiento	ST MLST	Haplotipo 23S	IVS 23S	Haplotipo ISR3	IVS ISR3
Cft 03-427 <sup>1</sup>	15	A	-	E	-
Cff8240 <sup>1</sup>	6	A	+	A	-
CffAu002	5	B	+	D	-
CffUy001	4	A	+	A	-
CffUy008	5	ND	ND	D	ND
CffUy012	6	ND	ND	D	ND
CffUy016	4	ND	ND	ND	ND
CffAr001	4	A	+	A	-
CffAr003	6	A	+	A	-
CffAr006	4	A	+	A	-
CffAr007	4	A	+	A	-
CffAr012	4	A	+	A	-
CffAr013	4	A	+	A	-
CffAr016	4	A	+	A	-
CffAr018	ND	ND	+	ND	-
CffAr022	ND	ND	+	ND	-
CffAr023	ND	ND	+	ND	-
CffAr024	ND	ND	+	ND	-
CffAr028	ND	ND	+	ND	-
CffAr030	ND	ND	+	ND	-
CffAr031	4	A	+	A	-
CffAr032	ND	ND	+	ND	-
CffAr033	ND	ND	+	ND	-
CffAr034	ND	ND	+	ND	-
CffAr035	ND	ND	+	ND	-
Cfv 84-112 <sup>1</sup>	4	A	+	A	-
NCTC10354 <sup>T</sup>	4	A	+	A	-
CfvAu001	4	A	+	A	-
CfvUy002	4	A	+	A	-
CfvUy003	4	A	+	A	-
CfvUy004	4	A	+	A	-
CfvUy005	4	A	+	C	-
CfvUy006	4	A	+	A	-
CfvUy007	4	A	+	A	-
CfvUy009	4	ND	+	ND	-
CfvUy010	ND	A	ND	A	ND
CfvUy014	4	A	+	A	-
CfvUy017	4	A	+	A	-
CfvUy018	4	A	+	A	-
CfvUy020	4	A	+	A	-
CfvAr002	4	A	+	B	-

Aislamiento	ST MLST	Haplotipo 23S	IVS 23S	Haplotipo ISR3	IVS ISR3
CfvAr004	4	A	+	A	-
CfvAr008	4	A	+	A	-
CfvAr009	4	A	+	A	-
CfvAr010	4	A	+	A	-
CfvAr021	ND	ND	+	ND	-
Cfvi 03/293 <sup>1</sup>	4	A	+	A	-
CfviAu003	12	ND	ND	ND	ND
CfviAr005	4	A	+	A	-
CfviAr011	4	A	+	A	-
CfviAr014	ND	ND	+	ND	-
CfviAr015	ND	ND	+	ND	-
CfviAr019	4	A	+	A	-
CfviAr020	ND	ND	+	ND	-
CfviAr025	ND	ND	+	ND	-
CfviAr026	ND	ND	+	ND	-
CfUy022	4	A	+	A	-
CfUy023	4	A	+	A	-
CfUy024	4	A	+	A	-
CfUy025	4	A	+	A	-
<b>TOTAL</b>	<b>43</b>	<b>39</b>	<b>55</b>	<b>41</b>	<b>55</b>

<sup>1</sup>cepas cuyo genoma totalmente secuenciado y completamente ensamblado se encuentra en bases de datos. Todos los análisis para estas cepas fueron realizados *in silico* (ver texto).





**Figura 14.** Árbol filogenético realizado con el método de máxima verosimilitud, utilizando las secuencias de los STs presentes en la base de datos. El largo de las ramas es proporcional a la distancia entre las secuencias. Las figuras a la derecha de cada ST indican la procedencia de los aislamientos en los que se encontró. Las flechas azules indican los STs encontrados en los aislamientos y en los genomas de origen humano o bovino. La flecha verde indica el ST presente en el genoma completo de la cepa Cft 03-427.

### ***5.2.3.2 Secuenciación parcial del gen ribosomal 23S y evaluación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)***

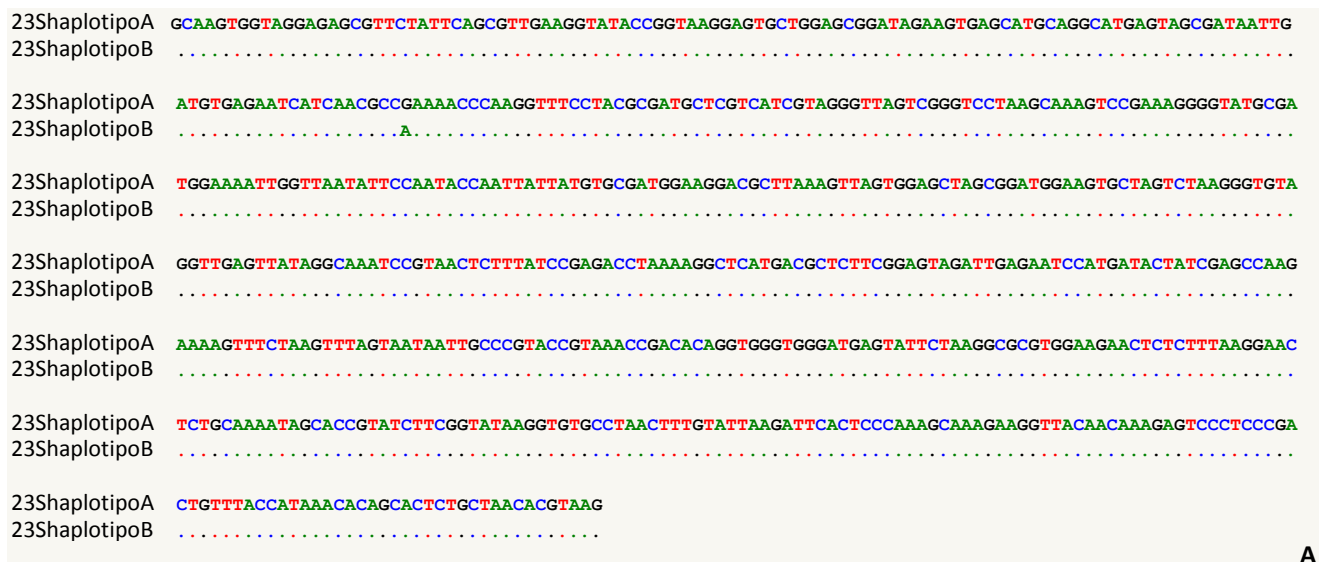
Se amplificó y secuenció un fragmento de 638 pb del gen ribosomal 23S en 32 aislamientos. Se encontraron dos haplotipos que difieren en una transición: 31 aislamientos tienen el haplotipo A, y el aislamiento CffAu002 tiene el haplotipo B (Tabla 6, Fig. 15A). Los genomas completos analizados también tienen el haplotipo A. El valor D para las secuencias de este fragmento es de 0.06 (Anexo 5).

Se analizaron 51 aislamientos para la presencia de la IVS, y todos presentan un amplicón de 485 pb con los cebadores IVSF e IVSR, lo cual indica que llevan una secuencia interviniente en el gen 23S (Tabla 6). Los genomas completos analizados también tienen la secuencia interviniente en su gen 23S, excepto el genoma de la cepa Cft 03-427.

### ***5.2.3.3 Secuenciación parcial de la región espaciadora interna del tercer operón ribosomal (ISR3) e identificación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)***

Se amplificó y secuenció un fragmento de 772 pb del tercer espaciador ribosomal en 34 aislamientos. Se encontraron 4 haplotipos (Tabla 6, Fig. 15B). Uno de los haplotipos se encontró en 29 aislamientos, otro en tres aislamientos, y los restantes dos haplotipos se encontraron en un aislamiento cada uno. Los cuatro haplotipos difieren en una o dos variantes nucleotídicas. Dos de las variantes encontradas son inserciones/delecciones, una es una transición y la otra una transversión. Los genomas completos tienen el haplotipo mayoritario, excepto el genoma de la cepa Cft 03-427, que presenta un quinto haplotipo, el cual difiere del resto en un promedio de 105 posiciones, incluyendo transiciones, transversiones e inserciones/delecciones (Tabla 6, Fig. 15B). El valor D para estas secuencias es de 0.16 (Anexo 5).

Se analizaron 51 aislamientos para la presencia de la IVS, y todos presentan un amplicón de 2030 pb con los cebadores C412F e ISRR, lo cual indica que ninguno presenta una secuencia interviniente en ninguno de sus espaciadores ribosomales (Tabla 6). En los genomas completos tampoco se encontraron secuencias intervinientes en los ISRs.



**Figura 15.** Secuencias obtenidas de los dos fragmentos de los operones ribosomales. **A:** haplotipos del gen 23S. **B:** haplotipos del ISR3.

#### **5.2.3.4 Análisis de la presencia de genes de virulencia**

Se determinó el tipo sap en 23 aislamientos, y se lo correlacionó con la presencia de cuatro genes de virulencia (*glf*, *wcbK*, *galE* y *mat1*). Diecisiete aislamientos presentaron amplificación sólo con los cebadores específicos de *sapA*, por lo que se clasificaron como tipo A. Los restantes seis aislamientos presentaron amplificación con ambos juegos de cebadores, por lo que se clasificaron como tipo AB. Todos los genomas completos analizados presentan los genes *sapA*, por lo que son de tipo A (Tabla 7).

El gen *glf* está presente en cinco aislamientos y en uno de los genomas completos. El gen *wcbK* está presente en cuatro aislamientos y en ninguno de los genomas completos. El gen *mat1* está presente en 20 aislamientos y en tres de los genomas completos. El gen *galE* está presente en 20 aislamientos y en los cuatro genomas completos. Existen 8 combinaciones diferentes de los cuatro genes (Tabla 7). El valor D para la variación en la presencia de estos genes combinados es de 0.73 (Anexo 5).

#### **5.2.3.5 Análisis de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX**

En los 37 aislamientos de *C. fetus* analizados con esta técnica, se encontraron 6 patrones de bandas generados mediante la amplificación con los cebadores REP1R y REP2I, 14 patrones generados con los cebadores ERIC1R y ERIC2, y 4 patrones generados con el cebador BOXA1R. Combinando la información obtenida con los tres juegos de cebadores, se observaron 16 patrones (Tabla 8, Fig. 16).

Con los tres juegos de cebadores hubo aislamientos en los cuales no se observó amplificación. La ausencia de amplificación fue considerada como un patrón, y corresponde al patrón F en las amplificaciones con REP1R y REP2I, al M en los patrones generados con ERIC1R y ERIC2, y al E en los observados con el cebador BOXA1R (Fig. 16). En las amplificaciones con REP1R y REP2I, el resto de los patrones están compuestos por 1 a 6 bandas que tienen tamaños entre 300 y 3000 pb. Los patrones generados con ERIC1R y ERIC2 están compuestos por entre 1 y 8 bandas que tienen tamaños entre 200 y 3000 pb. Con el cebador BOXA1R, se obtuvieron patrones que tienen entre 3 y 6 bandas con tamaños entre 100 y 2000 pb (Fig. 16).

**Tabla 7.** Resultados de la evaluación del tipo sap y de la presencia de genes de virulencia. +: resultado positivo (el gen está presente). -: resultado negativo (el gen no está presente). Esperado: combinación de genes que se espera que estén presentes según la hipótesis planteada por Kienesberger et al. (2014), en la cual hay una correlación del tipo sap con la presencia de estos genes.

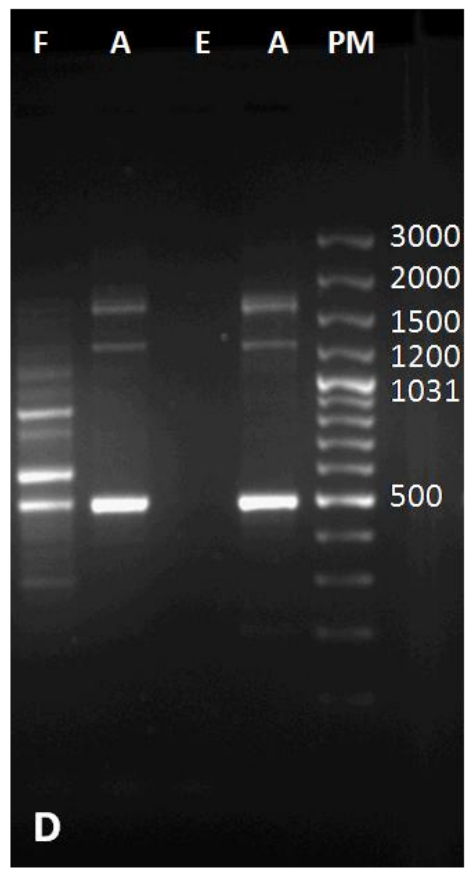
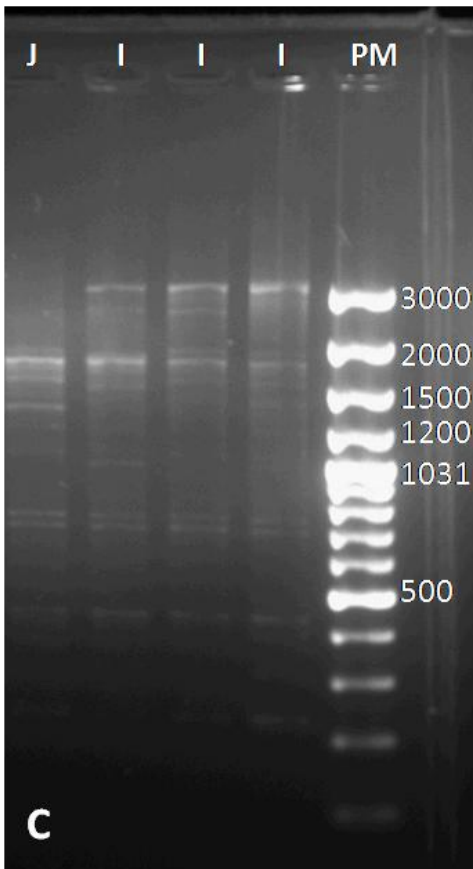
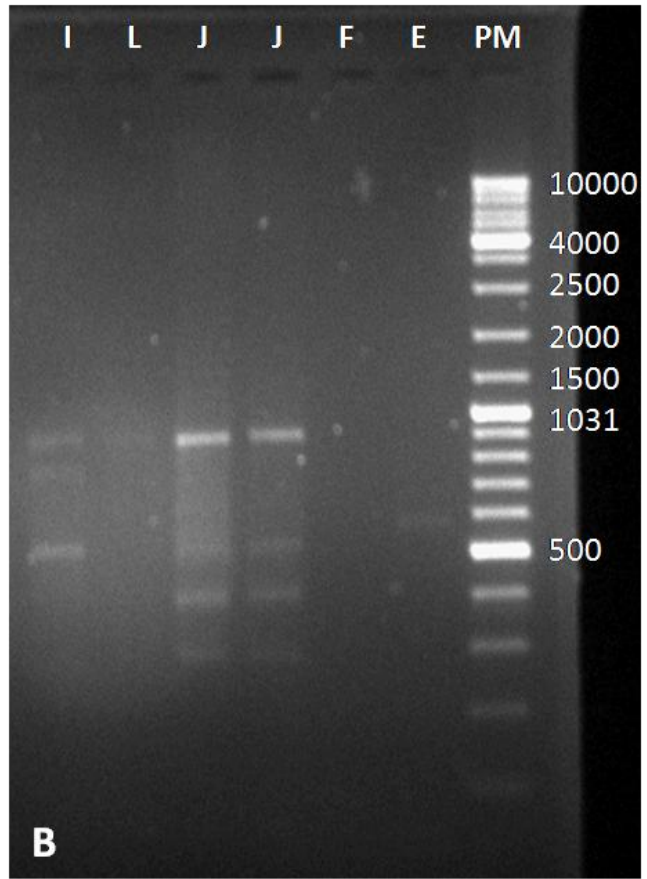
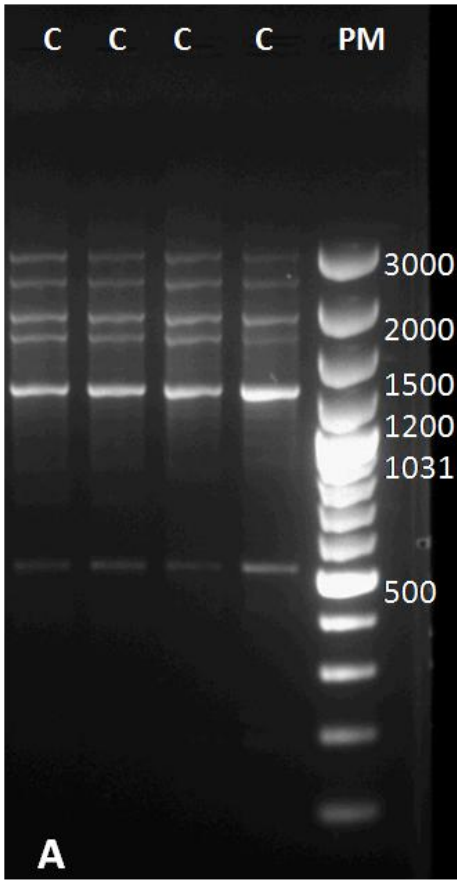
Aislamiento	Fenotipo	<i>sapA</i>	<i>sapB</i>	<i>mat1</i>	<i>glf</i>	<i>wcbK</i>	<i>galE</i>	Combinación	Esperado
Cft 03-427 <sup>1</sup>	Cft	+	-	+	-	-	+	2	1
Cff8240 <sup>1</sup>	Cff	+	-	-	+	-	+	1	1
CffAu002	Cff	+	+	+	+	+	+	4	4
CffAr001	Cff	+	-	+	-	-	+	2	1
CffAr003	Cff	+	-	+	-	-	+	2	1
CffAr007	Cff	+	-	+	-	-	+	2	1
CffAr012	Cff	+	-	+	-	-	+	2	1
CffAr013	Cff	+	-	+	-	-	+	2	1
CffAr016	Cff	+	-	+	-	-	-	3	1
CffAr022	Cff	+	-	+	-	-	+	2	1
CffAr023	Cff	+	+	+	+	+	+	4	4
CffAr031	Cff	+	+	+	-	+	-	7	4
CffAr032	Cff	+	+	+	-	-	+	6	4
CffAr033	Cff	+	+	+	-	+	+	8	4
Cfv 84-112 <sup>1</sup>	Cfv	+	-	+	-	-	+	2	2
NCTC10354 <sup>T</sup>	Cfv	+	-	+	-	+	+	5	2
CfvUy003	Cfv	+	-	+	-	-	-	3	2
CfvUy005	Cfv	+	-	+	-	-	+	2	2
CfvUy014	Cfv	+	-	+	-	-	+	2	2
CfvAr010	Cfv	+	+	+	-	-	+	6	4
Cfvi 03/293 <sup>1</sup>	Cfvi	+	-	+	-	-	+	2	2
CfviAr019	Cfvi	+	-	+	-	-	+	2	2
CfviAr020	Cfvi	+	-	+	-	-	+	2	2
CfviAr025	Cfvi	+	-	+	-	-	+	2	2
CfUy022	Cff	+	-	-	+	-	+	1	1
CfUy023	Cff	+	-	-	+	-	+	1	1
CfUy024	Cff	+	-	-	+	-	+	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>								

<sup>1</sup> cepas cuyo genoma totalmente secuenciado y completamente ensamblado se encuentra en bases de datos. Todos los análisis para estas cepas fueron realizados *in silico* (ver texto).

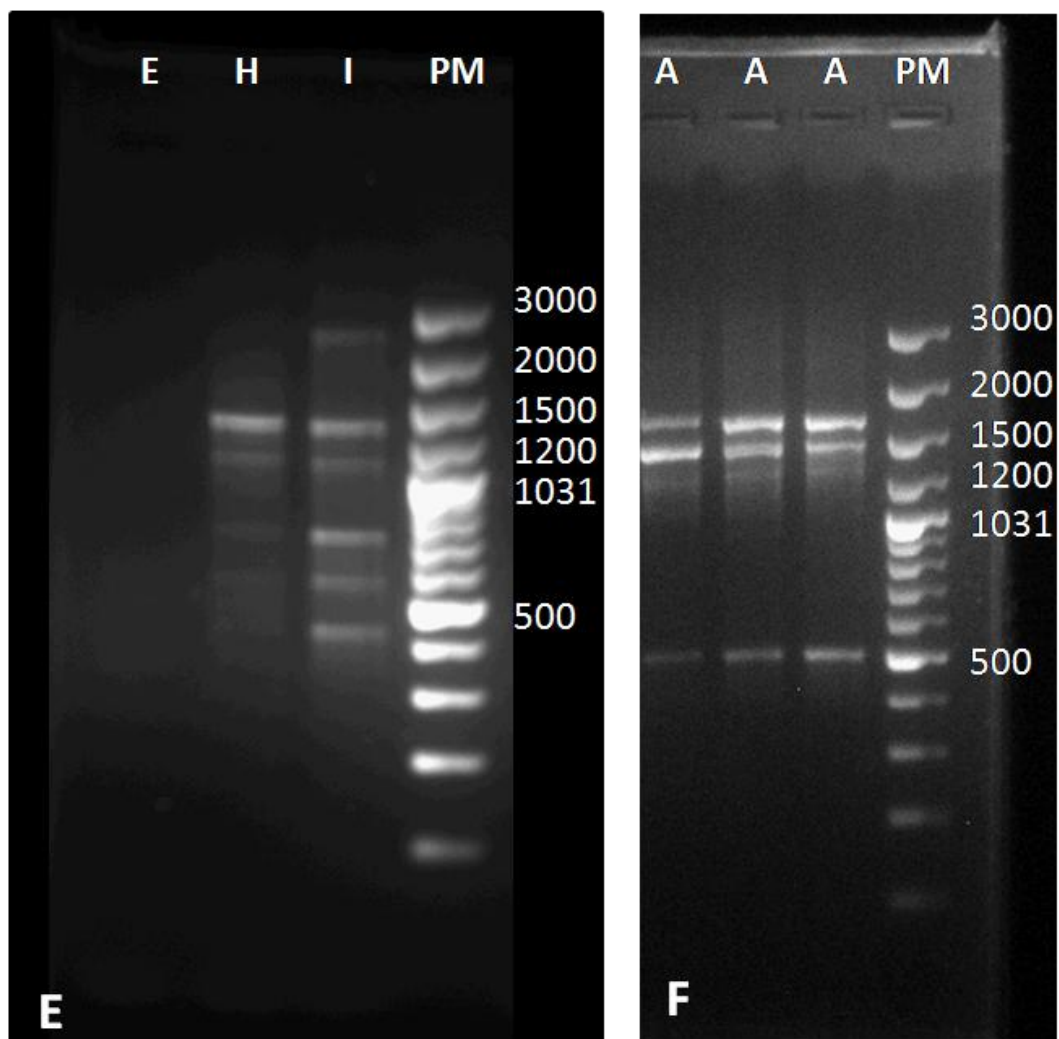
**Tabla 8.** Patrones de bandas generados mediante la amplificación basada en la presencia de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX. Se les asignan letras a los patrones de bandas obtenidos con cada juego de cebadores, y números a la combinación de los tres patrones para cada aislamiento. En los aislamientos tomados al azar en que se repitieron las PCRs, el resultado de las repeticiones se indica separado por una barra.

Aislamiento	Patrón REP	Patrón ERIC	Patrón BOX	Patrón combinado
Cff8240	F	M	E	9
Cfvi 03/293	F	M	E	9
Cfv 84-112	F	M	E	9
Cft 03-427	F	M	E	9
CffAu002	F/E	M	A	5/22
CffUy001	A	B	B	1
CffAr001	A	B	A/E	8/23
CffAr003	F/F	M	A	5/5
CffAr006	E	K	A	3
CffAr016	C	I	A/A	13/13
CffAr018	C	I	A/A	13/13
CffAr022	C	J/M	A	15/24
CffAr023	C/F	I	A/A	13/25
CffAr024	C	I	A	13
CffAr027	D	I/C	A/A	16/26
CffAr028	C/F	I	A	13/25
CffAr029	C	I	A	13
CffAr030	C/F	I/C	A	13/27
CffAr031	C/L	I/Q	A/A	13/28
CffAr032	C	J	A/A	15/15
CfvAu001	F	L/L	A	4/4
CfvUy002	A	C	A/A	2/2
CfvUy003	A	A	A	6
CfvUy005	E	K	A	3
CfvUy006	F	L	A	4
CfvUy007	A/H	A	A	6/29
CfvUy014	F/F	K	A	7/7
CfvUy018	F	N	F/F	11/11
CfvUy020	F/I	K	F	12/30
CfvAr002	F	M	E	9
CfvAr004	F/L	M	A	5/31
CfvAr009	E/J	K/C	A/A	3/32
CfviAr005	A	D	A/A	10/10
CfviAr014	C	H	A	14
CfviAr015	C	H/C	A/A	14/33
CfviAr017	C/J	I/C	A	13/32

Aislamiento	Patrón REP	Patrón ERIC	Patrón BOX	Patrón combinado
CfviAr019	C	I/M	A/E	13/34
CfviAr025	C/F	I	A/A	13/25
CfviAr026	C	J	A	15
CfUy022	E	K/C	A	3/35
CfUy023	E	K/C	A	3/35
CcC60	F	M	G	17
Ch99/243	F	M/K	H	18/36
NCTC 11562	F	L	I	19
CcHB41	F	P/Q	G	20/37
CjHB32	F	L	E	21
CjCP3	F/E	M/M	E	9/38
<b>Total</b>	<b>43</b>			
<b>Total <i>C. fetus</i></b>	<b>37</b>			







**Figura 16.** Ejemplos de los patrones obtenidos con los tres juegos de cebadores basados en secuencias repetidas. Electroforesis en gel de agarosa. En la parte superior de los geles se indica la letra asignada a cada patrón (ver tabla 8). **A-B.** Amplificación con los cebadores REP1R y REP2I. **C-D.** Amplificación con los cebadores ERIC1R y ERIC2. **E-F.** Amplificación con el cebador BOXA1R. PM: control de peso molecular.

En las 6 cepas de otras especies, en la amplificación con los cebadores REP1R y REP2I se encontró sólo el patrón F, que también aparece en 9 aislamientos de *C. fetus*. Los cebadores ERIC1R y ERIC2 generaron 3 patrones, dos de los cuales están también presentes en *C. fetus*, y hubo 4 patrones generados con el cebador BOXA1R, de los cuales dos aparecen también en *C. fetus*. Combinando la información obtenida con los tres juegos de cebadores, se observaron 6 patrones, uno de los cuales (patrón 9) es idéntico al observado en uno de los aislamientos de *C. fetus* (Tabla 8, Fig. 16).

Para los genomas completos se hizo una predicción de los patrones que se obtendrían mediante la búsqueda de las secuencias de los cebadores en cada genoma utilizando BLASTn. En el caso de los cebadores REP1R y REP2I, que contienen Inosina (Anexo 3), se tomaron en cuenta las reglas del balanceo. En ninguno de los casos, los genomas muestran la presencia de regiones a las cuales los cebadores puedan hibridarse, por lo que se considera que no habría amplificación en ninguno de ellos (Tabla 8).

En 2 de los 14 aislamientos en que se evaluó la reproducibilidad, en las amplificaciones con REP1R y REP2I el patrón fue el mismo en ambas amplificaciones (14%, Tabla 8). Para los cebadores ERIC1R y ERIC2 la reproducibilidad también fue de 14% (Tabla 8). Para el cebador BOXA1R se observó que coinciden los patrones de bandas obtenidos en 11 de los 14 aislamientos (79%, Tabla 8). En los 30 aislamientos en que se repitieron una o más PCR, 9 (30%) presentaron el mismo patrón combinado, mientras que las restantes 21 presentaron patrones diferentes, generándose 17 nuevos patrones combinados (Tabla 8). Debido a la escasa reproducibilidad de la metodología, el valor D para la variación en los patrones de bandas generados no fue calculado.

### **5.2.3.6 Análisis de genomas completos: identificación de variaciones genómicas**

#### **5.2.3.6.1 Análisis de genomas *in silico***

En la comparación entre los genomas de las cepas Cff 82-40 y Cfv 84-112 se observa la presencia de una inversión de aproximadamente 500 Kb de largo (Fig. 17B). La isla genómica descrita por Gorkiewicz *et al.* (2010) se encuentra ubicada en uno de los extremos de esta región invertida, pero por fuera de la misma, y está presente en el genoma de la cepa Cfv 84-112 y no en el de Cff 82-40 (Figs. 4 y 17B). Se observan varias inversiones con tamaños que van desde 1000 a 5000 pb. Hay una región de aproximadamente 118 Kpb que cambia de

ubicación en un genoma con respecto al otro (translocación). El resto de las translocaciones tienen entre 1000 y 6000 pb de largo (Fig. 17A y B).

En la comparación entre los genomas de las cepas Cff 82-40 y Cfvi 03-293 se constata la presencia de una inversión de aproximadamente 250 Kpb de largo (Fig. 17B). Esta región está incluida dentro de la región de 500 Kpb que se encuentra invertida en el genoma de Cfv 84-112 con respecto al de Cff 82-40 (Fig. 17B). La isla genómica característica de Cfv está presente en el genoma de la cepa Cfvi 03-293. Se encontraron varias inversiones con tamaños que van desde 1000 a 5000 pb, y translocaciones de entre 1000 y 6000 pb de largo (Fig. 17A y B).

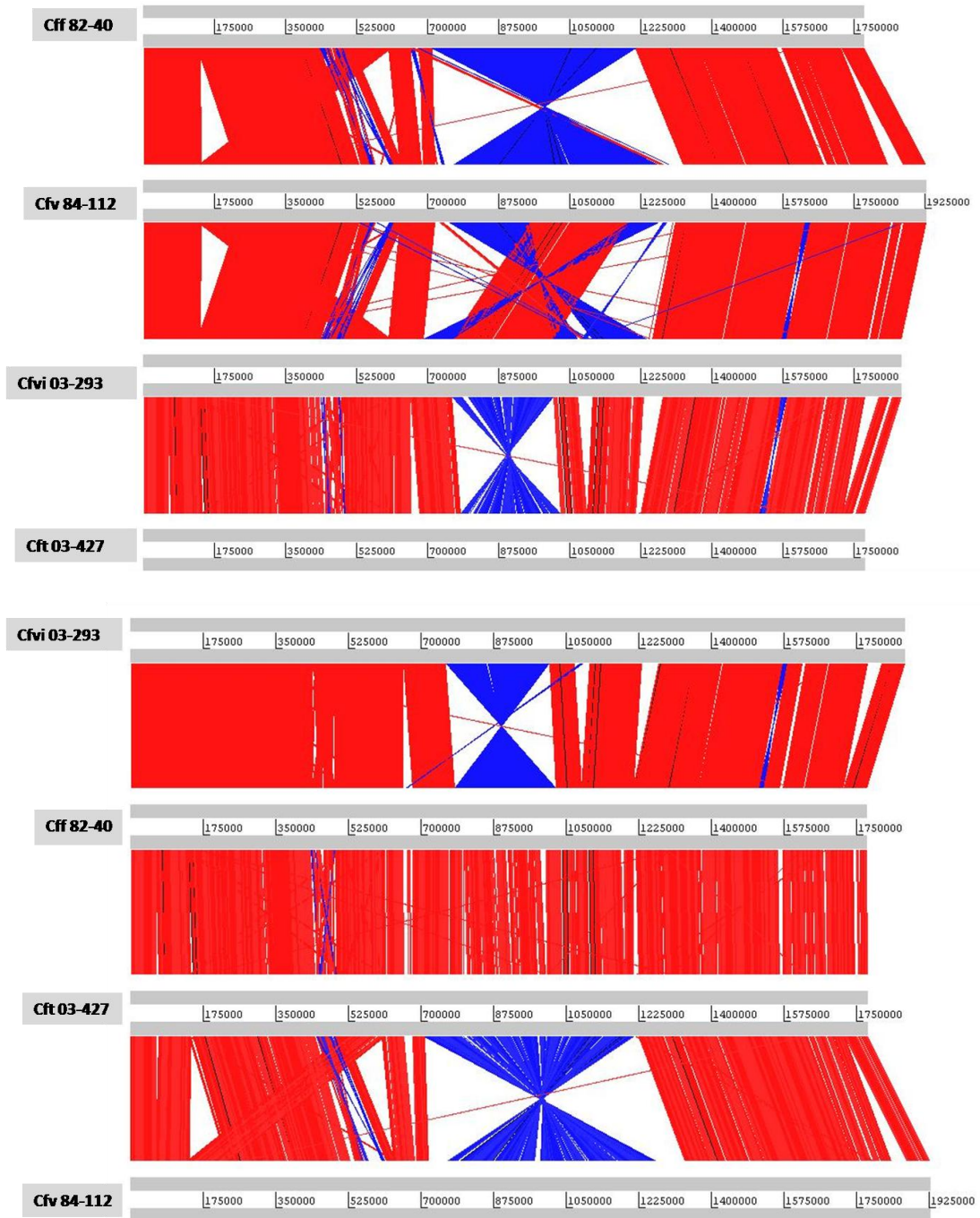
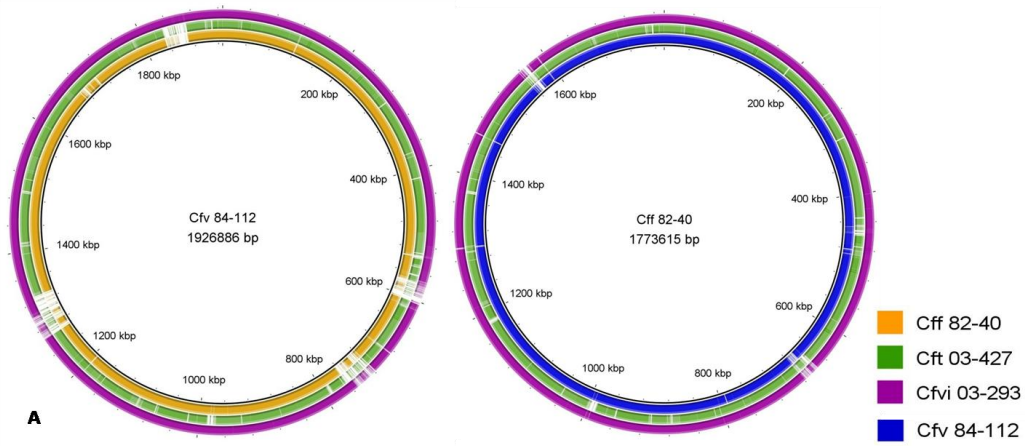
Las comparaciones de los genomas de las cepas Cfv 84-112 y Cfvi 03-293 con el de la cepa Cft 03-427 muestran características similares a las observadas en la comparación de las mismas con el genoma de la cepa Cff 82-40.

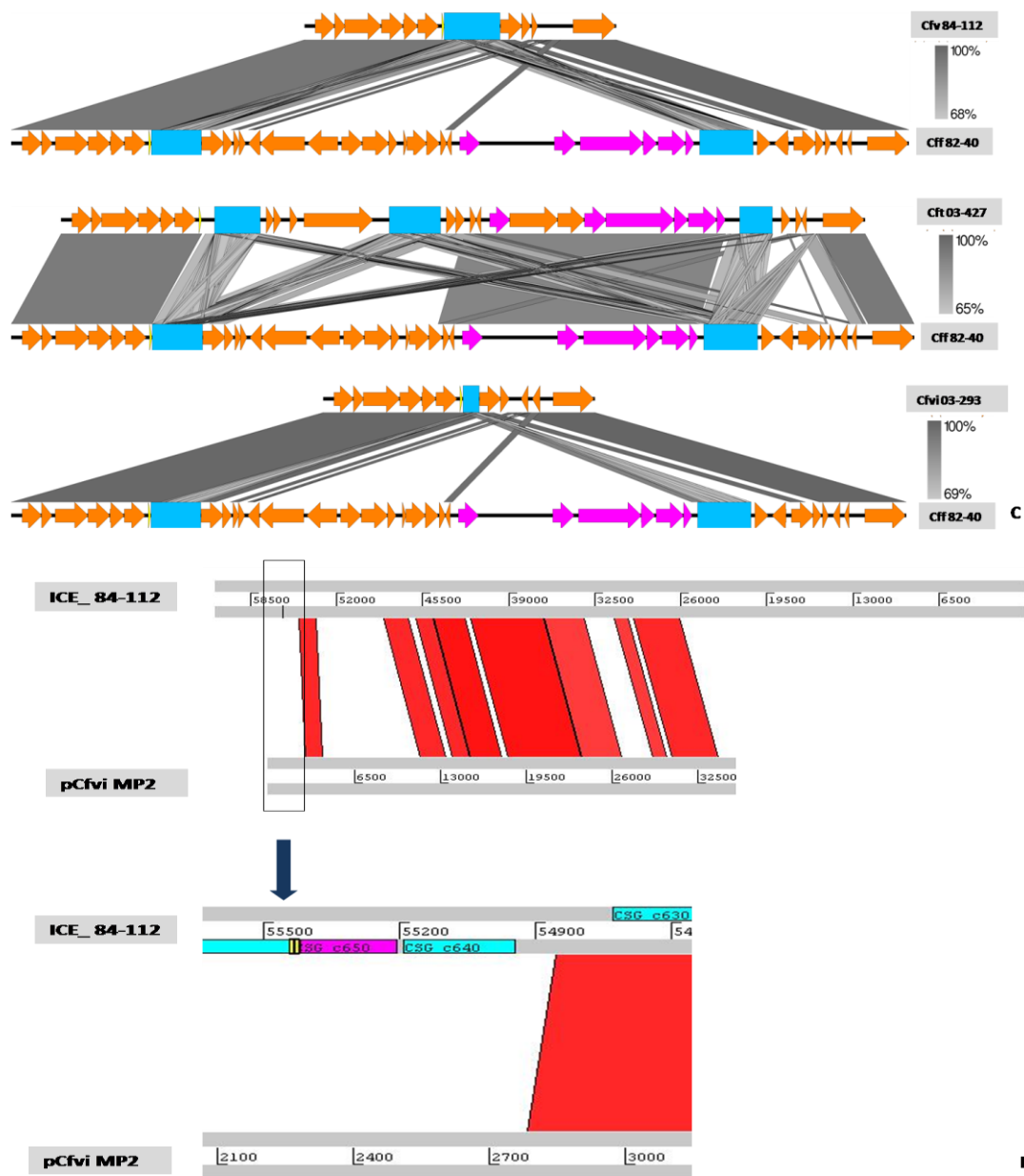
En la comparación entre los genomas de las cepas Cff 82-40 y Cft 03-427 se observan tres inversiones con tamaños que van desde 1100 a 1600 pb, y más de 20 regiones que no comparten identidad, con tamaños que van de 1000 a 9000 pb. Las translocaciones tienen un largo máximo de 2000 pb (Fig. 17A y B).

En todos los genomas hay regiones exclusivas que no comparten homología con ninguno de los otros genomas analizados (Fig. 17A y B).

