

**Determinación de la presencia de los genes  
putativos de virulencia de *Arcobacter* en  
diferentes medios de crecimiento,  
temperaturas y condiciones atmosféricas**

**Grecia Odalis Rivera Palomino**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2015

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Determinación de la presencia de los genes  
putativos de virulencia de *Arcobacter* en  
diferentes medios de crecimiento,  
temperaturas y condiciones atmosféricas**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado  
Académico de Licenciatura

Presentado por

**Grecia Odalis Rivera Palomino**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2015

# **Determinación de la presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en diferentes medios de crecimiento, temperaturas y condiciones atmosféricas**

Presentado por:

Grecia Odalis Rivera Palomino

Aprobado:

---

Mayra Márquez, Ph.D.  
Asesora Principal

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Director  
Departamento de Agroindustria  
Alimentaria

---

Estela Aguilar, M.Sc.  
Asesora

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

## Determinación de presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en diferentes medios de crecimiento, temperaturas y condiciones atmosféricas

Grecia Odalis Rivera Palomino

**Resumen.** *Arcobacter* ha sido reconocido como patógeno potencial en alimentos y agua. Es aislado a partir de productos animales y de fuentes de agua con contaminación fecal. *Arcobacter* spp. relacionadas con enfermedades en humanos son *A. butzleri*, *A. skirowii*, y *A. cryaerophilus*. Crece a temperaturas bajas (hasta 15 °C) y en presencia de oxígeno. Se usaron muestras de pollo para aislar *Arcobacter* a diferentes condiciones de crecimiento: temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Trypticosa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico), y evaluar la presencia o ausencia de siete genes putativos de virulencia: *ciaB*, *hecA*, *hecB*, *irgA*, *mviN*, *pldA*, y *tlyA*). Estos fueron analizados por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y electroforesis, con cuatro cepas de referencia de *A. butzleri* para validar condiciones. La presencia de los genes putativos de virulencia varió según la pieza de pollo y las condiciones de crecimiento. El gen *cj1349* no se presentó en este estudio, mientras que los genes que se presentaron en todas las muestras de pollo fueron *irgA* y *tlyA*, siendo los de mayor presencia (87 y 86%, respectivamente). Se recomienda para futuras investigaciones realizar un aislamiento previo de *Arcobacter* spp. para determinar los genes putativos de virulencia de cada especie.

**Palabras clave:** Aislamiento, Bolton, Campylobacteraceae, patógeno potencial, pollo.

**Abstract.** *Arcobacter* has been recognized as a potential pathogen in food and water. It is isolate from animal products and water sources with fecal contamination. *Arcobacter* spp. associated with human diseases are *A. butzleri*, *A. skirowii*, and *A. cryaerophilus*. It grows at lower temperatures (up to 15°C) and with oxygen presence. Chicken samples were used to isolate *Arcobacter* in different growth conditions: temperatures (15, 25, 30, 37 y 42°C), media (Bolton Blood Agar and Trypticis Soy Blood Agar) and atmosphere conditions (aerobic and microaerobic), and to evaluate the presence or absence of seven putative virulence genes: *ciaB*, *hecA*, *hecB*, *irgA*, *mviN*, *pldA*, y *tlyA*. They were analyzed by PCR (Polymerase Chain Reaction), with four reference strains of *A. butzleri* to validate the conditions. The presence of putative virulence genes changed depending on the chicken pieces and the growth conditions. The *cj1349* gen was not present in this study whereas the genes which were present in all the chicken samples were *irgA* and *tlyA* (87 and 86%, respectively). It is recommended for future researches to conduct a previous isolation of *Arcobacter* spp. to determinate the putative virulence genes of each species.

**Key words:** Bolton, Campylobacteraceae, chicken, isolation, potential pathogen.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Figuras .....	v
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>4 CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>5 RECOMENDACIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>6 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>36</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Listado de las cepas de <i>Arcobacter</i> utilizadas para determinar los controles positivos, ubicadas en el Centro de Investigación de Biomasa. ....	3
2. Formulación Caldo de Enriquecimiento Bolton.....	4
3. Formulación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la confirmación del género <i>Arcobacter</i> .....	5
4. Formulación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la confirmación de la especie <i>A. butzleri</i> .....	6
5. Formulación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la confirmación de la especie <i>A. cryaerophilus</i> .....	6
6. Condiciones de crecimiento a las que fueron sometidas las cepas de <i>Arcobacter</i> .	7
7. Formulación de Agar Soya Tripticasa.....	7
8. Formulación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la presencia de los genes de virulencia de <i>Arcobacter</i> .....	8
9. Pares de base (pb) para los genes de virulencia de <i>Arcobacter</i> .....	9
10. Formulación Caldo Selectivo <i>Arcobacter</i> .....	10
11. Formulación de antibióticos CAT, agregados después de la preparación y el autoclavado del caldo selectivo <i>Arcobacter</i> , rehidratados en 2 ml de agua estéril destilada.....	10
12. Número de piezas de pollo usadas en el experimento.....	11
13. Identificación de las especies de <i>Arcobacter</i> a través de PCR en las muestras de pollo donde fue encontrado el microorganismo.....	19
14. Prevalencia de <i>Arcobacter</i> en las diferentes piezas de pollo positivas para el estudio.....	21
15. Presencia de los genes putativos de virulencia de <i>Arcobacter</i> en las muestras de pollo positivas a <i>Arcobacter</i> a través del PCR.....	24
16. Presencia de los genes putativos de virulencia de <i>Arcobacter</i> en el hígado con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).....	27
17. Presencia de los genes putativos de virulencia de <i>Arcobacter</i> en el contramuslo con piel con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).....	28

Cuadros	Página
18. Presencia de los genes putativos de virulencia de <i>Arcobacter</i> en la pechuga con piel con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).....	29
19. Presencia de los genes putativos de virulencia de <i>Arcobacter</i> en el ala con piel con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).	30
20. Presencia de los genes putativos de virulencia de <i>Arcobacter</i> en el ala con piel con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).	30

Figuras	Página
1. Gel de electroforesis de la confirmación de <i>A. butzleri</i> en las cepas microbianas, con una amplificación de banda de 2061 pb.....	13
2. Gel de electroforesis de la presencia del gen <i>pdlA</i> en las cepas microbianas en Agar Bolton Sangre a 15 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 293 pb. ....	15
3. Gel de electroforesis de la presencia del gen <i>irgA</i> en las cepas microbianas en Agar Soya Tripticasa Sangre a 25 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 437 pb. ....	15
4. Gel de electroforesis de la presencia del gen <i>cj1349</i> en las cepas microbianas en Agar Bolton Sangre 30 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 659 pb. ....	16
5. Gel de electroforesis de la presencia del gen <i>hecA</i> en las cepas microbianas en Agar Soya Tripticasa sangre 37 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 537 pb.....	16
6. Gel de electroforesis de la presencia del gen <i>mviN</i> en las cepas microbianas en Agar Bolton Sangre 42 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 294 pb. ....	17
7. Gel de electroforesis de la presencia del gen <i>ciaB</i> en las cepas microbianas en Agar Soya Tripticasa Sangre 42 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 284 pb.....	17
8. Gel de electroforesis de la presencia del gen <i>tlyA</i> en las cepas microbianas en Agar Bolton Sangre 30 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 230 pb. ....	18
9. Gel de electroforesis de la presencia del gen <i>hecB</i> en las cepas microbianas en Agar Soya Tripticasa Sangre 30 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 528 pb.....	18

## 1. INTRODUCCIÓN

*Arcobacter* fue aislado en 1977 a partir de un aborto de feto bovino. Fue clasificado dentro del género *Campylobacter*, sin embargo algunas de sus características diferían con las de este género. Por ejemplo, puede crecer en presencia de oxígeno y a temperaturas bajas (Vandenberg *et al.*, 2004). Por estas razones, el género *Arcobacter* fue creado en 1991, basado en sus características de aerotolerancia y crecimiento a 15 °C. Este microorganismo fue incluido dentro de la familia Campylobacteraceae, junto con *Helicobacter* y *Campylobacter* (Levican, 2013 y Lee *et al.*, 2010).

*Arcobacter* es una bacteria Gram negativa y no forma esporas. Es una bacteria móvil y posee un flagelo polar en uno o en ambos lados de la célula. Las condiciones de crecimiento de *Arcobacter* son en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y en un amplio rango de temperaturas (15 a 42 °C). El crecimiento óptimo se da en condiciones microaeróbicas, con un rango de 3 a 10% de oxígeno, y no necesitan de la presencia de hidrógeno para poder desarrollarse (Ho *et al.*, 2006).

En la actualidad, 17 especies forman parte de este género (Levican *et al.*, 2012 y Calvo *et al.*, 2013). Sin embargo, solo tres especies están relacionadas a enfermedades en humanos, estas son: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Lee *et al.*, 2010). Su prevalencia varía, siendo *A. butzleri* la más prevalente e importante en la industria de alimentos, seguida por *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*. Otra especie relacionada con la industria alimentaria, pero en menor grado, es *A. cibarius* (Son *et al.*, 2006).

Los síntomas causados en humanos son diarreas persistentes y acuosas (Scarano *et al.*, 2014), dolor abdominal, náuseas y vómitos o fiebre (Vandenberg *et al.*, 2004). Una diarrea acuosa y persistente es asociada con *A. butzleri*, mientras que *A. skirrowii* se relaciona más con gastroenteritis. Además en algunos casos se puede producir septicemia (Van Driessche y Houf, 2007), enteritis y bacteremia (Levican, 2013). La enteritis causada por *Arcobacter* en la mayoría de casos no tiene mayores consecuencias. No obstante, esto variará según la severidad, la prolongación de los síntomas y el estado del sistema inmunológico del paciente. Es por eso que *A. butzleri* ha sido considerado como un peligro grave para la salud humana por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (Collado y Figueras, 2011).

*Arcobacter* spp. han sido aisladas de agua y alimentos de origen animal (Karadas *et al.*, 2013 y Merga *et al.*, 2011). Además, algunas especies han sido aisladas de superficies de plantas procesadoras de carne, de agua potable y de alcantarillas (Calvo *et al.*, 2013). Su aislamiento a partir de productos cárnicos se ha registrado a nivel mundial en países como Japón, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Turquía, México y Australia (Calvo *et al.*, 2013 y

Merga *et al.*, 2011). Se le ha relacionado con brotes transmitidos por agua acaecidos en Eslovenia y en dos estados de Estados Unidos: Ohio e Idaho (Shah *et al.*, 2011).

La prevalencia más alta es en la carne de pollo, seguida de la carne de cerdo y la carne de res. A pesar de que la prevalencia de *Arcobacter* en carne de pollo es muy elevada a nivel mundial, este microorganismo es escasamente detectado en el contenido intestinal de los pollos. Por lo tanto, se asume que la presencia de *Arcobacter* spp. en aves de corral puede deberse a la contaminación de la piel de las aves o a través del procesamiento (Ho *et al.*, 2006 y Quintones *et al.*, 2007). Por otra parte, es capaz de sobrevivir a un tratamiento de escaldado a 52 °C durante tres minutos, causando contaminación cruzada dentro y entre los tanques de escaldado y en las etapas de procesamiento posteriores. Además, los mariscos son otra fuente potencial de contaminación por *Arcobacter*. Un estudio realizado a 84 muestras de crustáceos (mejillones, camarones, almejas y ostras), reveló que el 100% de las almejas y un 41.1% de mejillones contenían diferentes especies de *Arcobacter*, demostrando su prevalencia en productos crudos (Collado y Figueras, 2011).

La patogenicidad y los mecanismos de virulencia de esta especie no han sido estudiados a profundidad. Sin embargo, se sabe de la presencia de genes putativos de virulencia en su estructura genómica. Los genes putativos son homólogos a los genes asociados con la patogenicidad en otros organismos estrechamente relacionados (Levicán, 2013). Esto quiere decir que los genes putativos que presentan similar estructura a los genes de virulencia estudiados en otros microorganismos (como *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*) cumplen una función parecida o igual a los genes de virulencia en los microorganismos anteriormente mencionados.

Los genes putativos de virulencia detectados en *Arcobacter* son: *mviN*, *cj1349*, *ciaB*, *hecA*, *hecB*, *irgA*, *tlyA* y *pldA* (Karadas 2013). Su evaluación se realiza a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR, por sus siglas en inglés), en la cual los cebadores amplifican un segmento de ADN para observar mejor su presencia o ausencia, y el comportamiento de estos genes.

En la presente investigación se evaluó la presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter*, tomando en cuenta diferentes condiciones de crecimiento (temperaturas, medios de crecimiento y condiciones atmosféricas) para determinar su resistencia frente a diferentes condiciones y cómo se presentaron en las diferentes piezas de pollo muestreadas.