En la comparación entre las regiones donde se ubican los loci CRISPR, se observó que los genomas de las cepas Cfv 84-112 y Cfvi 03-293 contienen un solo locus CRISPR, mientras que el genoma de la cepa Cff 82-40 tiene dos, y el de la cepa Cft 03-427 muestra tres loci. Con respecto a los genes *cas*, están ausentes de los genomas de Cfv 84-112 y Cfvi 03-293, mientras que los genomas de Cff 82-40 y Cft 03-427 tienen un *cluster* de seis genes *cas* que es idéntico en ambas cepas (Fig. 17C).

Durante la secuenciación de los genomas de las cepas Cfv 84-112 y Cfvi 03-293, se encontró que Cfv 84-112 porta un plásmido (ICE\_84-112; Kienesberger et al. 2014) y Cfvi 03-293 tiene tres plásmidos diferentes (pCfviMP1, pCfviMP2 y pCfviP3; van der Graaf-van Bloois 2014), mientras que en las restantes dos cepas, no se encontraron elementos extracromosómicos (Gilbert et al. 2013). Se compararon las secuencias de dichos plásmidos, observando que el plásmido ICE\_84-112 tiene homología parcial con el plásmido pCfviMP2 (Fig. 17D), pero no con pCfviMP1 ni pCfviP3. Se buscó la secuencia de los cebadores Fic4\_KpnI\_F y Fic4\_Sall\_R en estos plásmidos, encontrándola solamente en el plásmido





**Figura 17.** Análisis de variaciones genómicas. **A.** Comparación de los cuatro genomas completos de *C. fetus* mediante BLASTn, generada con el programa BRIG. En el centro de cada figura se indica la secuencia tomada como referencia, y cada uno de los otros tres genomas se representa con una barra de color. Las regiones coloreadas corresponden a zonas de homología, y las blancas a regiones donde no hay identidad. Las regiones que no están presentes en el genoma de referencia no aparecen en la figura. Las regiones invertidas se representan del mismo modo que las que están orientadas de la misma forma en ambos genomas, por lo que no se pueden diferenciar. **B.** Comparación de los cuatro genomas completos de *C. fetus* mediante BLASTn, generada con el programa ACT. Las barras grises paralelas representan las dos hebras del ADN. Las barras rojas que unen las secuencias de dos genomas representan regiones de al menos 90% de homología en al menos 999 pb. Las regiones azules representan zonas de homología donde una secuencia está invertida respecto a la otra. **C.** Comparación de las regiones genómicas que contienen los loci CRISPR, realizadas mediante BLASTn con el programa Easyfig. Celeste: loci CRISPR. Rosado: genes *cas*. Amarillo: genes de ARNt. Naranja: otros ORFs. Las barras en diferentes tonos de gris representan la homología encontrada en el BLAST. **D.** Arriba: comparación de las secuencias de los plásmidos ICE\_84-112 y pCfviMP2. Abajo: acercamiento de la región donde se encuentra el gen *Fic4*, marcado en rosado. En amarillo se marca la secuencia del cebador *Fic4\_KpnI\_F*. El espacio en blanco entre los plásmidos indica que en esa región no hay homología significativa.

ICE\_84-112 (Fig. 17D). Los tres plásmidos de la cepa Cfv 03-293 no comparten secuencias entre sí.

#### 5.2.3.6.2 Evaluación experimental de la presencia de variaciones genómicas

La presencia de la inversión de 500 Kpb entre los genomas de las cepas Cfv 84-112 y Cff 82-40, del plásmido ICE\_84-112, y de la isla genómica característica de Cfv se evaluó en 23 aislamientos.

En la evaluación de la presencia de la inversión, en todos los aislamientos la región genómica se encuentra en la misma orientación que en la cepa Cff 82-40 (Tabla 9).

El gen *Fic4*, indicativo de la presencia del plásmido ICE\_84-112, se amplificó en 3 de los 23 aislamientos (Tabla 9).

Siete aislamientos presentaron amplificación con los cebadores Inter2 e IslaR1, y dieron resultado negativo con los cebadores Inter1 e Inter2, indicando que estos aislamientos tienen la isla genómica (Tabla 9). Otros tres casos presentaron amplificación con ambos juegos de cebadores. La información obtenida con este método se correlacionó con la obtenida a partir del Mpx-PCR B, en el cual se amplifica un fragmento del gen *VirB11*, contenido en la isla, como marcador de la subespecie Cfv. Doce aislamientos presentaron amplificación con los cebadores Inter1 e Inter2 y no con los cebadores Inter2 e IslaR1, lo cual es indicativo de que no poseen la isla genómica (Tabla 9). En un caso, hubo una discrepancia entre los resultados con los dos juegos de cebadores y los resultados obtenidos del Mpx-PCR B, ya que se logró amplificar un fragmento del gen *VirB11*, pero los resultados de la evaluación de la presencia de la isla indican que la misma no está presente (Tabla 9).

**Tabla 9.** Resultados de la evaluación de la presencia de la inversión encontrada en el genoma de la cepa Cfv 84-112 con respecto a Cff 82-40, de la presencia del plásmido ICE\_84-112 y de la isla genómica característica de Cfv. Las discrepancias entre los resultados de la amplificación para la evaluación de la presencia de la isla característica de Cfv entre sí o con el resultado del Mpx-PCR B, que evalúa la presencia del gen *VirB11*, se muestran sombreadas en celeste. +: resultado positivo. -: resultado negativo.

Aislamiento	<i>VirB11</i>	INV84112			<i>Fic4</i>	Inter1/Inter2 (+ si NO HAY isla)	Inter2/IslaR1 (+ si HAY isla)
		F1/R1	F1/R4	Orientación			
Cft 03-427 <sup>1</sup>	Cff	+	-	82-40	-	+	-
Cff8240 <sup>1</sup>	Cff	+	-	82-40	-	+	-
CffAu002	Cff	+	-	82-40	-	+	-
CffAr001	Cff	+	-	82-40	-	+	+
CffAr003	Cff	+	-	82-40	+	+	+
CffAr007	Cfv	+	-	82-40	-	-	+
CffAr012	Cff	+	-	82-40	-	+	-
CffAr013	Cfv	+	-	82-40	-	-	+
CffAr016	Cff	+	-	82-40	-	+	-
CffAr022	Cff	+	-	82-40	+	+	-
CffAr023	Cff	+	-	82-40	-	+	-
CffAr031	Cff	+	-	82-40	-	+	-
CffAr032	Cff	+	-	82-40	+	+	-
CffAr033	Cff	+	-	82-40	-	+	-
Cfv 84-112 <sup>1</sup>	Cfv	-	+	84-112	+	-	+
NCTC10354	Cfv	+	-	82-40	-	+	-
CfvUy003	Cfv	+	-	82-40	-	-	+
CfvUy005	Cfv	+	-	82-40	-	-	+
CfvUy014	Cfv	+	-	82-40	-	-	+
CfvAr010	Cfv	+	-	82-40	-	+	+
Cfvi 03/293 <sup>1</sup>	Cfv	+	-	82-40	-	-	+
CfviAr019	Cfv	+	-	82-40	-	-	+
CfviAr020	Cff	+	-	82-40	-	+	-
CfviAr025	Cfv	+	-	82-40	-	-	+
CfUy022	Cff	+	-	82-40	-	+	-
CfUy023	Cff	+	-	82-40	-	+	-
CfUy024	Cff	+	-	82-40	-	+	-
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>						

<sup>1</sup>cepas cuyo genoma totalmente secuenciado y completamente ensamblado se encuentra en bases de datos. Todos los análisis consignados para estas cepas fueron realizados *in silico* (ver texto)

### **5.2.3.7 Evaluación de la presencia del cluster de genes *cas*, el gen *cas1* y el gen *RAMP* y secuenciación de los loci *CRISPR1* y *CRISPR2***

#### **5.2.3.7.1 Evaluación de la presencia del cluster de genes *cas*, el gen *cas1* y el gen *RAMP***

La presencia del *cluster* de genes *cas* y del gen *cas1* se evaluó en 53 aislamientos. Los 4 aislamientos humanos fueron positivos para ambas características. Los restantes 49 aislamientos dieron resultado negativo, por lo que se considera que estos aislamientos no poseen el *cluster* de genes *cas* ni el locus *CRISPR2* (Tabla 10). El locus *CRISPR1* pudo ser amplificado en todos los aislamientos, mientras que en los cuatro aislamientos que poseen el *cluster* de genes *cas* y el gen *cas1*, se pudo amplificar también el locus *CRISPR2*. Se tomaron al azar ocho aislamientos que no poseían el *cluster* de genes *cas* para intentar amplificar el *CRISPR2*, y el resultado fue negativo en todos los casos.

La presencia del gen *RAMP* fue verificada en todos los aislamientos analizados (Tabla 10). Se alinearon las secuencias de este gen para los cuatro genomas, y se observó que en los genomas de Cff 82-40, Cfv 84-112 y Cfvi 03-293 la secuencia es idéntica, mientras que la identidad de estas secuencias con la presente en Cft 03-427 es de 0.87.

#### **5.2.3.7.2 Secuenciación de los loci *CRISPR1* y *CRISPR2***

Se amplificó y secuenció el locus *CRISPR1* en 53 aislamientos. La longitud del amplicón es variable, ya que depende de la cantidad de unidades DR-espaciador que contenga el locus en cada aislamiento (Fig. 18). La secuencia líder tiene un largo de 360 pb y no presenta variaciones en ninguno de los aislamientos estudiados. El DR mide 30 pb y su secuencia está conservada entre los aislamientos. En todos los casos, las copias del DR dentro de cada locus son idénticas, excepto por la más alejada de la secuencia líder, que presenta una diferencia nucleotídica con las demás copias. Las secuencias del líder y los DRs de las cepas Cff 82-40, Cfv 84-112 y Cfvi 03-293 son idénticas a las encontradas en los aislamientos. En los tres loci *CRISPR* presentes en el genoma de la cepa Cft 03-427, los DRs son idénticos entre sí, pero presentan una diferencia nucleotídica con los DRs de los aislamientos y del resto de las cepas con genomas completos. Las secuencias líder tienen 16 diferencias nucleotídicas entre sí, y difieren en 62 posiciones de la de los aislamientos de mamíferos (Anexo 6). Las secuencias del líder y de los DRs fueron analizadas mediante BLASTn y ninguna de ellas dio resultados



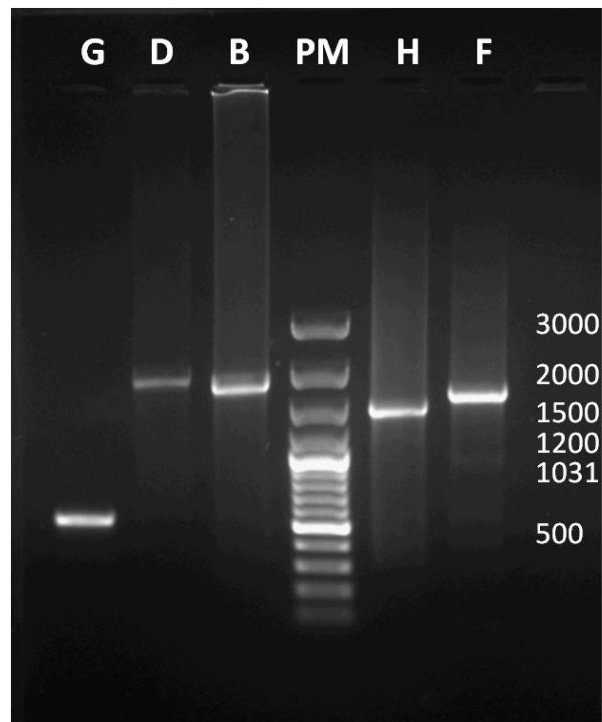
**Tabla 10.** Resultados de la evaluación de la presencia del *cluster* de genes *cas*, el gen *cas1* y el gen *RAMP* y de la secuenciación de los loci CRISPR1 y CRISPR2. +: resultado positivo. -: resultado negativo. ND: no determinado. Aus: locus ausente.

Aislamiento	Presencia <i>cas1</i>	Presencia genes <i>cas</i>	Presencia <i>RAMP</i>	Patrón CRISPR1	Patrón CRISPR2
Cft 03-427 <sup>1</sup>	+	+	+	ND	ND
Cff8240 <sup>1</sup>	+	+	+	A	A
CffAu002	-	-	+	G	Aus
CffUy001	-	-	+	B	Aus
CffUy008	-	-	+	S	Aus
CffAr001	-	-	+	F	Aus
CffAr003	-	-	+	G	Aus
CffAr006	-	-	+	M	Aus
CffAr007	-	-	+	J	Aus
CffAr012	-	-	+	G	Aus
CffAr013	-	-	+	L	Aus
CffAr016	-	-	+	D	Aus
CffAr018	-	-	+	Q	Aus
CffAr020	-	-	+	D	Aus
CffAr022	-	-	+	G	Aus
CffAr024	-	-	+	P	Aus
CffAr028	-	-	+	B	Aus
CffAr029	-	-	+	O	Aus
CffAr030	-	-	+	O	Aus
CffAr031	-	-	+	O	Aus
CffAr032	-	-	+	G	Aus
CffAr033	-	-	+	D	Aus
CffAr035	-	-	+	D	Aus
Cfv 84-112 <sup>1</sup>	-	-	+	R	Aus
NCTC10354 <sup>T</sup>	-	-	+	F	Aus
CfvAu001	-	-	+	E	Aus
CfvUy002	-	-	+	B	Aus
CfvUy003	-	-	+	B	Aus
CfvUy004	-	-	+	B	Aus
CfvUy005	-	-	+	B	Aus
CfvUy006	-	-	+	E	Aus
CfvUy007	-	-	+	C	Aus
CfvUy009	-	-	+	B	Aus
CfvUy014	-	-	+	H	Aus
CfvUy017	-	-	+	B	Aus
CfvUy018	-	-	+	B	Aus
CfvUy020	-	-	+	B	Aus
CfvAr002	-	-	+	D	Aus
CfvAr004	-	-	+	D	Aus
CfvAr008	-	-	+	K	Aus
CfvAr009	-	-	+	I	Aus
CfvAr010	-	-	+	D	Aus

Aislamiento	Presencia <i>cas1</i>	Presencia genes <i>cas</i>	Presencia RAMP	Patrón CRISPR1	Patrón CRISPR2
CfvAr021	-	-	+	D	Aus
Cfvi 03/293 <sup>1</sup>	-	-	+	G	Aus
CfviAu003	-	-	ND <sup>2</sup>	N	Aus
CfviAr005	-	-	+	D	Aus
CfviAr011	-	-	+	D	Aus
CfviAr014	-	-	+	D	Aus
CfviAr015	-	-	+	D	Aus
CfviAr019	-	-	+	D	Aus
CfviAr020	-	-	+	D	Aus
CfviAr025	-	-	+	D	Aus
CfviAr026	-	-	+	G	Aus
CfUy022	+	+	+	T	B
CfUy023	+	+	+	U	C
CfUy024	+	+	+	U	C
CfUy025	+	+	+	U	C
<b>TOTAL</b>	<b>57</b>	<b>57</b>	<b>56</b>	<b>56</b>	<b>5</b>

<sup>1</sup> cepas cuyo genoma totalmente secuenciado y completamente ensamblado se encuentra en bases de datos. Todos los análisis para estas cepas fueron realizados *in silico* (ver texto)

<sup>2</sup> no analizada por falta de material



**Figura 18.** Amplificación del locus CRISPR1. Electroforesis en gel de agarosa. En la parte superior de los gels se indica la letra asignada a cada patrón (ver tabla 10). PM: control de peso molecular.

significativos de identidad con otras secuencias en la base de datos.

El largo de los espaciadores varió entre 34 y 38 pb, siendo 36 pb el largo más común. En los 53 aislamientos y los 3 genomas completos de mamíferos se encontraron un total de 37 secuencias de espaciadores (Anexo 7).

No hay secuencias espaciadoras exclusivas de los aislamientos bovinos uruguayos y argentinos, sino que todos los espaciadores encontrados están también presentes en los CRISPRs de los genomas completos de la cepa humana Cff 82-40 y/o en las cepas bovinas Cfv 84-112 y Cfvi 03-293. Hay 7 secuencias de espaciadores que aparecen sólo en uno o ambos patrones obtenidos de los aislamientos humanos de Uruguay, y 3 espaciadores que están presentes sólo en la cepa Cff 82-40. Comparando el conjunto de espaciadores de bovinos con los encontrados en los humanos, hay 3 espaciadores exclusivos en los bovinos, y 15 que son exclusivos de los CRISPR humanos.

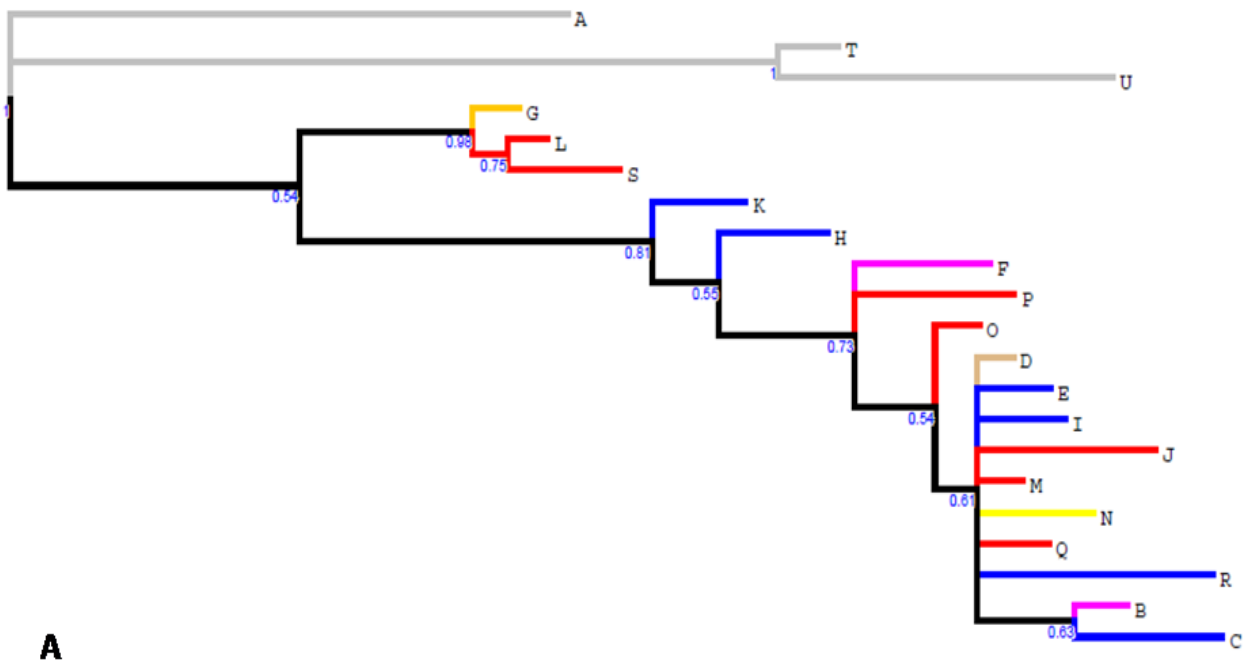
Se encontraron 21 patrones (combinaciones) que difieren en la presencia y/o la posición de las secuencias espaciadoras (Tabla 10, Fig. 19). El valor del índice de Simpson es de 0.94 (Anexo 5). La cantidad de espaciadores presentes en cada patrón varió entre cero y 34, y el largo de los amplicones se corresponde con esta variación (Figs. 18 y 19). La cepa Cft 03-427 no tiene secuencias de espaciadores compartidas con las secuencias del locus CRISPR1 de los aislamientos bovinos ni con el resto de las secuencias en ninguno de sus tres loci CRISPR. En conjunto, los tres loci de este genoma presentan 63 secuencias espaciadoras (Anexo 7).

Los aislamientos realizados a partir de diferentes tejidos del mismo individuo hospedero (CffAr029/CffAr030 y CfUy024/CfUy025) presentaron el mismo patrón de secuencia.

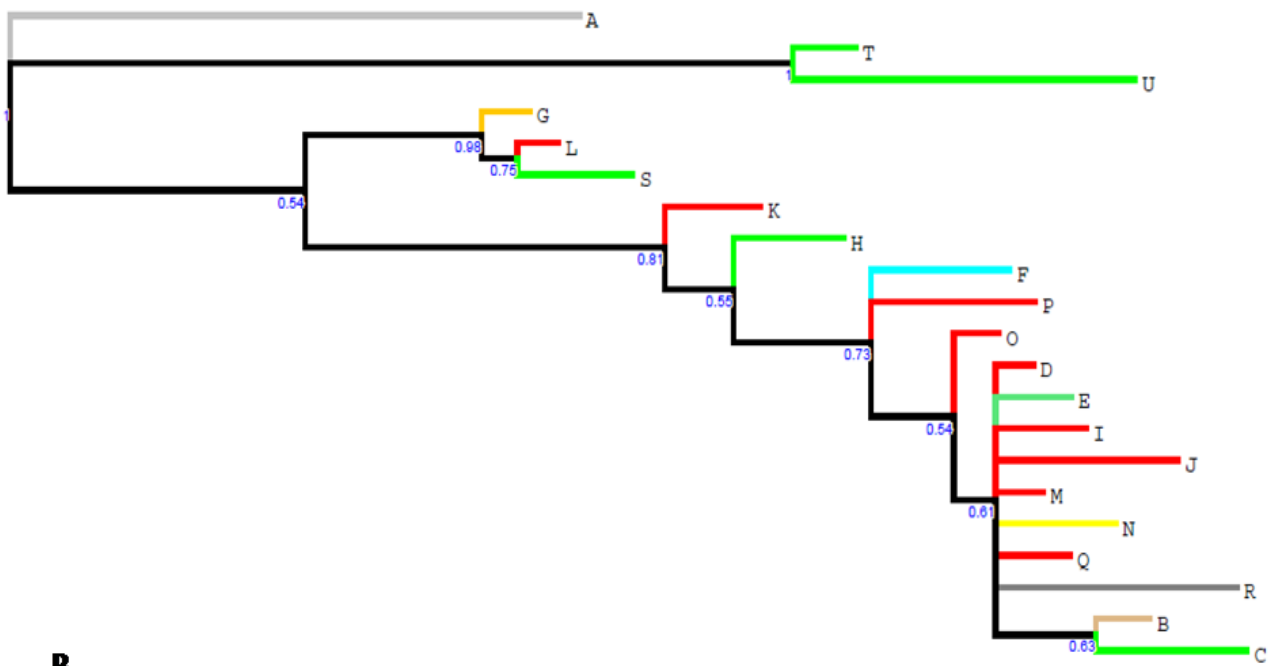
La red de haplotipos realizada con el método *median-joining* y el árbol filogenético realizado con el método bayesiano presentaron agrupamientos equivalentes de los patrones de secuencia del locus CRISPR1 (Figs. 20 y 21). La secuencia de la cepa Cft 03-427 fue excluida del análisis por dos razones: la diferencia en la secuencia de su DR y de su líder con respecto a las de las cepas de mamíferos, y la total ausencia de secuencias espaciadoras compartidas con los aislamientos y con el resto de los genomas completos.

En el árbol filogenético se observa una politomía basal que separa tres clados. Uno de ellos corresponde al patrón A, encontrado exclusivamente en la cepa Cff 82-40. El segundo clado está compuesto por los patrones T y U, ambos presentes solamente en los aislamientos uruguayos de origen humano. El tercer clado está compuesto por el resto de los patrones, que



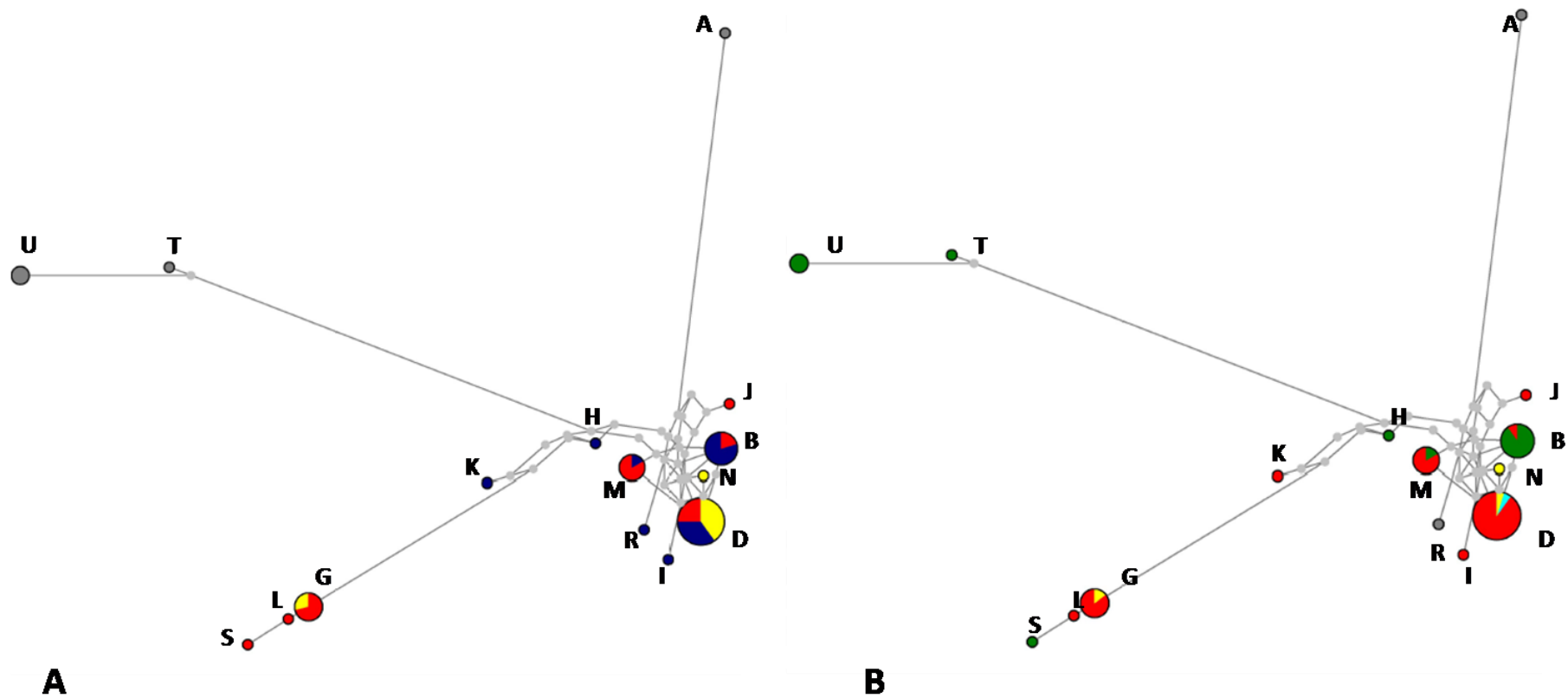


**A**



**B**

**Figura 20.** Árbol filogenético generado a partir de los patrones del locus CRISPR1 con el método MCMC en el programa Mr. Bayes. Se muestra un árbol consenso. En los nodos se muestra la proporción de árboles que presentan el clado correspondiente. Las ramas están coloreadas de acuerdo al hospedero y a la subespecie o el origen geográfico de los aislamientos. **A.** Gris: aislamientos humanos. Rojo: Cff. Azul: Cfv. Amarillo: Cfvi. Naranja: Cff y Cfvi. Magenta: Cff y Cfv. Marrón: Cff, Cfvi y Cfv. **B.** Gris: Estados unidos. Verde: Uruguay. Rojo: Argentina. Amarillo: Australia. Naranja: Australia y Argentina. Celeste: Argentina e Inglaterra. Marrón: Argentina y Uruguay. Verde oscuro: Australia y Uruguay.



**Figura 21.** Red de haplotipos generada a partir de los patrones del locus CRISPR1 con el método *median-joining* en el programa Network. El largo de las conexiones es proporcional al número de cambios entre un patrón y otro. Los nodos pequeños grises corresponden a los intermediarios hipotéticos (*median vectors*). El tamaño de los nodos es proporcional al número de aislamientos que los portan. Los patrones que difieren en menos de cinco espaciadores fueron incluidos en un mismo nodo (el nodo D tiene además los patrones E, Q y F; el nodo M incluye los patrones O, P y C). Los nodos están coloreados de acuerdo al hospedero y a la subespecie o al origen geográfico de los aislamientos. **A.** Gris: aislamientos humanos. Rojo: aislamientos bovinos Cff. Azul: aislamientos bovinos Cfv. Amarillo: aislamientos bovinos Cfvi. **B.** Gris: Estados Unidos. Verde: Uruguay. Rojo: Argentina. Amarillo: Australia. Celeste: Inglaterra.

aparecen sólo en los aislamientos bovinos. Dentro de este tercer clado, hay un agrupamiento preferencial de los patrones G, L y S por un lado, y del resto de los patrones (D, E, I, J, M, N, Q, R, B y C) por otro (Fig. 20).

En la red de haplotipos se observa un núcleo central que comprende a la mayoría de los patrones bovinos. A partir de este núcleo se derivan tres ramas: una correspondiente al patrón A; otra que comprende a los patrones T y U, y otra que contiene los patrones G, L y S (Fig. 21).

En ninguno de los agrupamientos se observa una asociación preferencial de los patrones de CRISPR con la subespecie o biovar al que pertenece el aislamiento según sus características bioquímicas (Fig. 20A y 21A).

Los dos patrones más abundantes (D y B) están representados desigualmente en los dos países donde se analizaron mayor cantidad de aislamientos: el patrón D aparece exclusivamente en Argentina, mientras que 9 de los 10 aislamientos que portan el patrón B son uruguayos (Fig. 20B y 21B).

Los aislamientos provenientes de diferentes hospederos (humanos o bovinos) presentan una marcada diferenciación. Si bien los aislamientos humanos uruguayos son claramente diferentes de la cepa de origen estadounidense, los aislamientos bovinos forman un clado aparte, mostrando que están más relacionados entre sí (Figs. 20 y 21).

El locus CRISPR2 fue amplificado y secuenciado sólo en los casos en que se comprobó la presencia del cluster de genes *cas* (4 aislamientos, todos de origen humano). La longitud del amplicón observado en los geles de agarosa es variable, ya que depende de la cantidad de unidades DR-espaciador que contenga el locus en el aislamiento analizado. La secuencia líder tiene un largo de 360 pb y no presenta variaciones en ninguno de los aislamientos estudiados ni en los genomas completos, excepto el de la cepa Cft 03-427. El DR mide 30 pb y es idéntico en todos los aislamientos. Ambas secuencias son idénticas a las secuencias presentes en el locus CRISPR1, y las copias del DR dentro del locus tampoco difieren (Anexo 6). El largo de los espaciadores varió entre 34 y 37 pb, siendo 36 pb el largo más común. En los 4 aislamientos y el genoma de la cepa Cff 82-40, se encontraron un total de 30 secuencias espaciadoras (Anexo 7), contenidas en 3 patrones que difieren en la presencia y/o la posición de las mismas (Tabla 10, Fig. 22). La cantidad de espaciadores

presentes en cada patrón varía entre 25 y 32 (Fig. 22). De las 24 secuencias espaciadoras presentes en el locus CRISPR2 de la cepa Cff 82-40, 22 están también presentes en los CRISPRs de los aislamientos uruguayos. Hay 9 secuencias de espaciadores que aparecen sólo en uno o ambos patrones obtenidos de los aislamientos humanos de Uruguay.

La cepa de origen reptiliano Cft 03-427 no tiene secuencias de espaciadores compartidas con las secuencias del locus CRISPR2 en ninguno de sus tres loci CRISPR, excepto por la secuencia 39, que corresponde al primer espaciador del tercer locus en Cft 03-427 (Cft03427spacer0.3), y al tercer espaciador del locus 2 de la cepa Cff 82-40 (Cff8240spacer2.2, Anexo 7).

Los aislamientos realizados a partir de diferentes tejidos del mismo hospedero (CfUy024/CfUy025) presentaron el mismo patrón de secuencia.

El valor D para las secuencias del locus CRISPR2 es de 0.83 (Anexo 5).

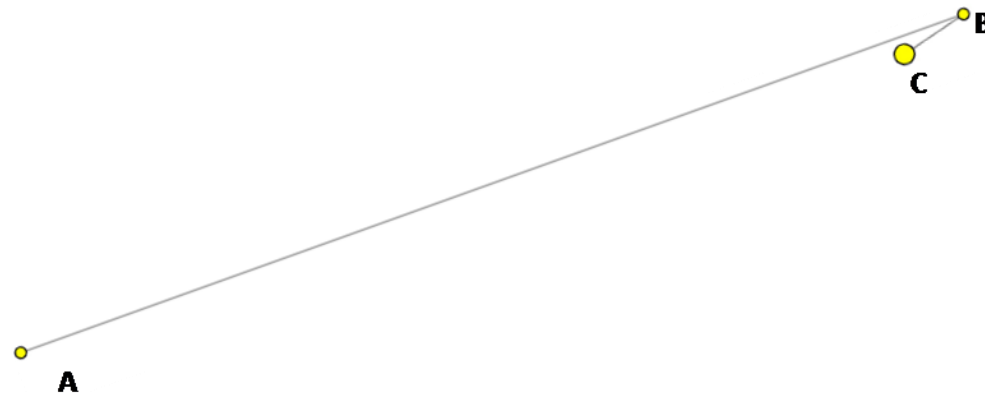
La red de haplotipos realizada con el método *median-joining* presentó un agrupamiento equivalente al observado con los patrones de secuencia del locus CRISPR1, ya que los patrones B y C, presentes en los aislamientos uruguayos, tienen una menor distancia entre sí que con el aislamiento de la cepa Cff 82-40, que presenta el patrón A (Fig. 23).

Las 132 secuencias de espaciadores encontradas en total fueron analizadas mediante BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Quince secuencias tuvieron un *score* igual o mayor a 54 en el primer *hit* del BLAST, y fueron analizadas con más detalle. Estos *hits* corresponden a regiones de los genomas completos de *C. fetus*, los cuales fueron visualizados con el programa Artemis para identificar los posibles ORFs anotados en las regiones que presentan identidad con los espaciadores, y mediante la búsqueda de motivos conservados en la base de datos de proteínas Pfam (<http://pfam.xfam.org/>, Anexo 7). El espaciador compartido entre las cepas Cff 82-40 y Cft 03-427 (secuencia 39) es a su vez idéntico a una región del genoma de la cepa Cfv 84-112, la cual codifica para una proteína hipotética de función desconocida.



Posición		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
Patrón	Largo																																					
A	25	1	-	-	-	38	-	35	39	40	41	-	42	-	-	43	-	44	45	46	-	47	48	49	-	50	51	52	53	-	54	55	55	56	57	58	59	60
B	31	1	124	125	126	-	127	35	39	40	41	128	42	127	48	43	129	44	45	46	-	47	-	49	131	50	51	52	53	132	54	55	-	56	57	58	-	60
C	32	3	124	125	126	-	127	35	39	40	41	128	42	127	48	43	129	44	45	46	130	47	-	49	131	50	51	52	53	132	54	55	-	56	57	58	-	60

**Figura 22.** Patrones de secuencia del locus CRISPR2. Cada secuencia espaciadora está representada por un número y un color (ver Anexo 7). Los espaciadores están separados por repetidos directos (DRs), no representados en la figura. La secuencia líder (no representada) se encuentra a la izquierda del conjunto de unidades DR-espaciador. A la izquierda se indican el número de aislamientos con cada patrón y el largo de los patrones (número de unidades DR-espaciador).



**Figura 23.** Red de haplotipos generada a partir de los patrones del locus CRISPR2 con el método *median-joining* en el programa Network. El largo de las conexiones es proporcional al número de cambios entre un patrón y otro. El tamaño de los nodos es proporcional al número de aislamientos que los portan. Todos los patrones corresponden a los aislamientos humanos.

## 6. Discusión

La especie *C. fetus* fue descrita a partir de características fenotípicas como la producción de catalasa y oxidasa, las temperaturas de crecimiento y la susceptibilidad a antibióticos (Penner 1988). La base genética subyacente a estas características es poco conocida, si bien los estudios genéticos realizados en la especie asumen que esta base existe, y puede explicar en gran parte no sólo las características diagnósticas de la especie, sino su variación intraespecífica, incluyendo las diferencias en la preferencia de nicho y hospedero, y posibles variaciones geográficas, características que son fundamentales por tratarse de un patógeno.

El presente trabajo de tesis está enfocado en la búsqueda y aplicación de marcadores genéticos que nos permitan relevar la variabilidad intraespecífica en *C. fetus*, y asociarla con características de interés evolutivo y epidemiológico. Para ello, se comenzó por analizar varias regiones pertenecientes al genoma *core*, y luego avanzamos en el conocimiento del genoma accesorio, el cual tiene una fuerte influencia de la transferencia horizontal de genes en su evolución.

Para cumplir con estos objetivos, es necesario un paso previo de identificación de la especie y sus subespecies. En *C. fetus*, esta tarea no es trivial, ya que si bien no se han encontrado mayores problemas en la identificación del género y la especie, no existe un método molecular de diferenciación de Cff y Cfv que tenga una sensibilidad y una especificidad adecuadas, debido a varios factores, entre los cuales uno de los más importantes es la complejidad y heterogeneidad en la determinación genética de la diferenciación bioquímica de Cff y Cfv. Por lo tanto es necesario realizar una evaluación de los métodos disponibles.

### 6.1 Identificación fenotípica y bioquímica de los aislamientos

Los métodos fenotípicos para la identificación de *C. fetus* y la diferenciación de Cff y Cfv son difíciles de aplicar y estandarizar. Esto se debe principalmente a que por su carácter microaerófilico, la bacteria debe ser transportada en un medio especial que garantice su viabilidad, y a su crecimiento lento (Alves et al. 2011, Mcmillen et al. 2006). Además de la laboriosidad de estos métodos, los mismos requieren de una

rigurosa estandarización, ya que la interpretación de los resultados puede verse influida por factores como variaciones fenotípicas entre las cepas (McGoldrick et al. 2013, Mshelia et al. 2010, Schulze et al. 2006, Hum et al. 1997, Penner 1988, Harvey y Greenwood 1983). Algunas cepas de Cfv son sensibles a la polimixina B, por lo cual no pueden ser detectadas por cultivo ya que no sobreviven en el medio de transporte, y en algunos casos el crecimiento de otras bacterias no permite que crezca *C. fetus* (McGoldrick et al. 2013, Chaban et al. 2012, Schmidt et al. 2010, Vargas et al. 2003). A pesar de estas dificultades, el estándar actual para la diferenciación de las subespecies Cff y Cfv son los ensayos bioquímicos de tolerancia a 1% de glicina y producción de H<sub>2</sub>S (OIE 2014), y son el marco de referencia para evaluar los métodos alternativos, por lo que esta información se utiliza en esta tesis como punto de partida de la caracterización. Los aislamientos utilizados en esta tesis provienen de laboratorios que son centros de referencia regionales para el diagnóstico y caracterización fenotípica de *C. fetus* con una larga trayectoria, y fueron analizados por técnicos con probada experiencia en el área, por lo que la correcta caracterización de los mismos está garantizada de la mejor forma posible.

Las dificultades metodológicas han llevado a la búsqueda de marcadores genéticos asociados a los caracteres fenotípicos, con el objetivo de identificar especies y subespecies por métodos genéticos alternativos. Los métodos moleculares tienen varias ventajas: su mayor rapidez y sensibilidad, la reducción del riesgo de contaminación del operario, la facilidad en la estandarización e interpretación de resultados, los menores cuidados requeridos en la toma y transporte de las muestras, y las posibilidades de automatización. Por estos motivos, los métodos moleculares de diagnóstico basados en técnicas de PCR a tiempo final y en tiempo real se han convertido en sustitutos de los métodos fenotípicos tradicionales en muchos patógenos (Lin et al. 2014, Pérez-Losada et al. 2013, Chaban et al. 2012, Foley et al. 2009).

## 6.2 Identificación genética de los aislamientos

### 6.2.1 Identificación del género *Campylobacter*

El género *Campylobacter* fue originalmente descrito a partir del contenido GC de su genoma. Sus características diagnósticas son, además del contenido GC, varias características fenotípicas (Veron y Chatelain 1973). Posteriormente, la cohesión filogenética del género fue confirmada mediante la utilización de secuencias del gen 16S (On et al. 2001), prestando apoyo a la metodología de identificación genética propuesta años antes, basada en la caracterización de este gen ribosomal (Linton et al. 1996).

La utilidad de la metodología diseñada por Linton *et al.* (1996) para la identificación del género también se ve corroborada por nuestros resultados, ya que todos los aislamientos analizados fueron identificados positivamente como pertenecientes al género *Campylobacter*. Resultados similares han sido observados en numerosos estudios, sustentando la confiabilidad del método (e.g. Zhang et al. 2009, Workman et al. 2005, Inglis y Kalischuk 2003). Nuestros resultados, por lo tanto, dan apoyo a la idea de que esta unidad taxonómica tiene una importante base filogenética. Los métodos de identificación basados en el gen 16S tienen varias características que los hacen ideales como herramientas taxonómicas. Los genes ribosomales no son propensos a sufrir procesos de THG (Makarova et al. 2001); las sustituciones en estos genes se comportan como un reloj molecular, y las relaciones filogenéticas elaboradas con las secuencias del 16S se corresponden con las observadas cuando se utilizan genomas completos (Clarridge 2004). Además, sufren un proceso continuo de homogeneización de secuencias que garantiza que las distintas copias de los genes presentes en el genoma sean idénticas (Pei et al. 2009; Rastogi et al. 2009), y las restricciones estructurales hacen que la presión selectiva para conservar su secuencia sea muy fuerte, lo que le da una gran estabilidad (Pei et al. 2009).

### 6.2.2 Identificación de la especie *Campylobacter fetus*

*Campylobacter fetus* fue descrita en base a características fenotípicas y ecológicas (Skirrow 2006). Su estatus taxonómico como especie fue confirmado posteriormente en base a estudios de hibridación ADN-ADN (Harvey y Greenwood 1983). Más adelante, se estableció que la especie tiene una identidad filogenética en base a estudios de secuencias parciales del gen 16S (Gorkiewicz et al. 2003). El estándar utilizado actualmente para la identificación molecular de la especie está basado en el gen *cstA*, que se considera parte del genoma *core* y un marcador robusto para la identificación de la especie (van der Graaf-van Bloois et al. 2013).

La identificación genética de la especie utilizada en esta tesis está incluida en los métodos Mpx-PCR A y B, y en el PCR en tiempo real, los cuales también fueron utilizados para diferenciar Cff de Cfv. En los Mpx-PCR A y B, el marcador de especie utilizado es el gen *cstA*. Para este marcador, los resultados de ambos métodos son completamente coincidentes (Tabla 3).

Con los métodos Mpx-PCR A y B, los aislamientos caracterizados fenotípicamente como *C. fetus* fueron positivos para la identificación genética de la especie *C. fetus* en todos los casos, excepto en el aislamiento CffAr007 (Tabla 3). La pertenencia de este aislamiento a *C. fetus* fue confirmada mediante la secuenciación de un fragmento del gen 16S, el cual diferencia inequívocamente a las especies del género entre sí y del resto de las bacterias (Fig. 9; Gorkiewicz et al. 2003).

Los aislamientos de otras especies no presentaron amplificación. Este resultado indica que el gen *cstA* tiene una alta especificidad como marcador de especie. Sin embargo, la ausencia de amplificación en el aislamiento CffAr007 y en otros aislamientos obtenidos en Argentina (Paolicchi, com. pers.) tiene una importancia fundamental, ya que pone de manifiesto que la sensibilidad del método es de un 98%, aunque hasta ahora tanto la sensibilidad como la especificidad reportadas para este marcador eran de un 100% (van der Graaf-van Bloois et al. 2013, 2014b, Schmidt et al. 2010, Schulze et al. 2006, Willoughby et al. 2005, Hum et al. 1997). Esta falta de amplificación podría deberse a la ausencia del gen en esta cepa, o a la presencia de variaciones de secuencia que impidan la correcta hibridación de los cebadores. Para evaluar esta posibilidad, se diseñaron nuevos cebadores que amplifican una región

más grande donde está incluido el sitio de hibridación de los cebadores utilizados. Estos nuevos cebadores tampoco mostraron amplificación en el aislamiento CffAr007, aunque sí lo hicieron en el aislamiento CfvAr004, usado como control positivo de la PCR. Este resultado podría estar indicando la ausencia del gen en este aislamiento, o una gran divergencia de secuencia. Para comprobar esta hipótesis, es necesario realizar un análisis más profundo de esta región genómica en ese aislamiento. La idea de que la secuencia del gen *cstA* en los diferentes aislamientos puede tener variaciones se ve reforzada por el hecho de que en la cepa de origen reptiliano Cft 03-427, los cebadores tienen varias diferencias de secuencia con la región donde deberían hibridar, lo cual explica el hecho de que los 13 aislamientos de esta subespecie utilizados para su descripción fueron negativos para el método de identificación de la especie basado en el gen *cstA* (Fitzgerald et al. 2014). En los aislamientos provenientes de mamíferos, sin embargo, no se han encontrado variaciones de secuencia en este gen. En todos los genomas completos de aislamientos de *C. fetus* de origen mamífero disponibles, la secuencia de este gen es idéntica. Dada la importancia de este gen en el metabolismo del nitrógeno, y el reciente descubrimiento de su función en las interacciones con el hospedero en *C. jejuni* (Rasmussen et al. 2013), consideramos importante continuar con la investigación de las variaciones presentes en el mismo y de sus posibles funciones en *C. fetus*.

Con el método basado en PCR en tiempo real, la identificación de los aislamientos como *C. fetus* fue positiva en todos los casos. En el aislamiento CffAr007, el fragmento del gen 16S utilizado como marcador de especie presenta amplificación. Ninguno de los aislamientos de otras especies presentó amplificación (Tabla 3). Estos resultados indican que tanto la sensibilidad como la especificidad del método son del 100%, representando una ventaja con respecto al método basado en el gen *cstA*. Además, las secuencias correspondientes a los cebadores y la sonda empleados en este ensayo están presentes sin cambios en el gen 16S de las dos cepas de la subespecie Cft cuyos genomas completos se encuentran en la base de datos (Fig. 9), al contrario de lo que ocurre con los cebadores que amplifican el gen *cstA*. Esto afirma que a pesar de dar resultados negativos en la identificación de especie con este último método, los aislamientos de Cft pertenecen a la especie *C. fetus*.

Además de presentar una alta sensibilidad, que permite el diagnóstico a partir de muestras de los animales infectados sin un paso de enriquecimiento previo, lo cual disminuye la dificultad y el costo de la toma de muestras, los métodos basados en PCR en tiempo real tienen ventajas comparativas con respecto a los basados en PCR a tiempo final, como la reducción del tiempo requerido para realizar el análisis y la mayor facilidad en su automatización. Tienen una especificidad muy alta, en especial en métodos basados en sondas TaqMan-MGB como es este caso, y pueden ser adecuadamente estandarizados. Además, la amplificación y detección del amplicón se realiza en una sola reacción con el tubo cerrado, lo cual minimiza el riesgo de contaminación cruzada (Chaban et al. 2012). Por lo tanto son una buena alternativa como herramienta en la rápida detección del patógeno, importante para el desarrollo de estrategias de control, en especial en el caso de la detección de la especie. El gen 16S, debido a su escasa variación intraespecífica, se utiliza como metodología estándar en la definición e identificación de especies (Kolbert y Persing 1999, Weisburg et al. 1991).

Por estos motivos, consideramos que la metodología de PCR en tiempo real basada en el gen 16S es una buena opción para el establecimiento de un nuevo estándar en la identificación molecular de *C. fetus*, ya que este es un marcador genético muy robusto.

### **6.2.3 Identificación de las subespecies *fetus* y *venerealis***

Las subespecies Cff y Cfv se definen por características ecológicas (Penner 1988). A pesar de sus diferencias, las subespecies Cff y Cfv tienen una relación genética muy estrecha, lo que hace muy difícil su diferenciación con métodos moleculares (Van Gorkiewicz et al. 2010, Moolhuijzen et al. 2009, Bergen et al. 2005, On et al. 2001, Tu y Dewhirst 2001, Hum et al. 1997, Harvey y Greenwood 1983). Todos los métodos existentes han sido cuestionados por su sensibilidad o por su especificidad (McGoldrick et al. 2013, van der Graaf-van Bloois et al. 2013). Otro problema con la mayoría de los métodos moleculares desarrollados hasta el momento es que necesitan partir de muestras enriquecidas, además de requerir personal especializado (Chaban et al. 2012).

En cuanto a la subespecie Cft, el criterio inicialmente utilizado para su definición es el de su marcada diferenciación genética respecto a Cff y Cfv, por lo que su detección con métodos moleculares no presenta las mismas dificultades (Fitzgerald et al. 2014).

Se evaluaron cuatro métodos para la diferenciación de Cff y Cfv, tres de los cuales (Mpx-PCR A y B, y PCR en tiempo real) se utilizan para identificar simultáneamente a la especie *C. fetus*.

En el Mpx-PCR A, la correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética (proporción de aislamientos que dan el mismo resultado con ambas técnicas) es de 0.66 (Tablas 3 y 4). Esta baja correspondencia se debe tanto a la existencia de aislamientos caracterizados bioquímicamente como Cff que se comportan como Cfv con el método molecular, como a la situación inversa. Por lo tanto se considera que el método diseñado por Hum *et al.* (1997), si bien concuerda con la identificación fenotípica de la especie en la amplia mayoría de los casos, no presenta una buena correlación con los resultados fenotípicos de la diferenciación de Cff y Cfv.

Este método ha sido probado en muchos laboratorios, con variaciones en cuanto a la sensibilidad y especificidad encontrada por los distintos investigadores, tanto para aislamientos de campo, como es nuestro caso, como para cepas de referencia (van der Graaf-van Bloois et al. 2013, 2014b, Schmidt et al. 2010, Schulze et al. 2006, Willoughby et al. 2005, Hum et al. 1997).

Algunos autores han propuesto que la falta de especificidad de este método se debe a que el gen *parA*, en el cual se basa el marcador de subespecie, está codificado en un plásmido que puede transferirse horizontalmente sin reflejar la diferencia entre las subespecies (Moolhuijzen et al. 2009, Willoughby et al. 2005). Esta hipótesis se basa en la observación de que el gen *parA* está codificado por un plásmido en la especie *C. jejuni* (Willoughby et al. 2005), pero este hecho no ha podido ser demostrado en *C. fetus*, ya que no se encontró asociación entre el perfil en la presencia de plásmidos de las cepas y la presencia del gen *parA* (Willoughby et al. 2005). De las cuatro cepas con genomas totalmente secuenciados analizados en esta tesis, dos poseen el gen *parA* (Cfv 84-112 y Cfv 03-293) y en ambas el mismo está ubicado en el cromosoma y no en los plásmidos que las cepas portan. Esta observación, sin embargo, no descarta la posibilidad de que algunas cepas porten



copias del gen en sus plásmidos, ya que el contenido de plásmidos de las diferentes cepas de *C. fetus* es variable.

Otras explicaciones para esta situación podrían ser la presencia de mutaciones en la secuencia donde hibridan los cebadores, o la transferencia horizontal de este gen. Estas hipótesis necesitan ser evaluadas a través de un análisis genómico de los aislamientos que presentan incongruencias en su caracterización, y de la posible variación de secuencia en el gen *parA*. Hasta ahora se ha encontrado una única variante de secuencia del gen, que difiere de la encontrada originalmente en 8 posiciones nucleotídicas, aunque estas diferencias no podrían explicar la ausencia de amplificación en cepas que lo contienen, ya que se ubica en una zona diferente de la región donde hibridan los cebadores (Chaban et al. 2012).

Actualmente, este es el método molecular recomendado por la OIE (2014) para diferenciar Cff de Cfv, por lo cual es importante que exista una buena correlación con los resultados obtenidos con métodos fenotípicos. Dados los resultados obtenidos en esta tesis y en estudios anteriores (van der Graaf-van Bloois et al. 2013, 2014b, Willoughby et al. 2005) consideramos que la recomendación de este método debe ser revisada.

Para el Mpx-PCR B la correspondencia entre la identificación bioquímica y la genética para este método es de 0.83 (Tablas 3 y 4). Si bien la especificidad aun es baja, este es un resultado más satisfactorio que el obtenido con el método Mpx-PCR A.

El método de diferenciación de subespecies contenido en el Mpx-PCR B está diseñado en base a la presencia de una isla genómica que fue descrita como exclusiva de la subespecie Cfv (Gorkiewicz et al. 2010). Sin embargo, esta isla de patogenicidad también se encuentra presente en Cff con algunas modificaciones (Abril et al. 2010). Algunos autores proponen que debido a su carácter de elemento móvil, sujeto al proceso de THG, esta es una herramienta poco confiable a la hora de diferenciar Cff de Cfv (van der Graaf-van Bloois et al. 2014b). Si bien no encontramos una buena correlación entre la determinación bioquímica de las subespecies y la presencia de la isla, este método tiene la ventaja de estar basado en una característica que tiene relevancia en la determinación de caracteres fenotípicos que participan en la relación de las cepas con su hospedero. Este carácter presenta un patrón de variación diferente

al descrito originalmente, por lo que su posible implicancia en la diferenciación de las subespecies debe ser estudiada más a fondo.

En el método de diferenciación de subespecies basado en PCR en tiempo real, la correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética es de 0.74 (Tablas 3 y 4). A pesar de estar basados en el mismo gen, el método de Mpx-PCR B y el de PCR en tiempo real presentan diferencias en su especificidad. Esto se debe principalmente a la mayor sensibilidad del método de PCR en tiempo real, ya que la mayoría de las diferencias se deben a aislamientos clasificados fenotípicamente como Cff que son positivos para el marcador de Cfv en el ensayo de PCR en tiempo real, y negativos en el Mpx-PCR B. El caso inverso también se da en tres aislamientos, lo cual podría explicarse por la alta especificidad del método, en el cual una variante de secuencia (SNP, polimorfismo de nucleótido simple) en la región donde hibridan los cebadores o la sonda, puede evitar la producción de fluorescencia en el ensayo de PCR en tiempo real.

Es de destacar que el aislamiento CffAr007, que no presenta amplificación del marcador de especie basado en el gen *cstA*, presentó amplificación del marcador de subespecie con los tres métodos. Este resultado confirma que el aislamiento CffAr007 pertenece a la especie *C. fetus*, ya que según los resultados de los tres métodos debería ser clasificado como perteneciente a la subespecie Cfv.

El método basado en la detección del elemento de inserción ISCfe1 se aplicó en 63 aislamientos que pertenecen a la especie *C. fetus* y en 7 aislamientos de otras especies (Tabla 3). Sin embargo, en ninguno de los aislamientos se logró obtener un resultado positivo, ya que en los casos en que hubo amplificación, el amplicón tuvo un tamaño diferente al esperado (Tabla 3, Fig. 12E). La correspondencia entre la identificación bioquímica y la genética no fue analizada debido a la ausencia de resultados positivos. La secuencia amplificada comparte identidad con secuencias del elemento ISCfe1, por lo que la identidad del amplicón es la esperada, a pesar de las diferencias de tamaño con respecto al descrito originalmente (Abril et al. 2007). Esto puede deberse a la presencia de varias copias de este elemento de inserción en los genomas de los aislamientos. En el trabajo donde se describió el elemento, se detectó que diferentes cepas de Cfv poseen diferente número de copias del elemento, y se utilizó esto como argumento de su posible actividad. Sin embargo en ese trabajo no se

reporta ninguna variación en el tamaño de los amplicones con los cebadores utilizados (Abril et al. 2007). Es probable que diferentes aislamientos puedan tener copias con diferentes tamaños, ya que este tipo de elementos son propensos a sufrir deleciones durante procesos de reordenamientos genómicos (Siguier et al. 2014). Otros autores han reportado la falta de especificidad y sensibilidad de este método, debida en parte a que las diferentes copias del ISCfe1 tienen diferencias de secuencia que evitan la hibridación de los cebadores en algunos casos (van der Graaf-van Bloois et al. 2013, 2014b). A pesar de estas dificultades metodológicas, este componente del genoma de *C. fetus* es interesante por la aparente variabilidad que refleja, debido probablemente a una dinámica de evolución rápida, por lo que requiere ser estudiado con mayor profundidad.

Dada la diversidad de metodologías desarrolladas para la detección de la especie y la diferenciación de Cff y Cfv, Van der Graaf- van Bloois *et al.* (2013) realizaron un estudio donde probaron las metodologías más utilizadas al momento. Su conclusión fue que ninguna de las herramientas moleculares presenta una concordancia total con la determinación fenotípica de Cff y Cfv. Los resultados de estos autores, por lo tanto, corroboran lo observado en nuestro trabajo.

#### **6.2.4 Identificación del biovar intermedius**

Los resultados de la identificación genética del biovar intermedius basada en la metodología propuesta por Moolhuijzen *et al.* (2009) muestran que la correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética es de 0.74 (Tabla 4). Esta baja correlación podría deberse al hecho de que este método fue propuesto en base a una diferencia de secuencia corroborada en una sola cepa, y posiblemente esta variante en el gen *VirB11* sea una particularidad de la cepa utilizada y de algunas otras cepas, que no esté relacionada con su pertenencia al biovar intermedius.

En esta tesis se diseñaron y estandarizaron tres métodos para la identificación del biovar intermedius, que presentan una correspondencia entre la identificación bacteriológica y la genética con valores que van desde 0.68 a 0.73 (Tabla 4). Se destaca que para el amplicón correspondiente a la región conservada del plásmido presente en el aislamiento CfvAr011, hubo amplificación solamente en el control positivo.

Si tomamos los resultados de las cuatro metodologías en conjunto, la correlación entre la identificación genética y fenotípica de Cfvi es muy baja. Este resultado puede deberse a que los métodos fueron diseñados en base a la escasa información genómica de que se disponía en el momento. Esta información puede no ser suficiente para dilucidar cuáles son las características genómicas de Cfvi, y cuál sería un método efectivo para poder diferenciarla de Cff y Cfv. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que en el genoma de la cepa Cfvi 03-293 (incluyendo los tres plásmidos presentes en dicha cepa), que fue ingresado a la base de datos con posterioridad al diseño y aplicación de estos cuatro métodos, no está presente ninguna de las secuencias utilizadas como blanco. También se deduce de los resultados que la presencia del plásmido detectado en la cepa CfviAr011 (INTA99/541) es una característica particular de algunas cepas, y no del biovar Cfvi.

Otra explicación posible es que Cfvi sea un conjunto heterogéneo formado por cepas que por diferentes motivos tienen un comportamiento anómalo en las pruebas bioquímicas de diferenciación de subespecies, el cual puede ser debido a una escasa estandarización de los métodos (Schulze et al. 2006). Esta hipótesis se ve sustentada por la escasa diferenciación entre Cff y Cfv, lo cual indirectamente cuestiona la separación del biovar Cfvi dentro de Cfv. En estudios genómicos recientes, se encontró información que apoya esta hipótesis, ya que en los genomas completos de varias cepas, no se encontraron regiones específicas de Cfv o Cfvi (van der Graaf-van Bloois et al. 2014b). Si bien se ha encontrado que el biovar Cfvi tiene variación geográfica en su frecuencia, siendo más prevalente en algunas poblaciones bovinas, sobretudo de países africanos, no se ha logrado establecer una correlación del mismo con las características clínicas de la enfermedad presente en dichos rodeos, por lo cual la importancia epidemiológica de Cfvi no está del todo clara (Mai et al. 2013b, Schmidt et al. 2010).

### **6.3 Análisis de la variabilidad genética en *Campylobacter fetus***

En esta tesis se aplican y comparan por primera vez varias metodologías de análisis de la variabilidad en *C. fetus*: MLST, análisis de secuencias del gen 23S y el espaciador ribosomal, análisis de la presencia de cuatro genes de virulencia y su

relación con el tipo sap, análisis de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX, análisis *in silico* y experimental de variaciones genómicas, evaluación de la presencia del *cluster* de genes *cas*, y secuenciación de los loci CRISPR1 y CRISPR2.

### 6.3.1 MLST

El MLST es considerado el *gold standard* para la caracterización de la mayoría de las especies del género *Campylobacter*, dada su portabilidad, su extendido uso y su valor para la realización de estudios epidemiológicos (Griekspoor et al. 2013, On 2013). En particular en *C. fetus*, resultados obtenidos con el esquema de MLST llevaron a proponer que la especie tiene una estructura poblacional clonal, y se considera a la subespecie Cfv como un clon bovino dentro de la misma (Van Bergen et al. 2005a). En un estudio realizado recientemente con 21 borradores de genomas completos de *C. fetus*, se propuso que el MLST es un reflejo fidedigno del genoma *core* (van der Graaf-van Bloois et al. 2014b).

Los cuatro STs encontrados en los aislamientos analizados en esta tesis habían sido previamente descritos (Tabla 6; Van Bergen et al. 2005a). El valor D para los resultados de MLST es de 0.16. Estos resultados corroboran lo observado en trabajos previos, en los que se propone que la variación en estos genes se acumula lentamente, y que la técnica es más apropiada para estudiar la evolución de *C. fetus* a largo plazo que para realizar estudios epidemiológicos, especialmente cuando se trata de aislamientos de origen mamífero (On 2013, van Bergen et al. 2005a). Asimismo, no se encuentra una relación entre la procedencia geográfica de los aislamientos y sus STs (Van Bergen et al. 2005a), de forma similar a lo que ocurre en otras especies de bacterias (Griekspoor et al. 2013, Sheppard et al. 2010).

La mayor diferenciación se observa cuando se analizan aislamientos de diferentes hospederos, como había sido puntualizado anteriormente (Wang et al. 2013). En la reconstrucción filogenética realizada con las secuencias de los 44 STs descritos para *C. fetus*, se observa que el ST-15, presente en el genoma de la cepa Cft 03-427, se ubica en un clado en el que se agrupan los aislamientos de reptiles y aislamientos humanos (Fig. 14). Este clado se diferencia claramente del que agrupa a

los ST 4, 5, 6 y 12, encontrados en los aislamientos humanos y bovinos, en el cual se ubican los STs encontrados en aislamientos de diferentes mamíferos, con la excepción del ST-43, presente en un aislamiento de tortuga, y que se propuso que es producto de la recombinación (Wang et al. 2013; Fig. 14). La presencia de aislamientos humanos en ambos clados pone de manifiesto que las cepas que infectan humanos pueden tener diferentes orígenes, y el MLST es una técnica adecuada para determinar si estas infecciones tienen origen mamífero o reptiliano. Dos de los aislamientos humanos analizados por Van Bergen *et al.* (2005) portan el ST-4, y pertenecen a la subespecie Cfv, lo cual estaría indicando un origen bovino de la infección (van der Graaf-van Bloois et al. 2013, Van Bergen et al. 2005a). En cuanto a los aislamientos humanos uruguayos, todos poseen el ST-4, por lo que podemos plantear la hipótesis de que la fuente de infección para estos casos podría ser bovina.

Se ha propuesto que Cfv se diferencia de Cff utilizando el esquema de MLST, ya que los STs presentes en Cfv están estrechamente relacionados y serían exclusivos de bovinos, no apareciendo en ninguno de los demás hospederos analizados (Van Bergen et al. 2005a). Esto apoyaría la hipótesis de que las subespecies Cff y Cfv se diferencian a nivel genético. La presencia de 5 aislamientos bovinos con fenotipo Cff y ST-4 no es tomada en cuenta por los autores para realizar esta proposición. Nuestros resultados no apoyan lo sugerido por estos autores, ya que el ST mayoritario en nuestra muestra, el ST-4, está presente en 9 aislamientos clasificados como pertenecientes a la subespecie Cff, tanto por los métodos fenotípicos como por los genéticos.

Dado el conjunto de datos obtenidos tanto en esta tesis como en trabajos anteriores (Wang et al. 2013, Van Bergen et al. 2005a) concluimos que la principal utilidad de este método es el análisis de la variación en los aislamientos de origen reptiliano, y la diferenciación de éstos de los aislamientos mamíferos, lo cual reafirma el concepto de que Cft es una entidad filogenética. Sin embargo, es una herramienta poco adecuada para la realización de estudios epidemiológicos en aislamientos bovinos.

### 6.3.2 Secuenciación parcial del gen ribosomal 23S y de la región espaciadora interna del tercer operón ribosomal (ISR3) e identificación de la presencia de secuencias intervinientes (IVSs)

Los resultados obtenidos para los operones ribosomales revelan una gran homogeneidad: existen dos haplotipos en el gen 23S, y cinco en el ISR3, de los cuales el más divergente (105 diferencias nucleotídicas) se encuentra en el genoma de la cepa Cft 03-427 (Tabla 6, Fig. 15). El valor D para las secuencias del gen 23S es de 0.06, y para el ISR3 es de 0.16. La IVS en el gen 23S está presente en todos los aislamientos y genomas completos, a excepción de la cepa Cft 03-427. En los ISRs, no se encontró variación en la presencia de IVSs (Tabla 6). El grado de conservación de la secuencia del gen 23S y de los ISR3 en *C. fetus* es muy alto, aun cuando se comparan secuencias de aislamientos obtenidos de diferentes hospederos mamíferos (bovinos y humanos), lo cual es evidenciado por los valores de D muy bajos.

Las secuencias utilizadas para realizar el análisis de los aislamientos de *C. fetus* en esta tesis son las dos regiones más variables del operón (Tazumi et al. 2009, Evers et al. 1994), y a pesar de la utilidad de estas secuencias para la caracterización en otras especies de bacterias, incluyendo a *C. jejuni* y *C. coli* (Man et al. 2010, Meinersmann et al. 2009, Evers 1993), las mismas no diferencian a Cff de Cfv, ni permiten la caracterización de aislamientos de *C. fetus* obtenidos de mamíferos. En cambio, cuando se comparan los aislamientos analizados y los genomas de las cepas Cff 82-40, Cfv 84-112 y Cffi 03-293 con la secuencia del ISR3 de la cepa reptiliana Cft 03-427, se encuentra una gran divergencia de secuencia, por lo cual estas secuencias, así como la presencia de una IVS en el gen 23S, son útiles para diferenciar aislamientos de origen mamífero de aquellos de origen reptiliano, diferenciación importante cuando se trata de establecer el origen de los aislamientos humanos.

En muchas especies de bacterias se han encontrado secuencias intervinientes (IVSs) tanto en el gen 16S como en el 23S y en el ISR (Nakajima et al. 2013, Liguori et al. 2011, Man et al. 2010, Meinersmann et al. 2009, Linton et al. 1994, Jensen et al. 1993). En el género *Campylobacter* se describió la presencia de IVSs en el gen 23S en varias de sus especies, incluyendo a *C. fetus* (Nakajima et al. 2013, Hayashi et al. 2012, Tazumi et al. 2009, Chan et al. 2007, Trust et al. 1994, Van Camp et al. 1993). Si bien la presencia

de secuencias intervinientes en el gen 23S suele provocar que el ARN transcrito a partir del mismo sea posteriormente clivado para eliminarla, este procesamiento no parece afectar su funcionamiento, ya que las cepas que las portan tienen un crecimiento similar al de las cepas que tienen genes 23S sin esta secuencia (Chan et al. 2007; Trust et al. 1994). Por lo tanto, es de esperar que las cepas de *C. fetus* que portan IVSs no tengan diferencias de viabilidad con respecto al resto.

### 6.3.3 Análisis de la presencia de genes de virulencia

Estudiar la evolución de la virulencia de las cepas de un patógeno es de suma importancia para el diseño de agentes antimicrobianos y de campañas de control (Allen et al. 2014, Heras et al. 2014). El análisis de los factores de virulencia presentes en un genoma se ha vuelto muy frecuente en los últimos años, con el advenimiento de la genómica. En estos estudios se ha observado que la concentración de factores de virulencia en las islas genómicas es más alta que en el resto del genoma, por lo cual se cree que la THG tiene un papel preponderante en la evolución de la patogenicidad (Ho Sui et al. 2009).

En esta tesis se determinó el tipo sap y se correlacionó con la presencia de cuatro genes de virulencia (*glf*, *wcbK*, *galE* y *mat1*, Tabla 7). El tipo AB es abundante, con una frecuencia de 0.26. En trabajos anteriores, la frecuencia de aislamientos tipo AB fue de entre 0.01 y 0.02 (Tu et al. 2005b, Van Bergen et al. 2005a, Tu y Dewhirst 2001, Perez-Perez et al. 1986). Anteriormente se había planteado que el tipo A puede estar presente tanto en la subespecie Cff como en Cfv, y los tipos B y AB son exclusivos de Cff (Van Bergen et al. 2005a). Sin embargo, uno de los aislamientos analizados en esta tesis, que pertenece a Cfv tanto cuando se lo evalúa con métodos fenotípicos como moleculares, es de tipo AB. Esta podría ser una cepa que hubiera adquirido el *cluster* de genes *sapB* por THG o recombinación (Tu y Dewhirst 2001), luego de la separación de las subespecies. La presencia de secuencias de profagos que se ha constatado en la isla sap podría estimular este tipo de procesos (van der Graaf-van Bloois et al. 2014b).

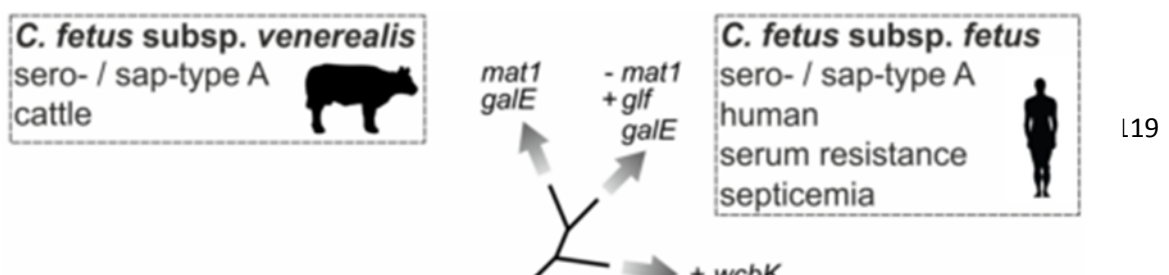
Otros autores plantearon que existe una asociación entre el ST y el tipo sap de las cepas (Van Bergen et al. 2005a). Según ese trabajo, los aislamientos con STs 4, 6 o 15 deberían pertenecer al tipo A, y los aislamientos con ST-5 al tipo B (Fig. 3A). En los



aislamientos analizados en esta tesis para el tipo sap, los resultados coinciden con lo esperado excepto para un aislamiento (CffAu002), que tiene el ST-5 pero pertenece al tipo AB. Esto podría ser debido a la adquisición del *cluster sapA* mediante un evento de THG.

En un estudio reciente de 22 borradores de genomas completos de *C. fetus*, se encontró una considerable variación en el contenido de genes, incluyendo varios genes de virulencia. Estas diferencias pueden estar asociadas a las diferentes presentaciones clínicas que las cepas provocan (Wagenaar et al. 2014). En otro estudio, basado en la comparación del genoma completo de la cepa Cfv 84-112 con el de la cepa Cff 82-40, se identificaron varios genes que actúan como factores de virulencia en *C. fetus*, y cuya presencia es variable entre las cepas (Kienesberger et al. 2014). Estos genes están relacionados con el metabolismo de los LPSs. Algunos ejemplos son los genes *mat1*, *glf*, *wcbK* y *galE*. El gen *galE* fue encontrado en todas las cepas analizadas. La presencia de los otros tres genes está asociada con el tipo sap de las cepas, con su hospedero y con la subespecie a que pertenecen (Kienesberger et al. 2014). Todas las cepas de Cff animales contienen *mat1* y *wcbK*, y son tipo B. Las Cff humanas tienen *glf* y no tienen ninguno de los otros dos genes, y son tipo A. Una cepa contiene los tres genes, y es tipo AB. Las cepas de origen reptiliano y las Cfv, que son tipo A, tienen *mat1* pero carecen del resto de los genes (Kienesberger et al. 2014). A partir de sus resultados, los autores proponen una hipótesis sobre la evolución de la distribución de estos genes. Según este modelo, *wcbK* y *glf* serían genes específicos de cada subespecie, y habrían sido adquiridos más recientemente que *mat1* y *galE*, que representarían componentes ancestrales del genoma. Las cepas tipo B (todas pertenecientes a Cff) mantuvieron *mat1* y *galE* y adquirieron *wcbK*. Las cepas de Cfv (todas tipo A), también mantuvieron *mat1* y *galE* sin adquirir ninguno de los otros genes. Las cepas Cff tipo A, frecuentemente encontradas en humanos, perdieron *mat1* y adquirieron *glf*. La excepción encontrada por los autores es una cepa Cff de tipo AB, que contiene los genes *glf* y *mat1* además de *galE* (Fig. 24A).

En la determinación de la presencia de los genes *glf*, *wcbK*, *galE* y *mat1* realizada en esta tesis, las combinaciones de genes encontradas se ajustan sólo en algunos casos



a lo esperado según el modelo de planteado por Kienesberger *et al.* (2014; Tabla 7, Fig. 24A). Existen múltiples excepciones, entre las que podemos destacar que la mayoría de las cepas de la subespecie Cff aisladas de bovino, que son tipo A, tienen los genes *mat1* y *galE* y carecen de los otros dos, combinación que había sido planteada como característica de la subespecie Cfv. De los aislamientos pertenecientes a Cfv, la mayoría tienen esta combinación. Estos resultados sugieren que esa combinación de genes está más correlacionada con el hospedero bovino que con la subespecie. Además, existen aislamientos bovinos que no poseen el gen *galE* (Tabla 7). Tanto los aislamientos humanos como la cepa de origen reptiliano tienen una combinación particular de genes, que coincide con la esperada según el modelo planteado por Kienesberger *et al.* (2014), y que no se encuentra en ninguno de los aislamientos bovinos. Los aislamientos que pertenecen al tipo sap AB tienen varias combinaciones diferentes de los otros tres genes, lo que estaría indicando que forman un grupo heterogéneo. A su vez, aparecen varias combinaciones de genes que no habían sido descritas previamente, por lo cual consideramos que la dinámica de pérdida y adquisición de los mismos es más compleja y rápida que lo planteado, hipótesis que se ve reforzada por el hecho de que estos genes se ubican en regiones genómicas sometidas a procesos de THG (Kienesberger *et al.* 2014).

En base a nuestros resultados, proponemos que la combinación de estos genes presente en las diferentes cepas puede explicarse tomando en cuenta solamente el hospedero, no encontrando una correlación con la pertenencia a las subespecies Cff o Cfv y el tipo sap de las mismas (Fig. 24B).

Se ha propuesto que estos genes participan directamente en la evasión del sistema inmune del hospedero, colaborando con la acción de las SLPs, y que los genes presentes en una cepa le aportan la capacidad de invadir ciertos hospederos (Kienesberger *et al.* 2014). Si bien se ha demostrado que *wcbK* participa en la biogénesis de los LPS y en la resistencia a los ácidos (Kienesberger *et al.* 2014), aun no está claro el papel funcional que juegan el resto de estos genes, por lo que investigar este aspecto podría ayudar a aclarar la determinación de la especificidad de hospedero en *C. fetus*.

#### **6.3.4 Análisis de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX**

Los análisis de patrones de bandas generados mediante la amplificación con cebadores que hibridan en secuencias repetidas dispersas han sido utilizados con éxito para la caracterización en varios patógenos (Foley et al. 2009). Para algunos de ellos se han podido desarrollar sistemas automatizados con buenos resultados, y con un poder de discriminación superior al de las metodologías de MLST y PFGE (Lin et al. 2014, Pasanen et al. 2014, Bourdon et al. 2011). Sin embargo, un problema de este tipo de técnica suele ser la reproducibilidad, que debe ser evaluada antes de establecerla como válida para realizar la caracterización.

En *C. fetus*, los cebadores basados en las secuencias ERIC fueron utilizados con anterioridad en un análisis epidemiológico, permitiendo diferenciar las subespecies Cff y Cfv, los serotipos A y B, y los aislamientos mamíferos de los reptilianos (Tu et al. 2005b). La reproducibilidad del método, sin embargo, no fue evaluada en dicho estudio.

Los resultados del análisis de aislamientos de *C. fetus* y de otras especies realizados en esta tesis indican que esta técnica, si bien evidencia una gran variación, tiene una escasa reproducibilidad (Tabla 8).

La falta de reproducibilidad del método en *C. fetus* puede deberse a que las amplificaciones observadas a partir de los aislamientos sean productos inespecíficos de la PCR, motivo por el cual pueden tener una variación aleatoria en su presencia. Esta hipótesis se ve reforzada por la ausencia de secuencias complementarias a los cebadores en los cuatro genomas completos analizados.

#### **6.3.5 Análisis de genomas completos: identificación de variaciones genómicas**

La información genómica es un buen punto de partida para la investigación de la interacción de un determinado microorganismo con su nicho, ya que da pautas acerca de su fisiología y su capacidad de adaptación. En este sentido, la genómica comparativa puede aportar información valiosa ya que permite correlacionar las características genómicas de las cepas con sus características fisiológicas, y plantear

hipótesis acerca de la evolución de su patogenicidad y de su capacidad de sobrevivir en ciertos ambientes. A su vez, permite realizar análisis evolutivos y revelar procesos de pérdida, adquisición y variación de la información genética (Eppinger et al. 2004).