Los objetivos de esta investigación fueron:

- Evaluar el efecto de temperatura, condición atmosférica y medio de cultivo en la presencia de los genes putativos de virulencia en *Arcobacter*.
- Aislar especies de *Arcobacter* a partir de muestras de piezas de pollo adquiridas en ventas al por menor.
- Determinar la presencia de genes de virulencia en los aislados de pollo.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del ensayo.** El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular en el Centro de Investigación de Biomasa, del Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Arkansas, localizada en la ciudad Fayetteville, estado de Arkansas, Estados Unidos de Norteamérica.

### **Fase I. Efecto de temperatura, condición atmosférica y medio de cultivo en la presencia de los genes putativos de virulencia en *Arcobacter***

**Cepas bacterianas.** Se evaluaron las siguientes cepas microbianas: *A. butzleri* ATCC 49616, *A. butzleri* ATCC 49962, *A. cryaerophilus* NADC 5536, *A. butzleri* NADC 9133, *A. butzleri* NADC 5361, *A. cryaerophilus* NADC 4054 y *A. butzleri* NADC 5511. Todas las cepas anteriormente mencionadas fueron facilitadas por el laboratorio del Dr. Ricke y la Dra. O'Bryan del Centro de Seguridad Alimentaria y del Laboratorio de Microbiología, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Listado de las cepas de *Arcobacter* utilizadas para determinar los controles positivos, ubicadas en el Centro de Investigación de Biomasa.

Nombre de aislado	Fuente de aislamiento	Número designado de cepa
<i>Arcobacter butzleri</i>	Muestra de diarrea humana	ATCC 49616
<i>Arcobacter butzleri</i>	Muestra de diarrea humana	ATCC 49942
<i>Arcobacter butzleri</i>	Pavo <sup>∞</sup>	NADC 5361
<i>Arcobacter butzleri</i>	Pavo <sup>∞</sup>	NADC 9133
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	No listado	NADC 4054
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	No listado	NADC 5536

<sup>∞</sup>Muestras procedentes del experimento de Nannapaneni *et al.*, 2009.

**Crecimiento de cepas de *Arcobacter*.** Las seis cepas fueron extraídas de un congelador a -80 °C (las muestras estaban criogenizadas). Estas fueron descongeladas a temperatura ambiente dentro de la cabina de seguridad biológica. Luego, 100 µl fueron extraídos de cada una de las cepas microbianas con ayuda de la micropipeta y fueron sembrados en Agar Bolton (Cuadro 2) a 37 °C en condiciones microaeróbicas, con las siguientes condiciones de gases: 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub> (Ministerio de Salud de Argentina, 2001) y se dejaron en incubación durante 24 horas. Se extrajeron varias colonias de cada placa con el asa bacteriológica y luego fueron introducidas en tubos criogénicos con glicerol al 50% + Cerebro Corazón Infusión Agar, para obtener una colección propia. Seguidamente fueron almacenadas a -80 °C (criogenización) durante 18 horas. A partir de la colección, 100 µl fueron sembrados en placas de Agar Bolton con 5% de sangre defibrinada de caballo. Las placas fueron incubadas a 37 °C, durante 24 horas en condiciones microaeróbicas.

Cuadro 2. Formulación Caldo de Enriquecimiento Bolton.

<b>Formulación</b>	<b>Gramos/Litro (g/L)</b>
Carne peptona	10
Hidrolizado de albúmina	5
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio (NaCl <sub>2</sub> )	5
Ácido alfa-cetoglutárico	1
Piruvato de sodio	0.5
Metabisulfito sódico	0.5
Carbonato de sodio	0.6
Hemina	0.01
<b>Total</b>	<b>27.61</b>

pH: 7.4 ±0.2 @25 °C

Para obtener Agar Bolton, se añadieron 15 gramos de agar Alfa-Aesar por cada litro de solución (Oxoid Microbiology Products, 2015).

**Extracción de ADN genómico (gDNA) mediante el método de ebullición.** Se extrajo el gDNA de las seis cepas a través del método de ebullición. Las colonias de *Arcobacter* fueron suspendidas en 1 ml de agua estéril destilada en tubos Eppendorf. Luego, fueron llevadas a ebullición por 20 minutos en un baño de agua hirviendo. Los tubos fueron transferidos por 15 minutos a un congelador a -20 °C. Transcurrido este tiempo, los tubos fueron centrifugados en la centrífuga Heraeus Biofuge Fresco Refrigerating Centrifuge por cinco minutos a 1606 x *g* para sedimentar los restos celulares. Los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos Eppendorf y almacenados en un congelador a -20 °C.

**Confirmación del género *Arcobacter*.** En un tubo de microcentrífuga se agregaron los reactivos para la amplificación (Cuadro 3). Los cebadores usados fueron Arco I F (5'-AGA GAT TAG CCT GTA TTG TAT C – 3') el cual delimitó la región del gen a amplificar (F es forward en inglés) y Arco II R (5'- TAG CAT CCC CGC TTC GAA TGA – 3') (de Oliveira *et al.*, 2001) el cual delimitó inversamente la región a amplificar (R reverse inglés). Las muestras fueron llevadas al termociclador (Artik Cycler), programado de la siguiente manera: etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por cinco minutos, 40 ciclos de amplificación programados a 94 °C por 30 segundos de una segunda desnaturalización, hibridación a 52 °C por 30 segundos, reacción de extensión a 72 °C por 30 segundos. Finalmente, una extensión final a 72 °C por cinco minutos. Se preparó gel de agarosa (1.5%) para la electroforesis, la cual fue llevada a cabo a una velocidad de 50 V (voltios) por dos horas. Las cepas con 1223 pb (pares de base) fueron confirmadas como *Arcobacter* (Doudah *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Formulación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la confirmación del género *Arcobacter*.

Componentes	Volumen
HotStart Taq 2x Master Mix (Biolabs)	12.5
Arco I F-Cebador 10Mm	0.5
Arco II R-Cebador 10Mm	0.5
gDNA	2
H <sub>2</sub> O estéril (doblemente destilada)	9.5
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>

**Nivel de especiación para *Arcobacter*.** Confirmado el género *Arcobacter*, se evaluó el nivel de especiación para *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*. En tubos de microcentrífuga se agregaron los reactivos necesarios para la amplificación (Cuadros 4 y 5). Se usó el mismo

programa PCR. Luego, se prepararon geles de agarosa (1.5%) para correr la electroforesis, a 50 V durante dos horas. Los pares de bases considerados para las especies fueron: *A. butzleri* 2061 pb y *A. cryaerophilus* 395 pb (Fallas-Padilla *et al.*, 2015).

Cuadro 4. Formulación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la confirmación de la especie *A. butzleri*.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen</b>
HotStart Taq 2x Master Mix (Biolabs)	12.5
Arco F- Cebador 10 $\mu$ M	0.5
But R- Cebador 10 $\mu$ M	0.5
gDNA	2
H <sub>2</sub> O estéril (doblemente destilada)	9.5
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>

Cuadro 5. Formulación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la confirmación de la especie *A. cryaerophilus*.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
HotStart Taq 2x Master Mix (Biolabs)	12.5
Cri F- Cebador 10 $\mu$ M	0.5
Cri R- Cebador 10 $\mu$ M	0.1
gDNA	2
H <sub>2</sub> O estéril (doblemente destilada)	9.5
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>

**Siembra de cepas en diferentes condiciones de crecimiento.** Una vez realizada la especiación, las cepas fueron sembradas en diferentes condiciones de crecimiento (Cuadro 6), tomando en cuenta los siguientes factores:

- Temperatura: 15, 25, 30, 37 y 42 °C.
- Condiciones atmosféricas: microaeróbico y aeróbico.
- Medios de crecimiento: Agar Bolton Sangre (con 5% sangre de caballo desfibrinada) y Agar Soya Trypticasa (con 5% sangre desfibrinada de caballo (Cuadro 7).

Todas fueron incubadas durante 24 horas. Para las placas expuestas a condiciones microaeróbicas, se usó una mezcla de gases de 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub> (Ministerio de Salud de Argentina, 2001), la cual fue obtenida a partir de tanques.

Cuadro 6. Condiciones de crecimiento a las que fueron sometidas las cepas de *Arcobacter*.

Temperaturas (°C)	Ambiente microaeróbico		Ambiente aeróbico	
	Agar Bolton Sangre	Agar Soya Trypticasa Sangre	Agar Bolton Sangre	Agar Soya Trypticasa Sangre
15	M15B	M15T	A15B	A15T
25	M25B	M25T	A25B	A25T
30	M30B	M30T	A30B	A30T
37	M37B	M37T	A37B	A37T
42	M42B	M42T	A42B	A42T

Cuadro 7. Formulación de Agar Soya Trypticasa.

Formulación	Gramos/Litro (g/L)
Caseína peptona (pancreática)	15
Soya peptona (papaínica)	5
Cloruro de sodio (NaCl <sub>2</sub> )	5
Agar	15
<b>Total</b>	<b>40</b>

pH: 7.4 ±0.2 @25 °C (Sigma-Aldrich, 2015)

**Extracción de ADN genómico (gDNA) a través de método de ebullición.** Se siguieron los pasos anteriormente mencionados para extraer el gDNA de cada una de las placas sembradas.

**Presencia de los genes putativos de virulencia.** Se evaluaron ocho genes de virulencia presentes en *Arcobacter*, los cuales fueron: *mviN*, *cj1349*, *ciaB*, *hecA*, *hecB*, *irgA*, *tlyA* y *pldA*. En tubos de microcentrífuga se agregaron los reactivos necesarios para la amplificación (Cuadro 8). Los cebadores usados fueron: *mviN*-F y *mviN*-R, *cj1349*-F y *cj1349*-R, *ciaB*-F y *ciaB*-R, *hecA*-F y *hecA*-R, *hecB*-F y *hecB*-R, *irgA*-F e *irgA*-R, *tlyA*-F y *tlyA*-R, y *pldA*-F y *pldA*-R.

Cuadro 8. Formulación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la presencia de los genes de virulencia de *Arcobacter*.

Componentes	Volumen (µl)
HotStart Taq 2x Master Mix (Biolabs)	12.5
<i>mviN</i> -F- Cebador 10µM <sup>∞</sup>	0.5
<i>mviN</i> -R- Cebador 10µM <sup>∞</sup>	0.5
gDNA	2
H <sub>2</sub> O estéril (doblemente destilada)	9.5
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>

<sup>∞</sup>Cambiar los cebadores para cada gen de virulencia específico.

Se usó el mismo programa PCR. Luego, se prepararon geles de agarosa (1.5%) para correr la electroforesis, a una velocidad de 50 V durante dos horas. Para observar la presencia de los genes de virulencia, se evaluaron los pares de base encontrados en los geles correspondientes a cada cepa evaluada a diferentes condiciones de crecimiento (Cuadro 9).

Cuadro 9. Pares de base (pb) para los genes de virulencia de *Arcobacter*.

Gen	Par de cebadores	Secuencia de cebadores (5'-3')	Tamaño de amplicón (pb)
<i>ciaB</i>	<i>cia</i> -F <i>cia</i> -R	TGGGCAGATGTGGATAGAGCTTGGA TAGTGCTGGTCGTCACATAAAG	284
<i>cj1349</i>	<i>cj1349</i> -F <i>cj1349</i> -R	CCAGAAATCACTGGCTTTTGAG GGGCATAAGTTAGATGAGGTTCC	659
<i>irgA</i>	<i>irgA</i> -F <i>IrgA</i> -R	TGCAGAGGATACTTGGAGCGTAACT GTATAACCCCATTTGATGAGGAGCA	437
<i>hecA</i>	<i>hecA</i> -F <i>hecA</i> -R	GTGGAAGTACAACGATAGCAGGCTC GTCTGTTTTAGTTGCTCTGCACTC	537
<i>hecB</i>	<i>hecB</i> -F <i>HecB</i> -R	CTAAACTCTACAAATCGTGC CTTTTGAGTGTTGACCTC	528
<i>mviN</i>	<i>mviN</i> -F <i>mviN</i> -R	TGCACTTGTTGCAAAACGGTG TGCTGATGGAGCTTTTACGCAAGC	294
<i>pldA</i>	<i>pldA</i> -F <i>pldA</i> -R	TTGACGAGACAATAAGTGCAGC CGTCTTTATCTTTGCTTTCAGGGA	293
<i>tlyA</i>	<i>tlyA</i> -F <i>tlyA</i> -R	CAAAGTCGAAACAAAGCGACTG TCCACCAGTGCTACTTCCTATA	230

Fuente: Doudiah *et al.*, 2012 (adaptado por el autor).

## Fase II. Aislamiento de las especies de *Arcobacter* a partir de las muestras de piezas de pollo adquiridas en ventas al por menor

**Compra de piezas de pollo.** Las piezas de pollo fueron compradas en el supermercado Walmart, Fayetteville, Arkansas, Estados Unidos. Se seleccionó esta cadena de supermercados debido a que no solamente es la más popular en esta ciudad, sino que es la más popular en Estados Unidos, y porque era la más cercana al Centro de Investigación de Biomasa. Se compraron ocho productos derivados de pollo: pechuga con piel, pechuga sin piel, ala con piel, hígado, contramuslo sin piel, contramuslo con piel, muslo con piel y muslo de ala con piel. Las piezas fueron compradas en paquetes, no por pollo entero.