Se ha sugerido que los genomas de *C. fetus* tienen un alto grado de sintonía, con más del 90% de secuencias compartidas, y no se reportan reordenamientos importantes (Kienesberger et al. 2014, van der Graaf-van Bloois 2014a, 2014b, Gilbert et al. 2013, Iraola et al. 2013, Ali et al. 2012, Stynen et al. 2011, Moolhuijzen et al. 2009). Sin embargo, en las comparaciones realizadas en esta tesis entre los genomas completos de las cepas Cff 82-40, Cfv 84-112, Cfvi 03-293 y Cft 03-427 se observan numerosos reordenamientos, que incluyen regiones invertidas, translocaciones e inserciones/deleciones de diversos tamaños. En todos los genomas hay regiones exclusivas que no comparten identidad de secuencia con ninguno de los otros genomas analizados (Fig. 17). Esto es un indicio de que la THG es una de las fuerzas que rigen la evolución en *C. fetus*. Anteriormente se propuso que el genoma de *C. fetus* evoluciona principalmente por THG, ya que cuando se comparan las secuencias de los genes compartidos entre las cepas, las mismas son 100% idénticas en la mayoría de los casos, y las principales diferencias se deben a la presencia o ausencia de determinados genes o regiones genómicas (Kienesberger et al. 2014). Este modo de evolución se propuso como posible explicación de la diferencia de nicho de las subespecies Cff y Cfv, ya que las diferencias genómicas entre las subespecies se ubican en regiones que muestran características típicas del ADN adquirido por THG: cambios bruscos en el contenido GC, proximidad de genes relacionados con la movilidad como profagos y transposasas, o de genes de ARNt (Iraola et al. 2014, Kienesberger et al. 2014, Ali et al. 2012).

En esta tesis, se evaluó experimentalmente la presencia de una inversión de 500 Kpb que se detectó en la comparación entre los genomas de las cepas Cff 82-40 y Cfv 84-112 (Fig. 17B), y se encontró que en todos los aislamientos analizados, la región se encuentra en la misma orientación que en la cepa Cff 82-40. Este resultado es indicativo de que la presencia de inversiones en *C. fetus* es una característica restringida a algunas cepas, y por lo tanto los reordenamientos ocurren con cierta frecuencia. La presencia de diferentes regiones invertidas en la comparación entre los distintos genomas apoya esta idea.

Las inversiones, deleciones y translocaciones son muy comunes en varias especies de bacterias (Fischer et al. 2014, Raftis et al. 2014, Sait et al. 2014, Xie et al. 2014, Touchon et al. 2009, Liu y Sanderson 1996) y suelen estar relacionados con la presencia de secuencias repetidas que propician la recombinación homóloga (Ahmed et al. 2008, Helm et al. 2003), como genes del ARN ribosomal o elementos genéticos móviles, los cuales están presentes en el genoma de *C. fetus* en más de una copia (Abril et al. 2007). Existen algunos ejemplos donde se ha podido correlacionar positivamente el contenido de ISs con la cantidad de translocaciones e inversiones presentes en un genoma, principalmente cuando se trata de regiones pequeñas que contienen un solo gen, como ocurre en *C. fetus* (Mira et al. 2002). El análisis de los puntos de corte de las regiones invertidas, sin embargo, no reveló la presencia de este tipo de secuencias, lo cual sugiere que los mecanismos que estimulan la presencia de reordenamientos en *C. fetus* no están dirigidos por la presencia de secuencias repetidas. También se ha sugerido que las horquillas de replicación pueden estar implicadas en la generación de reordenamientos (Mira et al. 2002, Tillier y Collins 2000). Sin embargo, en *C. fetus* no se encontró evidencia de este fenómeno, ya que los reordenamientos no son simétricos con respecto al origen de replicación, como ocurriría en ese caso.

La isla genómica descrita por Gorkiewicz *et al.* (2010) está presente en el genoma de la cepa Cfv 84-112 y en el de Cfvi 03-293, pero no en el de Cff 82-40 ni en el de Cft 03-427 (Fig. 17). En la evaluación de la presencia de esa isla genómica se encontró que la misma no guarda una correlación estrecha con la determinación bioquímica de las subespecies (Tabla 9). Tres casos presentaron amplificación con ambos juegos de cebadores, por lo que no se pudo determinar claramente la presencia o no de la isla. Los aislamientos que presentan la isla en su genoma presentan también amplificación del gen *VirB11*, lo cual es un indicativo de que la integridad de la isla está conservada. En un caso, hubo una discrepancia entre los resultados con los dos juegos de cebadores y los resultados obtenidos del Mpx-PCR B, ya que aunque se logró amplificar un fragmento del gen *VirB11*, la isla no está presente (Tabla 9). Estos resultados podrían deberse a la presencia de este gen en otra parte del cromosoma, o en un plásmido que esté presente en esa cepa y no haya sido descrito. Esta hipótesis se ve sustentada por el posible origen plasmídico de la isla genómica, ya que el T4SS de

la misma guarda gran similitud con el presente en los plásmidos pCC31 de *C. coli* y pTet de *C. jejuni* (Sprenger et al. 2012). Otra alternativa es que la isla se encuentre presente en otra parte del genoma, posibilidad que no puede ser evaluada con la estrategia empleada. Sin embargo, esto parece poco probable, ya que en estudios realizados con gran cantidad de cepas, se corroboró que cuando la isla se encuentra presente, se encuentra en todos los casos en la misma ubicación (Gorkiewicz et al. 2010).

Los elementos extracromosómicos tienen un rol fundamental en la habilidad de las bacterias para colonizar nuevos ambientes, particularmente cuando se encuentran con presiones selectivas fuertes, y están asociados con la virulencia y patogenicidad de las bacterias. El conocimiento de los plásmidos y el potencial de conjugación de una bacteria es importante para la comprensión de fenómenos como la evolución de la resistencia a antibióticos (Batchelor et al. 2004). En otras especies de epsilon proteobacterias, se ha observado una gran variabilidad en el contenido de plásmidos, además de la presencia de secuencias similares a las de algunos plásmidos que están integradas en el cromosoma bacteriano (Eppinger et al. 2004). En 3 de los 23 aislamientos analizados para la presencia del plásmido se logró amplificar una región del gen *Fic4*, indicativo de que el plásmido ICE\_84-112 está presente en esos aislamientos (Tabla 9). En estudios anteriores había sido descrito que la distribución del plásmido ICE\_84-112 en las cepas de *C. fetus* es acotada (Kienesberger et al. 2014), resultado que se ve corroborado por nuestras observaciones. Esto sugiere que el plásmido no es esencial para la patogenicidad de las cepas, pero puede conferirles ciertas ventajas en determinados ambientes donde se requiera una mayor plasticidad, ya que puede ser el vehículo de la transferencia horizontal de genes que sean importantes para la adaptación a nuevos ambientes. Los tres aislamientos que contienen el plásmido pertenecen a la subespecie Cff cuando se los evalúa tanto por métodos bacteriológicos como moleculares. Esto sugiere que la distribución del plásmido no es exclusiva de la subespecie Cfv como había sido previamente planteado (Kienesberger et al. 2014). Nuestros resultados corroboran lo observado anteriormente, con respecto a que el contenido de plásmidos de las cepas parece ser heterogéneo, ya que se han encontrado cepas con plásmidos diferentes y a su vez las cepas que comparten plásmidos no necesariamente están relacionadas (Willoughby et

al. 2005). Además, existe evidencia experimental de la transferencia de este plásmido entre las cepas de *C. fetus* (Kienesberger et al. 2007, 2011).

Este conjunto de resultados pone de manifiesto la necesidad de generar más información de genomas completos para estudiar la evolución genómica de la especie y su correlación con las diferencias en la patogenicidad de las cepas. La plasticidad genómica en *C. fetus* puede tener una función en su patogenicidad, como se observa en otras especies (Dobrindt et al. 2010, Helm et al. 2003). También existe evidencia de que la plasticidad genómica participa en los mecanismos de evasión del sistema inmune en infecciones persistentes en algunos patógenos. Considerando que las infecciones con *C. fetus* pueden ser crónicas tanto en toros como en vacas y en otros animales, es posible que la plasticidad genómica le confiera a este patógeno una ventaja en estas situaciones.

### **6.3.6 Evaluación de la presencia del cluster de genes *cas*, el gen *cas1* y el gen *RAMP***

En numerosas especies de bacterias, hay variación entre las cepas tanto en el número de loci CRISPR como en la presencia de *clusters* de genes *cas* y otros genes relacionados, como los genes *RAMP* (Palmer y Gilmore 2014, Sampson y Weiss 2013, Delaney et al. 2012, Pleckaityte et al. 2012, Cady et al. 2011, van der Ploeg 2009).

En el análisis de genomas completos de *C. fetus* se observó que los genomas de las cepas Cfv 84-112 y Cfvi 03-293 contienen un solo locus CRISPR, mientras que el genoma de la cepa Cff 82-40 tiene dos, y el de la cepa Cft 03-427 muestra tres loci. Con respecto a los genes *cas*, están ausentes de los genomas de Cfv 84-112 y Cfvi 03-293, mientras que los genomas de Cff 82-40 y Cft 03-427 tienen un cluster de seis genes *cas* que es idéntico en ambas cepas (Fig. 17C). En cuanto al gen *RAMP*, está presente en todos los genomas de *C. fetus* totalmente secuenciados que se encuentran en la base de datos, y tiene una alta conservación de secuencia, a excepción de la secuencia de la cepa Cft 03-427, que muestra una identidad de 0.87 con la secuencia del resto de las cepas.

La presencia del cluster de genes *cas* y del gen *cas1* se evaluó experimentalmente en los 53 aislamientos, y sólo se los detectó en los 4 aislamientos provenientes de humanos (Tabla 10). Mientras que la presencia del locus CRISPR1 está

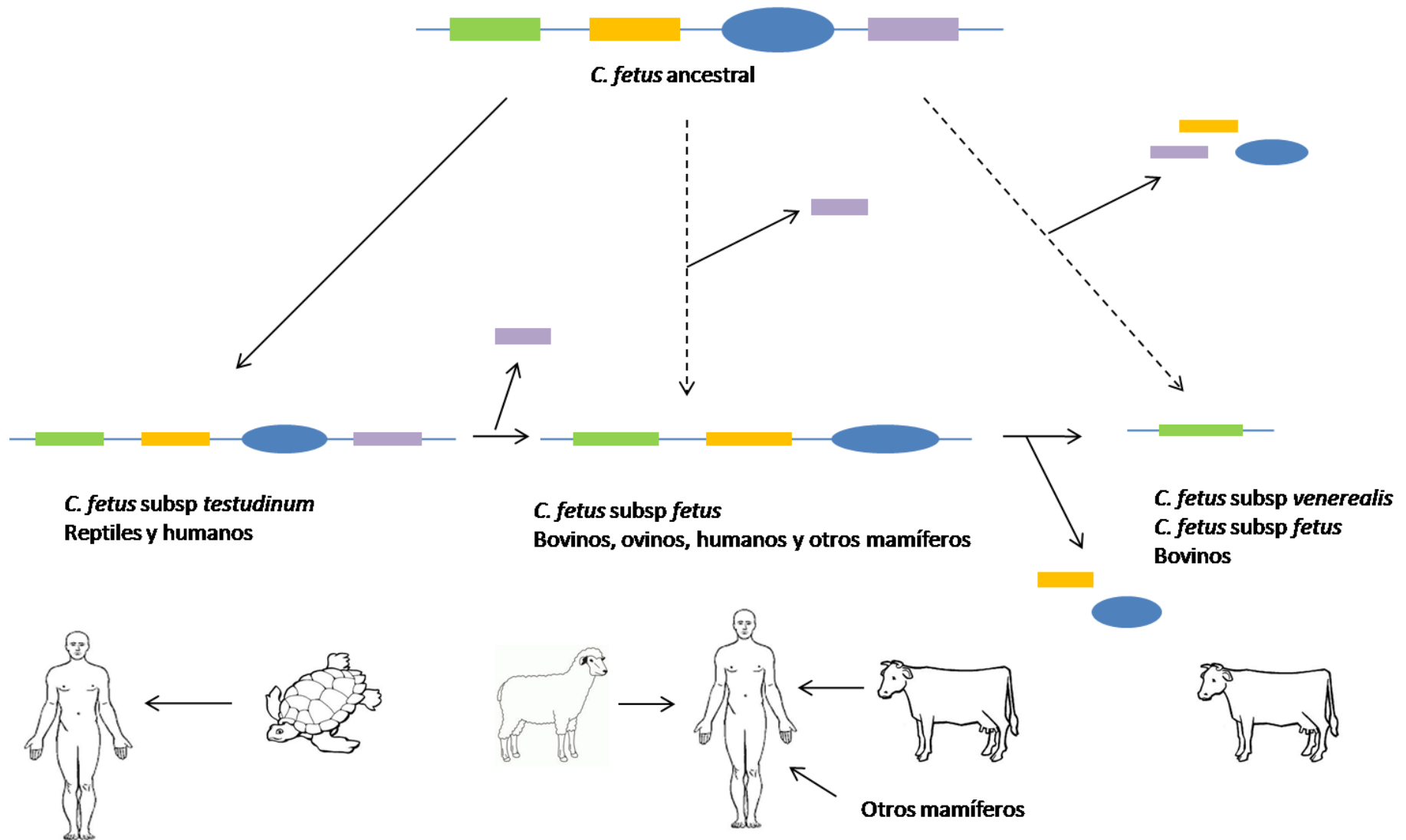
muy conservada en *C. fetus*, existe una marcada variación en la presencia del locus CRISPR2 y de los genes *cas*. Esta variación se ve favorecida por la presencia de secuencias que estimulan los procesos de THG en las regiones donde se encuentran los loci CRISPR, tanto en *C. fetus* como en otras especies, donde se han identificado las llamadas islas genómicas de defensa (Kienesberger et al. 2014, Makarova et al. 2013, Marraffini 2013, Ali et al. 2012, Ho Sui et al. 2009). En un trabajo en que se realizó la comparación del genoma completo de la cepa Cfv 84-112 con el de la cepa Cff 82-40, se encontró que Cfv 84-112 carece del locus CRISPR2 y de los genes *cas*. Se evaluó la presencia del gen *cas1* mediante PCR en 102 cepas de ambas subespecies, y se encontró que ninguna de las cepas Cfv y sólo una parte de los aislamientos bovinos, ovinos y humanos pertenecientes a Cff tienen este gen, que se considera representativo de la presencia del *cluster* de genes *cas* y del locus CRISPR2 (Kienesberger et al. 2014). Por lo tanto, los resultados de estos autores corroboran lo observado en esta tesis.

Hay una correlación entre el hospedero del cual provienen los aislamientos y la presencia de los distintos componentes del sistema. Se propuso que los reptiles serían el hospedero ancestral de *C. fetus*, a partir del cual la especie colonizó diferentes especies de mamíferos a lo largo de su evolución (Dingle et al. 2010, Tu et al. 2005, Tu y Dewhirst 2001). En base a la información disponible, planteamos la hipótesis de que en el estado ancestral, *C. fetus* poseía el *cluster* de genes *cas* y al menos tres loci CRISPR. Esta situación se mantiene en las cepas pertenecientes a la subespecie Cft, que pueden ser encontradas en humanos, como es el caso de la cepa Cft 03-427, o en reptiles, como la cepa recientemente secuenciada Pet-3 (Wang et al. 2015) que también posee tres loci CRISPR. Las cepas que poseen el *cluster* de genes *cas* y dos loci CRISPR se habrían originado por pérdida de uno de los loci, por dos vías alternativas: a partir del ancestro, o a partir de un salto de hospedero de las cepas presentes en reptiles, las cuales probablemente hayan sufrido más cambios genómicos, por ejemplo mediante la adquisición o pérdida de genes de virulencia, en ese proceso. Las cepas especializadas en bovinos podrían haberse originado a partir de cualquiera de ellas mediante la pérdida del *cluster* de genes *cas*, y uno o dos loci CRISPR según el caso (Fig. 25).



En otras especies, la variación en el número de loci CRISPR y en la presencia de genes *cas* se ha asociado con diversas características de las cepas, la mayoría de las cuales están relacionadas con la interacción con el hospedero. En *Gardnerella vaginalis*, la presencia de los genes *cas* está asociada con las diferencias en el tropismo de tejido (Pleckaityte et al. 2012). También se relacionó esta variación con la adquisición de resistencia a antibióticos en *E. amylovora* (McGhee y Sundin 2012) y en *Enterococcus faecalis*, donde las cepas que poseen sistemas CRISPR-*cas* funcionales tienen una capacidad menor de adquirir genes de resistencia (Palmer y Gilmore 2014). Los CRISPR participan en la regulación de la expresión de la sialyltransferasa en *C. jejuni*, la cual está asociada con la capacidad de causar el síndrome neurológico de Guillain-Barré (Louwen et al. 2012b). En *Pseudomonas aeruginosa*, los CRISPRs participan en el proceso de formación de biofilms (Sampson y Weiss 2013). A su vez, se ha relacionado la presencia de un sistema CRISPR-*cas* funcional con la disminución en la presencia de secuencias móviles como profagos y plásmidos integrados en el genoma en *Streptococcus pyogenes*, lo cual podría estar relacionado a la infectividad de algunas cepas (Nozawa et al. 2011).

El sistema CRISPR-*cas* otorga a las bacterias que lo portan una ventaja selectiva protegiéndolas de la adquisición de segmentos de ADN que tienen un costo energético para la célula. Por otra parte, también pueden impedir la incorporación de islas genómicas o genes que le aporten ventajas selectivas, por ejemplo nuevos factores de virulencia que le permitan colonizar nuevos tejidos, o genes de resistencia a antibióticos. El balance entre las presiones selectivas positivas y negativas hace que los sistemas CRISPR-*cas* estén en constante flujo (Jiang et al. 2013). En *C. fetus*, la ausencia del sistema en las cepas especializadas en bovinos puede aportar una ventaja selectiva, por ejemplo permitiendo la entrada de la isla genómica que se cree en gran medida responsable de la preferencia de hospedero en algunas cepas (Gorkiewicz et



**Figura 25.** Hipótesis sobre la evolución de la variación en la presencia del *cluster* de genes *cas* y los loci CRISPR en *C. fetus*. Las líneas punteadas representan vías alternativas.

al. 2010). Por lo tanto, la pérdida o ganancia de estos loci en *C. fetus* podría estar relacionada con la adaptación a diferentes hospederos, al igual que en otras especies como *Mycoplasma gallisepticum*, donde el cambio reciente de hospedero en algunas cepas, de pollos (*Gallus gallus domesticus*) a pinzones silvestres (*Carpodacus mexicanus*) se asocia a la pérdida de los genes *cas* y de diversidad en los espaciadores de los loci CRISPR, proceso que podría deberse a una disminución en las presiones selectivas por una menor presencia de fagos en el nuevo ambiente (Delaney et al. 2012).

A diferencia de lo observado en los genes *cas*, la presencia del gen *RAMP* fue verificada en todos los aislamientos analizados (Tabla 10). Este gen está asociado a la función del sistema CRISPR-*cas*, y su presencia en todos los aislamientos y genomas completos de *C. fetus* analizados indica que este es un carácter ancestral de la especie. El hecho de que este gen se haya mantenido presente en el genoma, con una conservación muy alta de secuencia, sugiere que el mismo cumple una función en la célula, aunque la misma podría estar asociada o no a la expresión del sistema CRISPR-*cas*. Se ha propuesto que algunas de las proteínas codificadas por la familia de genes *RAMP* pueden sustituir las funciones de los genes *cas*. Dado que la proteína RAMP codificada por el gen presente en *C. fetus* es una endonucleasa similar a cas5, es posible que en los genomas que no contienen *clusters* de genes *cas*, este gen pueda estar sustituyendo alguna de esas funciones. Alternativamente, este gen podría cumplir una función celular básica, hipótesis que ha sido planteada también por otros autores (Karginov y Hannon 2010), o estar implicado en procesos de THG. En muchas bacterias los genes *RAMP* se encuentran en *clusters* que codifican para seis proteínas que actúan juntas en el proceso de interferencia (Karginov y Hannon 2010), por lo que otra alternativa es que el gen *RAMP* sea un relicto de un ancestro donde el módulo *RAMP* estuviera completo y fuera funcional.

El conjunto de resultados obtenidos confirma que los sistemas CRISPR-*cas* tienen una dinámica compleja de interacciones entre sus componentes con cambios rápidos (Jiang et al. 2013), que esirá en un campo de estudio de creciente importancia.

### 6.3.7 Análisis de secuencias de los loci CRISPR1 y CRISPR2

Las secuencias del locus CRISPR1 tienen un alto grado de variación, tanto en la cantidad de espaciadores presentes en cada cepa como en sus patrones de secuencia (Fig. 19). Las secuencias del locus CRISPR1 son las más variables descritas hasta ahora en el genoma de *C. fetus*. Este alto grado de variación es coherente con lo observado en otras especies de bacterias (Barrangou y Horvath 2012, Marraffini y Sontheimer 2010).

En varios estudios anteriores (Barros et al. 2014, Timme et al. 2013, Barrangou y Horvath 2012, Richter et al. 2012, Weinberger et al. 2012, Nozawa et al. 2011, Deveau et al. 2008, Horvath et al. 2008, Barrangou et al. 2007) se observó que la evolución de los patrones de espaciadores en los loci CRISPR siguen ciertas reglas. La principal es que la adición de espaciadores está polarizada: los espaciadores nuevos se agregan siempre en el extremo proximal al líder. Además, puede haber deleciones intersticiales o duplicaciones de una o más unidades DR-espaciador. Otra característica es que la inserción de un espaciador es un evento único, por lo que los espaciadores idénticos son homólogos. Sin embargo, existen algunas excepciones a estas reglas, como en los loci de *E. coli*, donde se ha constatado la adquisición de espaciadores en posiciones intersticiales (Diez-Villaseñor et al. 2010). En el CRISPR1 de *C. fetus*, estas reglas parecen cumplirse en la mayoría de los casos. Los cinco espaciadores más distales al líder son los mismos en todos los patrones, aunque algunos tienen deleciones intersticiales de uno o más de uno de ellos (patrones J, L y P), y otros sólo contienen dos espaciadores, o ninguno (patrones G y S respectivamente). Además, varios de los patrones tienen una o más deleciones intersticiales (por ejemplo los patrones B o I), o duplicaciones de uno o más espaciadores (por ejemplo los patrones C o R; Fig. 19). Una excepción a las reglas son los aislamientos humanos de origen uruguayo, que parecen ser el producto de recombinación entre diferentes patrones, y haber sufrido algún proceso de reordenamiento interno, ya que comparten espaciadores tanto con el otro aislamiento humano como con los aislamientos bovinos, pero el orden en que se encuentran algunos espaciadores (por ejemplo el número 2) no se puede explicar aplicando las reglas establecidas hasta ahora (Fig. 19). Estos resultados ponen de manifiesto que la evolución de los patrones de secuencia en los CRISPR puede ser más

compleja que lo planteado anteriormente, y es necesario analizar más a fondo los patrones de variación en estos loci, especialmente en los aislamientos que provienen de humanos. Los mecanismos moleculares de adquisición de los espaciadores durante la fase de adaptación no se conocen a fondo (Barrangou y Marraffini 2014), y dada la diversidad funcional que presentan los sistemas CRISPR-*cas*, es probable que las reglas propuestas para la evolución de los patrones de secuencia no sean aplicables en todos los casos. El conjunto de los resultados evidencia la gran ventaja de los métodos basados en secuenciación para el relevamiento de la variación en estos loci, en oposición a métodos basados en hibridación como el *spoligotyping*, ya que solamente evaluando la presencia de un espaciador, se pierde la información de posibles procesos de recombinación y reordenamiento.

La validez de las secuencias de CRISPR para la realización de análisis filogenéticos en otras especies de bacterias se demostró en varios trabajos, comparando las filogenias realizadas con CRISPR con las obtenidas mediante metodologías bien establecidas. Algunos ejemplos de estas metodologías son el MLST (Fabre et al. 2012, Hauck et al. 2012, Lopez-Sanchez et al. 2012, Touchon et al. 2011), AFLP (Schouls et al. 2003), PFGE (Liu et al. 2011), datos de SNPs de genomas completos (Delaney et al. 2012, Abadia et al. 2010, 2011) y *ribotyping* (Rezzonico et al. 2011). Otros autores, sin embargo, no encontraron una buena correlación entre las filogenias realizadas con secuencias de CRISPR y diferentes metodologías. En *S. enterica enterica*, las filogenias realizadas a partir de SNPs de genomas completos y MLST son incongruentes con las realizadas a partir de secuencias de CRISPRs, probablemente debido a procesos de transferencia horizontal de los loci, que pueden haber ocurrido con mucha frecuencia (Pettengill et al. 2014, Timme et al. 2013). Estos resultados se apoyan también en las filogenias realizadas a partir de secuencias del gen *cas1*, ya que la presencia del mismo parece ser polifilética (Pettengill et al. 2014, Makarova et al. 2013). Sin embargo, este tema sigue siendo controversial entre los autores que trabajan en el modelo, ya que en otros estudios se ha propuesto que estas secuencias pueden ser útiles para la caracterización de este patógeno, e incluso han creado un método automatizado y bases de datos de patrones CRISPR para la caracterización de algunos serovares (Fabre et al. 2012, 2014, Shariat et al. 2013, Fricke et al. 2011). Otro ejemplo es *E. coli*, donde se encontró que las secuencias de CRISPR son un marcador epidemiológico poco

efectivo debido a una falta de congruencia entre las filogenias del gen *cas1*, las secuencias de CRISPR y la filogenia de la especie (Touchon y Rocha 2010), o *G. vaginalis*, donde se han logrado diseñar cebadores confiables para la amplificación de los loci, y no todas las cepas portan loci CRISPR (Pleckaityte et al. 2012). La correspondencia de la variación en los loci CRISPR con la filogenia de la especie debe ser evaluada en cada caso, ya que está influida por varios factores, como el momento de la evolución en el que se incorpora el locus y las interacciones de la bacteria con su ambiente.

La red de haplotipos realizada con el método *median-joining* y el árbol filogenético realizado con el método bayesiano presentaron agrupamientos equivalentes de los patrones de secuencia del locus CRISPR1 encontrados en los aislamientos y en los genomas completos (Figs. 20 y 21).

No se observa una asociación preferencial de los patrones de CRISPR con la determinación bioquímica de la subespecie o biovar al que pertenece el aislamiento (Fig. 20A y 21A). Por lo tanto, la separación de las subespecies Cff y Cfv no parece estar asociada a la variación en los loci CRISPR.

Los dos patrones más abundantes (D y B) están representados desigualmente en los dos países donde se analizaron mayor cantidad de aislamientos: el patrón D aparece exclusivamente en Argentina, mientras que 9 de los 10 aislamientos que portan el patrón B son uruguayos (Fig. 20B y 21B). Esto sugiere que existe una asociación entre el origen geográfico de los aislamientos y su patrón CRISPR, por lo cual el análisis de estas secuencias en *C. fetus* tendría utilidad para la realización de estudios epidemiológicos. Esta tendencia debe ser verificada mediante el análisis de un número mayor de aislamientos, ya que en un estudio anterior realizado mediante MLST se planteó que la variación en *C. fetus* no está asociada a la procedencia geográfica (Van Bergen et al. 2005a).

Los aislamientos provenientes de diferentes hospederos (humanos o bovinos) presentan una marcada diferenciación. Si bien los aislamientos humanos uruguayos son claramente diferentes de la cepa de origen estadounidense, los aislamientos bovinos forman otro clado, mostrando que están más relacionados entre sí. Además, es de destacar el hecho de que en el genoma de la cepa Cft 03-427, un aislamiento humano de origen reptiliano, las secuencias del DR y del líder tienen diferencias con las

encontradas en el resto de las cepas, y ninguno de los tres loci CRISPR contenidos en este genoma comparte espaciadores con los CRISPRs del resto de los aislamientos. Esta marcada diferencia impide incluir a la secuencia de Cft 03-427 en los análisis filogenéticos, y reafirma la identidad genética de la subespecie Cft (Fitzgerald et al. 2014). Esta diferenciación en el contenido de espaciadores ha sido observado en otras especies de patógenos, como *E. amylovora* o *E. coli*, asociados a cambios de un hospedero a otro (McGhee y Sundin 2012, Touchon et al. 2011).

El locus CRISPR2 fue amplificado y secuenciado en todos los casos en que se comprobó la presencia del cluster de genes *cas* (4 aislamientos, todos de origen humano), y no pudo ser amplificado en aislamientos que no poseen genes *cas*. La red de haplotipos realizada con el método *median-joining* presentó un agrupamiento equivalente al observado con los patrones de secuencia del locus CRISPR1, ya que los patrones presentes en los aislamientos uruguayos tienen una menor distancia entre sí que con el aislamiento de la cepa Cff 82-40 (Fig. 23). Esto indica que en las cepas que contienen el locus CRISPR2, el mismo aporta información epidemiológica similar a la aportada por el locus CRISPR1. Este resultado, junto con la identidad total de secuencia del DR y el líder entre los loci, estaría indicando que el origen de ambos loci es común, y que la presencia de ambos es ancestral para los aislamientos de mamíferos.

La distancia entre los aislamientos de distintos orígenes geográficos en el locus CRISPR1 es superior a la observada en el locus CRISPR2. Este hecho, junto con la ausencia del locus CRISPR2 en los aislamientos bovinos, nos lleva a proponer al locus CRISPR1 como primera elección a la hora de relevar la variabilidad en *C. fetus*, y considerarlo como una herramienta promisorio para la realización de estudios epidemiológicos, presentando ventajas comparativas respecto a los métodos basados en patrones de bandas utilizados con anterioridad (PFGE y AFLP; van Bergen et al. 2006, 2005c, Duim et al. 2001, On et al. 2001, Wagenaar et al. 2001, Salama et al. 1992) ya que por estar basado en secuencias de ADN, tiene una mayor reproducibilidad y portabilidad.

Las secuencias de CRISPR obtenidas en esta tesis fueron comparadas con las obtenidas mediante la secuenciación masiva del genoma completo en dos aislamientos (CfviAr011 y CfUy022). En esta comparación se observó que las secuencias del locus obtenidas por secuenciación masiva no estaban completas en un caso, y en el otro

presentaban sus espaciadores en un orden diferente al obtenido mediante la secuenciación con el método de Sanger. Esto se debe a que las secuencias obtenidas mediante metodologías de secuenciación masiva presentan problemas de ensamblaje en las regiones de repetidos (Treangen y Salzberg 2012, Cahill et al. 2010), por lo que consideramos que la utilización de cebadores específicos como los diseñados en esta tesis y la secuenciación mediante el método de Sanger son actualmente los más adecuados para elevar la variación en los loci CRISPR.

Las infecciones por *C. fetus* en humanos se consideran accidentales, al contrario de lo que sucede en bovinos, los cuales son hospederos primarios de la bacteria. Las fuentes de infecciones en humanos son múltiples, y se cree que muchas de las cepas que pueden infectar diversos hospederos, también son capaces de infectar humanos, aunque la base de esta virulencia no ha sido esclarecida (Wagenaar et al. 2014). Por lo tanto, rastrear la fuente de las infecciones es de gran importancia para la salud pública. Los tres casos de infecciones humanas estudiados en esta tesis parecen estar relacionados, ya que dos de ellos son idénticos en todos los marcadores analizados (CfUy023 y CfUy024), y el otro (CfUy022) tiene patrones CRISPR1 y CRISPR2 muy similares (Figs. 19 y 20), y es idéntico en el resto de los marcadores. Esta estrecha relación se observa claramente en las reconstrucciones filogenéticas realizadas con ambos loci (Figs. 20, 21 y 23). Estos datos sugieren que la fuente de infección para estos pacientes es común. También existe la posibilidad de que *C. fetus* se haya transmitido entre personas, aunque no se dispone de datos que confirmen si estos pacientes estuvieron o no en contacto entre sí o con la misma fuente probable de infección. Las rápidas dinámicas evolutivas evidenciadas por estos datos, y la posibilidad de que haya habido recombinación entre cepas de diferente origen para dar lugar a los aislamientos humanos de Uruguay, indican la necesidad de una estrecha vigilancia epidemiológica de este patógeno en nuestro territorio, ya que es un potencial problema de salud pública no sólo en animales sino también en humanos. El gran poder de resolución de las secuencias del locus CRISPR1 abre la posibilidad de utilizarlo como herramienta para identificar el origen animal de las infecciones, eventualmente hasta un determinado individuo, rodeo o región geográfica acotada. Aunque este objetivo requiere el análisis de un mayor número de cepas de diferentes



orígenes animales, esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que los aislamientos de diferentes hospederos son claramente divergentes.

En casos anteriores se observó que los aislamientos de patógenos realizados a partir de diferentes tejidos de un mismo individuo afectado (por ejemplo, aislamientos de *G. vaginalis* de cuello uterino o de vagina de una misma mujer) poseen diferentes patrones de secuencia en sus CRISPRs (Pleckaityte et al. 2012). Estas diferencias probablemente se deben a la exposición a diferentes ADNs foráneos en los diferentes ambientes. Además, en *C. fetus* se observó que aislamientos realizados a partir de diferentes tejidos de un mismo individuo tenían diferencias en sus pulsotipos (Tremblay et al. 2003). Según nuestros resultados, en cambio, los aislamientos realizados a partir de diferentes tejidos del mismo hospedero (CffAr029/CffAr030 y CfUy024/CfUy025) presentaron el mismo patrón de secuencia, tanto para el único locus presente en el caso de los aislamientos bovinos, como para ambos en los aislamientos humanos. Esto podría deberse a una inactividad del sistema CRISPR-*cas* en estas cepas, o a que la diferencia entre los tejidos no haya ejercido una presión selectiva suficiente como para diferenciar las poblaciones bacterianas, o al menos no en el tiempo transcurrido desde la infección hasta la toma de la muestra.

Los resultados de BLASTn de las secuencias de espaciadores mostraron escasos *hits* significativos (Anexo 7), como ocurre en otras especies de bacterias (Hargreaves et al. 2014). Es posible que esto sea consecuencia de la escasa información que existe de los bacteriófagos y otras fuentes de ADN foráneo presentes en los tejidos que la bacteria infecta, por lo que muchas de sus secuencias pueden no estar presentes en la base de datos. El genoma de *C. fetus* contiene a su vez escasas secuencias de profagos (Kienesberger et al. 2014), por lo cual es posible que la infección de la bacteria por estos virus sea relativamente poco frecuente. La mayoría de los *hits* significativos tienen identidad con ORFs de los propios genomas de *C. fetus* que están en la base de datos. Estos ORFs codifican para proteínas hipotéticas cuya función se desconoce, excepto en el caso del espaciador número 31, presente solamente en los patrones CRISPR1 de las cepas humanas uruguayas, que tiene identidad con un ORF de un profago. Este resultado indica que al menos en estas cepas, el sistema CRISPR-*cas* podría estar actuando como mecanismo de defensa contra la infección por bacteriófagos que contuvieran esta secuencia.

Los espaciadores número 33 y 39 tienen identidad completa con regiones del genoma de la cepa Cfv 84-112. La presencia de estos espaciadores podría deberse a que el sistema CRISPR-*cas* esté actuando en la regulación de la expresión génica. En algunos casos, como en *C. jejuni*, se ha propuesto que el sistema CRISPR-*cas* regula la expresión de proteínas de superficie y permite la adhesión a las células, ayudando a la bacteria a evadir la respuesta inmune del hospedero (Sampson y Weiss 2014).

La marcada conservación de las secuencias del DR y el líder, junto con la gran diversidad en las combinaciones de espaciadores en el locus CRISPR1 de los aislamientos bovinos sugieren que el mismo tiene alguna función adaptativa en estas cepas (Touchon et al. 2014, Barrangou y Horvath 2012, Horvath et al. 2008). La funcionalidad del locus como sistema inmune, sin embargo, se ve cuestionada por la ausencia de genes *cas* en estos aislamientos y en los genomas completos de aislamientos bovinos (Kienesberger et al. 2014, van der Graaf-van Bloois 2014a), aunque la presencia del gen *RAMP* podría estar indicando una sustitución de la función de estos genes por otros componentes del genoma. Dada la diversidad de genes *cas* que se han descrito, y el hecho de que genes no homólogos entre sí puedan cumplir funciones similares en las distintas etapas del proceso (Makarova et al. 2013, Zhang et al. 2013, Hale et al. 2012), es posible que en las cepas bovinas de *C. fetus*, algunas de las proteínas del metabolismo del ADN actúen en sustitución de las proteínas *cas*, e incluso que algunos de los ORFs que codifican para proteínas hipotéticas de función desconocida tengan un rol en este proceso.

Como alternativa, el locus CRISPR1 en bovinos podría no estar activo, posibilidad que se ve apoyada por la existencia de un aislamiento que posee un locus CRISPR sin espaciadores (patrón S). Si este es el caso, la diversidad observada podría ser un relicto de un pasado funcional, probablemente en el ancestro que sí portaba los genes *cas* (Fig. 25), o la consecuencia de recombinación homóloga intralocus, estimulada por la presencia de secuencias repetidas, que ha sido propuesta en otras bacterias donde se observan resultados similares (Bikard y Marraffini 2013, Nozawa et al. 2011).

En los loci que son funcionales, las diferencias en los CRISPR pueden deberse a diferencias en el contenido de fagos del ambiente, ya que la exposición a los ADNs foráneos es la que hace variar los patrones y dirige la adquisición y pérdida de espaciadores (McGhee y Sundin 2012). En *C. fetus*, estas diferencias podrían estar

marcadas por los distintos hospederos y los distintos tejidos que la bacteria coloniza. El hecho de que haya diferencias marcadas entre los CRISPR de los aislamientos de distintos hospederos, entonces, es un argumento a favor de la posible funcionalidad del locus.

Dado este conjunto de resultados, es posible que exista variación en la funcionalidad de los CRISPR en las diferentes cepas de *C. fetus*.

Consideramos que las secuencias de CRISPRs de *C. fetus*, además de ser una herramienta valiosa para el análisis de la variación en la especie, tienen característica distintiva de permitirnos observar la relación entre caracteres genéticos e importantes aspectos de la biología de este patógeno, como su preferencia de nicho y hospedero.

#### **6.4 Consideraciones finales**

Del conjunto de resultados de esta tesis, se derivan varias consideraciones acerca de la taxonomía de *C. fetus* y la evolución de su genoma.

En primer lugar, los aislamientos provenientes de diferentes hospederos presentan una marcada diferenciación con todas las metodologías de análisis de variabilidad utilizadas en esta tesis. Esto es particularmente evidente cuando se analiza el genoma completo de la cepa Cft 03-427, un aislamiento humano de origen reptiliano (Tu et al. 2005a, Tu y Dewhirst 2001). La distancia de esta cepa con respecto a los aislamientos bovinos y humanos avala la propuesta de considerar a estas cepas como una subespecie independiente de Cff y Cfv (Fitzgerald et al. 2014, Tu et al. 2005a), ya que la base genética de esta diferenciación parece clara con los resultados obtenidos en esta tesis, además de los mostrados en trabajos anteriores (Fitzgerald et al. 2014, Patrick et al. 2013, Dingle et al. 2010). La secuencia del gen 16S de esta cepa, sin embargo, es idéntica a la de las cepas aisladas de mamífero, lo cual confirma la pertenencia de los aislamientos reptilianos a la especie *C. fetus*.

En los primeros estudios que se realizaron para analizar la variación genética de *C. fetus*, basados en MLST, se propuso que la especie es relativamente joven en términos evolutivos y que tiene un modo de evolución clonal, en el cual los cambios se acumulan lentamente por transmisión vertical de mutaciones puntuales (Van Bergen

et al. 2005a). Según nuestros resultados, el genoma *core*, representado en esta tesis por los operones del ARN ribosomal y los siete genes contenidos en el esquema de MLST, parece tener una acumulación lenta de mutaciones puntuales. Sin embargo, hay otra porción del genoma, que representa el genoma accesorio y está compuesta por los CRISPR, los genes de virulencia, la isla genómica y los plásmidos, la cual presenta una mayor variación, y evoluciona más rápidamente por THG. A esto se suma la presencia de reordenamientos genómicos que durante su ocurrencia estimulan estos procesos. Esto tiene implicancias en el estudio de la patogenicidad de la especie, ya que la presencia de factores de virulencia, que frecuentemente son transmitidos por THG, tiene un grado moderado de variación que permite diferenciar los aislamientos de diferentes hospederos, y podría aportar información valiosa acerca del desarrollo de las diversas patologías que la bacteria causa, tanto en humanos como en animales.

En cuanto a la diferenciación de las subespecies Cff y Cfv, la misma es controversial y ha sido cuestionada por varios autores (van der Graaf-van Bloois et al. 2014b, Wang et al. 2013, Sprenger et al. 2012, Tu et al. 2005a, Hum et al. 1997, Penner 1988, Harvey y Greenwood 1983, Chang y Ogg 1971). Sin embargo, la denominación de las subespecies se mantiene debido a las diferencias en su presentación clínica y en su preferencia de hospedero en base a las cuales fueron definidas, que en la mayoría de los casos se corresponden con las diferencias bioquímicas que se han utilizado para identificarlas. Algunos autores apoyan la existencia de esta diferenciación (Chaban et al. 2012, Van Bergen et al. 2005a), pero si esta hipótesis es correcta, aun no se ha encontrado un marcador molecular que se corresponda completamente con los marcadores bioquímicos que se utilizan para diferenciar correctamente una subespecie de otra. La correspondencia entre las características ecológicas de las cepas y sus características bioquímicas puede no ser total, lo cual dificulta la búsqueda de marcadores moleculares para esta asociación, ya que, debido a las dificultades técnicas para evaluar de forma directa el comportamiento clínico de las cepas, se parte de la base de la diferenciación bioquímica para evaluar estos marcadores.

El conjunto de los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la visión de que la diferenciación bioquímica de Cff y Cfv no tiene una correlación directa con la variación genética dentro de la especie. Esto podría deberse a que las características utilizadas como marcador para diferenciarlas tienen una determinación compleja, y por lo tanto

su variación puede ser heterogénea, permitiendo que cepas no relacionadas filogenéticamente converjan en un mismo fenotipo. En particular para la tolerancia a la glicina, se ha propuesto que la herencia de este carácter es poligénica, y se han encontrado mutantes espontáneos que adquieren tolerancia a diferentes concentraciones de glicina en el medio de cultivo (Chang y Ogg 1971).

En cuanto a la subespecie Cft, el criterio inicialmente utilizado para su definición es el de su marcada diferenciación genética respecto a Cff y Cfv, por lo que su detección con métodos moleculares no presenta las mismas dificultades. Las diferencias de criterio en la definición de subespecies generan problemas en la comprensión de la taxonomía y evolución de la especie, por lo que consideramos que estas definiciones deben ser revisadas.

Un enfoque posible para investigar más a fondo esta cuestión es analizar genomas completos para esclarecer si las cepas que infectan distintos hospederos, y en particular las cepas de bovinos con diferente presentación clínica, tienen una diferenciación a nivel genómico, por ejemplo en su contenido de genes de virulencia. Si esta diferenciación se viera sustentada por estos estudios, los mismos serían un buen punto de partida para el desarrollo de nuevos métodos de diferenciación de Cff y Cfv, ya que como había sido puntualizado anteriormente, y se deriva también de los resultados de esta tesis, no existe hasta el momento una metodología eficiente para predecir el comportamiento clínico que define las subespecies, lo cual tiene una importancia fundamental a la hora de implementar planes de control. Esta importancia, en el caso de los bovinos, se debe a la necesidad de diferenciar las cepas que se transmiten por vía venérea de las que no, y aquéllas que causan síntomas de repetición de celos mediante la inflamación de las mucosas (que corresponderían a la subespecie Cfv) de las que pueden causar abortos por la colonización del embrión a través de la placenta (subespecie Cff). Relacionar la variación genética con estas características clínicas en base a las cuales fueron definidas las subespecies originalmente, entonces, sería un paso importante para el control de este patógeno en bovinos, y aportaría información valiosa para la comprensión de la epidemiología y la evolución de *C. fetus*.

## 7. Conclusiones

1. El método molecular de identificación del género *Campylobacter* funciona adecuadamente. La identificación de la especie *C. fetus* puede realizarse correctamente con el método de PCR en tiempo real basado en el gen 16S. Los métodos moleculares de diferenciación de las subespecies Cff y Cfv y para la identificación de Cfvi, en cambio, presentan discrepancias con los resultados de las pruebas bioquímicas. Esto podría deberse a que las características bioquímicas utilizadas tuvieran una base genética heterogénea, y por lo tanto las subespecies y el biovar determinados de este modo no constituyan entidades filogenéticas.
2. Los aislamientos analizados presentan una gran homogeneidad genética a nivel del MLST y de las secuencias de los operones ribosomales. Estos resultados indican que estas metodologías son más apropiadas para estudiar la evolución de *C. fetus* a largo plazo que para realizar estudios epidemiológicos.
3. La presencia de factores de virulencia tiene un grado de variación relativamente alto, lo cual refleja una dinámica compleja del contenido génico de la especie, que constituye una línea de investigación interesante para futuros estudios.
4. Los resultados de la amplificación de secuencias repetidas REP, ERIC y BOX tienen una escasa reproducibilidad, por lo que esta metodología no es adecuada para el estudio de la variabilidad genética en *C. fetus*.
5. El genoma de *C. fetus* tienen una gran plasticidad, cuyo estudio es fundamental para la comprensión de los mecanismos que rigen la evolución de la especie.
6. Las secuencias del locus CRISPR1 son las más variables del genoma, por lo que constituyen una herramienta promisoría para avanzar en el conocimiento epidemiológico de *C. fetus*.

7. Los aislamientos provenientes de diferentes hospederos presentan una marcada diferenciación con todas las metodologías de análisis de variabilidad utilizadas en esta tesis.
8. La diferenciación bioquímica de las subespecies Cff y Cfv no se correlaciona con las características genéticas analizadas en esta tesis.
9. La divergencia genética de la cepa Cft 03-427 con respecto a los aislamientos bovinos y humanos avala la propuesta de considerar a Cft como una subespecie independiente de Cff y Cfv, aunque su pertenencia a la especie se ve corroborada por las secuencias del gen 16S.
10. El genoma de *C. fetus* está compuesto por dos fracciones que evolucionan a diferentes ritmos. El genoma *core* evoluciona lentamente a través de mutaciones puntuales, y el genoma accesorio evoluciona principalmente por THG.

## 8. Perspectivas

1. La ausencia de una buena correlación de los métodos moleculares de diferenciación de subespecies con los bioquímicos subraya la necesidad de continuar con la búsqueda de marcadores genéticos que discriminen adecuadamente las subespecies. En este sentido, recientemente presentamos un proyecto, del cual soy responsable, al Fondo Sectorial de Salud Animal (ANII) para su financiación, que implica la secuenciación de genomas completos de aislamientos bovinos y la utilización de genómica comparativa para la identificación de blancos de diagnóstico. Una estrategia alternativa sería investigar la base genética de la diferenciación fenotípica, e intentar dilucidar la posible variación en la presencia o en la secuencia de los genes que codifican las vías metabólicas relacionadas con los fenotipos que diferencian a Cff de Cfv (tolerancia al medio con glicina y producción de H<sub>2</sub>S). La presencia (o no) de diferencias en estas vías metabólicas podría ayudar a definir mejor la justificación de la separación de *C. fetus* en las subespecies *fetus* y *venerealis*.
2. Dados los resultados obtenidos en esta tesis, consideramos que sería de gran importancia ampliar el estudio de la variación en el contenido de genes de virulencia, incorporando otros factores de virulencia tales como sistemas de dos componentes, proteínas de membrana, de la motilidad y de la resistencia a antibióticos, adhesinas y toxinas, particularmente la CDT, la cual es importante para la colonización de las células del hospedero, induciendo la detención del ciclo celular y posterior apoptosis. Esta información sería útil para entender las dinámicas evolutivas y la epidemiología de *C. fetus* a nivel regional, y ayudar a esclarecer la base genética de las preferencias de hospedero y tropismo de tejido en *C. fetus*. Esto es particularmente importante en las cepas capaces de infectar humanos, ya que las mismas tienen origen diverso y pueden provocar una gran variedad de síntomas, colonizando distintos tejidos. Investigar además la prevalencia de la isla genómica característica de Cfv en las cepas de *C. fetus* y



su posible relación con su origen geográfico, hospedero y presentación clínica es de suma importancia para evaluar el grado de patogenicidad de las cepas.

3. Dado que se encontró variación en el contenido de plásmidos de las cepas analizadas, es importante la realización de un estudio más profundo de los perfiles plasmídicos de las cepas, que puede dar información acerca de la variación de la especie en el contenido de elementos extracromosómicos.
4. Agregar nuevos genomas que se secuencien en el futuro próximo a los análisis de variaciones genómicas realizados en esta tesis, y profundizar en ellos, puede aportar interesantes avances en la comprensión de la evolución de la especie. Pensamos que los resultados de esta tesis hacen un aporte en este sentido, y ponen en evidencia la importancia de los estudios genómicos en *C. fetus*. A través de este tipo de estudios, se podrán explorar nuevas metodologías de estudio de la variación genética en la especie, que sean complementarios al uso de las secuencias de CRISPRs.
5. Para evaluar si las relaciones filogenéticas encontradas en *C. fetus* mediante las secuencias del CRISPR1 son consistentes con los datos de MLST, PFGE o AFLP, y para comparar el poder de discriminación de estas secuencias con el de los métodos de PFGE o AFLP, se necesita realizar un estudio más profundo que abarque un mayor número de cepas, con un rango geográfico más amplio y que provengan de diversos hospederos. Esto nos permitirá contar con un bagaje de información que nos permita rastrear la fuente de infecciones en humanos, además de aportar importante información epidemiológica que será muy valiosa en el control de la campylobacteriosis genital bovina.
6. La funcionalidad del locus CRISPR1, al menos en las cepas bovinas, no está esclarecida. Un avance importante para el estudio de la evolución del sistema CRISPR-*cas* en la especie sería investigar más a fondo esta cuestión. Estas investigaciones pueden llevarse a cabo mediante diversos enfoques, complementarios entre sí: la realización de infecciones con fagos a partir de

cultivos bacterianos y análisis de los espaciadores antes y después de la infección; infecciones experimentales en bovinos u otros hospederos, o en cultivos celulares, con cepas que porten tanto el sistema CRISPR-*cas* completo como sólo el CRISPR1, y comparación de los posibles cambios en el patrón de secuencias espaciadoras y secuenciación de los ARNs de diferentes aislamientos, que permitirían evaluar si los loci CRISPR y los genes *RAMP* y *cas* están siendo transcritos.

## 9. Referencias

- Abadia, E; Zhang, J; Ritacco, V; Kremer, K; Ruimy, R; Rigouts, L; Gomes, HM; Elias, AR; Fauville-Dufaux, M; Stoffels, K; Rasolofo-Razanamparany, V; Garcia de Viedma, D; Herranz, M; Al-Hajoj, S; Rastogi, N; Garzelli, C; Tortoli, E; Suffys, PN; van Soolingen, D; Refrégier, G; Sola, C. 2011. The use of microbead-based spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex to evaluate the quality of the conventional method: providing guidelines for Quality Assurance when working on membranes. *BMC infectious diseases* 11(1): 110.
- Abadia, E; Zhang, J; dos Vultos, T; Ritacco, V; Kremer, K; Aktas, E; Matsumoto, T; Refregier, G; van Soolingen, D; Gicquel, B; Sola, C. 2010. Resolving lineage assignation on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method. *Infection, genetics and evolution* 10(7): 1066–74.
- Abril, C; Brodard, I; Perreten, V. 2010. Two novel antibiotic resistance genes, tet(44) and ant(6)-Ib, are located within a transferable pathogenicity island in *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(7): 3052–5.
- Abril, C; Vilei, EM; Brodard, I; Burnens, A; Frey, J; Miserez, R. 2007. Discovery of insertion element ISCfe1: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clinical microbiology and infection* 13(10): 993–1000.
- ABSA. 2015. <http://www.absa.org/riskgroups/index.html>
- Achtman, M. 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annual review of microbiology* 62: 53–70.
- Ahmed, N; Dobrindt, U; Hacker, J; Hasnain, SE. 2008. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nature Reviews. Microbiology* 6: 37-94.
- Al-Attar, S; Westra, ER; van der Oost, J; Brouns, SJJ. 2011. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biological chemistry* 392(4): 277–89.
- Ali, A; Ussery, DW; On, S; Silva, A; Schneider, MP; Lage, AP; Miyoshi, A; Azevedo, V; Soares, SC; Santos, AR; Guimarães, LC; Barbosa, E; Almeida, SS; Abreu, VAC; Carneiro, AR; Ramos, RTJ; Bakhtiar, SM; Hassan, SS. 2012. *Campylobacter fetus* subspecies: comparative genomics and prediction of potential virulence targets. *Gene* 508(2): 145–56.

- Alikhan, N-F; Petty, NK; Ben Zakour, NL; Beatson, SA. 2011. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC genomics* 12(1): 402.
- Allen, RC; Popat, R; Diggie, SP; Brown, SP. 2014. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nature reviews. Microbiology* 12(4): 300–8.
- Almendros, C; Guzmán, NM; Díez-Villaseñor, C; García-Martínez, J; Mojica, FJM. 2012. Target Motifs Affecting Natural Immunity by a Constitutive CRISPR-Cas System in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 7(11): e50797.
- Alves, TM; Stynen, APR; Miranda, KL. 2011. Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina : epidemiologia , diagnóstico e controle 1. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(4): 336–44.
- Amir, A; Zeisel, A; Zuk, O; Elgart, M; Stern, S; Shamir, O; Turnbaugh, PJ; Soen, Y; Shental, N. 2013. High-resolution microbial community reconstruction by integrating short reads from multiple 16S rRNA regions. *Nucleic acids research* 41(22): e205.
- Aroori, S; Cogan, T; Humphrey, TJ. 2013. The Effect of Growth Temperature on the Pathogenicity of *Campylobacter*. *Current microbiology* 67 (3): 333-40
- Asakura, M; Samosornsuk, W; Taguchi, M; Kobayashi, K; Misawa, N; Kusumoto, M; Nishimura, K; Matsuhisa, A; Yamasaki, S. 2007. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microbial pathogenesis* 42(5-6): 174–83.
- Babu, M; Beloglazova, N; Flick, R; Graham, C; Skarina, T; Nocek, B; Gagarinova, A; Pogoutse, O; Brown, G; Binkowski, A; Phanse, S; Joachimiak, A; Koonin, EV; Savchenko, A; Emili, A; Greenblatt, J; Edwards, AM; Yakunin, AF. 2011. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Molecular microbiology* 79(2): 484–502.
- Bachmann, NL; Petty, NK; Ben Zakour, NL; Szubert, JM; Savill, J; Beatson, SA. 2014. Genome analysis and CRISPR typing of *Salmonella enterica* serovar Virchow. *BMC genomics* 15(1): 389.
- Bahl, H; Scholz, H; Bayan, N; Chami, M; Leblon, G; Gulik-Krzywicki, T; Shechter, E; Fouet, A; Mesnage, S; Tosi-Couture, E; Gounon, P; Mock, M; Conway de Macario, E; Macario, AJL; Fernández-Herrero, LA; Olabarria, G; Berenguer, J; Blaser, MJ; Kuen, B; Lubitz, W; Sára, M; Pouwels, PH; Kolen, KPAM; Boot, HJ; Palva, A; Truppe, M; Howorka, S; Schroll, G; Lechleitner, S; Resch, S. 1997. *Molecular biology of S-layers*. *FEMS Microbiology reviews* 20: 47-98.
- Bandelt, HJ; Forster, P; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16(1): 37–48.

- Barrangou, R; Marraffini, LA. 2014. CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Molecular cell* 54(2): 234–44.
- Barrangou, R; Horvath, P. 2012. CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual review of food science and technology* 3: 143–62.
- Barrangou, R; Fremaux, C; Deveau, H; Richards, M; Boyaval, P; Moineau, S; Romero, D a; Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819): 1709–12.
- Barrero, RA; Moolhuijzen, P; Indjein, L; Venus, B; Keeble-Gagnère, G; Power, J; Bellgard, MI. 2014. Draft Genome Sequences of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* bv. *venerealis* Strain B6 and bv. *intermedius* Strain 642-21. *Genome Announcements* 2 (5): e00943-14.
- Barros, MPS; França, CT; Lins, RHFB; Santos, MD V; Silva, EJ; Oliveira, MBM; Silveira-Filho, VM; Rezende, AM; Balbino, VQ; Leal-Balbino, TC. 2014. Dynamics of CRISPR Loci in Microevolutionary Process of *Yersinia pestis* Strains. *PloS one* 9(9): e108353.
- Barry, T; Colleran, G; Glennon, M; Dunican, LK; Gannon, F. 1991. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *Genome Research* 1(1): 51–6.
- Bastyns, K; Chapelle, S; Vandamme, P; Goossens, H; De Wachter, R. 1994. Species-specific Detection of *Campylobacters* Important in Veterinary Medicine by PCR Amplification of 23S rDNA Areas. *Systematic and Applied Microbiology* 17(4): 563–8.
- Batchelor, RA; Pearson, BM; Friis, LM; Guerry, P; Wells, JM. 2004. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology* 150(10): 3507–17.
- Belda, E; Moya, A; Silva, FJ. 2005. Genome rearrangement distances and gene order phylogeny in gamma-Proteobacteria. *Molecular biology and evolution* 22(6): 1456–67.
- Benejat, L; Gravet, A; Sifré, E; Ben Amor, S; Quintard, B; Mégraud, F; Lehours, P. 2013. 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. *Letters in applied microbiology* 2013: 1–6.
- Beveridge, TJ; Pouwels, PH; Sára, M; Kotiranta, A; Lounatmaa, K; Kari, K; Kerosuo, E; Haapasalo, M; Egelseer, EM; Schocher, I; Sleytr, UB; Morelli, L; Callegari, ML; Nomellini, JF; Bingle, WH; Smit, J; Leibovitz, E; Lemaire, M; Mira, I; Salamiou, S; Béguin, P; Ohayon, H; Gounon, P; Matuschek, M; Sahm, K; Bahl, H; Grogono-

- Thomas, R; Dworkin, J; Blaser, MJ; Woodland, RM; Newell, DG; Kessel, M; Koval, SF. 1997. Functions of S-layers. *FEMS Microbiology reviews* 20: 99-149.
- Bikard, D; Marraffini, LA. 2013. Control of gene expression by CRISPR-Cas systems. *F1000prime reports* 5: 47.
- Blaser, MJ. 1998. Editorial Response : *Campylobacter fetus*-Emerging Infection and Model System for Bacterial Pathogenesis at Mucosal Surfaces. *Clinical Infectious Diseases* 27(2): 256–8.
- Blaser, MJ; Gotschlich, EC. 1990. Surface Array Protein of *Campylobacter fetus*. *The journal of biological chemistry* 265(24): 14529-35.
- Blaser, MJ; Smith, PF; Janet, A; Heinzer, I; Bryner, JH. 1987. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* Infections: Serum Resistance Associated with High-Molecular-Weight Surface Proteins. *The journal of infectious diseases* 155 (4): 696-706.
- Blom, K; Patton, CM; Nicholson, MA; Swaminathan, B. 1995. Identification of *Campylobacter fetus* by PCR-DNA probe method. *Journal of clinical microbiology* 33(5): 1360–2.
- Bolotin, A; Quinquis, B; Sorokin, A; Ehrlich, SD. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151(8): 2551–61.
- Bondurant, RH. 2007. Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology* 68: 461–73.
- Bouchet, V; Huot, H; Goldstein, R. 2008. Molecular genetic basis of ribotyping. *Clinical microbiology reviews* 21(2): 262–73.
- Bourdon, N; Lemire, A; Fines-Guyon, M; Auzou, M; Périchon, B; Courvalin, P; Cattoir, V; Leclercq, R. 2011. Comparison of four methods, including semi-automated rep-PCR, for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of microbiological methods* 84(1): 74–80.
- Bove, R; López, F; Perera, C; Carracelas, B; Torres-Dini, D; De Souza, G; Azambuja, C; Bermúdez, J; Alzugaray, F; Mederos A. 2013. Diagnóstico de *Campylobacter fetus venerealis* por PCR, en un aborto bovino espontáneo. *Veterinaria (Montevideo)* 49 (192): 20-8.
- Briedis, DJ; Khamessan, A; Mclaughlin, RW; Vali, H; Panaritou, M; Chan, ECS. 2002. Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* from a Patient with Cellulitis. *Journal of clinical microbiology* 40(12): 4792–6.

- Brooks, BW; Devenish, J; Lutze-Wallace, CL; Milnes, D; Robertson, RH; Berlie-Surujballi, G. 2004. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples. *Veterinary microbiology* 103(1-2): 77–84.
- Brudey, K; Driscoll, JR; Rigouts, L; Prodinger, WM; Gori, A; Al-Hajoj, SA; Allix, C; Aristimuño, L; Arora, J; Baumanis, V; Binder, L; Cafrune, P; Cataldi, A; Cheong, S; Diel, R; Ellermeier, C; Evans, JT; Fauville-Dufaux, M; Ferdinand, S; Garcia de Viedma, D; Garzelli, C; Gazzola, L; Gomes, HM; Guttierrez, MC; Hawkey, PM; van Helden, PD; Kadival, GV; Kreiswirth, BN; Kremer, K; Kubin, M; Kulkarni, SP; Liens, B; Lillebaek, T; Ho, ML; Martin, C; Martin, C; Mokrousov, I; Narvskaja, O; Ngeow, YF; Naumann, L; Niemann, S; Parwati, I; Rahim, Z; Rasolofo-Razanamparany, V; Rasolonavalona, T; Rossetti, ML; Rüsck-Gerdes, S; Sajduda, A; Samper, S; Shemyakin, IG; Singh, UB; Somoskovi, A; Skuce, R a; van Soolingen, D; Streicher, EM; Suffys, PN; Tortoli, E; Tracevska, T; Vincent, V; Victor, TC; Warren, RM; Yap, SF; Zaman, K; Portaels, F; Rastogi, N; Sola, C. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology* 6: 23.
- Bryner, JH. 1964. *Vibrio* infection of the digestive organs of cattle. *American Journal of Veterinary Research* 25: 1048–50.
- Cady, KC; White, AS; Hammond, JH; Abendroth, MD; Karthikeyan, RSG; Lalitha, P; Zegans, ME; O’Toole, GA. 2011. Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbiology* 157(2): 430–7.
- Cahill, MJ; Köser, CU; Ross, NE; Archer, JAC. 2010. Read length and repeat resolution: Exploring prokaryote genomes using next-generation sequencing technologies. *PLoS ONE* 5(7): 1–9.
- Cain, AK; Boinett, CJ. 2013. A CRISPR view of genome sequences. *Nature Reviews Microbiology* 11(4): 226.
- Campbell, BJ; Engel, AS; Porter, ML; Takai, K. 2006. The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature reviews. Microbiology* 4(6): 458–68.
- Campero, CM; Anderson, ML; Walker, RL; Blanchard, PC; Barbano, L; Chiu, P; Martínez, A; Combessies, G; Bardon, JC; Cordeviola, J. 2005. Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 52(3): 138–41.
- Campero, CM; Moore, DP; Odeón, AC; Cipolla, AL; Odriozola, E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Veterinary research communications* 27(5): 359–69.

- Campero, CM. 2002. Pérdidas ocasionadas por las enfermedades venéreas de los bovinos. *Idia* 21(2): 127–31.
- Cao, G; Meng, J; Strain, E; Stones, R; Pettengill, J; Zhao, S; McDermott, P; Brown, E; Allard, M. 2013. Phylogenetics and differentiation of *Salmonella* newport lineages by whole genome sequencing. *PloS one* 8(2): e55687.
- Cao, B; Wang, M; Liu, L; Zhou, Z; Wen, S; Rozalski, A; Wang, L. 2009. 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions in four *Proteus* species. *Journal of microbiological methods* 77(1): 109–18.
- Carver, TJ; Rutherford, KM; Berriman, M; Rajandream, M-A; Barrell, BG; Parkhill, J. 2005. ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics* 21(16): 3422–3.
- Cascales, E; Christie, PJ. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology* 1(2): 137–49.
- Chaban, B; Chu, S; Hendrick, S; Waldner, C; Hill, JE. 2012. Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *veneralis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 76(3): 166–73.
- Chaban, B; Musil, KM; Himsworth, CG; Hill, JE. 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. *Applied and environmental microbiology* 75(10): 3055–61.
- Chan, K; Miller, WG; Mandrell, RE; Kathariou, S. 2007. The absence of intervening sequences in 23S rRNA genes of *Campylobacter coli* isolates from Turkeys is a unique attribute of a cluster of related strains which also lack resistance to erythromycin. *Applied and environmental microbiology* 73(4): 1208–14.
- Chang, W; Ogg, JE. 1971. Transduction and mutation to glycine tolerance in vibrio fetus. *American Journal of Veterinary Research* 32: 649–53.
- Chen, Y; Zhang, W; Knabel, SJ. 2007. Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal of clinical microbiology* 45(3): 835–46.
- Christensen, H; Jørgensen, K; Olsen, JE. 1999. Differentiation of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* by length and DNA sequence of the 16S-23S rRNA internal spacer region. *Microbiology* 145: 99–105.
- Christie, PJ; Atmakuri, K; Krishnamoorthy, V; Jakubowski, S; Cascales, E. 2005. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annual review of microbiology* 59: 451–85.



- Cilia, V; Lafay, B; Christen, R. 1996. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Molecular biology and evolution* 13(3): 451–61.
- Clarridge. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *17(4)*: 840–62.
- Clemmons, EA; Jean SM; Machiah, DK; Breeding, E; Sharma, P. 2014. Extraintestinal campylobacteriosis in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Comparative medicine* 64(6):496-500.
- Cobo, ER; Corbeil, LB; BonDurant, RH. 2011. Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. *Journal of reproductive immunology* 89(1): 55–61.
- Cobo, ER; Morsella, C; Cano, D; Cipolla, A; Campero, CM. 2004. Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. *Theriogenology* 62(8): 1367–82.
- Cobo, ER; Cipolla, A; Morsella, C; Cano, D; Campero, C. 2003. Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 50(2): 75–80.
- Cody, AJ; Maiden, MJC; Dingle, KE. 2009. Genetic diversity and stability of the *porA* allele as a genetic marker in human *Campylobacter* infection. *Microbiology* 155 (12): 4145–54.
- Colles, FM; Maiden, MCJ. 2012. *Campylobacter* sequence typing databases: applications and future prospects. *Microbiology* 158: 2695–709.
- Colles, FM; McCarthy, ND; Howe, JC; Devereux, CL; Gosler, AG; Maiden, MCJ. 2009. Dynamics of *Campylobacter* colonization of a natural host, *Sturnus vulgaris* (European starling). *Environmental microbiology* 11(1): 258–67.
- Condon, C; Liveris, D; Squires, C; Schwartz, I; Squires, CL. 1995. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *Journal of bacteriology* 177(14): 4152–6.
- Condon, C; Philips, J; Fu, Z; Squires, C; Squires, CL. 1992. Comparison of the expression of the RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* 1(1): 4175–85.
- Corbeil, LB; Campero, CM; Rhyan, JC; BonDurant, RH. 2003. Vaccines against sexually transmitted diseases. *Reproductive biology and endocrinology* 1: 118.
- Cui, Y; Li, Y; Gorgé, O; Platonov, ME; Yan, Y; Guo, Z; Pourcel, C; Dentovskaya, S V; Balakhonov, S V; Wang, X; Song, Y; Anisimov, AP; Vergnaud, G; Yang, R. 2008. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PloS one* 3(7): e2652.

- Decousser, J-W; Prouzet-Mauléon, V; Bartizel, C; Gin, T; Colin, J-P; Fadel, N; Holler, C; Pollet, J; Megraud, F. 2007. Fatal relapse of a purulent pleurisy caused by *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Journal of clinical microbiology* 45(7): 2334–6.
- Delaney, NF; Balenger, S; Bonneaud, C; Marx, CJ; Hill, GE; Ferguson-Noel, N; Tsai, P; Rodrigo, A; Edwards, SV. 2012. Ultrafast evolution and loss of CRISPRs following a host shift in a novel wildlife pathogen, *Mycoplasma gallisepticum*. *PLoS genetics* 8(2): e1002511.
- Deveau, H; Barrangou, R; Garneau, JE; Labonté, J; Fremaux, C; Boyaval, P; Romero, DA; Horvath, P; Moineau, S. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology* 190(4): 1390–400.
- Devenish, J; Brooks, B; Perry, K; Milnes, D; Burke, T; McCabe, D; Duff, S. 2005. Validation of a Monoclonal Antibody-Based Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Campylobacter fetus*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 12(11): 1261–8.
- DIEA- MGAP. 2012. Estadísticas agropecuarias. Anuario estadístico agropecuario 2012. [http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,27,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU;,.=](http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,27,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU;,.).
- Díez-Villaseñor, BC; Almendros, C; Mojica, FJM; Díez-Villaseñor, C; García-Martínez, J. 2010. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* 156(5): 1351–61.
- Dingle, KE; Blaser, MJ; Tu, Z-C; Pruckler, J; Fitzgerald, C; van Bergen, MAP; Lawson, AJ; Owen, RJ; Wagenaar, JA. 2010. Genetic relationships among reptilian and mammalian *Campylobacter fetus* strains determined by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology* 48(3): 977–80.
- Dingle, KE; Colles, FM; Wareing, DRA; Ure, R; Fox, AJ; Bolton, FE; Bootsma, HJ; Willems, RJL; Urwin, R; Maiden, MCJ. 2001. Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. *Journal of clinical microbiology* 39(1): 14–23.
- Dobrindt, U; Zdziarski, J; Salvador, E; Hacker, J. 2010. Bacterial genome plasticity and its impact on adaptation during persistent infection. *International journal of medical microbiology* 300(6): 363–6.
- DSMZ- Bacterial Nomenclature Up-to-Date. 2015. <http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/bacterial-nomenclature-up-to-date.html>.
- Dubreuil, JD; Kostrzynska, M; Austin, JW; Trust, TJ. 1990. Antigenic differences among *Campylobacter fetus* S-layer proteins. *Journal of bacteriology* 172(9): 5035–43.
- Duim, B; Vandamme, PA; Rigter, A; Laevens, S; Dijkstra, JR; Wagenaar, JA. 2001. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology* 147(10): 2729–37.

- Dworkin, J; Blaser, MJ. 1997. Molecular mechanisms of *Campylobacter fetus* surface layer protein expression. *Molecular microbiology* 26(3): 433–40.
- Dworkin, J; Blaser, MJ. 1997. Nested DNA inversion as a paradigm of programmed gene rearrangement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(3): 985–90.
- Dworkin, J. 1995. Segmental conservation of *sapA* sequences in type B *Campylobacter fetus* Cells. *The journal of biological chemistry* 270 (25): 15093-101
- Dworkin, J; Tummuru, MK; Blaser, MJ. 1995. A lipopolysaccharide-binding domain of the *Campylobacter fetus* S-layer protein resides within the conserved N terminus of a family of silent and divergent homologs. *Journal of bacteriology* 177(7): 1734–41.
- Enright, MC; Spratt, BG. 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 144: 3049–60.
- Eppinger, M; Baar, C; Raddatz, G; Huson, DH; Schuster, SC. 2004. Comparative analysis of four Campylobacterales. *Nature reviews. Microbiology* 2(11): 872–85.
- Eyers, M; Chapelle, S; Van Camp, G; Goossens, H; De Wachter, R. 1994. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *Journal of clinical microbiology* 31(12): 3340-3.
- Fabre, L; Le Hello, S; Roux, C; Issenhuth-Jeanjean, S; Weill, F-X. 2014. CRISPR Is an Optimal Target for the Design of Specific PCR Assays for *Salmonella enterica* Serotypes Typhi and Paratyphi A. *PLoS neglected tropical diseases* 8(1): e2671.
- Fabre, L; Zhang, J; Guigon, G; Le Hello, S; Guibert, V; Accou-Demartin, M; de Romans, S; Lim, C; Roux, C; Passet, V; Diancourt, L; Guibourdenche, M; Issenhuth-Jeanjean, S; Achtman, M; Brisse, S; Sola, C; Weill, F-X. 2012. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. *PloS one* 7(5): e36995.
- Fagan, RP; Fairweather, NF. 2014. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nature reviews. Microbiology* 12(3): 211–22.
- Fahmy, D; Day, CJ; Korolik, V. 2012. Comparative in silico analysis of chemotaxis system of *Campylobacter fetus*. *Archives of microbiology* 194(2): 57-63.
- FAOSTAT. 2013. <http://faostat.fao.org>.
- Feil, EJ; Enright, MC. 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Current opinion in microbiology* 7(3): 308–13.

- Fischer, W; Breithaupt, U; Kern, B; Smith, SI; Spicher, C; Haas, R. 2014. A comprehensive analysis of *Helicobacter pylori* plasticity zones reveals that they are integrating conjugative elements with intermediate integration specificity. *BMC genomics* 15(1): 310.
- Fitzgerald, C; Tu, ZC; Patrick, M; Stiles, T; Lawson, AJ; Santovenia, M; Gilbert, MJ; van Bergen, M; Joyce, K; Pruckler, J; Stroika, S; Duim, B; Miller, WG; Loparev, VL; Sinnige, JC; Fields, PI; Tauxe, RV; Blaser, MJ; Wagenaar, JA. 2014. Description of *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64 (9): 2944-8.
- Foley, SL; Lynne, AM; Nayak, R. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, genetics and evolution* 9(4): 430-40.
- Fóscolo, CB; Pellegrin, AO; Leite, RC; Stynen, APR; Lage, AP. 2005. Vaccination of bulls against Bovine Genital Campylobacteriosis: a therapeutic approach. *Animal reproduction* 2 (2): 122-7.
- Fouts, DE; Mongodin, EF; Mandrell, RE; Miller, WG; Rasko, DA; Ravel, J; Brinkac, LM; DeBoy, RT; Parker, CT; Daugherty, SC; Dodson, RJ; Durkin, AS; Madupu, R; Sullivan, SA; Shetty, JU; Ayodeji, MA; Shvartsbeyn, A; Schatz, MC; Badger, JH; Fraser, CM; Nelson, KE. 2005. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS biology* 3(1): e15.
- Fricke, WF; Mammel, MK; McDermott, PF; Tartera, C; White, DG; Leclerc, JE; Ravel, J; Cebula, TA. 2011. Comparative genomics of 28 *Salmonella enterica* isolates: evidence for CRISPR-mediated adaptive sublineage evolution. *Journal of bacteriology* 193(14): 3556-68.
- Fujihara, N; Takakura, S; Saito, T; Linuma, Y. 2006. A case of perinatal sepsis by *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* infection successfully treated with carbapenem e case report and literature review. *Journal of infection* 53: e199-e200.
- Fujita, M; Fujimoto, S; Morooka, T; Amako, K. 1995. Analysis of strains of *Campylobacter fetus* by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology* 33(6): 1676-8.
- Gädicke, P; Monti, G. 2012. Factors related to the level of occurrence of bovine abortion in Chilean dairy herds. *Preventive veterinary medicine* 110 (2):183-9.
- Gallay, A; Prouzet-mauléon, V; Kempf, I; Lehours, P; Labadi, L; Camou, C; Denis, M; Valk, H De; Desenclos, J; Mégraud, F. 2007. *Campylobacter* Antimicrobial Drug Resistance among Humans, Broiler, Chickens, and Pigs, France. *Emerging infectious diseases* 13(2): 259-66.

- Garcia, MM; Lutze-Wallace, CL; Denes, AS; Eaglesome, MD; Holst, E; Blaser, MJ. 1995. Protein shift and antigenic variation in the S-layer of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of *sapA* homologs. *Journal of bacteriology* 177(8): 1976–80.
- Garcia, MM; Ruckerbauer, GM; Eaglesome, MD; Boisclair, WE. 1983. Detection of *Campylobacter fetus* in artificial insemination bulls with a transport enrichment medium. *Canadian journal of comparative medicine* 47(3): 336–40.
- George, HA; Hoffman, PS; Smibert, RM; Krieg, NR. 1978. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *Journal of clinical microbiology* 8(1): 36–41.
- Gilbert, MJ; Kik, M; Timmerman, AJ; Severs, TT; Kusters, JG; Duim, B; Wagenaar, JA. 2014. Occurrence, diversity, and host association of intestinal *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* in reptiles. *PloS one* 9(7): e101599.
- Gilbert, MJ; Miller, WG; Yee, E; Blaser, MJ; Wagenaar, JA; Duim, B; Gilbert; Sinnige, JC; Fields, PI; Tauxe, R V. 2013. Complete Genome Sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* Strain 03-427<sup>T</sup>. *Genome announcements* 1(6): 3–4.
- Gorkiewicz, G; Kienesberger, S; Schober, C; Scheicher, SR; Gully, C; Zechner, R; Zechner, EL. 2010. A genomic island defines subspecies-specific virulence features of the host-adapted pathogen *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Journal of bacteriology* 192(2): 502–17.
- Gorkiewicz, G; Feierl, G; Schober, C; Dieber, F; Ko, J; Zechner, R; Zechner, EL. 2003. Species-Specific Identification of Campylobacters by Partial 16S rRNA Gene Sequencing. *Society* 41(6): 2537–46.
- Griekspoor, P; Colles, FM; McCarthy, ND; Hansbro, PM; Ashhurst-Smith, C; Olsen, B; Hasselquist, D; Maiden, MCJ; Waldenström, J. 2013. Marked host specificity and lack of phylogeographic population structure of *Campylobacter jejuni* in wild birds. *Molecular ecology* 22(5): 1463–72.
- Grissa, I; Vergnaud, G; Pourcel, C. 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC bioinformatics* 8: 172.
- Groff, ACM. 2005. PCR para o diagnóstico da campilobacteriose genital bovina. Tesis de maestría, Universidade Federal de Santa Maria. 39 pp.
- Grogono-Thomas, R; Dworkin, J; Blaser, MJ; Newell, DG. 2000. Roles of the surface layer proteins of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* in ovine abortion. *Infection and immunity* 68(3): 1687–91.