**Preparación de muestras de pollo.** La preparación de las muestras de pollo se hizo en dos partes: una al día siguiente de ser compradas y otra luego de dos semanas. Al día siguiente de ser compradas, se pusieron las muestras de pollo de 10 g cada una, en 90 ml de 0.1% agua peptonada en bolsas para el homogenizador peristáltico. Después, éstas fueron introducidas al homogenizador peristáltico por 60 segundos. Luego, 1 ml del

exudado de pollo de cada bolsa fue extraído e introducido en tubos con 9 ml de Caldo de Enriquecimiento Bolton. Dos semanas después, se repitió el proceso pero en Caldo Selectivo *Arcobacter* (Cuadro 10) con Cefoperazona, Anfotericina B y Teicoplanina (CAT) (Cuadro 11). Todos los tubos fueron incubados a 25 °C por 48 horas en condiciones aeróbicas.

Cuadro 10. Formulación Caldo Selectivo *Arcobacter*.

<b>Formulación</b>	<b>Gramos/Litro (g/L)</b>
Peptona	18
Cloruro de sodio (NaCl <sub>2</sub> )	5
Extracto de levadura	1
<b>Total</b>	<b>24</b>

pH: 7.2 ±0.2 @25 °C (Himedia Laboratories, 2015)

Cuadro 11. Formulación de antibióticos CAT, agregados después de la preparación y el autoclavado del caldo selectivo *Arcobacter*, rehidratados en 2 ml de agua estéril destilada.

<b>Compuesto</b>	<b>Miligramos (mg)</b>
Cefoperazona	4
Teicoplanina	2
Anfotericina B	5
<b>Total</b>	<b>11</b>

∞ Los compuestos mencionados están basados para una dilución de 500 ml (Himedia Laboratories, 2015).

Cuadro 12. Número de piezas de pollo usadas en el experimento.

Piezas de pollo	N° de muestras analizadas
Ala con piel	4
Contramuslo con piel	5
Contramuslo sin piel	4
Muslo con piel	5
Hígado	3
Pechuga con piel	5
Pechuga sin piel	6
Muslo de ala con piel	3

**Sembrado en placas.** Luego del periodo de incubación, 100 µl de cada tubo fueron extraídos y esparcidos en placas de Agar Bolton Sangre. Todas las placas fueron incubadas a 25 °C durante 5 días.

**Confirmación de la presencia de bacterias Gram negativas.** Después de los cinco días, se realizó la prueba de KOH 3% (hidróxido de potasio) para confirmar la presencia de bacterias Gram negativas en las placas sembradas.

**Extracción de ADN genómico (gDNA) a través de método de ebullición.** El método usado fue el mismo anteriormente explicado en la Fase I.

**Confirmación de género *Arcobacter*.** El método y las concentraciones usadas fueron los mismos, anteriormente explicados en la Fase I (Cuadro 3).

**Nivel de especiación para *Arcobacter*.** El método y las concentraciones usadas fueron las mismas, anteriormente explicadas en la Fase I (Cuadros 4 y 5), se tomaron en cuenta las siguientes especies y pares de bases: *A. butzleri* 2061 pb, *A. cryaerophilus* 395 pb, *A. skirrowii* 198 pb, *A. thereius* 1590 pb y *A. cibarius* 1125 pb (Fallas-Padilla *et al.*, 2015).

### **Fase III. Evaluación de la presencia de los genes de virulencia de *Arcobacter* en los aislados de pollo**

**Siembra de cepas en diferentes condiciones de crecimiento.** Las condiciones a las que fueron sembradas fueron las mismas que las indicadas en la Fase I (Cuadro 7).

**Extracción de ADN genómico (gDNA) a través de método de ebullición.** El método usado fue el mismo anteriormente explicado en la Fase I.

**Presencia de los genes de virulencia.** El método y las concentraciones usadas fueron las mismas, anteriormente explicadas en la Fase I (Cuadros 8 y 9).

**Diseño experimental.** Para el análisis estadístico, se realizó una prueba de chi-cuadrado para analizar la presencia de los genes putativos de virulencia en las cepas de *Arcobacter* brindadas por la Universidad de Arkansas, una prueba de chi-cuadrado para evaluar si hubo diferencias entre los ambientes por cada muestra de pollo y un chi-cuadrado para evaluar la presencia de los ocho genes putativos de virulencia de las especies de *Arcobacter* encontradas en los aislados de pollo. El valor de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo en cada prueba de chi-cuadrado.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Confirmación del género *Arcobacter* y de las especies presentes en las cepas microbianas.** Las seis cepas fueron positivas al género *Arcobacter*, ya que presentaron un tamaño de banda de amplificación de 1223 pb, lo cual es igual a lo reportado en la literatura para este género. En el nivel de especiación, cuatro de las seis cepas fueron confirmadas como *A. butzleri*: ATCC 49616, ATCC 49942, NADC 5361 y NADC 9133 (Figura 1) ya que presentaron un tamaño de banda de amplificación de 2061 pb; tal y como lo indicaba la información de los laboratorios (Fallas *et al.*, 2014). Las otras dos cepas no coincidían con *A. cryaerophilus*, ya que no se observó amplificación de 395 pb reportados para esta especie cuando se llevó a cabo la electroforesis, por el contrario, el número de pares de base era mucho mayor. Por lo tanto, las cepas NADC 4054 y NADC 5536 fueron descartadas del estudio.

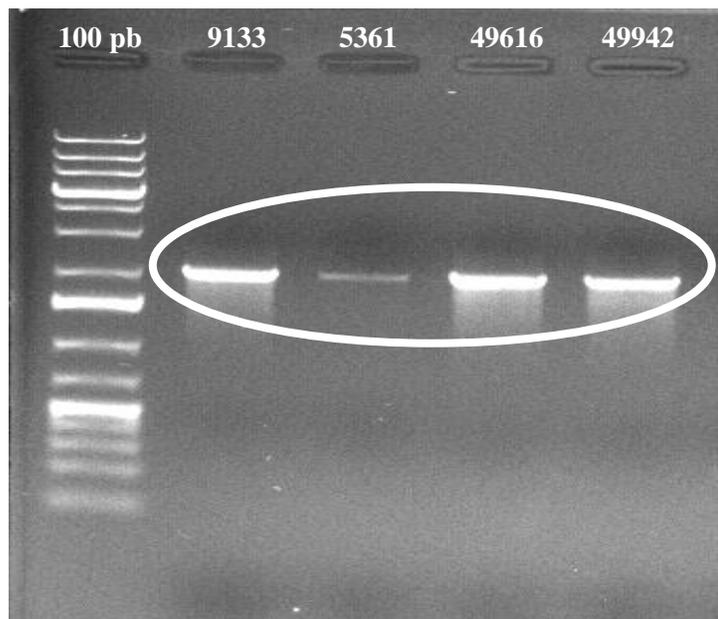


Figura 1. Gel de electroforesis de la confirmación de *A. butzleri* en las cepas microbianas, con una amplificación de banda de 2061 pb.

**Presencia de los genes de virulencia en las cepas microbianas de *A. butzleri*.** La presencia de los ocho genes de virulencia (*mviN*, *cj1349*, *ciaB*, *hecA*, *hecB*, *irgA*, *tlyA* y *pldA*) fueron encontrados en las cuatro cepas microbianas. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la presencia de estos genes de virulencia a diferentes

condiciones de crecimiento (temperatura: 15, 25, 30, 37 y 42 °C; medios de crecimiento: Agar Bolton Sangre y Agar Soya Trypticosa Sangre; y condiciones atmosféricas: microaerobismo y aerobismo), ya que se obtuvo un valor  $P = 1$ .

Los genes de virulencia de *Arcobacter* son putativos debido a que tienen estructura de aminoácidos y funciones similares a otras estructuras genómicas ya estudiadas. Cada gen putativo presente en las cepas de *Arcobacter* tiene diferente función.

El gen *mviN* (Figura 6) traduce la proteína MviN, la cual es la encargada de realizar la biosíntesis de peptidoglicano, homóloga función cumple en la bacteria *E. coli*. El gen *cj1349* (Figura 4) codifica proteínas que ligan la fibronectina, las cuales promueven la unión de las bacterias a las células intestinales (Karadas *et al.*, 2013). El gen *ciaB* (Figura 7) traduce el antígeno invasor B, el cual contribuye a la invasión de la célula huésped.

El gen *hecA* (Figura 5) traduce a la proteína HecA, la cual es miembro de la familia de la hemaglutinina filamentosa, está implicada en el apego, la agregación y la muerte celular epidérmica, función homóloga cumple en *Erwinia chrysanthemi* (Karadas *et al.*, 2013). El gen *hecB* (Figura 9) codifica proteínas para la activación de la hemolisina (Doudah *et al.*, 2011). El gen *irgA* (Figura 3) traduce una proteína en la membrana externa, la cual regula la composición del hierro, que es requerido para establecer y mantener las infecciones; homóloga función cumple en *E. coli* (Karadas *et al.*, 2013). El gen *tlyA* (Figura 8) traduce la hemolisina, que hace lisis a los eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Además, produce poros en la membrana citoplasmática (Rahman *et al.*, 2010 y Bakás *et al.*, 2013).

El gen *pldA* (Figura 2) traduce la proteína PdlA, la cual está implicada en generar pequeños agujeros en la membrana externa de la célula, para permitir el escape de las bacteriocinas. Es importante mencionar que esta proteína se encuentra afuera de la membrana y requiere de calcio para activar la fosfolipasa A. Esta proteína tiene un rol importante en la lisis de los eritrocitos (Grant *et al.*, 1997).

Anteriormente, el genoma de ATCC 49616 fue secuenciado por Miller *et al.* (2007), y se confirmó la presencia de los ocho genes putativos de virulencia, en sus óptimas condiciones de crecimiento (37 °C, bajo un ambiente de microaerobismo). Las demás condiciones de crecimiento fueron probadas en ATCC 49616 y se encontró la presencia de todos los genes putativos de virulencia en todos los ambientes evaluados.

Las otras tres cepas fueron evaluadas bajo las mismas condiciones, pero sin información previa acerca de cómo se presentarían los genes de virulencia en ellas. Para estos casos, todos los ambientes de crecimiento tuvieron presencia de todos los genes de virulencia. Tener cuatro cepas positivas para todos los ambientes con todos los genes de virulencia aumenta el número de controles positivos y su elegibilidad para diferentes proyectos.

Algunas bandas de presencia de los genes de virulencia se mostraron más nítidas y fuertes debido a la concentración de gDNA cuando se realizó el método de ebullición: a mayor cantidad de colonias recogidas con el asa bacteriológica, más nitidez de los genes en los geles de electroforesis.

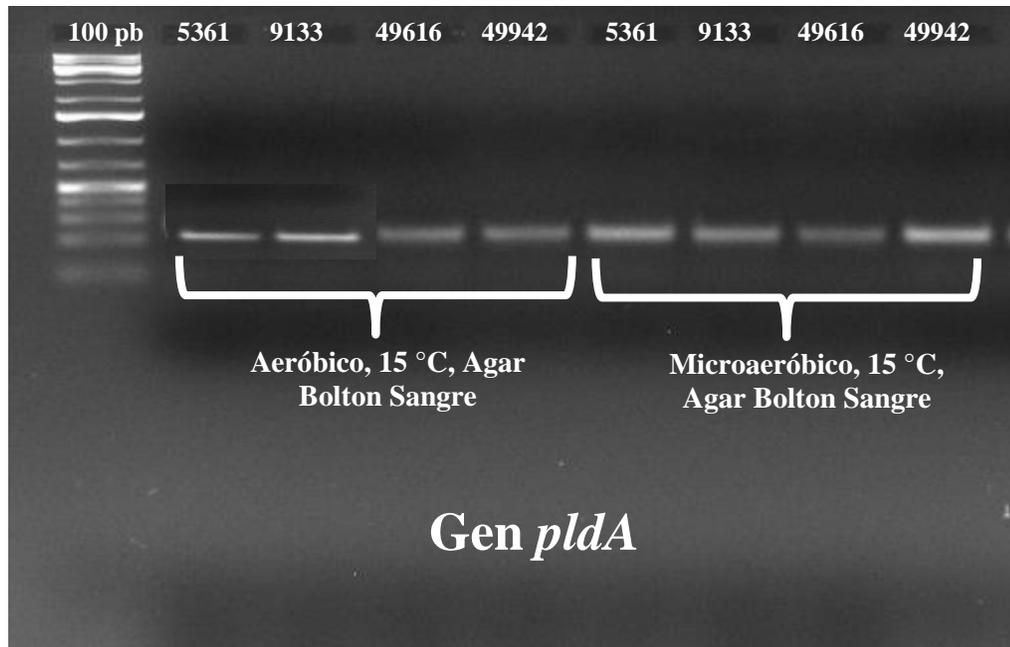


Figura 2. Gel de electroforesis de la presencia del gen *pldA* en las cepas microbianas en Agar Bolton Sangre a 15 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 293 pb.