- Gunderson, FF; Cianciotto, NP. 2013. The CRISPR-Associated Gene *cas2* of *Legionella pneumophila* Is Required for Intracellular Infection of Amoebae. *mBio* 4(2): e00074-13.
- Gupta, RS. 2006. Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (Campylobacteriales). *BMC genomics* 7: 167.
- Gurtler, V; Stanisich, V. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142:3-16.
- Haft, DH; Selengut, J; Mongodin, EF; Nelson, KE. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology* 1(6): e60.
- Hale, CR; Majumdar, S; Elmore, J; Pfister, N; Compton, M; Olson, S; Resch, AM; Glover, CVC; Graveley, BR; Terns, RM; Terns, MP. 2012. Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Molecular cell* 45(3): 292–302.
- Hargreaves, KR; Flores, CO; Trevor, D; Lawley, TD; Clokie, RJ. 2014. Abundant and Diverse Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat Spacers in *Clostridium difficile* Strains and Prophages Target Multiple Phage Types within This Pathogen. *mBio* 5(5): e01045-13.
- Harvey, SM; Greenwood, JR. 1983. Relationships Among Catalase-Positive Campylobacters Determined by Deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33(2): 275-84.
- Hauck, Y; Soler, C; Jault, P; Mérens, A; Gérome, P; Nab, C Mac; Trueba, F; Bargues, L; Thien, HV; Vergnaud, G; Pourcel, C. 2012. Diversity of *Acinetobacter baumannii* in Four French Military Hospitals, as Assessed by Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis. *PloS one* 7(9): e44597.
- Hayashi, K; Tazumi, A; Nakanishi, S; Nakajima, T; Matsubara, K; Ueno, H; Moore, JE; Millar, BC; Matsuda, M. 2012. Molecular analysis of the 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) and truncated tRNA(Ala) gene segments in *Campylobacter lari*. *World journal of microbiology & biotechnology* 28(6): 2403–10.
- Hebert, G; Hollis, DG; Weaver, RE; Lambert, MA; Blaser, MJ; Moss, W. 1982. 30 Years of Campylobacters : Biochemical Characteristics and a Biotyping Proposal for *Campylobacter jejuni*. *Journal of clinical microbiology* 15(6): 1065–73.
- Helm, RA; Lee, AG; Christman, HD; Maloy, S. 2003. Genomic rearrangements at *rrn* operons in *Salmonella*. *Genetics* 165(3): 951–9.
- Heras, B; Scanlon, MJ; Martin, JL. 2014. Targeting Virulence not Viability in the Search for Future Antibacterials. *British journal of clinical pharmacology* 79(2): 208-15.

- Ho Sui, SJ; Fedynak, A; Hsiao, WWL; Langille, MGI; Brinkman, FSL. 2009. The association of virulence factors with genomic islands. *PloS one* 4(12): e8094.
- Hofreuter, D; Novik, V; Galán, JE. 2008. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell host & microbe* 4(5): 425–33.
- Holden, M; Crossman, L; Cerdeño-Tárraga, A; Parkhill, J. 2004. Pathogenomics of non-pathogens. *Nature reviews. Microbiology* 2(2): 91.
- Horvath, P; Romero, DA; Coûté-Monvoisin, A-C; Richards, M; Deveau, H; Moineau, S; Boyaval, P; Fremaux, C; Barrangou, R. 2008. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology* 190(4): 1401–12.
- Hsiao, WWL; Ung, K; Aeschliman, D; Bryan, J; Finlay, BB; Brinkman, FSL. 2005. Evidence of a large novel gene pool associated with prokaryotic genomic islands. *PLoS genetics* 1(5): e62.
- Hum, S; Quinn, K; Brunner, J; On, SLW. 1997. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J* 75(11): 827–31.
- Hunter, PR; Gaston, MA. 1988. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J Clin Microbiol* 26(11): 2465–6.
- Hurcombe, SD; Fox, JG; Kohn, CW. 2009. Isolation of *Campylobacter Fetus* Subspecies *Fetus* in a Two-Year-Old Quarterhorse with Chronic Diarrhea of an Undetermined Etiology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21(2): 266–9.
- Ichiyama, S; Hirai, S; Minami, T; Nishiyama, Y. 1998. *Campylobacter fetus* Subspecies *fetus* Cellulitis Associated *Campylobacter* with Bacteremia in Debilitated Hosts. *27(2): 252–5.*
- Inglis, GD; Kalischuk, LD. 2003. Use of PCR for Direct Detection of *Campylobacter* Species in Bovine Feces. *Applied and environmental microbiology* 69(6): 3435–47.
- Iraola, G; Pérez, R; Naya, H; Paolicchi, F; Pastor, E; Valenzuela, S; Calleros, L; Velilla, A; Hernández, M; Morsella, C. 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.
- Iraola, G; Pérez, R; Naya, H; Paolicchi, F; Harris, D; Lawley, TD; Rego, N. Hernández, M; Calleros, L; Carretto, L; Velilla, A; Morsella, C; Méndez, A; Gioffre, A. 2013. Complete Genome Sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* Biovar Intermedius, Isolated from the Prepuce of a Bull. *1(4): e00526-13.*

- Iraola, G; Hernández, M; Calleros, L; Paolicchi, F; Silveyra, S; Velilla, A; Carretto, L; Rodríguez, E; Pérez, R; Rodr, E; Ruben, P. 2012. Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *Journal of veterinary science* 13(4): 371–6.
- Iriarte, P; Owen, RJ. 1996. PCR-RFLP analysis of the large subunit (23S) ribosomal RNA genes of *Campylobacter jejuni*. *Letters in applied microbiology* 23(3): 163–6.
- Jansen, R; Van Embden, JD; Gaastra, W; Schouls, LM. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology* 43(6): 1565–75.
- Jensen, MA; Webster, JA; Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and environmental microbiology* 59(4): 945–52.
- Jiang, W; Maniv, I; Arain, F; Wang, Y; Levin, BR; Marraffini, LA. 2013. Dealing with the Evolutionary Downside of CRISPR Immunity: Bacteria and Beneficial Plasmids. *PLoS genetics* 9(9): e1003844.
- Jimenez, DF; Perez, AM; Carpenter, TE; Martinez, A. 2011. Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires , Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 101(3-4): 157–62.
- Jonsson, J; Hoffner, S; Berggren, I; Bruchfeld, J; Ghebremichael, S; Pennhag, A; Groenheit, R. 2014. Comparison between RFLP and MIRU-VNTR Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Stockholm 2009 to 2011. *PloS one* 9(4): e95159.
- Juhas, M; van der Meer, JR; Gaillard, M; Harding, RM; Hood, DW; Crook, DW. 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS microbiology reviews* 33(2): 376–93.
- Kamerbeek, J; Schouls, L; Kolk, A; van Agterveld, M; van Soolingen, D; Kuijper, S; Bunschoten, A; Molhuizen, H; Shaw, R; Goyal, M; van Embden, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of clinical microbiology* 35(4): 907–14.
- Karginov, FV; Hannon, GJ. 2010. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Molecular cell* 37(1): 7-19.
- Kerstens, K; Vos, PDE; Gillis, M; Swings, J; Vandamme, P; Stackebrandt, E. 2006. Introduction to the Proteobacteria. *Prokaryotes* 5:3–37.
- Khan, IUH; Edge, TA. 2007. Development of a novel triplex PCR assay for the detection and differentiation of thermophilic species of *Campylobacter* using 16S-23S rDNA



internal transcribed spacer (ITS) region. *Journal of applied microbiology* 103(6): 2561–9.

Kienesberger, S; Sprenger, H; Wolfgruber, S; Halwachs, B; Thallinger, GG; Perez-Perez, GI; Blaser, MJ; Zechner, EL; Gorkiewicz, G. 2014. Comparative Genome Analysis of *Campylobacter fetus* Subspecies Revealed Horizontally Acquired Genetic Elements Important for Virulence and Niche Specificity. *PloS one* 9(1): e85491.

Kienesberger, S; Schober Trummler, C; Fauster, A; Lang, S; Sprenger, H; Gorkiewicz, G; Zechner, EL. 2011. Interbacterial macromolecular transfer by the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* type IV secretion system. *Journal of bacteriology* 193(3): 744–58.

Kienesberger, S; Gorkiewicz, G; Joainig, MM; Scheicher, SR; Leitner, E; Zechner, EL. 2007. Development of experimental genetic tools for *Campylobacter fetus*. *Applied and environmental microbiology* 73(14): 4619–30.

Kiggins, EM; Plastringe, WN. 1958. Some metabolic activities of *Vibrio fetus* of bovine origin. *Journal of bacteriology* 75(2): 205–8.

Kolbert, CP; Persing, DH. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Current opinion in microbiology* 2(3): 299–305.

Korczak, BM; Stieber, R; Emler, S; Burnens, AP; Frey, J; Kuhnert, P. 2006. Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from *rpoB* sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56(5): 937–45.

Krause, M. 2008. Pathogenicity mechanisms of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus*: characterization of pathogenicity factors and signaling in host cell invasion. Tesis de doctorado. Otto-von-Guericke-Universität. 146 pp.

Kunin, V; Sorek, R; Hugenholtz, P. 2007. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome biology* 8(4): R61.

Kupczok, A; Bollback, JP. 2014. Motif depletion in bacteriophages infecting hosts with CRISPR systems. *BMC genomics* 15: 663.

De la Cruz, F; Frost, LS; Meyer, RJ; Zechner, EL. 2010. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews* 34(1): 18–40.

Lacher, DW; Steinsland, H; Blank, TE; Donnenberg, MS; Whittam, TS. 2007. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *Journal of bacteriology* 189(2): 342–50.

Leaper, S; Owen, RJ. 1981. Identification of Catalase-Producing *Campylobacter* Species Based on Biochemical Characteristics and on Cellular Fatty Acid Composition. *Current microbiology* 6: 31–35.

- Ledina, D; Ivić, I; Karanović, J; Karanović, N; Kuzmičić, N; Ledina, D; Puljiz, Z. 2012. *Campylobacter fetus* infection presenting with bacteremia and cellulitis in a 72-year-old man with an implanted pacemaker: a case report. *Journal of medical case reports* 6(1): 414.
- Lee, ZM-P; Bussema, C; Schmidt, TM. 2009. rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic acids research* 37: D489–93.
- Levin, BR; Moineau, S; Bushman, M; Barrangou, R. 2013. The Population and Evolutionary Dynamics of Phage and Bacteria with CRISPR–Mediated Immunity. *PLoS Genetics* 9(3): e1003312.
- Li, W; Raoult, D; Fournier, P-E. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS microbiology reviews* 33(5): 892–916.
- Liguori, AP; Warrington, SD; Ginther, JL; Pearson, T; Bowers, J; Glass, MB; Mayo, M; Wuthiekanun, V; Engelthaler, D; Peacock, SJ; Currie, BJ; Wagner, DM; Keim, P; Tuanyok, A. 2011. Diversity of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) reveals phylogenetic relationships in *Burkholderia pseudomallei* and its near-neighbors. *PLoS one* 6(12): e29323.
- Lin, T; Lin, L; Zhang, F. 2014. Review on Molecular Typing Methods of Pathogens. *Open Journal of medical microbiology* 147–52.
- Linton, D; Owen, RJ; 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(9): 707–18.
- Linton, D; Clewley, JP; Burnens, A; Owen, RJ; Stanley, J. 1994. An intervening sequence (IVS) in the 16S rRNA gene of the eubacterium *Helicobacter canis*. *Nucleic acids research* 22(11): 1954–8.
- Liu, F; Barrangou, R; Gerner-Smidt, P; Ribot, EM; Knabel, SJ; Dudley, EG. 2011. Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Applied and environmental microbiology* 77(6): 1946–56.
- Liu, SL; Sanderson, KE. 1996. Highly plastic chromosomal organization in *Salmonella typhi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(19): 10303–8.
- Lopez-Sanchez, M-J; Sauvage, E; Da Cunha, V; Clermont, D; Ratsima Hariniaina, E; Gonzalez-Zorn, B; Poyart, C; Rosinski-Chupin, I; Glaser, P. 2012. The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. *Molecular microbiology* 85(6): 1057–71.

- Louwen, R; Baarlen, P; Vliet, a. HM; Belkum, A; Hays, JP; Endtz, HP. 2012a. *Campylobacter* bacteremia: A rare and under-reported event? *European Journal of Microbiology and Immunology* 2(1): 76–87.
- Louwen, R; Horst-Kreft, D; de Boer, AG; van der Graaf-van Bloois, L; de Knecht, G; Hamersma, M; Heikema, AP; Timms, AR; Jacobs, BC; Wagenaar, JA; Endtz, HP; van der Oost, J; Wells, JM; Nieuwenhuis, EES; van Vliet, AHM; Willemsen, PTJ; van Baarlen, P; van Belkum, A. 2012b. A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 32(2): 207-26.
- Lowder, B V; Guinane, CM; Ben Zakour, NL; Weinert, LA; Conway-Morris, A; Cartwright, RA; Simpson, AJ; Rambaut, A; Nübel, U; Fitzgerald, JR. 2009. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(46): 19545–50.
- Lupski, JR; Weinstock, GM. 1992. Short, Interspersed Repetitive DNA Sequences in Prokaryotic Genomes. *Microbiology* 174(14): 4525–9.
- Maddison, WP; Maddison, DR. 2014. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.01 <http://mesquiteproject.org>.
- Mai, HM; Irons, PC; Kabir, J; Thompson, PN. 2013a. Herd-level risk factors for *Campylobacter fetus* infection, *Brucella* seropositivity and within-herd seroprevalence of brucellosis in cattle in northern Nigeria. *Preventive veterinary medicine* 111(3-4): 256–67.
- Mai, HM; Irons, PC; Kabir, J; Thompson, PN. 2013b. Prevalence of bovine genital campylobacteriosis and trichomonosis of bulls in northern Nigeria. *Acta veterinaria scandinavica* 55(1): 56.
- Maiden, MCJ. 2008. Population genomics: diversity and virulence in the *Neisseria*. *Current Opinion in Microbiology* 11(5): 467–71.
- Maiden, MC; Bygraves, JA; Feil, E; Morelli, G; Russell, JE; Urwin, R; Zhang, Q; Zhou, J; Zurth, K; Caugant, DA; Feavers, IM; Achtman, M; Spratt, BG. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6): 3140–5.
- Makarova, KS; Wolf, YI; Koonin, EV. 2013. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Research* 2013: 1–18.
- Makarova, KS; Aravind, L; Wolf, YI; Koonin, EV. 2011a. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology direct* 6(1): 38.

- Makarova, KS; Haft, DH; Barrangou, R; Brouns, SJJ; Charpentier, E; Horvath, P; Moineau, S; Mojica, FJM; Wolf, YI; Yakunin, AF; van der Oost, J; Koonin, EV. 2011b. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature reviews. Microbiology* 9(6): 467–77.
- Makarova, KS; Grishin, NV; Shabalina, SA; Wolf, YI; Koonin, EV. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct* 1: 7.
- Makarova, KS; Aravind, L; Grishin, NV; Rogozin, IB; Koonin, EV. 2002. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Gene* 30(2): 482–96.
- Makarova, KS; Ponomarev, VA; Koonin, EV. 2001. Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. *Genome biology* 2(9): research 0033.1
- Man, SM. 2011. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 8(12): 669–85.
- Man, SM; Kaakoush, NO; Octavia, S; Mitchell, H. 2010. The internal transcribed spacer region, a new tool for use in species differentiation and delineation of systematic relationships within the *Campylobacter* genus. *Applied and environmental microbiology* 76(10): 3071–81.
- Marraffini, LA. 2013. CRISPR-Cas Immunity against Phages: Its Effects on the Evolution and Survival of Bacterial Pathogens. *PLoS Pathogens* 9(12): e1003765.
- Marraffini, LA; Sontheimer, EJ. 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature reviews. Genetics* 11(3): 181–90.
- Mccoy, EC; Wiltberger, HA; Winter, AJ. 1976. Antibody-Mediated Immobilization of *Campylobacter fetus*: Inhibition by a Somatic Antigen Hooke Filament, Infection and immunity 13(4): 1266–72.
- McGhee, GC; Sundin, GW. 2012. *Erwinia amylovora* CRISPR Elements Provide New Tools for Evaluating Strain Diversity and for Microbial Source Tracking. *PloS one* 7(7): e41706.
- McGoldrick, A; Chanter, J; Gale, S; Parr, J; Toszeghy, M; Line, K. 2013. Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. *Journal of microbiological methods* 94(3): 199–204.
- Mcmillen, L; Fordyce, G; Doogan, VJ; Lew, AE. 2006. Comparison of Culture and a Novel 5' Taq Nuclease Assay for Direct Detection of *Campylobacter fetus* subsp.

*venerealis* in Clinical Specimens from Cattle. *Journal of clinical microbiology* 44(3): 938–945.

Meinersmann, RJ; Phillips, RW; Ladely, SR. 2009. Inter- and intra-genomic heterogeneity of the intervening sequence in the 23S ribosomal RNA gene of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Systematic and applied microbiology* 32(2): 91–100.

Meinersmann, RJ; Patton, CM; Evins, GM; Wachsmuth, IK; Fields, PI. 2002. Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52(5): 1789–97.

Mellmann, A; Mosters, J; Bartelt, E; Roggentin, P; Ammon, A; Friedrich, AW; Karch, H; Harmsen, D. 2004. Sequence-Based Typing of *flaB* Is a More Stable Screening Tool Than Typing of *flaA* for Monitoring of *Campylobacter* Populations. *Journal of clinical microbiology* 42(10): 4840–2.

Messner, P; Schaffer, C; Egelseer, E; Sleytr, UB. 2010. Occurrence, Structure, Chemistry, Genetics, Morphogenesis, and Functions of S-Layers. En: *Prokaryotic Cell Wall Compounds*. Eds. König, H; Claus, H; Varma, A. Springer, Berlin. Pp. 53-109.

Miller, WG; Chapman, MH; Yee, E; On, SLW; McNulty, DK; Lastovica, AJ; Carroll, AM; McNamara, EB; Duffy, G; Mandrell, RE. 2012. Multilocus Sequence Typing Methods for the Emerging *Campylobacter* Species *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C. concisus*, and *C. curvus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2: 45.

Miller, WG; Wesley, I V; On, SLW; Houf, K; Mégraud, F; Wang, G; Yee, E; Srijan, A; Mason, CJ. 2009. First multi-locus sequence typing scheme for *Arcobacter* spp. *BMC microbiology* 9: 196.

Miller, WG; On, SLW; Wang, G; Fontanoz, S; Lastovica, AJ; Mandrell, RE. 2005. Extended Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter coli*. *Journal of clinical microbiology* 43(5): 2315–29.

Mira, A; Klasson, L; Andersson, SGE. 2002. Microbial genome evolution: sources of variability. *Current opinion in microbiology* 5(5): 506–12.

Miyazaki, R; Minoia, M; Pradervand, N; Sentchilo, V; Sulser, S; Reinhard, F; Van Der Meer, JR. The *clc* Element and Related Genomic Islands in Proteobacteria. En: *Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements*, eds. Roberts, AP; Mullany, P. Landes Bioscience. Capítulo 16. Pp 261-72.

Mojica, FJM; Díez-Villaseñor, C; García-Martínez, J; Almendros, C. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155(3): 733–40.

- Mojica, FJM; Díez-Villaseñor, C; García-Martínez, J; Soria, E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution* 60(2): 174–82.
- Mojica, FJM; Díez-Villaseñor, C; Soria, E; Juez, C. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology* 36(1): 244-6.
- Molina, L; Perea, J; Meglia, G; Angón, E; García, A. 2013. Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Preventive veterinary medicine* 110(3-4): 388–94.
- Moolhuijzen, PM; Lew-Tabor, AE; Wlodek, BM; Agüero, FG; Comercci, DJ; Ugalde, R a; Sanchez, DO; Appels, R; Bellgard, M. 2009. Genomic analysis of *Campylobacter fetus* subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets. *BMC microbiology* 9: 86.
- Moran, AP; O'Malley, DT; Kosunen, TU; Helander, IM. 1994. Biochemical characterization of *Campylobacter fetus* lipopolysaccharides. *Infection and immunity* 62(9): 3922–9.
- Mshelia, GD; Amin, JD; Egwu, GO; Woldehiwet, Z; Murray, RD. 2012. The prevalence of bovine venereal campylobacteriosis in cattle herds in the Lake Chad basin of Nigeria. *Tropical animal health and production* 44: 1487–9.
- Mshelia, GD; Amin, JD; Egwu, GO; Yavari, CA; Murray, RD; Woldehiwet, Z. 2010a. Detection of antibodies specific to *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in the vaginal mucus of Nigerian breeding cows. *Veterinaria italiana* 46(3): 337–44.
- Mshelia, GD; Amin, JD; Woldehiwet, Z; Murray, RD; Egwu, GO. 2010b. Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reproduction in domestic animals* 45(5): e221–30.
- Nakajima, T; Ara, W; Kagawa, S; Moore, JE; Matsubara, K; Matsuda, M. 2013. Absence of intervening sequences and point mutations in the V domain within 23S rRNA in *Campylobacter lari* isolates. *Folia microbiologica* 58(6): 607-13.
- Nakajima-kawakami, Y; Okumura, A; Yamashita, S; Mori, M. 2010. A neonate with focal cerebritis caused by *Campylobacter fetus*. *Journal of pediatric infectious diseases* 5: 289–92.
- Nozawa, T; Furukawa, N; Aikawa, C; Watanabe, T; Haobam, B; Kurokawa, K; Maruyama, F; Nakagawa, I. 2011. CRISPR inhibition of prophage acquisition in *Streptococcus pyogenes*. *PloS one* 6(5): e19543.
- OIE. 2014. Código sanitario para los animales terrestres. Capítulos 1.4. (Vigilancia Sanitaria De Los Animales Terrestres) y 11.3. (Campilobacteriosis Genital Bovina).

- On, SLW. 2013. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: where to from here? *Journal of microbiological methods* 95(1): 3–7.
- On, SL; Harrington, CS. 2001. Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. *Journal of applied microbiology*. 90: 285–93.
- Oyarzabal, OA; Wesley, T V; Harmon, KM; Barbaree, JM; Lauerman, LH; Backert, S; Conner, DE. 1997. *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16s rDNA. *Veterinary microbiology* 58: 61–71.
- Pacanowski, J; Lalande, V; Lacombe, K; Boudraa, C; Legrand, P; Trystram, D; Kassis, N; Arlet, G; Mainardi, J; Doucet-populaire, F; Girard, P; Meynard, J; Pacanowski, J; Lalande, V; La, K; Lesprit, P. 2008. *Campylobacter* Bacteremia : Clinical Features and Factors Associated with Fatal Outcome. *Clinical infectious diseases* 47(6): 790–6.
- Pallen, MJ; Wren, BW. 2007. Bacterial pathogenomics. *Nature* 449: 835–42.
- Palmer, KL; Whiteley, M. 2011. DMS3-42: the secret to CRISPR-dependent biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 193(14): 3431–2.
- Palmer, KL; Gilmore, MS. 2014. Enterococcal Genomics. En: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Eds. Gilmore, MS; Clewell, DB; Ike, Y; Shankar, N. Boston: Massachusetts
- Palmer, KL; Gilmore, MS. 2010. Multidrug-Resistant Enterococci Lack CRISPR-cas. *mBio* 1(4): e00227-10
- Pasanen, T; Koskela, S; Mero, S; Tarkka, E; Tissari, P; Vaara, M; Kirveskari, J. 2014. Rapid molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clones with rep-PCR and evaluation of carbapenemase genes by new multiplex PCR in Hospital District of Helsinki and Uusimaa. *PloS one* 9(1): e85854.
- Patrick, ME; Gilbert, MJ; Blaser, MJ; Tauxe, RV; Wagenaar, JA; Fitzgerald, C. 2013. Human Infections with New Subspecies of *Campylobacter fetus*. *Emerging infectious diseases* 19(10): 1678–80.
- Pei, A; Nossa, CW; Chokshi, P; Blaser, MJ; Yang, L; Rosmarin, DM; Pei, Z. 2009. Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *PloS one* 4(5): e5437.
- Penner, JL. 1988. The Genus *Campylobacter*: a Decade of Progress. *Clinical microbiology reviews* 1(2):157-72.
- Pérez Luz, S; Rodríguez-Valera, F; Lan, R; Reeves, PR. 1998. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. *Journal of bacteriology* 180(8): 2144–51.

- Pérez-Losada, M; Cabezas, P; Castro-Nallar, E; Crandall, KA. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, genetics and evolution* 16: 38–53.
- Perez-Perez, GI; Blaser, MJ; Bryner, JH. 1986. Lipopolysaccharide structures of *Campylobacter fetus* are related to heat-stable serogroups. *Infection and immunity* 51(1):209-12.
- Pettengill, JB; Timme, RE; Barrangou, R; Toro, M; Allard, MW; Strain, E; Musser, SM; Brown, EW. 2014. The evolutionary history and diagnostic utility of the CRISPR-Cas system within *Salmonella enterica* ssp. *enterica*. *PeerJ* 2: e340.
- Pleckaityte, M; Zilnyte, M; Zvirbliene, A. 2012. Insights into the CRISPR/Cas system of *Gardnerella vaginalis*. *BMC microbiology* 12(1): 301.
- Pourcel, C; Salvignol, G; Vergnaud, G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151(3): 653–63.
- Quintans, G. 2013. Rodeos de cría: redoblando esfuerzos en esta primavera. *Revista INIA* 34:7–9.
- Raftis, EJ; Forde, BM; Claesson, MJ; O’Toole, PW. 2014. Unusual genome complexity in *Lactobacillus salivarius* JCM1046. *BMC genomics* 15: 771.
- Rasmussen, JJ; Vegge, CS; Frøkiær, H; Howlett, RM; Krogfelt, KA.; Kelly, DJ; Ingmer, H. 2013. *Campylobacter jejuni* carbon starvation protein A (*CstA*) is involved in peptide utilization, motility and agglutination, and has a role in stimulation of dendritic cells. *Journal of Medical Microbiology* 62: 1135–43.
- Rastogi, R; Wu, M; Dasgupta, I; Fox, GE. 2009. Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *BMC microbiology* 9: 208.
- Rennie, RP; Strong, D; Taylor, DE; Salama, SM; Davidson, C. 1994. *Campylobacter fetus* diarrhea in a Hutterite colony : epidemiological observations and typing of the causative organism. *Journal of clinical microbiology* 32(3):721-4.
- Repiso, MV; Gil, A; Bañales, P; D’Anatro, N; Fernandez, L; Guarino, H; Herrera, B; Nuñez, A; Olivera, M; Osawa, T; Silva, M. 2005. Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria* 40: 1-28.
- Rezzonico, F; Smits, THM; Duffy, B. 2011. Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Applied and environmental microbiology* 77(11): 3819–29.



- Richter, H; Zoepfel, J; Schermuly, J; Maticzka, D; Backofen, R; Randau, L. 2012. Characterization of CRISPR RNA processing in *Clostridium thermocellum* and *Methanococcus maripaludis*. *Nucleic acids research* 40(19): 9887–96.
- Rocha, FS Da; Jesus, VLT De; Torres, HM; Gomes, MJP; Figueiredo, MJ De; Nascimento, ER Do; Ferreira, T; Aquino, MHC De. 2009. Investigação de *Campylobacter fetus* e *Tritrichomonas foetus* na mucosa prepucial de touros da região do M dio Paraíba, RJ. *Ciência Rural* 39(5): 1587–90.
- Ronquist, F; Teslenko, M; van der Mark, P; Ayres, DL; Darling, A; H hna, S; Larget, B; Liu, L; Suchard, M a; Huelsenbeck, JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61(3): 539–42.
- Rutherford, K; Parkhill, J; Crook, J; Horsnell, T; Rice, P; Rajandream, MA; Barrell, B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16(10): 944–5.
- Sait, M; Livingstone, M; Clark, EM; Wheelhouse, N; Spalding, L; Markey, B; Magnino, S; Lainsou, FA; Myers, GSA; Longbottom, D. 2014. Genome sequencing and comparative analysis of three *Chlamydia pecorum* strains associated with different pathogenic outcomes. *BMC genomics* 15(1): 23.
- Salama, SM; Garcia, MM; Taylor, DE. 1992a. Differentiation of the subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing. *International journal of systematic bacteriology* 42(3): 446–50.
- Salama, SM; Tabor, H; Richter, M; Taylor, DE. 1992b. Pulsed-field gel electrophoresis for epidemiologic studies of *Campylobacter hyointestinalis* isolates. *Journal of clinical microbiology* 30(8): 1982–4.
- Salihu, MD; Abdulkadir, JU; Oboegbulem, SI; Egwu, GO; Magaji, AA; Lawal, M; Hassan, Y. 2009. Isolation and prevalence of *Campylobacter* species in cattle from Sokoto state, Nigeria. *Veterinaria italiana* 45(4): 501–5.
- Sampson, TR; Weiss, DS. 2013. Alternative Roles for CRISPR/Cas Systems in Bacterial Pathogenesis. *PLoS pathogens* 9(10): e1003621.
- Sampson, TR; Weiss, DS. 2014. CRISPR-Cas systems: new players in gene regulation and bacterial physiology. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4: 37.
- Sapranauskas, R; Gasiunas, G; Fremaux, C; Barrangou, R; Horvath, P; Siksnys, V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 39(21): 9275–82.
- Schmidt, T; Venter, EH; Picard, JA. 2010. Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of

subspecies in South African field isolates. *Journal of the South African Veterinary Association* 81(2): 87–92.

Schouls, LM; Reulen, S; Duim, B; Wagenaar, JA; Willems, RJL; Dingle, KE; Colles, FM; Embden, JDA Van. 2003. Comparative Genotyping of *Campylobacter jejuni* by Amplified Fragment Length Polymorphism, Multilocus Sequence Typing, and Short Repeat Sequencing : Strain Diversity, Host Range, and Recombination. *Journal of clinical microbiology* 41(1): 15–26.

Schulze, F; Bagon, A; Müller, W; Hotzel, H. 2006. Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. *Journal of clinical microbiology* 44(6): 2019–24.

Sechi, LA; Daneo-Moore, L. 1993. Characterization of intergenic spacers in two rrn operons of *Enterococcus hirae* ATCC 9790. *Journal of bacteriology* 175(10): 3213–9.

Selim, AM; Elhaig, MM; Gaede, W. 2014. Development of multiplex real-time PCR assay for the detection of *Brucella* spp., *Leptospira* spp. and *Campylobacter foetus*. *Veterinaria italiana* 50(4): 269–75.

Shariat, N; DiMarzio, MJ; Yin, S; Dettinger, L; Sandt, CH; Lute, JR; Barrangou, R; Dudley, EG. 2013. The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. *Food microbiology* 34(1): 164–73.

Sheppard, SK; Colles, F; Richardson, J; Cody, AJ; Elson, R; Lawson, A; Brick, G; Meldrum, R; Little, CL; Owen, RJ; Maiden, MCJ; McCarthy, ND. 2010a. Host association of *Campylobacter* genotypes transcends geographic variation. *Applied and environmental microbiology* 76(15): 5269–77.

Sheppard, SK; Dallas, JF; Wilson, DJ; Strachan, NJC; McCarthy, ND; Jolley, KA; Colles, FM; Rotariu, O; Ogden, ID; Forbes, KJ; Maiden, MCJ. 2010b. Evolution of an agriculture-associated disease causing *Campylobacter coli* clade: evidence from national surveillance data in Scotland. *PloS one* 5(12): e15708.

Sheppard, SK; Dallas, JF; Strachan, NJC; MacRae, M; McCarthy, ND; Wilson, DJ; Gormley, FJ; Falush, D; Ogden, ID; Maiden, MCJ; Forbes, KJ. 2009. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clinical infectious diseases* 48(8): 1072–8.

Shimizu, Y; Ishii, A; Takahata, A; Kajiyama, T; Yamahatsu, A; Ito, H; Kurusu, A; Hamada, C; Horikoshi, S; Tomino, Y. 2012. *Campylobacter* bacteremia in hemodialysis patients by eating raw meat - the importance of sanitary education. *Case reports in nephrology and urology* 2(2): 145–51.

Siguier, P; Gourgouyere, E; Chandler, M. 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS microbiology reviews* 38(5): 865–91.

- Skirrow, MB. 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): 1213–7.
- Smibert, RM. 1978. The genus *Campylobacter*. *Annual review of microbiology* 32: 673–709.
- Smith, T; Taylor, M. 1919. Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. Sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *Journal of experimental medicine* 30(4): 299–312.
- Smith, NH; Gordon, SW; de la Rua-Domenech, R; Clifton-Hadley, RS; Hewinson, RG. 2006. Bottlenecks and broomsticks : the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature reviews. Microbiology* 4: 670-80.
- Sorek, R; Kunin, V; Hugenholtz, P. 2008. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature reviews. Microbiology* 6(3): 181–6.
- Spence, RP; Bruce, IR; McFadden, AMJ; Hill, FI; Tisdall, D; Humphrey, S; van der Graaf, L; van Bergen, MAP; Wagenaar, JA. 2011. Cross-reaction of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time PCR. *The Veterinary record* 168(5): 131.
- Sprenger, H; Zechner, EL; Gorkiewicz, G. 2012. So close and yet so far — Molecular microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2(1): 66–75.
- Stynen, R; Lage, AP; Robert, J; Rezende, AM; Afonseca, VD; Resende, D; Ruy, PDC; Daher, N; Resende, DM; Almeida, SS De; Castro, S De; Augusto, V; Abreu, C De; Rocha, ACM; Rodrigues, A; Guilherme, E; Barbosa, V; Fonseca, D; Dorella, FA; Miyoshi, A; Lima, RJ De; Davi, F; Sá, PG De; Lopes, TS; Mauricio, R; Rodrigues, A; Carneiro, AR; Leão, T; Cerdeira, LT; Thiago, R; Ramos, J; Silva, A; Azevedo, V; Ruiz, JC; Moore, RJ; Ca, P De; Resende, DDM; Soares, SDC; Costa, DF; Jero, AR; Sa, PG De; Lea, T; Juca, RT. 2011. Complete Genome Sequence of Type Strain *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354<sup>T</sup>. *Journal of bacteriology* 193(20): 5871–3.
- Sullivan, MJ; Petty, NK; Beatson, SA. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 27(7): 1009–10.
- Suy, F; Le Dû, D; Roux, A-L; Hanachi, M; Dinh, A; Crémieux, A-C. 2013. Meningitis and endocarditis caused by *Campylobacter fetus* after raw-liver ingestion. *Journal of clinical microbiology* 51(9): 3147–50.
- Taboada, EN; Clark, CG; Sproston, EL; Carrillo, CD. 2013. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. *Journal of microbiological methods* 95(1): 24–31.

- Tamura, K; Stecher, G; Peterson, D; FilipSKI, A; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30(12): 2725–9.
- Tamura, K; Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* 10(3): 512–26.
- Tanaka, A; Takahashi, J; Hirabayashi, H; Ogihara, N; Mukaiyama, K; Shimizu, M; Hashidate, H; Kato, H. 2012. A Case of Pyogenic Spondylodiscitis Caused by *Campylobacter fetus* for Which Early Diagnosis by Magnetic Resonance Imaging Was Difficult. *Asian spine journal* 6(4): 274–8.
- Tazumi, A; Ono, S; Sekizuka, T; Moore, JE; Millar, BC; Matsuda, M. 2009. Molecular characterization of the sequences of the 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) from isolates of *Taylorella asinigenitalis*. *BMC research notes* 2: 33.
- Tazumi, A; Sekizuka, T; Moore, JE; Millar, BC; Taneike, I; Matsuda, M. 2008. Molecular characterization of intervening sequences in 23S rRNA genes and 23S rRNA fragmentation in *Taylorella equigenitalis*. *Folia microbiologica* 53(6): 486–92.
- Terns, MP; Terns, RM. 2011. CRISPR-based adaptive immune systems. *Current opinion in microbiology* 14(3): 321–7.
- Thompson, LM; Smibert, RM; Johnson, JL; Krieg, NR. 1988. Phylogenetic Study of the Genus *Campylobacter*. *International journal of systematic bacteriology* 38(2): 190–200.
- Tibayrenc, M. 1996. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. *Annual review of microbiology* 50: 401–29.
- Tillier, ER; Collins, RA. 2000. Genome rearrangement by replication-directed translocation. *Nature genetics* 26(2): 195–7.
- Timme, RE; Pettengill, J; Allard, MW; Strain, E; Barrangou, R; Wehnes, C; Kessel, J Van; Karns, J; Musser, SM; Brown, EW. 2013. Phylogenetic diversity of the enteric pathogen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inferred from genome-wide reference-free SNP characters. *Genome biology and evolution* 5(11): 2109-23.
- Touchon, M; Cury, J; Yoon, E-J; Krizova, L; Cerqueira, GC; Murphy, C; Feldgarden, M; Wortman, J; Clermont, D; Lambert, T; Grillot-Courvalin, C; NemeC, A; Courvalin, P; Rocha, EP. 2014. The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences. *Genome biology and evolution* 6(10): 2866-82.
- Touchon, M; Charpentier, S; Clermont, O; Rocha, EPC; Denamur, E; Branger, C. 2011. CRISPR distribution within the *Escherichia coli* species is not suggestive of

- immunity-associated diversifying selection. *Journal of bacteriology* 193(10): 2460–7.
- Touchon, M; Rocha, EPC. 2010. The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. *PLoS one* 5(6): e11126.
- Touchon, M; Hoede, C; Tenailon, O; Barbe, V; Baeriswyl, S; Bidet, P; Bingen, E; Bonacorsi, S; Bouchier, C; Bouvet, O; Calteau, A; Chiapello, H; Clermont, O; Cruveiller, S; Danchin, A; Diard, M; Dossat, C; Karoui, M El; Frapy, E; Garry, L; Ghigo, JM; Gilles, AM; Johnson, J; Le Bouguéneq, C; Lescat, M; Mangenot, S; Martinez-Jéhanne, V; Matic, I; Nassif, X; Oztas, S; Petit, MA; Pichon, C; Rouy, Z; Ruf, C Saint; Schneider, D; Tourret, J; Vacherie, B; Vallenet, D; Médigue, C; Rocha, EPC; Denamur, E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS genetics* 5(1): e1000344.
- Treangen, TJ; Salzberg, SL. 2012. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nature reviews. Genetics* 29(1): 997–1003.
- Tremblay, C; Gaudreau, C; Lorange, M. 2003. Epidemiology and Antimicrobial Susceptibilities of 111 *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* Strains Isolated in Quebec, Canada, from 1983 to 2000. *Journal of clinical microbiology* 41(1): 463–466.
- Trust, TJ; Logan, SM; Gustafson, CE; Romaniuk, PJ; Kim, NW; Chan, VL; Ragan, MA; Guerry, P; Gutell, RR. 1994. Phylogenetic and molecular characterization of a 23S rRNA gene positions the genus *Campylobacter* in the epsilon subdivision of the Proteobacteria and shows that the presence of transcribed spacers is common in *Campylobacter* spp. *Journal of bacteriology* 176(15): 4597–609.
- Truyers, I; Luke, T; Wilson, D; Sargison, N. 2014. Diagnosis and management of venereal campylobacteriosis in beef cattle. *BMC veterinary research* 10(1): 280.
- Tu, Z; Eisner, W; Kreiswirth, BN; Blaser, MJ. 2005a. Genetic Divergence of *Campylobacter fetus* Strains of Mammal and Reptile Origins. *Journal of clinical microbiology* 43(7): 3334–40.
- Tu, Z-C; Gaudreau, C; Blaser, MJ. 2005b. Mechanisms underlying *Campylobacter fetus* pathogenesis in humans: surface-layer protein variation in relapsing infections. *The Journal of infectious diseases* 191(12): 2082–9.
- Tu, Z; Zeitlin, G; Gagner, J; Keo, T; Hanna, BA; Blaser, MJ. 2004. *Campylobacter fetus* of Reptile Origin as a Human Pathogen. *Journal of clinical microbiology* 42(9): 4405–7.
- Tu, Z-C; Wassenaar, TM; Thompson, SA; Blaser, MJ. 2003. Structure and genotypic plasticity of the *Campylobacter fetus* sap locus. *Molecular microbiology* 48(3): 685–98.

- Tu, Z; Dewhirst, FE. 2001. Evidence that the *Campylobacter fetus* sap Locus Is an Ancient Genomic Constituent with Origins before Mammals and Reptiles Diverged. *Journal of bacteriology* 69(4): 2237–44.
- Tummuru, MK; Blaser, MJ. 1993. Rearrangement of sapA homologs with conserved and variable regions in *Campylobacter fetus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(15): 7265–9.
- Tummuru, MK; Blaser, MJ. 1992. Characterization of the *Campylobacter fetus* sapA promoter: evidence that the sapA promoter is deleted in spontaneous mutant strains. *Journal of bacteriology* 174(18): 5916–22.
- Van Belkum, A; Tassios, PT; Dijkshoorn, L; Haeggman, S; Cookson, B; Fry, NK; Fussing, V; Green, J; Feil, E; Gerner-Smidt, P; Brisse, S; Struelens, M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical microbiology and infection* 13 (3): 1–46.
- Van Belkum, A; Scherer, S; van Alphen, L; Verbrugh, H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and molecular biology reviews* 62(2): 275–93.
- Van Bergen, MAP; van der Graaf-van Bloois, L; Visser, IJR; van Putten, JPM; Wagenaar, JA. 2006. Molecular epidemiology of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on bovine artificial insemination stations using pulsed field gel electrophoresis. *Veterinary microbiology* 112(1): 65–71.
- Van Bergen, MAP; Dingle, KE; Maiden, MCJ; Newell, DG; Bloois, LVDG; Putten, JPM Van; Wagenaar, JA; Bergen, MAP Van. 2005a. Clonal Nature of *Campylobacter fetus* as Defined by Multilocus Sequence Typing. *Journal of clinical microbiology* 43(12): 5888–98.
- Van Bergen, MAP; Linnane, S; van Putten, JPM; Wagenaar, JA. 2005b. Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 24(3): 1017–26.
- Van Bergen, MAP; Simons, G; van der Graaf-van Bloois, L; van Putten, JP; Rombout, J; Wesley, I; Wagenaar, JA. 2005c. Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Journal of medical microbiology* 54(12): 1217–24.
- Van Camp, G; Chapelle, S; De Wachter, R. 1993. Amplification and sequencing of variable regions in bacterial 23S ribosomal RNA genes with conserved primer sequences. *Current microbiology* 27(3): 147–51.
- Vandamme, P; De Ley, J. 1991. Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. *International journal of systematic bacteriology* 41(3):451-5

- Van der Graaf-van Bloois, L; Miller, WG; Yee, E; Bono, JL ; Rijnsburger, M; Campero, C; Wagenaar, JA; Duim, B. 2014a. First Closed Genome Sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* bv. *intermedius*. 2(1): 1983–1984.
- Van der Graaf-van Bloois, L; Miller, WG; Yee, E; Rijnsburger, M; Wagenaar, JA; Duim, B. 2014b. Inconsistency of phenotypic and genomic characteristics of *Campylobacter fetus* subspecies requires re-evaluation of current diagnostics. *Journal of clinical microbiology* 52(12): 4183-8.
- Van der Graaf-van Bloois, L; van Bergen, MAP; van der Wal, FJ; de Boer, AG; Duim, B; Schmidt, T; Wagenaar, JA. 2013. Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods* 95(1): 93–7.
- Van Essen-Zandbergen, A; Smith, H; Veldman, K; Mevius, D. 2007. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 59(4): 746–50.
- Van der Ploeg, JR. 2009. Analysis of CRISPR in *Streptococcus mutans* suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages. *Microbiology* 155(6): 1966–76.
- Vargas, A; Costa, MM; Vainstein, MH; Kreutz, LC; Neves, JP. 2003. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. *Veterinary Microbiology* 93(2): 121–32.
- Veron, M; Chatelain, R. 1973. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Veron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23(2): 122–34.
- Versalovic, J; Koeth, T; Lupski, JR. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research* 19(24): 6823–31.
- Versalovic, J; Schneider, M; De Bruijn, FJ; Lupski, JR. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology* 5(1): 25-40.
- Wagenaar, JA; van Bergen, MAP; Blaser, MJ; Tauxe, R V; Newell, DG; van Putten, JPM; Bergen, MAP Van; Robert, V; Putten, JPM Van; Diseases, M; Consultancy, FZ; Birches, S. 2014. *Campylobacter fetus* infections in humans: exposure and disease Accepted. *Clinical infectious diseases* 58(11): 1–26.
- Wagenaar, JA; van Bergen, MAP; Newell, DG; Grogono-thomas, R; Duim, B. 2001. Comparative Study Using Amplified Fragment Length Polymorphism

- Fingerprinting, PCR Genotyping, and Phenotyping To Differentiate *Campylobacter fetus* Strains Isolated from Animals. *Society* 39(6): 2283–2286.
- Waldner, C; Hendrick, S; Chaban, B; Guerra, AG; Griffin, G; Campbell, J; Hill, JE. 2013. Application of a new diagnostic approach to a bovine genital campylobacteriosis outbreak in a Saskatchewan beef herd. *Canadian veterinary journal* 54: 373-6
- Wallden, K; Rivera-Calzada, A; Waksman, G. 2010. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cellular microbiology* 12(9): 1203–12.
- Wang, C-M; Shia, W-Y; Jhou, Y-J; Shyu, C-L. 2013. Occurrence and molecular characterization of reptilian *Campylobacter fetus* strains isolated in Taiwan. *Veterinary microbiology* 164(1): 67-76.
- Wang, G; Clark, CG; Taylor, TM; Pucknell, C; Barton, C; Price, L; Woodward, DL; Rodgers, FG. 2002. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. 40(12): 4744–7.
- Wang, E; Garcia, MM; Blake, MS; Pei, Z; Blaser, MJ. 1993. Shift in S-layer protein expression responsible for antigenic variation in *Campylobacter fetus*. *Journal of bacteriology* 175(16): 4979–84.
- Weinberger, AD; Sun, CL; Pluciński, MM; Deneff, VJ; Thomas, BC; Horvath, P; Barrangou, R; Gilmore, MS; Getz, WM; Banfield, JF. 2012. Persisting viral sequences shape microbial CRISPR-based immunity. *PLoS computational biology* 8(4): e1002475.
- Weisburg, WG; Barns, SM; Pelletier, DA; Lane, DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173(2): 697–703.
- Willoughby, K; Nettleton, PF; Quirie, M; Maley, M a; Foster, G; Toszeghy, M; Newell, DG. 2005. A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *Journal of applied microbiology* 99(4): 758–66.
- Woese, CR. 1987. *Bacterial Evolution* Microbiological reviews 51(2): 221–71.
- Workman, SN; Mathison, GE; Lavoie, MC. 2005. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. *Journal of clinical microbiology* 43(6): 2642–50.
- Xie, J; Zhou, F; Xu, G; Mai, G; Hu, J; Wang, G; Li, F. 2014. Genome-wide screening of pathogenicity islands in *Mycobacterium tuberculosis* based on the genomic barcode visualization. *Molecular biology reports* 41(9): 5883-9.



- Yamazaki, W; Taguchi, M; Misawa, N. 2010. Development of loop-mediated isothermal amplification and PCR assays for rapid and simple detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Microbiology and immunology* 54(7): 398–404.
- Yamazaki, W; Taguchi, M; Ishibashi, M; Nukina, M; Misawa, N; Inoue, K. 2009. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Campylobacter fetus*. *Veterinary microbiology* 136(3-4): 393–6.
- Yang, LY; Pei, ZH; Fujimoto, S; Blaser, MJ. 1992. Reattachment of surface array proteins to *Campylobacter fetus* cells. *Journal of bacteriology* 174(4): 1258–67.
- Zegans, ME; Wagner, JC; Cady, KC; Murphy, DM; Hammond, JH; O'Toole, GA. 2009. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 191(1): 210–9.
- Zhang, Q; Doak, TG; Ye, Y. 2013. Expanding the catalog of *cas* genes with metagenomes. *Nucleic acids research* 42(4): 2448-59.
- Zhang, J; Abadia, E; Refregier, G; Tafaj, S; Boschioli, ML; Guillard, B; Andremont, A; Ruimy, R; Sola, C. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of “spoligotyping” with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *Journal of medical microbiology* 59(3): 285–94.
- Zhang, L; Man, SM; Day, AS; Leach, ST; Lemberg, DA; Dutt, S; Stormon, M; Otley, A; O'Loughlin, E V; Magoffin, A; Ng, PHY; Mitchell, H. 2009. Detection and isolation of *Campylobacter* species other than *C. jejuni* from children with Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology* 47(2): 453–5.

## 10. Anexos

### Anexo 1. Aislamiento bacteriano y realización de pruebas bioquímicas

#### Transporte de las muestras

Las muestras fueron extraídas de raspajes prepuciales de toros, mucus cérvico vaginal de vacas o tejidos de embriones abortados. En el momento de colectar la muestra, la misma se sembró en medio de transporte de Cary y Blair (TEM, *Transport Enrichment Medium*), el cual mantiene a la bacteria en condiciones viables hasta su llegada al laboratorio y puede ser utilizado en la primera etapa del aislamiento.

#### Aislamiento de *Campylobacter fetus*

Las muestras fueron incubadas en el medio TEM durante 5-6 días y luego se sembraron en medios sólidos para aislamiento. Se utilizó el medio Skirrow con sulfato de polimixina B (2,5 UI/ml), trimetoprima (5 µg/ml), vancomicina (10 µg/ml) y cicloheximida (50 µg/ml). Como medio alternativo se utilizó agar sangre al 5%. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera microaerofílica con un 5–10% oxígeno, 5–10% dióxido de carbono y 5–9% de hidrógeno.

#### Identificación de *Campylobacter fetus*

La identificación de *C. fetus* se realizó a través de la morfología de la colonia y de la morfología microscópica.

Morfología de la colonia: las colonias de *C. fetus* aparecen después de 2–5 días en los medios de cultivo. Éstas miden 1–3 mm de diámetro, son ligeramente grisáceas-rojizas, redondas, convexas, lisas, brillantes y con borde regular.

Morfología microscópica: *C. fetus* es una bacteria móvil, aunque esta propiedad puede desaparecer después de subcultivos. Tiene forma de bacilo curvado fino, de 0,3–0,4 µm de ancho y 0,5– 8,0 µm de largo. Se observan simultáneamente formas cortas (en forma de coma), medias (en forma de S) y largas (helicoidales - espirales). En cultivos de muchos días se pueden observar formas cocoides.

## **Identificación bioquímica de las subespecies *fetus* y *venerealis***

Se realizaron pruebas bioquímicas de crecimiento en presencia de glicina (Cff positiva, Cfv y Cfvi negativas) y producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) (Cff y Cfvi positivas, Cfv negativa).

Crecimiento en presencia de 1% de glicina: se inoculó una suspensión de bacterias (McFarland Nº 1) en medio de cultivo con 1%, 1.3% y 1.9% de glicina y sin glicina. La incubación se realizó bajo condiciones atmosféricas de microaerofilia a 37°C durante 3-5 días.

Producción de H<sub>2</sub>S: se inoculó una suspensión de bacterias (McFarland Nº 1) en tubos inclinados con medio sólido triple azúcar-hierro (medio TSI). La incubación se realizó en condiciones atmosféricas de microaerofilia a 37°C durante 3-5 días. El cambio de color del rojo al negro indica la producción de H<sub>2</sub>S.

## **Anexo 2.** Protocolos de extracción de ADN

### **Método con kit comercial (QIAamp® DNA Mini kit)**

Las extracciones de ADN con este método fueron hechas a partir de 500 µL de cultivos resuspendidos en PBS 1x.

Se utilizó el siguiente protocolo:

1. El material se centrifuga durante 10 min a 7500 rpm.
2. Se abren los tubos en zona estéril y se retira el sobrenadante. Se agregan 180 µL de *Buffer ATL* (buffer de lisis) y 20 µL de proteinasa K. A partir de este paso el protocolo se continúa fuera de zona estéril.
3. Se vortexea el tubo y se coloca en baño a 56° C durante 1 hora, agitando cada 15 minutos.
4. Se agregan 200 µL de *Buffer AL*. Se vortexea el tubo y se coloca en baño a 70° C durante 10 minutos.
5. Se agregan 200 µL de etanol absoluto, se vortexea y se transfiere la mezcla a una columna con un tubo de colecta.
6. Se centrifuga a 8000 rpm durante un minuto. Se descarta el tubo con el filtrado y se transfiere la columna a un tubo limpio.
7. Se agregan 500 µL de Buffer AW1 y se centrifuga a 8000 rpm durante un minuto. Se descarta el tubo con el filtrado y se transfiere la columna a un tubo limpio.
8. Se agregan 500 µL de Buffer AW2 y se centrifuga a 8000 rpm durante un minuto. Se descarta el tubo con el filtrado, se transfiere la columna a un tubo limpio y se centrifuga a 13000 rpm durante un minuto. Se descarta el tubo con el filtrado y se transfiere la columna a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
9. Se agregan 200 µL de agua desionizada y libre de nucleasas y se incuba a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se centrifuga a 8000 rpm durante un minuto para eluir la muestra.
10. Se repite el paso 10 en un nuevo tubo.

## Método de fenol- cloroformo

Las extracciones de ADN con este método fueron hechas a partir de 500 µL de cultivos resuspendidos en medio skirrow-sangre con glicerina, suero equino y antibióticos (mezcla utilizada para el congelado de las cepas). Se utilizó el siguiente protocolo:

1. El material se centrifuga durante 10 min a 7500 rpm.
2. Se abren los tubos en zona estéril y se retira el sobrenadante. Se colocan 340 µL de buffer de lisis (100 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris.HCl pH 8.0, 100 mM NaCl), 40 µL de SDS 10% en buffer TE pH 8,0 y 20 µL de proteinasa K (Sigma), a una concentración de 20 mg/mL. A partir de este paso el protocolo se continúa fuera de zona estéril.
3. Se vortexea el tubo y se coloca en baño a 55° C durante 1 hora, agitando cada 15 minutos.
4. Se agregan 400 µL de fenol, se mezcla y se centrifuga 5 minutos a 13000 rpm.
5. Se recupera la fase superior y se transfiere a un nuevo tubo.
6. Se agregan 200 µL de fenol y 200 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 24:1). Se mezcla y se centrifuga 5 minutos a 13000 rpm
7. Se recupera la fase superior y se transfiere a un nuevo tubo.
8. Se agregan 400 µL de cloroformo: alcohol isoamílico. Se mezcla y se centrifuga 5 minutos a 13000 rpm
9. Se recupera la fase superior y se transfiere a un nuevo tubo.
10. Se agregan 0.1 volúmenes de acetato de amonio 4M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), mezclando suavemente con pipeta.
11. Se mantiene precipita a -20°C al menos dos horas (generalmente toda la noche)
12. Se centrifuga 15 minutos a 13000 rpm y a una temperatura de 4°C, y se descarta el sobrenadante.
13. Se agregan 400 µL de etanol 70% frío y se centrifuga 15 minutos a 13000 rpm a 4°C.
14. Se descarta el sobrenadante y se dejan secar los tubos temperatura ambiente durante 2 a 3 hs
15. Se resuspende la muestra en 30 µL de agua desionizada y libre de nucleasas.

**Anexo3.** Cebadores, sondas, ciclados y condiciones de reacción de PCR a tiempo final y real; purificación de productos de PCR

**Tabla A1.** Secuencias de los cebadores utilizados, su temperatura de hibridación y las condiciones de PCR para cada locus.

Cebador	Secuencia (5´-3´)	Locus	Temperatura de hibridación (°C)	Condiciones de reacción <sup>2</sup>	Ciclado <sup>1</sup>	Referencia
C412F	GGATGACACTTTTCGGAGC	<i>16S</i>	50	A	1	Linton et al. 1996
C1288R	CATTGTAGCACGTGTGTC	<i>16S</i>	50	A	1	Linton et al. 1996
MG3F	GGTAGCCGCAGCTGCTAAG	<i>cstA</i>	53	D	1	Hum et al. 1997
MG4R	TAGCTACAATAACGACAAC	<i>cstA</i>	53	D	1	Hum et al. 1997
VenSF	CTTAGCAGTTTGCATATTGCCATT	<i>parA</i>	49	D	1	Hum et al. 1997
VenSR	GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT	<i>parA</i>	49	D	1	Hum et al. 1997
nC1165g4F	AGGACACAAATGGTAACTGG	<i>VirB11</i>	53	D	1	Moolhuijzen et al. 2009
nC1165g4R	GATTGTATAGCGGACTTTGC	<i>VirB11</i>	53	D	1	Moolhuijzen et al. 2009
16SFw	CCTTACCTGGGCTTGAT	<i>16S</i>	54	F	4	No publicado
16SRv	GCACCTGTCTCAACTTTC	<i>16S</i>	54	F	4	No publicado
16SP	VIC-ATCTCTAAGAGATTAGTTG-MGB/NFQ	<i>16S</i>	54	F	4	No publicado
VIRb11/14P	FAM/TTCAAGCGG/ZEN/ACACAACGGCTCAAT/3IABkFQ	<i>VirB11</i>	50	F	4	No publicado
VIRb11/14Fw	GGCGGAGAGACTTACGATTT	<i>VirB11</i>	50	F	4	No publicado
VIRb11/14Rv	CGATCAATGGCGGACTTTAC	<i>VirB11</i>	50	F	4	No publicado
CVEN-L	ATTAGTATTTGCAATATGTGAA	<i>ISCfe1</i>	48	C	1	Abril et al. 2007
CVEN-R2	AATTGATATTAATTTGATTGA	<i>ISCfe1</i>	48	C	1	Abril et al. 2007
C1023G3F	ATATCAATGGAGTCTGGCAC	<i>VirB11</i>	51.5	C	1	Moolhuijzen et al. 2009
C1023G3R	AATGTTGTCTTACCACTGCC	<i>VirB11</i>	51.5	C	1	Moolhuijzen et al. 2009
Cfvi162F	GAGCAAGAATAAACTCTGATG	<i>ATPasa AAA</i>	47	C	1	Esta tesis
Cfvi162R	CTTTTCATCTATGCTATGCC	<i>ATPasa AAA</i>	47	C	1	Esta tesis
CfvirulF2	CTTGAAAATGGTTTCGAGCATAG	<i>VapD</i>	46	C	1	Esta tesis
CfvirulR1	CTTTAGCACATAAGTCTTGTATAG	<i>VapD</i>	46	C	1	Esta tesis
plasmIF	GAAGATGTTTCTATAATCTGCGAAG	ORF0023 <sup>3</sup>	47	C	1	Esta tesis
plasmIR	GTAGCTCTGTTATTATCAATGCTC	ORF0023 <sup>3</sup>	47	C	1	Esta tesis
aspA1F	CCTATGACTTTAGGTCAAGAG	<i>aspA (MLST)</i>	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
aspA2F	TGTAGCTAGAGTACGGCAAG	<i>aspA (MLST)</i>	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
glnA1F	GATGGTAGTTCTATAGACGC	<i>glnA (MLST)</i>	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
glnA2F	CTTCCGTTATCTCCATAAAGC	<i>glnA (MLST)</i>	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
gltA1F	CGATATAGCGTGGCTAGCTG	<i>gltA (MLST)</i>	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
gltA2F	AGCGTGAGTAGATCCTACG	<i>gltA (MLST)</i>	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a

Cebador	Secuencia (5'-3')	Locus	Temperatura de hibridación (°C)	Condiciones de reacción <sup>4</sup>	Ciclado <sup>1</sup>	Referencia
glyA1F	GATAAAATACTGGTATGGATC	<i>glyA</i> (MLST)	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
glyA2F	CCCTCTGTTTATTAAGACTTC	<i>glyA</i> (MLST)	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
pgmA1F	AGAGTTGTTTTGGACGTTGC	<i>pgm</i> (MLST)	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
pgmA2F	GTAGCTCATCAAGAGGTCTC	<i>pgm</i> (MLST)	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
tktA1F	GAGATAGATTGGTATTTAGCGG	<i>tkt</i> (MLST)	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
tktA2F	GTGACTACCTTCTAAATCTCC	<i>tkt</i> (MLST)	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
uncA1F	AAGAGTACGGTGCTATGGAC	<i>uncA</i> (MLST)	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
uncA2F	CTCTCATCAAGATCGCTTGC	<i>uncA</i> (MLST)	50	A	1	Van Bergen et al. 2005a
23SF	GCAAGTGGTAGGAGAGCGTTC	<i>23S</i>	53.5	A	1	Esta tesis
23SR	CTTACGTGTTAGCAGAGTGCTGTG	<i>23S</i>	53.5	A	1	Esta tesis
23SIVSF	GTGGAAAACGATGTGGAGTACTG	<i>23S</i> (IVS)	55	A	1	Esta tesis
23SIVSR	GCATACCCCTTTTCGGACTTTG	<i>23S</i> (IVS)	55	A	1	Esta tesis
ISRF	GAGGTCACAAGTTCAAGTC	ISR3	48.5	A	1	Esta tesis
ISRR	CGTTAGCTCCGATTG	ISR3	48.5	A	1	Esta tesis
SAF01	ATGTTAAACAACAGATGT	<i>sapA</i>	45	C	1	Tu et al. 2001
SAR01	ATCAAGATCACTAGCACTA	<i>sapA</i>	45	C	1	Tu et al. 2001
SBF01	TTCAGAGCTATTTATAGTTC	<i>sapB</i>	45	C	1	Tu et al. 2001
SBR01	TCAACTACTACTATTACTA	<i>sapB</i>	45	C	1	Tu et al. 2001
glf_screen_f	AACCTGGAGATTATTTAGCG	<i>glf</i>	47	C	1	Kienesberger et al. 2014
glf_screen_r	ATTTATATTCTCCAAGTCTACC	<i>glf</i>	47	C	1	Kienesberger et al. 2014
wcbK_screen_f	GCACAAAGCTTTGTAGGTATAAGC	<i>wcbK</i>	50	C	1	Kienesberger et al. 2014
wcbK_screen_r	CTATAAGCAAATCAACTTCAGCC	<i>wcbK</i>	50	C	1	Kienesberger et al. 2014
mat1_screen_f	ATTATCCTAACAAAGATGTAAGG	<i>mat1</i>	47	C	1	Kienesberger et al. 2014
mat1_screen_r	TAATTTTCTAATGACTTTTGCCG	<i>mat1</i>	47	C	1	Kienesberger et al. 2014
galE_BamHI_fwd	TAAGGATCCATGAATATCTTGATAACCGGA	<i>galE</i>	56	C	1	Kienesberger et al. 2014
galE_PstI_rev	AATCTGCAGTAGCTATTTAGTTTCTTCTCC	<i>galE</i>	56	C	1	Kienesberger et al. 2014
REP1R	IIICGICGICATCIGGC	Secuencias REP	40	A	1	Versalovic et al. 1991
REP2I	ICGICTTATCIGGCCTAC	Secuencias REP	40	A	1	Versalovic et al. 1991
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Secuencias ERIC	40	A	1	Versalovic et al. 1991
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Secuencias ERIC	40	A	1	Versalovic et al. 1991
BOXA1R	CTACCGCAAGGCGACGCTGACG	Secuencias BOX	40	A	1	Versalovic et al. 1991
INV84112F1	CTACTGAAGCTACGGTTAGTGAG	Inv Cff 8240/ Cfv84112	53	C	1	Esta tesis
INV84112R1	GAGCTTTCACAACTTCATAGTAGTC	Inv Cff 8240/ Cfv84112	53	C	1	Esta tesis
INV84112R4	GACAGACTAGCACCGTTTTTAC	Inv Cff 8240/ Cfv84112	53	C	1	Esta tesis
Fic4_KpnI_F	TAAGGTACCCGAATATTTATAATGTTTCAAGAG	<i>Fic4</i>	53	C	1	Kienesberger et al. 2014
Fic4_Sall_R	TAAGTCGACTTATCTGTTATGCTCCAAATT	<i>Fic4</i>	53	C	1	Kienesberger et al. 2014

Cebador	Secuencia (5'-3')	Locus	Temperatura de hibridación (°C)	Condiciones de reacción <sup>2</sup>	Ciclado <sup>1</sup>	Referencia
Inter2	CGAACCTAATTTATCTATAATAGG	Isla genómica de Cfv	45	C	1	Gorkiewicz et al. 2010
Inter1	CATAAATGCCGTAGTCCGG	Isla genómica de Cfv	45	C	1	Gorkiewicz et al. 2010
IslaR1	GTATTGTATAACAAATATCTTCAAG	Isla genómica de Cfv	45	C	1	Esta tesis
cas1_probe_F	AATTATATCACAAGTAGAAGC	<i>cas1</i>	45	C	1	Kienesberger et al. 2014
cas1_probe_R	TAAGACTAAATCTAGCATCG	<i>cas1</i>	45	C	1	Kienesberger et al. 2014
caslongR1	CAAAATCAAGACCGCCTATACTTATCTCATCTACGTCATC	<i>cluster cas</i> <sup>4</sup>	58	E	3	Esta tesis
cas1a5F1	GAAAATGAGTTTGCAATGTTTATAGAAACCGACTCAG	<i>cluster cas</i> <sup>4</sup>	58	E	3	Esta tesis
RAMPF1	GCATGTAGCACACGTAACGCTAG	<i>RAMP</i>	57	C	1	Esta tesis
RAMPR1	GCTAATTTGCAAGTAGCCAACGC	<i>RAMP</i>	57	C	1	Esta tesis
CRISPF6	CTGCATTAAGCTTTTTCCAACC	CRISPR1	52	B	2	Esta tesis
CRISPR9	CACTTAGTACGCCTTTAAACTTCTC	CRISPR1	52	B	2	Esta tesis
CRISPR2longF	GAAAAGATGACGTAGATGAGATAAGTATAGGCGTCTTG	CRISPR2	60	E	3	Esta tesis
CRISPR2longR3	GAATTTATAACCGTTTGATAACTTCAAAGTCGCAGATC	CRISPR2	60	E	3	Esta tesis
CRISPF1	CCAACCTCAATTTAATGTTAG	CRISPR1	43	B	2	Esta tesis
CRISPF4	GTTAGCAATCTCATTTCGTC	CRISPR1	-	secuenciación	secuenciación	Esta tesis
CRISPR4	GTTAAGTTGGATTGTTTCAACAC	CRISPR1	-	secuenciación	secuenciación	Esta tesis
CRISPF5	CTTAGATGATGAGTTTATTATAGTTTGC	CRISPR1	-	secuenciación	secuenciación	Esta tesis
CRISPF3	GATGATGAGTTTATTATAGTTTGC	CRISPR1	-	secuenciación	Secuenciación	Esta tesis
CRISPR2	GCTACAGGCAATTTTGT	CRISPR2	-	secuenciación	Secuenciación	Esta tesis
Spacer 1.2F	GCAGAACTAAAAAGCCATATC	CRISPR2	-	secuenciación	Secuenciación	Esta tesis
CRISPR7	GTTATTTGAGATAGCCGTTTATCTG	CRISPR2	-	secuenciación	Secuenciación	Esta tesis
Spacer4.2F	GACTTTGAAGATAGCAATCATAG	CRISPR2	-	secuenciación	Secuenciación	Esta tesis
Spacer22.2R	GATTCCATTTGCGCGAG	CRISPR2	-	secuenciación	Secuenciación	Esta tesis

<sup>1</sup> ver Tabla A3.

<sup>2</sup> ver Tabla A2.

<sup>3</sup> se indica el ORF del plásmido pTet de *C. jejuni*, con el cual hibridarían los cebadores.

<sup>4</sup> ver figura 4.



**Tabla A2.** Condiciones de reacción. Se presentan las concentraciones de reactivos para las diferentes condiciones de reacción utilizadas.  $C_0$ : concentración de la solución *stock*.  $C_f$ : concentración en el *mix* de PCR

Protocolo A (Taq polimerasa SBS Genetech)				Protocolo B (Dream Taq polimerasa Thermo)			
Reactivo	$C_0$	$C_f$	$V_0$ ( $\mu$ L/tubo)	Reactivos	$C_0$	$C_f$	$V_0$ ( $\mu$ L/tubo)
Agua	--	--	c.s.p. 20 $\mu$ L	Agua	--	--	c.s.p. 20 $\mu$ L
PCR buffer	10x	1x	2	PCR buffer	10x	1x	2
dNTPs	2,5 mM c/u	0,0625 mM	0,5	dNTPs	2,5 mM c/u	0,125 mM	1
Cebador F	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1	BSA	8 mg/mL	0,4 mg/mL	1
Cebador R	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1	Cebador F	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1
Taq	5 U/ $\mu$ L	1 U	0,2	Cebador R	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1
ADN	Variable	1-2 ng/ $\mu$ L	Variable	Taq	5 U/ $\mu$ L	1 U	0,2
				ADN	Variable	1-2 ng/ $\mu$ L	Variable
Protocolo C (Recombinant Taq polimerasa Thermo)				Protocolo D (Recombinant Taq polimerasa Thermo, Mpx-PCR)			
Reactivo	$C_0$	$C_f$	$V_0$ ( $\mu$ L/tubo)	Reactivos	$C_0$	$C_f$	$V_0$ ( $\mu$ L/tubo)
Agua	--	--	c.s.p. 20 $\mu$ L	Agua	--	--	c.s.p. 20 $\mu$ L
PCR buffer	10x	1x	2	PCR buffer	10x	1x	2
dNTPs	2,5 mM c/u	0,0625 mM	0,5	dNTPs	2,5 mM c/u	0,125 mM	1
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2	BSA	8 mg/mL	0,4 mg/mL	1
BSA	8 mg/mL	0,4 mg/mL	1	Cebador F <sup>1</sup>	10 $\mu$ M	0,65 $\mu$ M	1,3
Cebador F	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1	Cebador R <sup>1</sup>	10 $\mu$ M	0,65 $\mu$ M	1,3
Cebador R	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1	Cebador F <sup>2</sup>	10 $\mu$ M	0,35 $\mu$ M	0,7
Taq	5 U/ $\mu$ L	1,5 U	0,3	Cebador R <sup>2</sup>	10 $\mu$ M	0,35 $\mu$ M	0,7
ADN	Variable	1-2 ng/ $\mu$ L	Variable	Taq	5 U/ $\mu$ L	1,5 U	0,3
				ADN	Variable	1-2 ng/ $\mu$ L	Variable
Protocolo E (Long PCR enzyme mix Thermo)				Protocolo F (PCR en tiempo real, Master mix Bioron)			
Reactivos	$C_0$	$C_f$	$V_0$ ( $\mu$ L/tubo)	Reactivos	$C_0$	$C_f$	$V_0$ ( $\mu$ L/tubo)
Agua	--	--	c.s.p. 20 $\mu$ L	Agua	--	--	c.s.p. 25 $\mu$ L
PCR buffer	10x	1x	2	Master mix	2x	1x	12,5
dNTPs	2,5 mM c/u	0,4 mM	3,2	MgCl <sub>2</sub>	25mM	2 mM	2
Cebador F	10 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M	1,2	Cebador F	10 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M	0,75
Cebador R	10 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M	1,2	Cebador R	10 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M	0,75
enzyme mix	5 U/ $\mu$ L	1,25 U	0,25	Sonda	5 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	0,5
ADN	Variable	1-2 ng/ $\mu$ L	Variable	ADN	Variable	1-2 ng/ $\mu$ L	1

<sup>1</sup> cebadores correspondientes al amplicón de mayor tamaño.

<sup>2</sup> cebadores correspondientes al amplicón de menor tamaño.

**Tabla A3.** Ciclados utilizados. La temperatura de hibridación para cada juego de cebadores se especifica en la tabla A1. El tiempo de extensión varía según el tamaño del amplicón (30 segundos cada 500 pb).

<b>Proceso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	
<b>Protocolo 1</b>			
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95 °C	30 seg	<b>30 ciclos</b>
Hibridación	--	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg- 1 min 30 seg	
Extensión final	72°C	5 min	
<b>Protocolo 2</b>			
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95 °C	30 seg	<b>40 ciclos</b>
Hibridación	--	1 min	
Extensión	72°C	2 min 30 seg	
Extensión final	72°C	10 min	
<b>Protocolo 3</b>			
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	
Desnaturalización	95°C	1 min	<b>10 ciclos</b>
Hibridación	--	2 min	
Extensión	68°C	4 min	
Desnaturalización	95°C	1 min	<b>20 ciclos</b>
Hibridación	--	2 min	
Extensión	68°C	4 min 40 seg	
Extensión final	68°C	10 min	
<b>Protocolo 4</b>			
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	
Desnaturalización	95 °C	30 seg	<b>40 ciclos</b>
Hibridación	--	30 seg	
Extensión	60°C	30 seg	
Extensión final	60°C	5 min	

## Purificación de productos de PCR

### Purificación directa

Las purificaciones directas de productos de PCR se realizaron con el kit ISOLATE PCR and Gel kit (Bioline). Se utilizó el siguiente protocolo:

1. Se colocan 500  $\mu$ L de *Binding buffer A* en una columna con un tubo de colecta y se agrega el producto de PCR, mezclando con pipeta
2. Se centrifuga dos minutos a 10000 g
3. Se descarta el tubo de colecta con el líquido y se coloca la columna en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL
4. Se agregan 20  $\mu$ L de *Elution Buffer* a la columna, se incuba tres minutos a temperatura ambiente, y se centrifuga a 6000 g durante un minuto.
5. Se descarta la columna y el producto se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

### Purificación a partir de geles de agarosa

Las purificaciones a partir de bandas en los geles de agarosa se realizaron con el kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (General Electric). Se utilizó el siguiente protocolo:

1. Mediante observación del gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, se identifica la banda a extraer y se corta con una hoja de bisturí.
2. Se pesa la banda extraída y se agregan 10  $\mu$ L de *Capture buffer type 3* por cada 10 mg de agarosa.
3. Se mezcla por inversión y se incuba a  $60^{\circ}\text{C}$  en baño seco hasta que la agarosa esté totalmente disuelta (10-30 minutos).
4. Se coloca la mezcla anterior en una columna con un tubo de colecta, se incuba tres minutos a temperatura ambiente, y se centrifuga a 16000 g durante 30 segundos.
5. Se descarta el líquido, se colocan 500 $\mu$ L de *Wash buffer type1* en la columna y se centrifuga a 16000 g durante 30 segundos.
6. Se descarta el líquido, se coloca la columna en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y se agregan 20  $\mu$ L de agua desionizada y libre de nucleasas. Se incuba tres minutos a temperatura ambiente, y se centrifuga a 16000 g durante un minuto.
7. Se descarta la columna y el producto se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

#### **Anexo 4.** Protocolos utilizados para la clonación de productos de PCR

##### **Ligación de productos de PCR**

Todos los productos de PCR fueron purificados directamente o mediante extracción de banda previo a la ligación (Anexo 3).

La ligación se realizó con el kit CloneJet PCR cloning kit (Thermo Scientific), que contiene el vector de clonación de extremos romos Pjet1.2/Blunt. Ya que los productos de PCR obtenidos con las polimerasas utilizadas (Anexo 3) contienen Adeninas en sus extremos 3', se requiere un paso previo de "blunting" que elimine estos extremos, para generar los extremos romos requeridos por el vector, que se realiza con una enzima contenida en el kit de clonación.

Se utilizó el siguiente protocolo:

1. Se prepara la reacción de *blunting* en hielo, con un volumen final de 18µL:
  - 10 µL de *Reaction Buffer 2X*
  - 150 ng de producto de PCR purificado (volumen variable)
  - 1 µL de *DNA Blunting Enzyme*
  - Agua desionizada y libre de nucleasas (volumen variable)
2. Se vortexea y se incuba a 70°C durante 5 minutos.
3. Se enfría en hielo y se agregan:
  - 1 µL del vector de clonación pJET1.2/blunt
  - 1 µL de *DNA Ligase T4*
4. Se vortexea y se incuba a 22°C durante 5 minutos.

##### **Transformación de células competentes**

Para la transformación se utilizaron células electrocompetentes *E. coli* XL-1 Blue. Se utilizó el siguiente protocolo de transformación mediante electroporación:

1. Se colocan las cubas para electroporar bacterias (1 mm) en hielo
2. Se configura el equipo de electroporación (Electroporador del Institut Pasteur: ECM 830 de BTX) para dar un pulso unipolares de 8 mseg con un voltaje de 500 V.
3. En zona estéril, se toman 40 µL de bacterias electrocompetentes y se mezclan con 5 µL del producto de ligación (con una concentración de 10-30 ng/µL). Esta mezcla se coloca dentro de la celda de la cuba para electroporar.

4. Se coloca la cuba dentro de la celda del equipo y se da el pulso eléctrico.
5. En zona estéril, se mezclan las bacterias electroporadas con 1 mL de LB. Se transfiere la mezcla a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se deja incubando durante 1 hora a 37°C en agitación (entre 500 y 700 rpm).

### **Selección de transformantes**

Las células transformadas fueron cultivadas toda la noche en estufa a 37°C en LB agar con ampicilina a una concentración de 50 µg/mL. El sistema de selección de este kit funciona con un gen letal contenido en el plásmido, que se interrumpe cuando el inserto se liga al sitio de clonación. Como resultado, únicamente las células que contienen los plásmidos recombinantes son capaces de crecer, ya que al cultivarlas en un medio con ampicilina, sólo aquellas células que adquieren plásmidos sobreviven, puesto que la resistencia a ampicilina está codificada en este plásmido.

### **Screening mediante PCR**

Se confirmó la presencia del inserto mediante PCR con cebadores específicos, siguiendo los mismos protocolos utilizados para la amplificación de los fragmentos a partir de ADN genómico (Anexo 3).