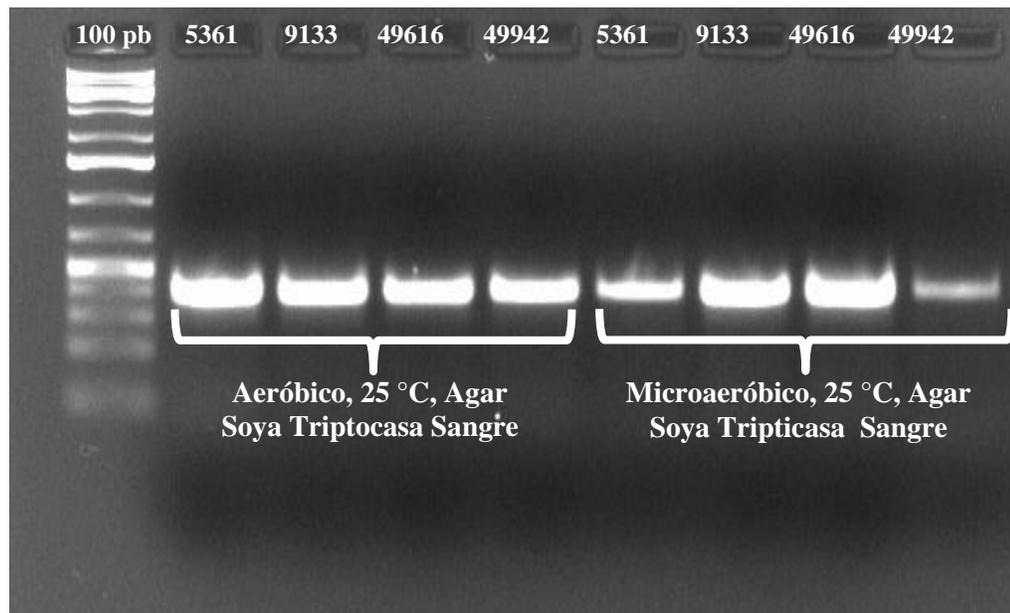


Figura 3. Gel de electroforesis de la presencia del gen *irgA* en las cepas microbianas en Agar Soya Trypticasa Sangre a 25 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 437 pb.

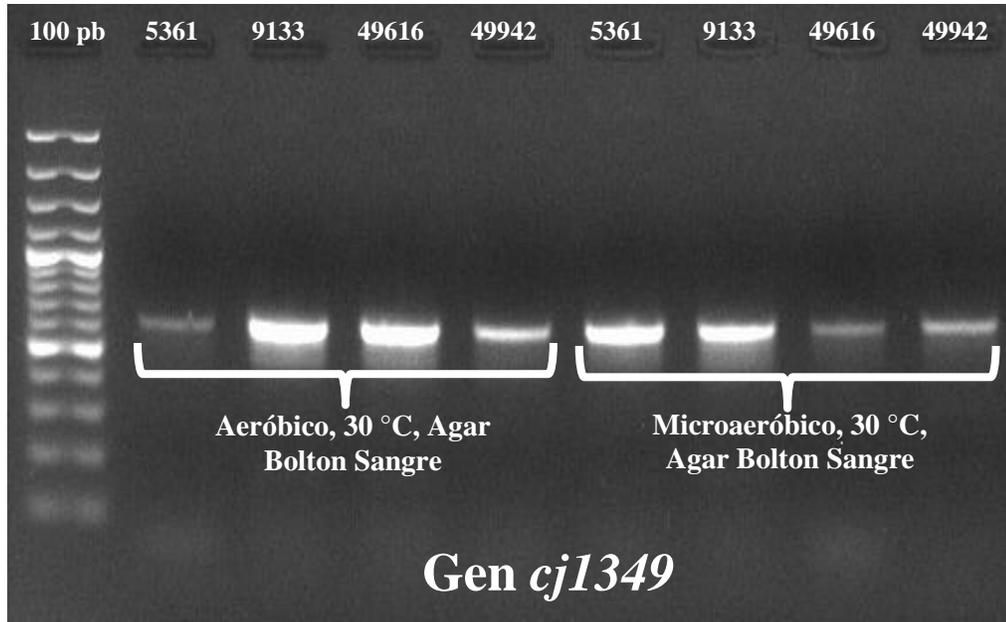


Figura 4. Gel de electroforesis de la presencia del gen *cj1349* en las cepas microbianas en Agar Bolton Sangre 30 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 659 pb.

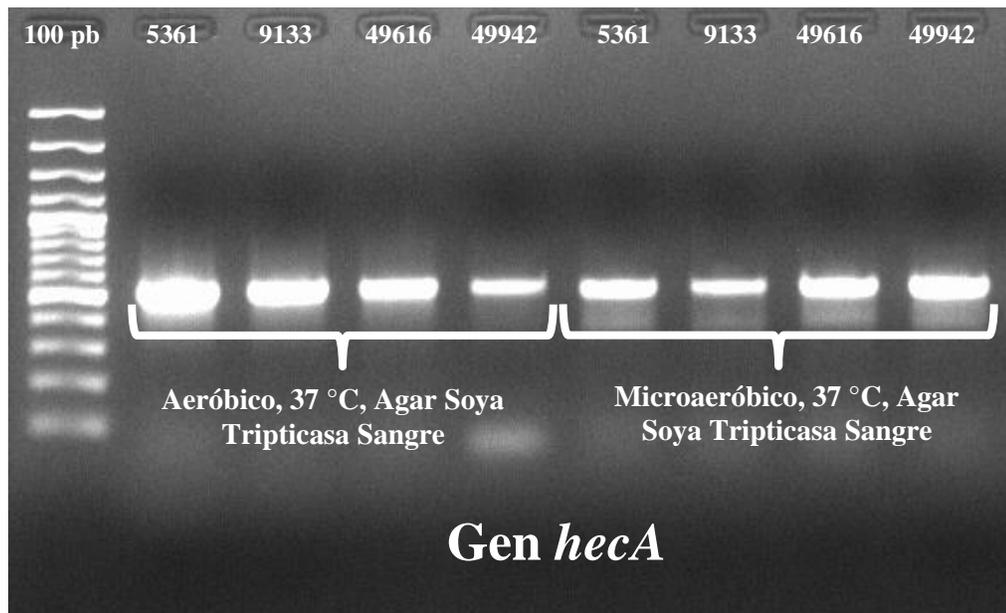


Figura 5. Gel de electroforesis de la presencia del gen *hecA* en las cepas microbianas en Agar Soya Trypticosa sangre 37 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 537 pb.

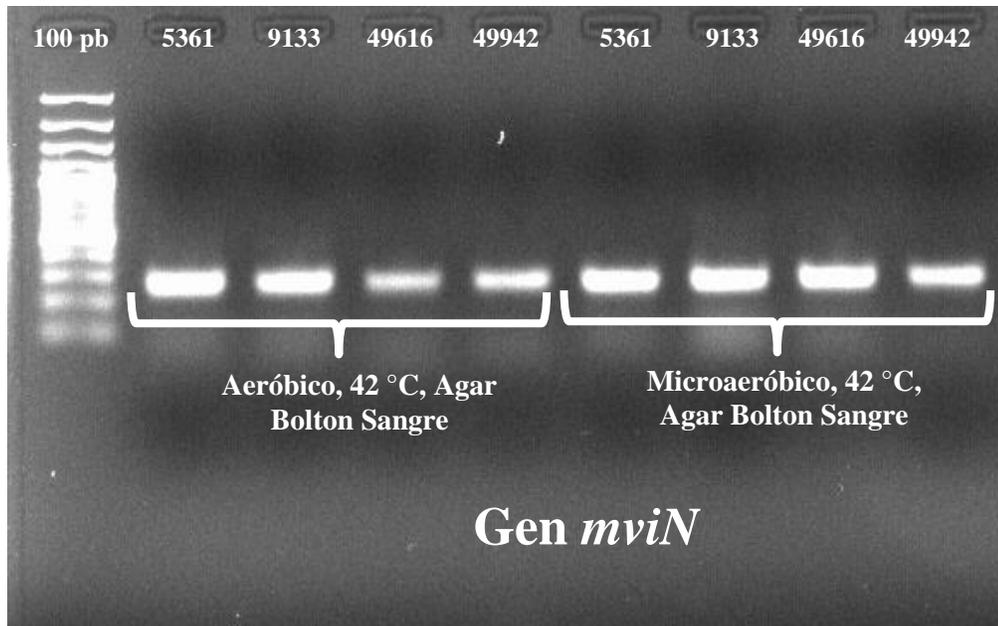


Figura 6. Gel de electroforesis de la presencia del gen *mviN* en las cepas microbianas en Agar Bolton Sangre 42 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 294 pb.

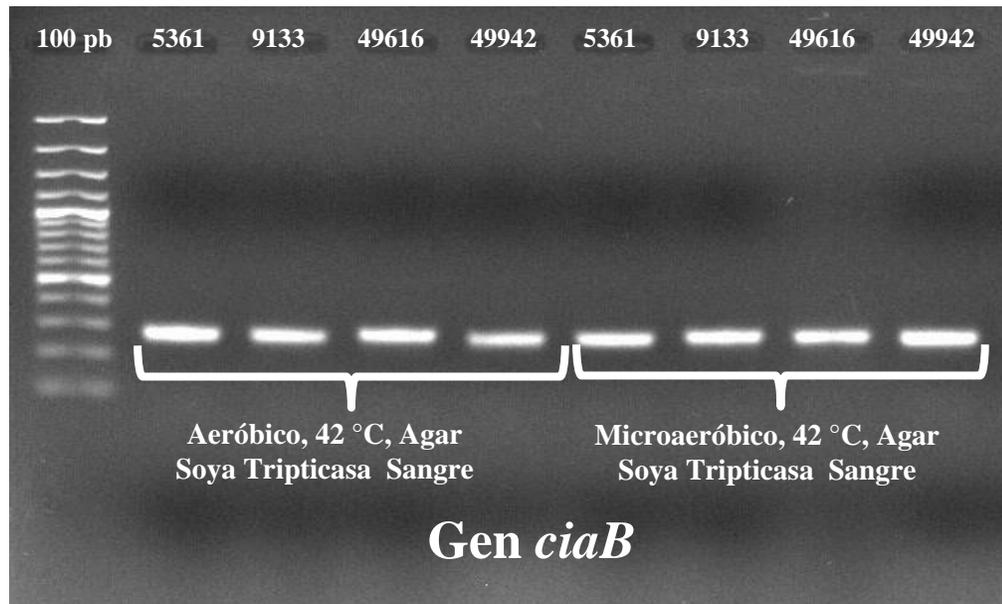


Figura 7. Gel de electroforesis de la presencia del gen *ciaB* en las cepas microbianas en Agar Soya Trypticosa Sangre 42 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 284 pb.

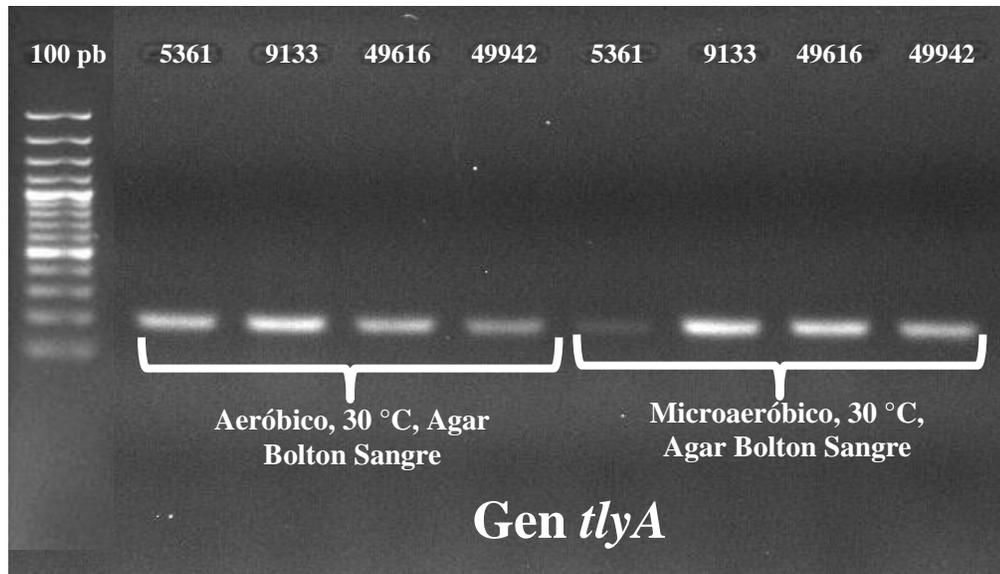


Figura 8. Gel de electroforesis de la presencia del gen *tlyA* en las cepas microbianas en Agar Bolton Sangre 30 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 230 pb.