### **Extracción de plásmido**

Las colonias positivas para la presencia de inserto fueron crecidas en LB líquido con ampicilina 50 µg/mL, y se realizó una extracción de plásmido con el kit ISOLATE Plasmid Mini Kit (Bioline). Se utilizó el siguiente protocolo:

1. Partiendo de 3 mL de cultivo líquido, se transfiere a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifuga a 16000 g durante un minuto, descartando el sobrenadante (este paso se realiza dos veces en el mismo tubo para centrifugar todo el cultivo).
2. El *pellet* se resuspende en 250 µL de *Resuspension Buffer* mediante vortexeo.
3. Se agregan 250 µL de *Lysis BufferP* y se mezcla por inversión.
4. Se agregan 350 µL de *Neutralization Buffer* y se mezcla por inversión.
5. Se centrifuga a 16000 g durante 10 minutos.
6. Se transfiere el sobrenadante a una columna con un tubo de colecta y se centrifuga a 10000 g durante un minuto.

7. Se descarta el filtrado, se agregan 500  $\mu\text{L}$  de *Wash Buffer AP* y se centrifuga a 10000 g durante un minuto.
8. Se descarta el filtrado, se agregan 700  $\mu\text{L}$  de *Wash Buffer BP* y se centrifuga a 10000 g durante un minuto.
9. Se descarta el filtrado y se centrifuga a 16000 g durante dos minutos. Se descarta el tubo de colecta con el líquido y se coloca la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
10. Se agregan 30  $\mu\text{L}$  de *Elution Buffer*, se incuba tres minutos a temperatura ambiente, y se centrifuga a 10000 g durante un minuto.
11. Se descarta la columna y el producto se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

## Anexo 5. Cálculo de valores D

El poder de discriminación de las metodologías se comparó utilizando el índice de diversidad de Simpson (valor D), calculado según Hunter y Gaston (1988). Cuanto mayor sea el valor D, más discriminante será la metodología. Se considera que una metodología es suficientemente discriminante si D supera el valor de 0.9. El cálculo se realiza con la siguiente fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

donde N es el número de aislamientos totales, S es el número de haplotipos o patrones, y  $n_j$  es el número de aislamientos con cada patrón.

En las tablas a continuación se presenta la comparación de valores D para cada metodología en diferentes conjuntos de muestras.

**Tabla A4.** Resultados del cálculo de valores D en los aislamientos que fueron analizados con todas las metodologías. Las metodologías que no presentaron variación (presencia de IVSs, de la inversión del genoma de Cfv 84-112 y del gen *RAMP*) no fueron incluidas. Para la presencia de los genes de virulencia se utiliza un patrón que combina los resultados de seis PCRs para diferentes genes (ver Tabla 7). Para la presencia de la isla genómica característica de Cfv y del cluster de genes *cas*, se combina la información de dos aproximaciones (ver Tablas 9 y 10). N: número de muestras. S: número de haplotipos. D: valor D. P: presente. A: ausente. I: indeterminado.

Aislamiento	ST MLST	Haplotipo 23S	Haplotipo ISR3	Genes virulencia	Presencia Isla	<i>Fic4</i>	Presencia genes <i>cas</i>	Patrón CRISPR1
Cff8240 <sup>1</sup>	6	A	A	1	A	A	P	A
CffAu002	5	B	D	4	A	A	A	G
CffAr001	4	A	A	2	I	A	A	F
CffAr003	6	A	A	2	I	P	A	G
CffAr007	4	A	A	2	P	A	A	J
CffAr012	4	A	A	2	A	A	A	G
CffAr013	4	A	A	2	P	A	A	L
CffAr016	4	A	A	3	A	A	A	D
CffAr031	4	A	A	7	A	A	A	O
Cfv 84-112 <sup>1</sup>	4	A	A	2	P	P	A	R
NCTC10354 <sup>T</sup>	4	A	A	5	I	A	A	F
CfvUy003	4	A	A	3	P	A	A	B
CfvUy005	4	A	C	2	P	A	A	B
CfvUy014	4	A	A	2	P	A	A	H
CfvAr010	4	A	A	6	I	A	A	D
Cfvi 03/293 <sup>1</sup>	4	A	A	2	P	A	A	G
CfviAr019	4	A	A	2	P	A	A	D
CfUy022	4	A	A	1	A	A	P	T
CfUy023	4	A	A	1	A	A	P	U
CfUy024	4	A	A	1	A	A	P	U
<b>N</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
<b>S</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>12</b>
<b>D</b>	<b>0.28</b>	<b>0.10</b>	<b>0.19</b>	<b>0.73</b>	<b>0.37</b>	<b>0.19</b>	<b>0.34</b>	<b>0.94</b>



**Tabla A5.** Resultados del cálculo de valores D en los aislamientos que fueron analizados con todas las metodologías basadas en secuenciación. N: número de muestras. S: número de haplotipos. D: valor D.

<b>Aislamiento</b>	<b>ST MLST</b>	<b>Haplotipo 23S</b>	<b>Haplotipo ISR3</b>	<b>Patrón CRISPR1</b>
Cff8240	6	A	A	A
CffAu002	5	B	D	G
CffUy001	4	A	A	B
CffAr001	4	A	A	F
CffAr003	6	A	A	G
CffAr006	4	A	A	M
CffAr007	4	A	A	J
CffAr012	4	A	A	G
CffAr013	4	A	A	L
CffAr016	4	A	A	D
CffAr031	4	A	A	O
Cfv 84-112	4	A	A	R
NCTC10354	4	A	A	F
CfvAu001	4	A	A	E
CfvUy002	4	A	A	B
CfvUy003	4	A	A	B
CfvUy004	4	A	A	B
CfvUy005	4	A	C	B
CfvUy006	4	A	A	E
CfvUy007	4	A	A	C
CfvUy014	4	A	A	H
CfvUy017	4	A	A	B
CfvUy018	4	A	A	B
CfvUy020	4	A	A	B
CfvAr002	4	A	B	D
CfvAr004	4	A	A	D
CfviAr005	4	A	A	D
CfvAr008	4	A	A	K
CfvAr009	4	A	A	I
CfvAr010	4	A	A	D
Cfvi 03/293	4	A	A	G
CfviAr011	4	A	A	D
CfviAr019	4	A	A	D
CfUy022	4	A	A	T
CfUy023	4	A	A	U
CfUy024	4	A	A	U
<b>N</b>	<b>36</b>	<b>36</b>	<b>36</b>	<b>36</b>
<b>S</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>18</b>
<b>D</b>	<b>0.16</b>	<b>0.06</b>	<b>0.16</b>	<b>0.91</b>

**Tabla A6.** Resultados del cálculo de valores D en los aislamientos que fueron analizados mediante secuenciación del locus CRISPR1 y CRISPR2. Los aislamientos realizados a partir de diferentes tejidos del mismo huésped (CffAr029/CffAr030 y CfUy024/CfUy025) se cuentan una sola vez. N: número de aislamientos. S: número de haplotipos. D: valor D.

Aislamiento	Patrón CRISPR1	Patrón CRISPR2
Cff8240	A	A
CffAu002	G	Aus
CffUy001	B	Aus
CffUy008	S	Aus
CffAr001	F	Aus
CffAr003	G	Aus
CffAr006	M	Aus
CffAr007	J	Aus
CffAr012	G	Aus
CffAr013	L	Aus
CffAr016	D	Aus
CffAr018	Q	Aus
CffAr020	D	Aus
CffAr022	G	Aus
CffAr024	P	Aus
CffAr028	B	Aus
CffAr029/030	O	Aus
CffAr031	O	Aus
CffAr032	G	Aus
CffAr033	D	Aus
CffAr035	D	Aus
Cfv 84-112	R	Aus
NCTC10354	F	Aus
CfvAu001	E	Aus
CfvUy002	B	Aus
CfvUy003	B	Aus
CfvUy004	B	Aus

Aislamiento	Patrón CRISPR1	Patrón CRISPR2
CfvUy005	B	Aus
CfvUy006	E	Aus
CfvUy007	C	Aus
CfvUy009	B	Aus
CfvUy014	H	Aus
CfvUy017	B	Aus
CfvUy018	B	Aus
CfvUy020	B	Aus
CfvAr002	D	Aus
CfvAr004	D	Aus
CfvAr008	K	Aus
CfvAr009	I	Aus
CfvAr010	D	Aus
CfvAr021	D	Aus
Cfvi 03/293	G	Aus
CfviAu003	N	Aus
CfviAr005	D	Aus
CfviAr011	D	Aus
CfviAr014	D	Aus
CfviAr015	D	Aus
CfviAr019	D	Aus
CfviAr020	D	Aus
CfviAr025	D	Aus
CfviAr026	G	Aus
CfUy022	T	B
CfUy023	U	C
CfUy024/025	U	C

	Patrón CRISPR1	Patrón CRISPR2
<b>N</b>	<b>54</b>	<b>4</b>
<b>S</b>	<b>21</b>	<b>3</b>
<b>D</b>	<b>0.88</b>	<b>0.83</b>

**Anexo 6.** Secuencias de los repetidos directos (DR) y de los líderes encontradas en los genomas completos y en los aislamientos analizados. La secuencia alternativa del DR de la cepa Cff 82-40 representa al repetido más distal al líder en el locus CRISPR1

```
DR_Cft03-427      GTTTGCTAATGACAATATTTGTGTTGAAAC
DR_Cff82-40      .....G.....
DR_Cff82-40_alternativo .....G.....T.....
```

```
líder1_Cft03-427  ATTTAAATAATTAAATTTAGATAATTAAAATTCAAGTTCATATTAATAAACTATTTACACACCAACAATCACAAATTTATATTTTATATTACATTAAG
líder2_Cft03-427  .....-.....T..A..TA..A..T.....-----.....
líder3_Cft03-427  .....-.....C.....
líderly2_Cff82-40  ..A...CCC..C.C...TA..GT...-G..TT.A..T..GC...T.A...T.T...CT..CT.....C.G.....
```

```
líder1_Cft03-427  TTTTTCCAACCTAATTTTAGTTAAACTTTTAAAAAACATAGATAAATAGTTTAAATTTAATGTTTTTTATGATATTTAACTTATTATTGTTATTTTTA
líder2_Cft03-427  .....T.....
líder3_Cft03-427  .....
líderly2_Cff82-40  .....-.....C..-.....T
```

```
líder1_Cft03-427  AATTTAGATTGGAAAATAAATTTATTTTTATTATTTATAGCTATATTATATATAAAAACAAATAATCCATTTTAAATAGTTTTAAATAGT-TTTTAAATT
líder2_Cft03-427  .....T.....C.....-.....
líder3_Cft03-427  .....-.....
líderly2_Cff82-40  .....C.C.....T.....T.....T.....G..A.A.C..T.....
```

```
líder1_Cft03-427  TATTTCTTATTTCAATTTCTAATTTAAATTTCTTTTTTAAATTTAATTAGATGATGAGTTTATTATG-
líder2_Cft03-427  .....-
líder3_Cft03-427  .....-
líderly2_Cff82-40  .....T...C.T...G..-----.....C.....AG
```

**Anexo 7.** Secuencias de espaciadores encontradas en los loci CRISPR

**Tabla A7.** Resultados del análisis realizado con BLASTn. Las secuencias fueron numeradas de acuerdo a su orden de aparición. Se muestra como referencia la posición del espaciador en la primera secuencia en la que se encontró: se indica la cepa o aislamiento, el número antes del punto indica la posición, y el número luego del punto indica el locus. Los *hits* en el BLASTn que corresponden a un espaciador en un locus CRISPR de alguno de los genomas completos se omiten. Se marcan en **negrita** los *scores* mayores a 54.

Número	Referencia	Secuencia 5' - 3'	Primer Hit BLAST	Identidad	Score
0	Cff8240spacer0.1	TCATTTTTGTCATCAGGACCAGGAGAACTGACAC	<i>Candidatus methanosphaerula</i>	0.68 (23/34)	40.1
1	Cff8240spacer1.1	TATAAAGGGACCTACGAACTAAGCTAGAACCCTTTT	<i>Solanum lycopersicum</i>	0.5 (18/36)	36.2
2	Cff8240spacer2.1	TCGAATAAGTTGTTAAGATTATGCAACTTTTTTGTA	<i>Homo sapiens</i>	0.69 (25/36)	44.1
3	Cff8240spacer3.1	TGAGCATATTCTGGATAAGATAAAAAGTGCGTGAATA	<i>Bactrocera dorsalis</i>	0.56 (20/36)	40.1
4	Cff8240spacer4.1	AGCATTTTAACGATAGAATCAAACTTTTAGCTTTT	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.58 (21/36)	42.1
5	Cff8240spacer5.1	GTGTAAGCAAGATGGCAAGAGACTATCTCCTGTTGT	<i>Mus musculus</i>	0.53 (19/36)	38.2
6	Cff8240spacer6.1	CGGGGAGCAACGTTAGCAATCTCATTTCCGTCCAT	<i>Caenorhabditis remanei</i>	0.51 (18/35)	36.2
7	Cff8240spacer7.1	TGGGGATTGATGAAATTTTAACTATATAGCATTC	<i>Solanum lycopersicum</i>	0.56 (20/36)	40.1
8	Cff8240spacer8.1	TTACCAATTTCTATTACTACCGGTTACCGGTAT	<i>Chrysochloris asiatica</i>	0.64 (23/36)	40.1
9	Cff8240spacer9.1	TGTATGTTGGTAGCTTTTATGGTTACTTTACATAAC	<i>Mus musculus</i>	0.56 (20/36)	40.1
10	Cff8240spacer10.1	TAAACTATTTGTTATCCTGGTTGATACCGCTTAAA	<i>Ralstonia eutropha</i>	0.61 (22/36)	38.2
11	Cff8240spacer11.1	ATTAAGCCGAATTACTCCCATTTTTTTTTGACTTGG	<i>Caenorhabditis elegans</i>	0.59 (22/37)	44.1
12	Cff8240spacer12.1	GAATTTAATCGGAGTTTACAGGCCGGATCTAATTC	<i>Drosophila virilis</i>	0.5 (18/36)	38.2
13	Cff8240spacer13.1	TCACCAAAAAACCAGGAATTAATAAAAAAGTAAAA	<i>Homo sapiens</i>	0.64 (23/36)	46.1
14	Cff8240spacer15.1	TAGCTAGAAAATGTAATGCTCCCATCCTTCTACC	<i>Oscillatoria acuminata</i>	0.56 (20/36)	40.1
15	Cff8240spacer16.1	AATCCAACCTAACAAAAATGTTATATAAAATCACC	<i>Ilyoplax deschampsi</i>	0.69 (24/35)	42.1
16	Cff8240spacer17.1	TAAGCAAGGCTTATAAGCTCTTTACAATGCATTTTT	<i>Hydrogenobaculum</i> sp.	0.56 (20/36)	40.1
17	Cff8240spacer18.1	AGAACTGTTTTAACCTCACTCCATCAATCTCTTTT	<i>Trichobilharzia regenti</i>	0.69 (25/36)	44.1
18	Cff8240spacer19.1	CAGTATGCCATTTGATTCTAGTTGCGCTATAGCTCT	<i>Vitis vinifera</i>	0.56 (20/36)	40.1
19	Cff8240spacer20.1	CATCCTCCTTTAATTTATTACATTTAAACAATTTA	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.58 (21/36)	42.1

Número	Referencia	Secuencia 5' - 3'	Primer Hit BLAST	Identidad	Score
20	CfvUy003spacer0	CCGTAAGCTACATTGTAAGCTAAGTCTTCAAAGACT	<i>Mus musculus</i>	0.56 (20/36)	40.1
21	CfvUy003spacer5	TTTTTATAAGGCTCATTTTTGAAGATATTATGCTGC	<i>Ilyobacter polytropus</i>	0.65 (24/37)	42.1
22	CfvUy003spacer6	TCCAGAGCTAATAAGGGATTTAGAGCAGCTAAAAACT	Cfv 84-112; Cfvi03-293 plasmido pCfviMP1	0.89 (33/37); 0.78 (29/37)	<b>73.8; 58.0</b>
23	CfvUy003spacer7	CGCAAAAAGAGTTGAAATATATAGATAATAGGTTAA	Cfv 84-112; Cfvi03-293 plasmido pCfviMP1	0.94 (34/36); 0.94 (34/36)	<b>71.9; 56.0</b>
24	CfvUy003spacer9	ATGAGTTTTAAATTTGATAGATCTGAAAAGATTATTC	<i>Onchocerca ocheng</i>	0.58 (21/36)	42.1
25	CfvUy003spacer10	CTTGATACTTTTTGCTTGATTAGCTTTGCATTTTTA	<i>Syphacia muris</i>	0.64 (23/36)	40.1
26	CfvUy003spacer11	TCCCGTTATCTACCTCTGGCGCCATGCTCTCTCCG	<i>Neolamprologus brichardi</i>	0.53 (19/36)	38.2
27	CfvUy003spacer12	TTTGAAGTGCACGACGCTATAACTAGAACACGGATC	<i>Aspergillus oryzae</i>	0.53 (19/36)	38.2
28	CfvUy003spacer13	TACATCTTTTATCTCCTCTTTGTATTCTTTAGCTC	Cfv 84-112	0.97 (35/36)	<b>63.9</b>
29	CfvAu001spacer13	CCCTTCTGCGATATATTTGATGAAAAACAGAAAGG	<i>Cyprinus carpio</i>	0.58 (21/36)	42.1
30	CfUy022spacer0.1	CCTTTTTTAAAGCTGCTTATTGCTCCAGCACTTACT	<i>Solanum pennellii</i>	0.56 (20/36)	40.1
31	CfUy022spacer1.1	TTTTCAAACCTAACGACGTATATAGCGCCTTCGC	Cfv 84-112	0.92 (33/36)	<b>60.0</b>
32	CfUy022spacer2.1	GAAATACAAATATCTGCAGGAAGTGTTTTAGATAA	<i>Homo sapiens</i>	0.57 (20/35)	40.1
33	CfUy022spacer4.1	CCGGATTCTACTTTGATAAAAAAGGCCTTGGATGCTAT	Cfv 84-112	1 (38/38)	<b>75.8</b>
34	CfUy022spacer5.1	TTTTATAAATCATATCACGCTTAGCCTTATTAATT	<i>Solanum lycopersicum</i>	0.51 (18/35)	36.2
35	CfUy022spacer6.1	TCTTCTAAAGCAGAACTAAAAAGCCATATCCGATG	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	0.69 (24/35)	48.1
36	CfUy022spacer10.1	TCGAGTATCGGTTTCAATTTTATTCTTTGTAATTA	<i>Mus musculus</i>	0.63 (22/35)	44.1
37	CfUy022spacer11.1	CGACTTAGTGCTGTACATTCAAATACAAATAATTT	<i>Solanum pennellii</i>	0.6 (21/35)	42.1
38	Cff8240spacer0.2	TCGTTAATATTATTTTTGTTGCAATGTTTGCATTTT	<i>Solanum pennellii</i>	0.81 (29/36)	44.1
39	Cff8240spacer2.2	AGAGAAGCAAGGCTTAAAAATGTTTCGCAGATGGCGG	Cfv 84-112	1 (36/36)	<b>71.9</b>
40	Cff8240spacer3.2	TTTTGTATCAGAACCCAGGACCAGGAGAACCTGA	<i>Takifugu rubripes</i>	0.65 (22/34)	44.1
41	Cff8240spacer4.2	TGATGTATTGACTTTGAAGATAGCAATCATAGGCAAA	<i>Orycteropus afer</i>	0.54 (20/37)	40.1
42	Cff8240spacer5.2	GGCGCAGCCGTAGAATTAGGGCTTAGTTTCGGCAAT	<i>Sus scrofa</i>	0.53 (19/36)	38.2
43	Cff8240spacer6.2	CTTTTTCAAGCTCGATTTTAAATATCCCATTGCGCG	Cfv 84-112	0.94 (34/36)	<b>56.0</b>
44	Cff8240spacer7.2	TTTTTACCGTTTTGAAAATCAACAAAAAGTTCTATA	<i>Solanum lycopersicum</i>	0.61 (22/36)	44.1
45	Cff8240spacer8.2	TCATTA AACACGATATTGTGATCCGCCTTTCATAT	<i>Gorilla gorilla</i>	0.53 (19/36)	38.2
46	Cff8240spacer9.2	CCTTTATAATCTATACTAAAACATTTAATATAATAT	<i>Dendroctonus ponderosae</i>	0.57 (21/37)	42.1
47	Cff8240spacer10.2	GCATATTAACAAGCTAAATGACTTTCTTAAAAGTAA	Cfv 84-112	0.97 (35/36)	<b>63.9</b>
48	Cff8240spacer12.2	GGGGATATGGTAAAATCTGCAGTTAAATCTAAGTTAT	Cfv 84-112	0.86 (32/37)	<b>63.9</b>

Número	Referencia	Secuencia 5' - 3'	Primer Hit BLAST	Identidad	Score
49	Cff8240spacer13.2	GATAATCAAAATTTTACAAAGCAAGTCTTGACAC	<i>Mus musculus</i>	0.61 (22/36)	44.1
50	Cff8240spacer14.2	CCATTTAGCATATCATATACTTGATCTGCCATTTAT	<i>Babesia bigemina</i>	0.61 (22/36)	38.2
51	Cff8240spacer15.2	ACTTTTAGTGTTGCAAGGAGATAGTAAGAGATGCA	<i>Homo sapiens</i>	0.56 (20/36)	40.1
52	Cff8240spacer16.2	TCTGATAAAATGTATTTGGATCAATACCTAAAGCTC	<i>Hymenolepis nana</i>	0.67 (24/36)	42.1
53	Cff8240spacer17.2	TCGTAATCTTCTCCATAATTTAAAGTATAGATTA	Cfv 84-112	0.83 (30/36)	42.1
54	Cff8240spacer18.2	TCGAATCCGTATGTGTTACAACCTTCTGAATCTTC	<i>Mus musculus</i>	0.54 (19/35)	38.2
55	Cff8240spacer19.2	TTGAAATACATATCTGAGTAAAATGGAGCCCACTCT	Cfv 84-112	0.69 (25/36)	44.1
56	Cff8240spacer21.2	TCTTTGCTTTTTGTCTTTGCTATTTTACTTTTAAAG	Cfv 84-112	0.94 (33/35)	<b>54.0</b>
57	Cff8240spacer22.2	TCGAAATACAAGCTCGCGCAAATGGAATCCATTCT	<i>Caenorhabditis elegans</i>	0.61 (22/36)	38.2
58	Cff8240spacer23.2	TTAAATCTCCTTATCGCTTATTATATTTATTAATTT	<i>Solanum lycopersicum</i>	0.64 (23/36)	46.1
59	Cff8240spacer24.2	TTATCTATGATTTGGACGTTTGTGAGCGCGGAGCTTA	<i>Naegleria gruberi</i>	0.59 (22/37)	38.2
60	Cff8240spacer25.2	ATGGAATATTTTTGTTAAACGCATTCATACAAAATT	<i>Populus trichocarpa</i>	0.56 (20/36)	40.1
61	Cft03427spacer0.1	CTAGCCTCGTAAACATCTTGCTGCTCTTTTTTTG	Cfv 84-112	0.72 (26/36)	46.1
62	Cft03427spacer1.1	CACTACAGGTACATTTATAACATCAAATAATAATTTT	<i>Homo sapiens</i>	0.62 (23/37)	46.1
63	Cft03427spacer2.1	CAAAATATTTACAACCTCGATTTATTAATTTGTTGAT	<i>Glomus irregulare</i>	0.65 (24/37)	48.1
64	Cft03427spacer3.1	CAAGCATAGATTGCGGCTAATTTGTCCGTGGGATAGT	<i>Oryza sativa</i>	0.65 (24/37)	40.1
65	Cft03427spacer4.1	CTCTCTTAATGCAGCTAAGATATCATCTATACCTTTT	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0.56 (20/36)	40.1
66	Cft03427spacer5.1	CTATAAAGAACTAACAGCTCTCTAGTTTCTGCTGATA	<i>Mus musculus</i>	0.56 (20/36)	40.1
67	Cft03427spacer6.1	CCGTTAAGCCTTCTATAAACGAGAATGAAATGGCTA	<i>Mahella australiensis</i>	0.53 (19/36)	38.2
68	Cft03427spacer7.1	AAAGAAGCGTACGTGCATTCCGCACCTACTTTAA	<i>Vibrio</i> sp.	0.5 (18/36)	36.2
69	Cft03427spacer8.1	CACGGAAATTTGTTGAAAGTCTTTGAAGTTTTAACG	<i>Cucumis sativus</i>	0.65 (24/37)	42.1
70	Cft03427spacer9.1	CTCTTTAATGCAGCTAAGATATCATCTATACCTTTT	Cfv 84-112	0.68 (25/37)	44.1
71	Cft03427spacer10.1	CGTTTGTATTGCAATGTATGCGTCTTGACAGACTCC	<i>Neolamprologus brichardi</i>	0.59 (20/37)	40.1
72	Cft03427spacer11.1	CAGGAATTACTGCTTTTATGTTAGGGTCTATTTGGTGT	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	0.53 (20/38)	40.1
73	Cft03427spacer12.1	CGATGATAAGATTTTTGAAGAAAATGTAGCAAATGAT	<i>Entamoeba histolytica</i>	0.59 (22/37)	44.1
74	Cft03427spacer13.1	CAAATTAGCTATATTTATAAACTCCTATTTTGGTGTT	<i>Danio rerio</i>	0.57 (21/37)	42.1
75	Cft03427spacer15.1	CGCGTACTCTCCTAACTCTTCAAATAAATTTCTTGTT	<i>Caenorhabditis elegans</i>	0.57 (21/37)	42.1
76	Cft03427spacer16.1	CAAGTCAATAGCTGTTTTATCGGTAGCGCTATGGC	<i>Methanothermococcus okinawensis</i>	0.53 (19/36)	38.2
77	Cft03427spacer17.1	CATTTTACTATACGCTTCTTAGCATTCTGTTTGGCT	<i>Clostridium botulinum</i>	0.57 (21/37)	42.1

Número	Referencia	Secuencia 5' - 3'	Primer Hit BLAST	Identidad	Score
78	Cft03427spacer18.1	CTCTCGATTATTAGATCGCCCTCTACGTCTGCAAAA	<i>Sorex araneus</i>	0.51 (18/35)	36.2
79	Cft03427spacer19.1	CAATTTATCTCTGCTGGGAACACCCTTAATATTTT	<i>Mus musculus</i>	0.6 (21/35)	42.1
80	Cft03427spacer20.1	CGTAAGTTTTATTGCTGGTTTTAACTTAAGATTATTG	<i>Formosa agariphila</i>	0.59 (22/37)	44.1
81	Cft03427spacer21.1	CTAAACCCAAAAACGCTAAATTTGAGTGTGCAAAATAG	<i>Bombus terrestris</i>	0.59 (20/37)	40.1
82	Cft03427spacer22.1	CAAAAACTATGTTGATGAAGCTTTAAAAAGAATAG	<i>Clostridium tetani</i>	0.58 (21/36)	42.1
83	Cft03427spacer23.1	CGTTCACCACAATCGGCCTCGTGTCTCTTATTTT	<i>Callorhinchus milii</i>	0.58 (21/36)	36.2
84	Cft03427spacer0.2	CAAGTAACTACGCTCTTGATAGCTTAAAGGCTCTAGG	Cfv 84-112	0.97 (36/37)	<b>71.9</b>
85	Cft03427spacer1.2	CTTCGGCTAGGTCTACCGTTGGCATTACTTTAAAATTT	<i>Babesia bovis</i>	0.58 (22/38)	44.1
86	Cft03427spacer2.2	CGAAAGATACTTACCATTAGGAGAATAGTCATTGCT	<i>Condylura cristata</i>	0.53 (19/36)	38.2
87	Cft03427spacer4.2	CATGTCAGAGCATTATAAAAGCCTAAATTAGGCTT	<i>Tetrahymena thermophila</i>	0.56 (20/36)	40.1
88	Cft03427spacer5.2	CTCCAAAAAATGCTAAAGCTTTCACTACTTGAAAA	<i>Homo sapiens</i>	0.56 (20/36)	40.1
89	Cft03427spacer6.2	CTTTCAATCCACTTTAAACTCTATTTTTAAAAAACT	<i>Homo sapiens</i>	0.59 (22/37)	44.1
90	Cft03427spacer7.2	CTTTGCAGACTGCTGTCGTCCAGCTCTGAAATTTTC	<i>Octodon degus</i>	0.59 (22/37)	44.1
91	Cft03427spacer8.2	CTTGTTAAGTCCAAAAATCCGGACTTTTAGTAATAC	<i>Megamonas hypermegale</i>	0.49 (18/37)	36.2
92	Cft03427spacer9.2	CTCAAATTCGCCGATCTTTGGAGTTTGGCGTTCT	<i>Bartonella australis</i>	0.53 (19/36)	38.2
93	Cft03427spacer10.2	CAAATTTAGCAGGTTTTATAGGACATTGCGTTGTGGAA	<i>Latimeria chalumnae</i>	0.5 (19/38)	38.2
94	Cft03427spacer11.2	CTTGATGAAAATGGCGAGAGACTTTTAAACAAAGGCGG	Cfv 84-112	0.76 (28/37)	<b>56.0</b>
95	Cft03427spacer13.2	CTCTTGCTTCCATTCCAAAAGACCACATTAGCCAT	Cfvi03-293	0.89 (32/36)	46.1
96	Cft03427spacer14.2	CAGGCTTAATACAACCTTTTAGCAATATTATTATAAA	<i>Trametes suaveolens</i>	0.56 (20/36)	40.1
97	Cft03427spacer15.2	CTTTTTAAATCAATATTCTTATTTTTAATTCGCTT	<i>Prochlorococcus marinus</i>	0.67 (24/36)	48.1
98	Cft03427spacer16.2	CGCGGCATCTTAAATGGCTTTTTTATATGTGTCTAAA	<i>Populus trichocarpa</i>	0.59 (22/37)	44.1
99	Cft03427spacer17.2	CGCAAATTCTCTAGAAATAGAAAATCTTTTTCTACTC	<i>Oryza sativa</i>	0.59 (22/37)	44.1
100	Cft03427spacer18.2	CCTTTGAGCATTAGTAATACTCTTAGAAGTAGTAAGA	<i>Paramecium tetraurelia</i>	0.59 (20/37)	40.1
101	Cft03427spacer19.2	CGCTGTTTTCATCTTGTCTCTTTTTTTCTTAAAAT	<i>Caenorhabditis elegans</i>	0.59 (22/37)	46.1
102	Cft03427spacer20.2	CATGATACAAAGCGTGGTTGGTAGATATTATATTTT	<i>Selenomonas ruminantium</i>	0.5 (18/36)	36.2
103	Cft03427spacer21.2	CTCATAGAATGTGTTTTTATTGTACTTTCTAGCAGGT	Cfv 84-112	0.84 (31/37)	50.1
104	Cft03427spacer22.2	CTAGCAAACGCACCTTTAAAGGCTGGAGACGCTATA	Cfv 84-112	0.97 (35/36)	<b>69.9</b>
105	Cft03427spacer23.2	CTAGTTAGATTTGCGTTCTATTTTATAGATAGTAACG	<i>Zonotrichia albicollis</i>	0.53 (19/36)	38.2
106	Cft03427spacer24.2	CTTTTATATCTAAAATCATCGCTTAAATGACGTTTATC	<i>Oleispira antarctica</i>	0.53 (20/38)	40.1

Número	Referencia	Secuencia 5' - 3'	Primer Hit BLAST	Identidad	Score
107	Cft03427spacer25.2	CAGAGAAGTTTCGAAATCGACTTCTGTTTTAGCGTCG	<i>Serratia marcescens</i>	0.59 (20/37)	40.1
108	Cft03427spacer26.2	CCCTTGATTTTTGTATAGAGTTGGTTTTATGTCAATC	<i>Danio rerio</i>	0.65 (24/37)	42.1
109	Cft03427spacer2.3	CATACTTGTTAGGAAATTTGACTACGCTAAAACAAGA	<i>Homo sapiens</i>	0.59 (20/37)	40.1
110	Cft03427spacer3.3	CAGTTAAAAAATGAGAGTAAGCCGTTTTTTGTAAT	<i>Danio rerio</i>	0.51 (19/37)	38.2
111	Cft03427spacer4.3	CAGTCCTCCATAAATGAAAACGAAATGGCTACATAT	<i>Polaribacter sp</i>	0.53 (19/36)	38.2
112	Cft03427spacer5.3	CAAAACTATTTTTGAGTTATATTTTTATGCCTATTTTAA	<i>Homo sapiens</i>	0.65 (24/37)	42.1
113	Cft03427spacer6.3	CAGAAATTTAGTATCGATATAATCGCACCTATACACG	<i>Microcoleus sp.</i>	0.49 (18/37)	36.2
114	Cft03427spacer7.3	CACTCCAAAATCCTCGCCCTGAACGCTGCTAAAAGCT	<i>Curvibacter sp.</i>	0.65 (24/37)	42.1
115	Cft03427spacer8.3	CAGCCGATGAGCAAAGATGTGGCGGGTAAGATACTGG	<i>Amborella trichopoda</i>	0.57 (21/37)	36.2
116	Cft03427spacer9.3	CGGGAGTAAAAAATATTTAATTTTACATCCCACCCA	<i>Glycine max</i>	0.59 (22/37)	44.1
117	Cft03427spacer10.3	CTTTAATTTTATGCTATCTTTTAAACTCATTTAAATCT	<i>Schistosoma mansoni</i>	0.58 (22/38)	44.1
118	Cft03427spacer11.3	CTTTGCCATAACTAAGAGCATATTTTTTATATTCAT	<i>Glycine max</i>	0.56 (20/36)	40.1
119	Cft03427spacer12.3	CAGTGGGGGATATCGTTAAGCTCAAGAGCCCAACACA	<i>Tremella mesenterica</i>	0.48 (18/37)	36.2
120	Cft03427spacer13.3	CTCTTTGCTTACAGAACATTGTATCCCTTACTCTGAGT	<i>Alligator sinensis</i>	0.57 (21/37)	42.1
121	Cft03427spacer14.3	CTAAGTAATGTTTTTGGTGTTGAAGATGACTATGACG	<i>Mus musculus</i>	0.58 (21/36)	42.1
122	Cft03427spacer15.3	CAAGTCTGCTTTAGTGGATCAGATAATAAATAATTAT	<i>Sebaldella termitidis</i>	0.65 (24/37)	40.1
123	Cft03427spacer16.3	TCCCCTAATATAGCTATTAAGGCTATCATATTTA	<i>Tetrahymena thermophila</i>	0.66 (23/35)	40.1
124	CfUy022spacer0.2	CCGCCAAAACACTTACAAGGTATAAACGGCTCTTA	<i>Danio rerio</i>	0.6 (21/35)	42.1
125	CfUy022spacer1.2	TTTTTAGATATCCAAAAGGCATTTTGACGTATGG	Cfv 84-112	0.42 (15/36)	30.2
126	CfUy022spacer2.2	TTAGAACCAGGAGAACCGACACCGGCACCAGGGTTG	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	0.56 (20/36)	40.1
127	CfUy022spacer3.2	TTGATATTAGTATAAGCAATATCATATTTTTTAATA	<i>Homo sapiens</i>	0.58 (21/36)	42.1
128	CfUy022spacer8.2	TACGCTTCTTTGGTGCTACGCTTTGGATTTGATTT	Cft 03-427	0.44 (16/36)	32.2
129	CfUy022spacer13.2	TTGCTACAAAGACGGTGATACTATAACGTATTATTT	Cfvi03-293 pCfviP3	0.89 (31/35)	<b>61.9</b>
130	CfUy022spacer16.2	TTTTTTAGCCTTTACTTGCTCTTTTGCTTCTTGTTCT	<i>Gongylonema pulchrum</i>	0.59 (22/37)	44.1
131	CfUy022spacer19.2	GGAGAAGATTACGATGAAGCAAAGATACCCTAATA	Cfv 84-112	0.92 (33/36)	<b>96.1</b>
132	CfUy022spacer24.2	ACTCTATTAAGCTCATTTCAACTGTTTTAACTTT	<i>Toxocara canis</i>	0.71 (25/35)	44.1



**Tabla A8.** Regiones dentro de los genomas de *C. fetus* que tienen similitud con secuencias de espaciadores.

Número	ORF en Cfv 84-112	ORF en Cfvi03-293	ORF en Cfvi03-293 pCfviMP1	ORF en Cfvi03-293 pCfviP3
22	Proteína hipotética CSG 7150/13250	--	Proteína hipotética A0049	--
23	Proteína hipotética CSG 7120/13280	--	Proteína hipotética A0109	--
28	Regulador transcripcional hipotético	--	--	--
31	Regulador transcripcional del profago MuSo2	Regulador transcripcional del profago MuSo2	Proteína hipotética A0020	--
33	Proteína hipotética CSG 7020/13380	--	--	--
39	Proteína hipotética CSG 7170/13230	Proteína hipotética 1053	Proteína hipotética A0020	--
43	Proteína hipotética CSG 7030/13370	--	--	--
47	Proteína hipotética CSG 7030/13370	--	--	--
48	Proteína hipotética CSG 7110/13290	--	Proteína hipotética A0108	--
56	Proteína hipotética CSG 7310/13090	--	--	--
84	Proteína hipotética CSG 7170/13230	Proteína hipotética 1053	Proteína hipotética A0020	--
94	Proteína hipotética CSG 7170/13230	--	Proteína hipotética A0020	--
104	Proteína hipotética CSG 7170/13230	--	Proteína hipotética A0020	--
129	--	--	--	Proteína del sistema toxina/antitoxina
131	Proteína hipotética CSG 7020/13380	--	--	--

## **Anexo 8.** Publicaciones asociadas al trabajo de tesis

### **Artículos publicados**

Iraola, G; Pérez, R; Naya, H; Paolicchi, F; Pastor, E; Valenzuela, S; **Calleros, L**; Velilla, A; Hernández, M; Morsella, C. 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.

Iraola, G; Pérez, R; Naya, H; Paolicchi, F; Harris, D; Lawley, TD; Rego, N. Hernández, M; **Calleros, L**; Carretto, L; Velilla, A; Morsella, C; Méndez, A; Gioffre, A. 2013. Complete Genome Sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* Biovar Intermedius , Isolated from the Prepuce of a Bull. 1(4): e00526-13.

Iraola, G; Hernández, M; **Calleros, L**; Paolicchi, F; Silveyra, S; Velilla, A; Carretto, L; Rodríguez, E; Pérez, R; Rodr, E; Ruben, P. 2012. Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *Journal of veterinary science* 13(4): 371–6.

### **Manuscritos en preparación**

Assessing the intra-specific genetic variability in the clonal pathogen *Campylobacter fetus*: CRISPRs as a tool for evolutionary studies

Development and assessment of a Real-Time PCR assay for rapid and sensitive detection of *Campylobacter fetus*