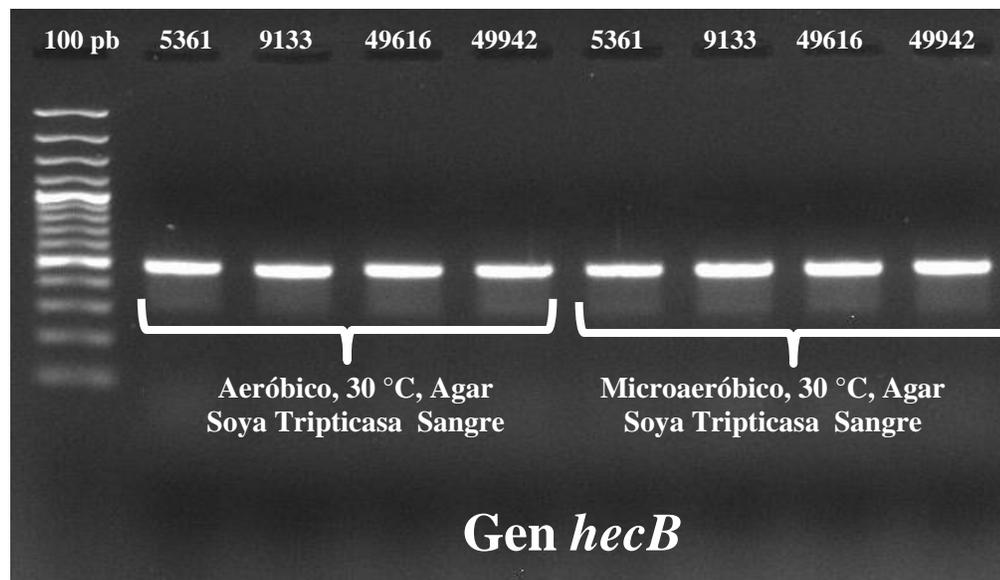


Figura 9. Gel de electroforesis de la presencia del gen *hecB* en las cepas microbianas en Agar Soya Trypticosa Sangre 30 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, con una amplificación de banda de 528 pb.

**Aislados de pollo positivos a *Arcobacter*.** Las piezas de pollo en Caldo de Enriquecimiento Bolton que tuvieron presencia de *Arcobacter* fueron el hígado, el contramuslo con piel y la pechuga de pollo con piel; mientras que las piezas de pollo en Caldo Selectivo *Arcobacter* con antibióticos CAT, con presencia de este microorganismo fueron: muslo de ala con piel, pechuga con piel y ala con piel. Las especies de *Arcobacter* identificadas en las muestras de pollo anteriormente mencionadas fueron *A. cryaerophyllus*, *A. cibarius* y *A. skirrowii* (Cuadro 13).

Cuadro 13. Identificación de las especies de *Arcobacter* a través de PCR en las muestras de pollo donde fue encontrado el microorganismo.

Pieza de pollo	N° muestras analizadas	N° muestras positivas a <i>Arcobacter</i>	Especies de <i>Arcobacter</i> aisladas		
			<i>A.</i> <i>cibarius</i>	<i>A.</i> <i>cryaerophyllus</i>	<i>A.</i> <i>skirrowii</i>
Hígado	3	1	+	+	+
Contramuslo con piel	5	1	+	-	-
Pechuga con piel	5	2	+	-	+
Ala con piel	4	1	-	-	+
Muslo de ala con piel	7	1	-	-	+

Es común ver que en una misma muestra hayan colonias de diferentes especies, algo reflejado también en las investigaciones de Rahimi *et al.* (2012) y Kabeya *et al.* (2004). Además, los estudios de Fernández *et al.* (2014), demostraron la presencia de dos especies en una misma muestra, *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* en tres muestras de carne de pollo, con una prevalencia de 2.4%.

Las muestras de pollo que resultaron positivas a *Arcobacter* fueron: el hígado, la pechuga con piel, el ala con piel, el muslo con piel, el contramuslo con piel y el muslo de ala con piel. En dos de las muestras de pollo del estudio fueron encontradas más de una especie de *Arcobacter*. En el caso del hígado, se encontraron tres especies: *A. cibarius*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*. El hígado es un importante productor de proteínas relacionadas con la coagulación de la sangre (Wissman, 2007), como es el caso del fibrinógeno, del cual, por acción de la coagulasa en presencia de protombina, se produce la fibrina. La fibrina contribuye a la coagulación del plasma. También se produce la fibronectina, la cual es sintetizada por los hepatocitos (Medina, 1996).

La afinidad de estas tres especies de *Arcobacter* con el hígado se debe a su alto potencial de adhesión a las células sanguíneas y a las proteínas relacionadas con la traducción y formación de estas. Estas tres especies son catalogadas como adhesivos bacterianos, debido a que reconocen y se entrelazan a las matrices extracelulares de sus hospederos (células sanguíneas: eritrocitos, plaquetas y plasma) y a las moléculas de superficie

celular, tales como fibronectina, fibrina, fibrinógeno, elastina, vitronectina, heparina, entre otros. Esta es uno de las etapas iniciales de la infección. Esto sucede debido a la presencia de genes putativos específicos de virulencia (*tlyA*, *pldA*, *hecA*, *hecB*). Las especies anteriormente mencionadas producen una lisis de las células sanguíneas, eluden las barreras epiteliales y colonizan al hospedero. Asimismo, interrumpen la producción de la fibrina, al alterar el proceso de la fibronectina, haciendo que esta no se pueda producir y que el proceso de coagulación de la sangre sea ineficiente (Ali, 2013).

En el caso de la pechuga con piel se encontraron dos especies: *A. cibarius* y *A. skirrowii*. La presencia de estos dos microorganismos en esta pieza de pollo tiene relación a la alta irrigación sanguínea que recibe, en comparación al ala con piel (*A. skirrowii*), el contramuslo con piel (*A. cibarius*) y el muslo de ala con piel (*A. skirrowii*), los cuales presentan menor irrigación sanguínea en comparación con el hígado y la pechuga. Esto se ve reflejado en la adhesión a los sustratos celulares, la cual se hace menos eficiente al no brindar condiciones óptimas para el desarrollo, puesto que todas estas necesitan de la presencia de sangre con fibronectina para poder adherirse y desarrollarse (Doudiah *et al.*, 2011).

En las muestras analizadas en el experimento, se halló una prevalencia de 33.33% de *Arcobacter* recuperado del hígado de pollo, examinado en tres muestras y obteniendo una muestra positiva. Mientras que un estudio realizado por Abdelrahman *et al.* (2012), examinó 48 muestras de hígado de pollo, obteniendo 32 muestras positivas para *Arcobacter* con una prevalencia de 72.7%. Para el caso del ala con piel, Ibrahim *et al.* 2003 realizó estudios similares pero con alas con piel frescas y congeladas. Fueron examinadas dos piezas de alas con piel frescas, de las dos piezas se aisló *Arcobacter*, con una prevalencia del 100%. Para el caso de las alas con piel congeladas, se evaluaron nueve muestras, de las cuales cuatro resultaron positivas a *Arcobacter*, con una prevalencia de 44.4%. En el experimento realizado, de las cuatro muestras de ala con piel examinadas, una salió positiva a *Arcobacter*, evidenciando una prevalencia de 25% (Cuadro 14).

Cuadro 14. Prevalencia de *Arcobacter* en las diferentes piezas de pollo positivas para el estudio.

Pieza de pollo	N° de muestras analizadas	N° de muestras positivas a <i>Arcobacter</i>	Prevalencia (%)
Hígado	3	1	33.33
Contramuslo con piel	5	1	20.00
Pechuga con piel	5	2	40.00
Ala con piel	4	1	25.00
Muslo de ala con piel	7	1	14.29

Entender la prevalencia de *Arcobacter* en las piezas de pollo analizadas permite obtener una visión de cómo este microorganismo está presente en diferentes muestras de pollo, comparar resultados de prevalencia con los de otros autores e inferir el impacto que puede tener en los organismos de los seres humanos al consumirlas. En el caso de las muestras analizadas en el estudio, la prevalencia de *Arcobacter* fue baja, pero no significa que no sea riesgoso para la salud y no se descarta que se desate en algún momento una epidemia entre la población.

El aporte del Cuadro 14 es importante, porque no hay estudios previos que indiquen la prevalencia de este microorganismo en las piezas de pollo analizadas, a excepción del hígado, que sí ha sido estudiado por otros autores. Por otro lado, el conocer la prevalencia contribuye a tomar medidas de control más estrictas en los mataderos y durante el procesamiento de la carne de pollo. Esto debido a que en teoría la presencia de este microorganismo en estas piezas no debería ser baja, por el contrario, no debería existir presencia de estos. Los datos presentados conllevan a hacer un análisis más minucioso de cómo se está manejando la producción y si el procesamiento y sus medidas de control de la inocuidad y la calidad son las más adecuadas.

**Presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en las muestras de pollo positivas.** Los estudios de Doudah *et al.* (2011), demostraron la presencia del gen *cj1349*, lo cual no se pudo demostrar en este estudio. La razón de la ausencia de este gen se debió a que este codifica proteínas de la membrana externa que facilitan el contacto célula a célula con las células epiteliales intestinales por la adhesión a fibronectina (Doudah *et al.*, 2011), por lo tanto, para que se dé su presencia, debe existir fibronectina en la sangre. Sin embargo, el tiempo de vida media de la fibronectina es de 24 a 72 horas, luego es eliminada de la circulación (Lucena *et al.*, 2007). Las muestras de pollo en el actual

experimento fueron procesadas luego de las 72 horas, por lo tanto esta proteína no se mantuvo luego de este periodo en la sangre de las muestras de pollo. Por el contrario, perdió sus propiedades y, al no tener el gen el sustrato base para actuar, no apareció.

La presencia del gen *irgA* en todas las muestras de pollo positivas a *Arcobacter* hace referencia a la capacidad que le brinda este gen a las especies de *Arcobacter* de poder importar hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ). El hierro es esencial para el crecimiento, la supervivencia y la virulencia de microorganismos (Del Castillo-Rueda y Khosravi-Shahi, 2010). La disponibilidad del hierro en la sangre es limitada, y más aún cuando las células que son usadas como hospederos usan como mecanismo de defensa la producción y secreción de lactoferrinas. Las lactoferrinas entran en competencia con el patógeno debido a que les restringen la captación de hierro. De esta manera, el patógeno desarrolla sistemas de captación y asimilación de hierro, para evitar entrar en la fase de muerte (Noinaj *et al.*, 2010).

La energía necesaria para la obtención de hierro a partir del sustrato extracelular hacia el interior de la célula hospedera es proporcionada a través de un sistema de transducción de energía de la proteína TonB. La proteína TonB transporta energía de la fuerza motriz de los protones de la membrana interna a los receptores de la membrana externa. De esta manera la fuerza de importación de hierro generada por la el patógeno es más fuerte que la fuerza del mecanismo de defensa de la célula hospedera (Naikare *et al.*, 2013). La presencia del gen *irgA* demuestra la capacidad de las especies de *Arcobacter* de iniciar la colonización de los hospederos y del requerimiento de hierro para esta acción.

La presencia del gen *tlyA* está directamente ligado a la presencia del gen *irgA*, debido a que el primero necesita un ambiente con condiciones de hierro, el cual es proveído por la acción del segundo. El gen *tlyA* está relacionado a la lisis de los eritrocitos en la sangre (Girbau *et al.*, 2015) y es un formador de poros en la membrana citoplasmática de la célula hospedera. Una vez establecido en condiciones favorables, el gen *tlyA* se desarrolla y forma poros en la membrana de la célula hospedera (Martino *et al.*, 2001). En el experimento se puede apreciar que ambos genes aparecen en todas las piezas de pollo, corroborando las afirmaciones anteriores y dejando claro que un gen es dependiente de otro: *tlyA* depende de *irgA*.

La presencia del gen *pldA* se dio en casi todas las muestras de pollo, exceptuando las alas con piel. La presencia de este gen está ligada a la presencia del gen *tlyA*, debido a que *pldA* permite el escape de bacteriocinas, las cuales son toxinas proteicas que son sintetizadas con el fin de inhibir el crecimiento de otras bacterias o cepas similares. Las bacteriocinas hacen su escape a través de los poros generados en la membrana citoplasmática de la célula hospedera por el gen *tlyA*, al mismo tiempo que el gen *pldA* genera agujeros en la membrana citoplasmática de la célula hospedera. Además, el gen *pldA* traduce la fosfolipasa A, la cual está relacionada a la lisis de los eritrocitos. Para activar la acción de la fosfolipasa A, es necesaria la presencia de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el medio. Una cantidad excesiva de iones  $\text{Ca}^{2+}$  aumentará la actividad hemolítica de la fosfolipasa A (Grant *et al.*, 1997).

Se detectó presencia del gen *mviN* en tres muestras de pollo: el hígado, el contramuslo con piel y la pechuga con piel. Este gen traduce la proteína MviN, que según estudios recientes es la lípido II flipasa. Esta proteína está directamente involucrada en el transporte transmembrana de precursores de peptidoglicano a través de la membrana interna. El objetivo de esta proteína es asegurar la resistencia de *Arcobacter* ante los cambios osmóticos constantes generados por el medio y el mecanismo de defensa de la célula hospedera (Inoue *et al.*, 2008). Además, la traducción de la proteína está relacionada indirectamente con la síntesis de peptidoglicano en la célula hospedera, debido a que usa la cadena de isoprenoides (componente del lípido II flipasa), creando nuevos sitios de crecimiento celular y provocando la lisis celular (Fay y Dworkin 2009).

La presencia de los genes *hecA* y *hecB* se dio en el hígado, el contramuslo con piel y la pechuga con piel. La presencia de uno está relacionado con la presencia del otro, pues el gen *hecB* ayuda a la acción del gen *hecA*. Ambos traducen las proteínas HecB y HecA, respectivamente. El gen *hecA* es miembro de la familia hemaglutinina filamentosa (Doudah *et al.*, 2012). La hemaglutinina filamentosa es una familia de proteínas que está asociada a la superficie bacteriana y permite la adhesión de *Arcobacter* a los fagocitos.

Adicionalmente, esta familia de proteínas puede modular la inmunidad de la célula hospedera al influir en la presencia de las citosinas proinflamatorias en las células epiteliales y los macrófagos (Julio y Cotter 2005). Además, *hecA* es considerado como un miembro de las adhesinas, el cual tiene un rol importante en el apego, agregación y muerte celular epidérmica.

La proteína HecB permite la codificación de los transportadores TpsB funcional, los cuales ayudan a la secreción de la proteína HecA (Rojas *et al.*, 2002). Los transportadores TpsB funcional son proteínas traducidas por el gen *tpsB*, estas proteínas están implicadas en la secreción de la citotoxina hemolisina A. La hemolisina A provoca lisis celular al participar en la formación de poros en la membrana de la célula hospedera, permitiéndole así iniciar el proceso de infección a la bacteria (Carvajal 2014).

La presencia del gen *ciaB* se dio en el hígado, el contramuslo con piel y la pechuga con piel. Este gen traduce proteínas de invasión, las cuales son inyectadas a la célula hospedera a través de un sistema de secreción. Asimismo, traduce la proteína antígeno B, la cual comparte similitudes con el Sistema de Secreción Tipo III (Type 3 Secretion System, T3SS por sus siglas en inglés), y está asociado con la invasión celular (Oyarzabal 2012 e Iraola *et al.*, 2014). El antígeno B al igual que el T3SS traslocan los factores de virulencia hasta el citosol de la célula hospedera, esto se realiza con el motivo de esquivar los mecanismos de defensa de esta (De Paz 2010). Es necesaria la presencia de una baja concentración de  $Ca^{2+}$  en el citosol para regular el T3SS (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003). Sin embargo, el mecanismo de acción del antígeno B no está determinado en su totalidad, debido a que en la actualidad no hay información suficiente que lo sustente (Cuadro 15).

Cuadro 15. Presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en las muestras de pollo positivas a *Arcobacter* a través del PCR.

Pieza de pollo	N° muestras positivas a <i>Arcobacter</i>	Presencia de genes putativos de virulencia							
		<i>ciaB</i>	<i>cjl349</i>	<i>irgA</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>mviN</i>	<i>pldA</i>	<i>tlyA</i>
Hígado	1	+	-	+	+	+	+	+	+
Contramuslo con piel	1	+	-	+	+	+	+	+	+
Pechuga con piel	2	+	-	+	+	+	+	+	+
Ala con piel	1	-	-	+	-	-	-	-	+
Muslo de ala con piel	1	-	-	+	-	-	-	+	+

**Presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en las diferentes condiciones de crecimiento según la pieza de pollo.** La presencia de los genes putativos de virulencia tuvo variaciones dependiendo de la pieza de pollo examinada (hígado, alas con piel, pechuga con piel, contramuslo con piel y muslo de ala con piel) y las condiciones de crecimiento a las cuales fueron sometidas. El gen *cjl349* no fue encontrado en ninguna de las muestras de pollo, en ninguna condición de crecimiento.

Como anteriormente se explicó, el gen *cjl349* necesita de fibronectina en la sangre. El tiempo de vida media de la fibronectina, es de 24 a 72 horas, luego es eliminada de la circulación (Lucena *et al.*, 2007). Las muestras de pollo en el experimento fueron procesadas luego de las 72 horas, por lo que esta proteína no se mantuvo luego de este periodo en la sangre de las muestras de pollo, sino que perdió sus propiedades y, al no tener el gen el sustrato base adecuado para actuar, no se pudo presentar.

En general, el comportamiento de la presencia de los genes putativos de virulencia es guiado por un patrón estocástico y que presenta mucha variabilidad. Esto es debido a que la microbiota está determinada por factores externos y genéticos, haciendo que el estudio y la comprensión de la presencia de estos genes sea más complicada (Benson *et al.*, 2010). Un punto importante que dificulta entender el comportamiento de los genes putativos de virulencia en *Arcobacter* es que los estudios previos relacionados a esta investigación son escasos y no brindan la suficiente información para comparar resultados.

Para el hígado, el gen *ciaB* apareció en todas las condiciones de crecimiento, exceptuando la condición a 25 °C, en Agar Bolton Sangre en condiciones microaeróbicas. Los genes *irgA*, *pldA* y *tlyA* están ligados entre sí. La presencia del primero permite la presencia del tercero, y gracias a la presencia del segundo se facilita el trabajo del tercero. Esto se explica de modo que se necesita del gen *irgA* para que el gen *tlyA* se pueda presentar, pues es el que le brinda el sustrato de Fe<sup>2+</sup> necesario (Noinaj *et al.*, 2010); mientras que el gen *tlyA* ayuda a que la secreción de toxinas de *pldA* sea más eficiente, al mismo tiempo que

permite la creación de espacios en la membrana citoplasmática de la célula hospedera para expulsar sus bacteriocinas (Grant *et al.*, 1997).

El gen *irgA* estuvo presente en todas las condiciones de crecimiento en el hígado, mientras que el gen *tlyA* no estuvo presente en todas las condiciones de crecimiento. Este gen no se presentó a 15 °C, en condiciones aeróbicas en Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre, y además estuvo ausente a 25 °C, en condiciones microaeróbicas en ninguno de los medios de crecimiento.

El gen *pldA* estuvo presente en todas las muestras de pollo y condiciones de crecimiento evaluadas en el experimento. Este resultado hace suponer que en las condiciones anteriores en las que se mencionaron que no creció el gen *tlyA*, la expulsión de las bacteriocinas fue menos eficiente que en las condiciones en las que ambos genes (*pldA* y *tlyA*) se presentaron en conjunto. Esta suposición se debe a que *pldA* puede crear sus propios poros en las membranas citoplasmáticas para su expulsión, similar función a la que cumple el gen *tlyA*, sin embargo la creación de estos poros no es su principal función.

El gen *mviN* estuvo presente a 37 °C, en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, en Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre. Los genes *hecA* y *hecB*, presentaron una presencia variada, siendo el gen *hecB* que se presentó en todas las condiciones. En el caso del gen *hecA*, este no tuvo presencia en nueve condiciones de crecimiento evaluadas: 15 °C en condiciones microaeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre, 15 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas en ambos medios de crecimiento, a 25 °C en condiciones aeróbicas y microaeróbicas en ambos medios de crecimiento, y a 30 °C en condiciones microaeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre (Cuadro 16).

En el caso del contramuslo con piel, los genes *hecA* y *hecB* se presentaron en todas las condiciones de crecimiento. Los genes *irgA* y *pldA* estuvieron presentes en todas las condiciones de crecimiento, mientras que el gen *tlyA* solamente no se presentó a 37 °C en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre. El gen *mviN* no se presentó a 15 °C y a 25 °C en ninguna condición atmosférica ni en ningún medio de crecimiento. El gen *ciaB* no tuvo presencia a 15 °C en condiciones microaeróbicas en Agar Bolton Sangre y en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre, a 25 °C en ninguna condición atmosférica y medio de crecimiento, a 30 °C en condiciones microaeróbicas en ningún medio de crecimiento y a esa misma temperatura en condiciones aeróbicas en Agar Bolton Sangre (Cuadro 17).

Para la pechuga con piel, el gen *ciaB* se presentó en condiciones óptimas a 37 °C en condiciones microaeróbicas (Calvo *et al.*, 2013; Valcárcel 2014 y Sanz *et al.*, 1994) en ambos medio de crecimiento. El gen *hecA* se presentó en todas las condiciones de crecimiento y el gen *hecB* se presentó en las condiciones óptimas a 37 °C en condiciones microaeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre. El gen *irgA* se presentó en todas las condiciones de crecimiento. El gen *tlyA* no se presentó a 15 °C en las condiciones atmosféricas y medios de crecimiento, a 25 °C en condiciones microaeróbicas en ambos medios de crecimiento y en condiciones aeróbicas en Agar Bolton Sangre. El gen *pldA* no se presentó a 42 °C en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre, mientras que el gen *mviN* se presentó en todas las condiciones de crecimiento (Cuadro 18).

En el caso del ala con piel, el gen *ciaB* estuvo ausente en todas las condiciones de crecimiento, al igual que en los genes *hecA*, *hecB*, *mviN* y *pldA*. El gen *irgA* no se presentó a 15 °C en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre, a 25 °C en condiciones microaeróbicas en Agar Bolton Sangre y en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre, a 30 °C en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre, a 37 °C en condiciones aeróbicas en ambos medios de crecimiento, a 42 °C en condiciones aeróbicas en ambos medios de crecimiento y en condiciones microaeróbicas en Agar Bolton Sangre. El gen *tlyA* estuvo ausente a 37 °C en condiciones aeróbicas en Agar Bolton Sangre y a 42 °C en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre (Cuadro 19).

En el caso del muslo de ala con piel, los genes *mviN*, *ciaB* y *hecA* no se presentaron en ninguna condición de crecimiento. El gen *irgA* estuvo ausente a 15 °C en condiciones microaeróbicas en ambos medios de crecimiento y en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre. El gen *hecB* no se presentó a 15 °C en condiciones microaeróbicas en ambos medios de crecimiento y en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre, a 37 °C en condiciones aeróbicas en Agar Soya Tripticasa Sangre, y a 42 °C en ninguna condición atmosférica ni medio de crecimiento. El gen *pldA* no tuvo presencia a 42 °C en condiciones microaeróbicas en ambos medios de crecimiento. El gen *tlyA* se presentó en todas las condiciones de crecimiento tomadas en cuenta para este estudio (Cuadro 20).

Cuadro 16. Presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en el hígado con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Trypticasa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).

Pieza de pollo	N° muestras positivas a <i>Arcobacter</i>	Condiciones de crecimiento	Genes putativos de virulencia							
			<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>irgA</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>mviN</i>	<i>pldA</i>	<i>tlyA</i>
Hígado	1 ( <i>A. cibarius</i> , <i>A. cryaerophilus</i> y <i>A. skirrowii</i> )	M15B	+	-	+	+	+	+	+	+
		M15T	+	-	+	-	+	-	+	+
		A15B	+	-	+	-	+	-	+	-
		A15T	+	-	+	-	+	-	+	-
		M25B	-	-	+	-	+	-	+	-
		M25T	+	-	+	-	+	-	+	-
		A25B	+	-	+	-	+	-	+	+
		A25T	+	-	+	-	+	-	+	+
		M30B	+	-	+	+	+	-	+	+
		M30T	+	-	+	-	+	-	+	+
		A30B	+	-	+	+	+	-	+	+
		A30T	+	-	+	+	+	-	+	+
		M37B	+	-	+	+	+	+	+	+
		M37T	+	-	+	+	+	+	+	+
		A37B	+	-	+	+	+	+	+	+
		A37T	+	-	+	+	+	+	+	+
		M42B	+	-	+	-	+	-	+	+
		M42T	+	-	+	+	+	-	+	+
		A42B	+	-	+	+	+	-	+	+
		A42T	+	-	+	+	+	-	+	+

Cuadro 17. Presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en el contramuslo con piel con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).

Pieza de pollo	N° muestras positivas a <i>Arcobacter</i>	Condiciones de crecimiento	Genes putativos de virulencia							
			<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>irgA</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>mviN</i>	<i>pldA</i>	<i>tlyA</i>
Contramuslo con piel	1 ( <i>A. cibarius</i> )	M15B	-	-	+	+	+	-	+	+
		M15T	+	-	+	+	+	-	+	+
		A15B	+	-	+	+	+	-	+	+
		A15T	-	-	+	+	+	-	+	+
		M25B	-	-	+	+	+	-	+	+
		M25T	-	-	+	+	-	-	+	+
		A25B	-	-	+	+	+	-	+	+
		A25T	-	-	+	+	+	-	+	+
		M30B	-	-	+	+	-	+	+	+
		M30T	-	-	+	+	-	+	+	+
		A30B	-	-	+	+	+	+	+	+
		A30T	+	-	+	+	-	+	+	+
		M37B	+	-	+	+	+	+	+	+
		M37T	+	-	+	+	+	+	+	+
		A37B	+	-	+	+	+	+	+	+
		A37T	+	-	+	+	+	+	+	-
		M42B	+	-	+	+	+	+	+	+
		M42T	+	-	+	+	+	+	+	+
		A42B	+	-	+	+	-	+	+	+
		A42T	+	-	+	+	+	+	+	+

Cuadro 18. Presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en la pechuga con piel con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticosa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).

Pieza de pollo	N° muestras positivas a <i>Arcobacter</i>	Condiciones de crecimiento	Genes putativos de virulencia							
			<i>ciaB</i>	<i>cjl349</i>	<i>irgA</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>mviN</i>	<i>pldA</i>	<i>tlyA</i>
Pechuga con piel	2 ( <i>A. skirrowii</i> y <i>A. cibarius</i> )	M15B	-	-	+	+	-	+	+	-
		M15T	-	-	+	+	-	+	+	-
		A15B	-	-	+	+	-	+	+	-
		A15T	-	-	+	+	-	+	+	-
		M25B	-	-	+	+	-	+	+	-
		M25T	-	-	+	+	-	+	+	-
		A25B	-	-	+	+	-	+	+	-
		A25T	-	-	+	+	-	+	+	+
		M30B	-	-	+	+	-	+	+	+
		M30T	-	-	+	+	-	+	+	+
		A30B	-	-	+	+	-	+	+	+
		A30T	-	-	+	+	-	-	+	+
		M37B	+	-	+	+	-	+	+	+
		M37T	+	-	+	+	+	+	+	+
		A37B	-	-	+	+	-	+	+	+
		A37T	-	-	+	+	-	+	+	+
		M42B	-	-	+	+	-	+	+	+
		M42T	-	-	+	+	-	+	+	+
		A42B	-	-	+	+	-	+	+	+
		A42T	-	-	+	+	-	+	-	+

Cuadro 19. Presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en el ala con piel con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).

Pieza de pollo	N° muestras positivas a <i>Arcobacter</i>	Condiciones de crecimiento	Genes putativos de virulencia							
			<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>irgA</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>mviN</i>	<i>pldA</i>	<i>tlyA</i>
Ala con piel	1 ( <i>A. skirrowii</i> )	M15B	-	-	+	-	-	-	-	+
		M15T	-	-	+	-	-	-	-	+
		A15B	-	-	+	-	-	-	-	+
		A15T	-	-	-	-	-	-	-	+
		M25B	-	-	-	-	-	-	-	+
		M25T	-	-	+	-	-	-	-	+
		A25B	-	-	+	-	-	-	-	+
		A25T	-	-	-	-	-	-	-	+
		M30B	-	-	+	-	-	-	-	+
		M30T	-	-	+	-	-	-	-	+
		A30B	-	-	+	-	-	-	-	+
		A30T	-	-	-	-	-	-	-	+
		M37B	-	-	+	-	-	-	-	+
		M37T	-	-	+	-	-	-	-	+
		A37B	-	-	-	-	-	-	-	-
		A37T	-	-	-	-	-	-	-	+
		M42B	-	-	-	-	-	-	-	+
		M42T	-	-	+	-	-	-	-	+
		A42B	-	-	-	-	-	-	-	+
		A42T	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 20. Presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en el ala con piel con las diferentes condiciones de crecimiento, tomando en cuenta temperatura (15, 25, 30, 37 y 42 °C), medios de crecimiento (Agar Bolton Sangre y Agar Soya Tripticasa Sangre) y condiciones atmosféricas (aeróbico y microaeróbico).

Pieza de pollo	N° muestras positivas a <i>Arcobacter</i>	Condiciones de crecimiento	Genes putativos de virulencia								
			<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>irgA</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>mviN</i>	<i>pldA</i>	<i>tlyA</i>	
		M15B	-	-	-	-	-	-	-	+	+
		M15T	-	-	-	-	-	-	-	+	+
		A15B	-	-	-	-	-	-	-	+	+
		A15T	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		M25B	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		M25T	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		A25B	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		A25T	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		M30B	-	-	+	-	+	-	-	+	+
Muslo de ala con piel	1 ( <i>A. skirrowii</i> )	M30T	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		A30B	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		A30T	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		M37B	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		M37T	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		A37B	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		A37T	-	-	-	-	-	-	-	+	+
		M42B	-	-	+	-	-	-	-	-	+
		M42T	-	-	-	-	-	-	-	-	+
		A42B	-	-	+	-	-	-	-	+	+
		A42T	-	-	+	-	-	-	-	+	+

La prevalencia del gen *ciaB* se dio en un 32% de todo el experimento mientras que en otros estudios tuvo una prevalencia del 100% (Girbau *et al.*, 2015) y arriba del 92% (Doudah *et al.*, 2012). El gen *irgA* estuvo presente en el experimento en un 87% y en un 100% en un estudio reportado por Doudah *et al.* (2012). El gen *hecA* estuvo presente en la investigación en un 51%, mientras que en un estudio realizado por Doudah *et al.* (2012), se presentó en un 100% y en un estudio realizado por Karadas *et al.* (2013), apareció en un 13%. El gen *mviN* demostró su presencia en un 36% del estudio, mientras que otras investigaciones demostraron una prevalencia mayor del 85% (Doudah *et al.*, 2012). El gen *hecB* mostró su prevalencia en un 48% del estudio y una investigación de Karadas *et al.* (2013) encontró una prevalencia del 44% para este gen. El gen *pldA* tuvo una prevalencia de 77% en el estudio, en comparación con una prevalencia de más de 85% en un estudio realizado por Doudah *et al.* (2012). Finalmente, el gen *tlyA* se encontró en un 86% de la investigación, mientras que un estudio realizado por Doudah *et al.* (2012), se encontró una prevalencia mayor al 85%. Los genes *irgA* y *tlyA* fueron los que más se presentaron.

En cuanto a las condiciones de crecimiento, las condiciones de crecimiento más óptimas fueron a 37 °C en Agar Bolton Sangre en condiciones microaeróbicas, con la presencia del 67.5% de genes putativos de virulencia, y a 37 °C, en Agar Soya Trypticosa Sangre en condiciones microaeróbicas, con la presencia del 65% de genes putativos de virulencia. De esta manera se confirma las condiciones óptimas de crecimiento del género *Arcobacter* descritas en otros estudios (Calvo *et al.*, 2013; Valcárcel, 2014 y Sanz *et al.*, 1994).

Es necesario resaltar la importancia de la investigación presentada. Estudios anteriores a este sólo demuestran el crecimiento y presencia de los genes putativos de virulencia de esta bacteria en sus condiciones óptimas. Investigaciones previas no tomaron en cuenta el desarrollo de este microorganismo en condiciones de estrés a temperaturas máximas (42 °C) y mínimas (15 °C).

La presencia de este microorganismo en las muestras de pollo analizadas demuestra cómo *Arcobacter*, a pesar de no ser una bacteria muy investigada hasta la actualidad, es un patógeno con alto potencial de contaminación y que puede causar epidemia en varias partes del mundo. Sus síntomas no son mortales, solo en casos muy extremos, pero pueden llegar a ocasionar grandes pérdidas. Estas pérdidas están directamente relacionadas con el sector salud y el sector avícola. En el sector salud por producir gastos para el Estado para suplir de medicación adecuada (que por cierto aún no se tienen estudios definitivos acerca de la medicación correcta contra este microorganismo) y en el sector avícola puede causar que se dejen de percibir grandes cantidades de dinero al encontrar carcasas de pollo contaminadas, que no cumplan con los requisitos microbiológicos y de inocuidad.

El impacto de *Arcobacter* va más allá de la escasa información con la que se cuenta en la actualidad. Están comprometidos varios países, por ejemplo Brasil, ya que es el mayor exportador a nivel mundial. Sus exportaciones de 3.58 millones de toneladas al año (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina 2015), le generan un ingreso de más de US\$4699 millones (Alimentación Revistas 2011). El impacto de carcasas de

pollo contaminadas con *Arcobacter* reduciría considerablemente las exportaciones de este país y se dejarían de percibir grandes ingresos por esta actividad, generando desestabilidad económica en el sector avícola brasileño. La importancia de este estudio radica, además, en la prevalencia a nivel mundial de *Arcobacter* spp. (Abdelrahman *et al.*, 2012; Quintones *et al.*, 2007 e Ibrahim *et al.*, 2002) y su relación al consumo de carne de pollo. El consumo per cápita de pollo a nivel mundial es 27.76 kg. Los países que más consumen carne de pollo, son: Kuwait con un consumo de 60 kg/persona/año, Emiratos Árabes Unidos e Israel con un consumo de 59 kg/persona/año, Estados Unidos con 54.9 kg/persona/año, Brasil con 54.8 kg/persona/año, Barbados con 52.3 kg/cápita/año, Brunéi con 47.4 kg/persona/año, Malasia con 45.6 kg/persona/año, Países Bajos con 45.2 kg/persona/año y Arabia Saudita con 42.7 kg/persona/año (Medrano 2013).

Por otro lado, otros países que enfrentarían serios problemas por una potencial epidemia causada por *Arcobacter* en el sector avícola, serían la Federación Rusa, Japón, Arabia Saudita y China, debido a que son los más grandes importadores de carne de pollo a nivel mundial (Secretaría de Estado de Agricultura *et al.*, 2007; Herrera y Benavides 2007). Es importante resaltar que otros países, con menores volúmenes de exportaciones e importaciones, también verían afectadas sus economías y sus hábitos alimenticios sufrirían cambios.

Los datos obtenidos a partir de este estudio sirven como fundamento de la base para comprender el comportamiento de cómo este microorganismo puede formar biofilms y la resistencia que pueden adquirir. Adicionalmente, los datos que se presentaron sirven de base para que futuras investigaciones se puedan enfocar en ensayos de adhesión e invasión de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter*, con las diferentes condiciones de crecimiento y en diferentes líneas de células. De esta forma, se puede contribuir a entender mejor el mecanismo de acción de cada uno de estos genes putativos de virulencia y saber si presentan diferencias o no con las funciones de los genes de otras bacterias que ya han sido estudiadas, y con las que comparten estructuras similares.

#### 4. CONCLUSIONES

- Las temperaturas, condiciones atmosféricas y medios de cultivo no influyeron en la presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* de los controles positivos.
- Hubo presencia de *Arcobacter* spp. en las muestras de pollo adquiridas en ventas al por menor.
- Hubo diferencias en la prevalencia de *Arcobacter* entre las partes de pollo, siendo las partes con mayor irrigación de sangre como el hígado, el contramuslo la pechuga y el ala, las que mayor prevalencia presentaron en comparación al muslo de ala, con menor irrigación de sangre.
- La presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en aislados de pollo son una fuente de riesgo para la salud, por estar presentes ante condiciones de crecimiento adversas.

## 5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el gen de virulencia *cadF* a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y electroforesis, con las mismas condiciones de crecimiento evaluadas en este estudio.
- Realizar aislamiento de las especies de *Arcobacter* de los aislados de pollo y evaluar los genes de virulencia con las mismas condiciones evaluadas en este estudio para conocer su presencia en cada especie.
- Revisar o utilizar otro método para extracción de gDNA a partir de las colonias de *Arcobacter*.
- Conducir el mismo experimento con más repeticiones para obtener mayor cantidad de datos para poder compararlos entre sí.

## 6. LITERATURA CITADA

Abdelrahman, H., A. Ahmad, M. Abdelwahab y S. Salem. 2012. Incidence of *Arcobacter* species in chicken meat marketed in Ismailia city. SCVMJ 17(2): 13-19.

Ali, M. 2013. Studies on *Arcobacter* species, their isolation and pathogenicity. Tesis Ph.D., Edinburgh, Escocia, School of Life Sciences Heriot-Watt University. 211 p.

Alimentación Revistas. 2011. Brazil: The country is a leader in the export of beef and chicken. Consultado el 2 de septiembre. Disponible en <http://www.alimentacion.enfasis.com/notas/20400-el-pais-s-lider-la-exportacion-carne-bovina-y-pollo>

Bakás, L., S. Maté, R. Vasquez y V. Herlax. 2013. Mechanism of action of the toxin alpha hemolysin *Escherichia coli*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 47(2): 353-361.

Benson, A., S. Kelly, R. Legge, F. Ma, S. Low. 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. PNAS 104(44): 18933-18938.

Calvo, G., M. Arias y H. Fernández. 2013. *Arcobacter*: An emerging foodborne pathogen. Latin American Nutrition Files 63(2): 164-172.

Carvajal, L. 2014. Genómica funcional de transportadores MDR bacterianos en infecciones de plantas. Tesis Ph.D.; Granada, España, Universidad de Granada. 225 p.

Collado, L. y M. Figueras. 2011. Taxonomy, Epidemiology and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. Clinical Microbiology Reviews 24(1): 174-192.

Del Castillo-Rueda, A. y P. Khosravi-Shahi. 2007. Papel del hierro en la interacción entre el huésped y el patógeno. Medicina Clínica 134(10): 452-456.

De Paz, H. 2010. Estudio comparativo de sistemas de secreción tipo IV implicados en transferencia conjugativa de DNA y virulencia bacteriana. Universidad de Cantabria. Santander, España. 282 p.

De Oliveira, S., H. de Souza, B. Sonntag, N. Ikuta, V. Lunge, A. Fonseca y J. Corio. 2001. Isolation of *Arcobacter* spp. From Poultry Carcasses, in Brazil. Ciência Rural 31(4): 639-643.

- Doudiah, L., L. De Zutter, J. Baré, P. De Vos, P. Vandamme, O. Vandenberg, A. Van den Abeley K. Houf. 2012. Occurrence of Putative Virulence Genes in *Arcobacter* Species Isolated from Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology* 50(3): 735-741.
- Doudiah, L., L. De Zutter, P. Vandamme y K. Houf. 2010. Identification of Five Human and Mammal Associated *Arcobacter* Species by a Novel Multiplex-PCR Assay. *Journal of Microbiological Methods* 80(3): 281-286.
- Fallas-Padilla, K., Rodríguez-Rodríguez, H. Fernández-Jaramillo, M. Arias. 2015. *Arcobacter*: Comparison of Isolation Methods, Diversity, and Potential Pathogenic Factors in Commercially Retailed Chicken Breast Meat from Costa Rica. *Journal of Food Protection* 77(6): 880-884.
- Fay, A., y J. Dworkin. 2009. *Bacillus subtilis* Homologs of MviN (MurJ), the Putative *Escherichia coli* Lipid II Flippase, Are Not Essential for Growth. *Journal of Bacteriology* 191(19): 6020-6028.
- Fernández, H., M. Paz, I. Mansailla, M. Gonzalez y F. Latif. 2014. *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in human, animals and food sources, in Southern Chile. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(1): 145-147.
- Girbau, C., C. Guerra, I. Martínez-Malaxetxebarria, R. Alonso y A. Fernández-Astorga. 2015. Prevalence of ten putative virulence genes in the emerging foodborne pathogen *Arcobacter* isolated from food products. *Food Microbiology* 52: 145-149.
- González-Pedrajo, B., G. Dreyfus. 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Universidad Autónoma de México. México DF, México. 19 p.
- Grant, K., I. Ubarretxena, N. Dekker, P. Richardson y S. Park. 1997. Molecular Characterization of *pldA*, the Structural Gene for a Phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its Contribution to Cell-Associated Hemolysis. *American Society for Microbiology* 65(4): 1172-1180.
- Herrera, D. y H. Benavides. 2007. El Entorno Comercial Internacional del Sector Avícola Centroamericano. Consultado el 2 de septiembre de 2015. Disponible en <http://www.iica.int/Esp/organizacion/LTGC/Comercio/Publicaciones%20de%20Polticas%20y%20Comercio/El%20Entorno%20Internacional%20del%20Sector%20Av%20C3%ADcol a%20Centroamericano.pdf>
- Himedia. *Arcobacter* Broth Base. Consultado el 16 de julio de 2015. Disponible en <http://himedialabs.com/TD/M1637.pdf>
- Himedia. CAT Supplement. Consultado el 16 de julio de 2015. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/FD145.pdf>

Ho, H.; L. Lipman y W. Gaastra. 2006. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology* 115 (1-3): 1-13.

Ibrahim, H., F. Aydin, K. Houf, M. Sahin, P. Vandamme. 2002. The Prevalence of *Arcobacter* spp. on Chicken Carcasses Sold in Retail Markets in Turkey, and Identification of the Isolates Using SDS-PAGE. *International Journal of Food Microbiology* 81: 21-28.

Inoue, A., Y. Murata, H. Takahashi, N. Tsuji, S. Fujisaki y J. Kato. 2008. Involvement of an Essential Gene, *mviN*, in Murein Synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190(21): 7298-7301.

Iraola, G., R. Pérez, H. Naya, F. Paolicchi, E. Pastor, S. Valenzuela, L. Calleros, A. Velilla, M. Hernández y C. Morsella. 2014. Genomic evidences for the emergence and evolution of pathogenicity and niche preferences in the genus *Campylobacter*. *Genomic Biology and Evolution*.

Julio, S., y P. Cotter. 2005. Characterization of the Filamentous Hemagglutinin-Like Protein FhaS in *Bordetella bronchiseptica*. *Infection and Immunity* 73(8): 4960-4971.

Kabeya, H., S. Maruyama, Y. Morita, T. Ohsuga, S. Ozawa, Y. Kobayashi, M. Abe, Y. Katsube y T. Mikami. 2004. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *International Journal of Food Microbiology* 90 (2004) 303 – 308.

Karadas, G., S. Sharbati, I. Hänel, U. Messelha"ußer, E. Glocker, T. Alter y G. Gözl. 2013. Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *Journal of Applied Microbiology* 115: 593-590.

Lee, M. H., C. Doo-Sung, C. Sunkeum, B. Lee, J. Jung y C. Choi. 2010. Prevalence of *Arcobacter* species isolated from retail meats in Korea. *Journal of Food Protection* 73(7): 1313-1316.

Levican, A. 2013. Sanitary Importance of *Arcobacter*. Tesis Ph.D. Tarragona, España. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques Unitat de Biologia i Microbiologia. 263 p.

Levican, A., A. Alkestas, C. Günter, S. Forsythe y M. Figueras. 2013. Adherence to an invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 79(16): 4951-4957.

Levican, A., L. Collado, C. Aguilar, C. Yustes, A. Diéguez, J. Romalde y M. Figueras. 2012. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* spp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology* 35(3): 133-138.

Lucena, S., C. Arocha y B. Guerrero. 2007. Fibronectina. Estructura y reacciones relacionadas a la hemostasia. *Revisión. Investigación Clínica* 48(2).

Martino, M., R. Stabler, Z. Zhang, M. Farthing, B. Wren y R. Dorrell. 2001. *Helicobacter pylori* Pore-Forming Cytolysin Orthologue TlyA Possesses In Vitro Hemolytic Activity and Has a Role in Colonization of the Gastric Mucosa. *Infection and Immunity* 69(3): 1697-1703.

Medina, E. 1996. La Fibronectina como Factor de Colonización en Catéteres: Efecto de varios Antimicrobianos. Tesis Ph.D., Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología. 141 p.

Medrano, A. 2013. Análisis de la Avicultura Nacional y Regional 2013. Consultado el 8 de septiembre de 2015. Disponible en <http://www.bcrp.gob.pe/docs/Proyeccion-Institucional/Encuentros-Regionales/2013/la-libertad/eeer-la-libertad-2013-medrano.pdf>

Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J. H., Winstanley, C., Bennet, M., Hart, C. A., Miller, W. G., Williams, N. J. 2011. Comparison of *Arcobacter* isolation methods and diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5): 1646-1650.

Miller, W., C. Parker, M. Rubenfield, G. Mendz, M. Wönsten, D. Ussery, J. Stolz, T. Binnewies, P. Hallin, G. Wang, J. Malek, A. Rogosin, L. Stanker y R. Mandrell. 2007. The Complete Genome Sequence and Analysis of the Epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *Plos One* 12: 1-21.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina. 2015. Consultado el 2 de septiembre de 2015. Disponible en [http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/renavi/Anuario\\_Avícola\\_2014.pdf](http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/renavi/Anuario_Avícola_2014.pdf)

Ministerio de Salud de Argentina. 2001. Manual de Procedimientos *Campylobacter*. Subsecretaría de Investigación y Tecnología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires, Argentina. Consultado el 17 de junio de 2015. Disponible en [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/publications/documents/Argentina-LevelII/Manual\\_Procedimientos\\_Campylobacter.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/publications/documents/Argentina-LevelII/Manual_Procedimientos_Campylobacter.pdf)

Naikara, H., J. Butcher, A. Flint, J. Xu, K. Raymond y A. Stinzi. 2013. *Campylobacter jejuni* ferric-enterobactin receptor CfrA is TonB3 dependent and mediates iron acquisition from structurally different catechol siderophores. *National Institute of Health* 5(8): 988-996.

Nannapaneni, R., V. Chalova, P. Crabdall, S. Ricke, M. Johnson y C. O'Bryam. 2009. *Campylobacter* and *Arcobacter* Species Sensitivity to Commercial Orange Oil Fractions. *International Journal of Food Microbiology* 129: 43-49.

Noinaj, N., M. Guillier, T. Barnard y S. Buchanan. 2010. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *National Institute of Health* 64: 43-60.

Oxoid Microbiology Products. Bolton Selective Enrichment Broth. Consultado el 16 de julio de 2015. Disponible en [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0983&org=154&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0983&org=154&c=UK&lang=EN)

Oyarzabal, O. 2012. *Microbial Food Safety: An Introduction*. Springer. 242 p.

ProCon. 2012. U.S. and International Meat Consumption Chart. Consultado el 8 de septiembre de 2015. Disponible en <http://vegetarian.procon.org/view.resource.php?resourceID=004716#III>

Quintones, B., C. Parker, J. Janda, W. Miller y R. Mandrell. 2007. Detection and Genotyping of *Arcobacter* and *Campylobacter* Isolates from Retail Chicken Samples by Use of DNA Oligonucleotide Arrays. *Applied and Environmental Microbiology* 73(11): 3645-3655.

Rahimi, E., H. Hormozipoor, M. Gholami Ahangaran y F. Yazdi. 2012. Prevalence of *Arcobacter* species on chicken carcasses during processing in Iran. *Poultry Science Association* 408-412.

Rahman, A., S. Srivastava, A. Sneh, N. Ahmed y M. Krishnasastry. 2010. Molecular characterization of *tlyA* gene product, Rv1694 of *Mycobacterium tuberculosis*: A non-conventional hemolysin and a ribosomal RNA methyl transferase. *BMC Biochemistry* 11-35.

Rojas, C., J. Hyun, W. Deng, J. Doyle y A. Collmer. 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Universidad de Washington*. Seattle, Washington 99(20): 13142-13147.

Sanz, J., M. Usera, J. Reina, L. Cardeñoso y F. Vasallo, F. 1994. *In: J. Picazo (ed) Procedimientos en Microbiología Clínica: Gastroenteritis bacterianas vítricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias*. España, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. p 7-8.

Scarano, C., F. Giacometti, G. Manfreda, A. Lucchi, E. Pes, C. Spanu, E. Pietro, L. De Santis y A. Serraino. 2014. *Arcobacter butzleri* in Sheep Ricotta Cheese at Retail and Related Sources of Contamination in an Industry Dairy Plant. *Journal of Applied Microbiology* 80(22): 7036-7041.

Secretaría de Estado de Agricultura, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y Consejo Nacional de Competitividad. 2007. Estudio de la Cadena Agroalimentaria de Carne de Pollo en la República Dominicana. Consultado el 2 de septiembre de 2015. Disponible en <http://www.iica.int/Esp/regiones/caribe/repDominicana/Documents/Cadenas%20Agroalimentarias/Cadena%20Agroalimentaria%20de%20Carne%20de%20Pollo.pdf>

Shah, A., A. Saleha, Z. Zunita y M. Murugaiyah, M. 2011. *Arcobacter*-An emerging threat to animals and animal origin food products? Trends in Food Science & Technology 22: 225-236.

Sigma-Aldrich. Tryptic Soy Agar. Consultado el 16 de julio de 2015. Disponible en <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Fluka/Datasheet/22091dat.pdf>

Son, I., M. Englen, M. Berrang, M., P. Fedorka-Cray y M. Harrison, M. 2006. Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. International Journal of Food Microbiology 13: 16-22.

Valcárcel, L. 2014. Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios en alimentos. Tesis Ing., Valencia, España, Universitat Politècnica de València. 64 p.

Vandenberg, O., A. Dediste, K. Houf, S. Ibekwen, H. Souayah, S. Cadranel, N. Douat, G. Zissis, J. Butzler y P. Vandamme. 2004. *Arcobacter* species in humans. Emerging Infectious Diseases 10(10): 1863-1867.

Van Driessche, E. y K. Houf. 2007. Discrepancy Between the Occurrence of *Arcobacter* in Chickens and Broiler Carcass Contamination. Poultry Science 86: 744-751.

Wissman, M. 2007. Bird Liver Basics. Consultado el 6 de agosto de 2015. Disponible en <http://www.birdchannel.com/bird-magazines/bird-talk/2008-january/bird-liver-basics.aspx>