

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MORELOS**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA**

**Análisis pangenómico del género *Campylobacter* y su
aplicación en la determinación de marcadores moleculares
para la detección de *C. fetus***

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Biól. Daniel Rivera Mendoza

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Deyanira Pérez Morales

Cuernavaca, Morelos

Diciembre, 2020

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la **Dra. Deyanira Pérez Morales**, por haberme apoyado, una vez más, en la realización de este proyecto, por la confianza y esperanza depositadas en mí, por formar parte importante de los cimientos sobre los cuales se está edificando mi carrera académica, y que me han ayudado, día a día, a mejorar constantemente.

Al **Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán**, por haberme permitido trabajar dentro de su grupo de investigación, y haber enriquecido mi formación con sus críticas constructivas entorno al proyecto.

Al **Dr. Enrique Merino Pérez**, por haberme encaminado a través del mundo de los análisis biocomputacionales, y haberme permitido aprender de él en clases durante su materia, así como durante mis exámenes tutorales.

Al **Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann**, por haberme orientado en el manejo de herramientas bioinformáticas las cuales fueron una base para la realización de este proyecto.

A mis sinodales, la **Dra. María del Rayo Sánchez Carbente**, el **Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís**, y el **Dr. Gabriel del Río Guerra**, por toda su paciencia, consejos, revisiones y críticas constructivas que fueron fundamentales para culminar este proyecto. Gracias por todo.

A todas las personas que se han cruzado en mi vida durante estos años de la realización de este proyecto. Agradezco mucho cada uno de los aprendizajes que he podido tener, provenientes de todos y cada uno de ustedes.

DEDICATORIA

A mi madre, **Teresa Mendoza Estrada**. Ma, tú sabes que todo esto siempre ha sido, es, y será para ti.

“Estamos en una etapa única de nuestra historia. Nunca antes habíamos tenido tanta conciencia de lo que le estamos haciendo al planeta, y nunca antes habíamos tenido el poder de hacer algo al respecto. Seguramente todos tenemos la responsabilidad de cuidar nuestro Planeta Azul. El futuro de la humanidad y, de hecho, toda la vida en la tierra, ahora depende de nosotros.”

-David Attenborough

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
Bacterias patógenas	7
Bacterias patógenas que se transmiten por animales del sector pecuario	7
El género <i>Campylobacter</i>.....	10
Importancia epidemiológica de <i>Campylobacter</i> spp.	11
Métodos de identificación del género <i>Campylobacter</i>	14
Patogénesis	15
Mecanismo de invasión.....	15
<i>Campylobacter fetus</i>	16
Incidencia y patogénesis	16
Diagnóstico.....	17
Prevención y control	17
Identificación de bacterias patógenas en los alimentos	18
Marcadores moleculares	19
Tipos de marcadores moleculares	20
Secuenciación de ADN	21
Últimos avances en técnicas para la detección de marcadores filogenéticos.....	22
La biología computacional como herramienta.....	22
Pangenoma	26
ANTECEDENTES	27
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos.....	30
MÉTODOS.....	31
Obtención de datos genómicos	31
Pangenoma de <i>Campylobacter</i>	32
Alineamiento de las secuencias únicas de <i>C. fetus</i> contra la base de datos del NCBI	33
Diseño de oligonucleótidos para la amplificación <i>in silico</i> de secuencias únicas de <i>C. fetus</i>	33
Amplificación <i>in silico</i> de secuencias específicas de <i>C. fetus</i>	33

RESULTADOS	35
Obtención de datos genómicos	35
Pangenoma del género <i>Campylobacter</i>	35
Análisis filogenético del género <i>Campylobacter</i>	37
Identificación funcional putativa de los genes que conforman al genoma <i>core</i> del género <i>Campylobacter</i>	39
Genes específicos de especies de <i>Campylobacter</i>	40
Identificación funcional putativa de los genes específicos de <i>C. fetus</i>	41
Validación de la presencia de secuencias exclusivas en <i>C. fetus</i>	42
Diseño de oligonucleótidos para la amplificación <i>in silico</i> de genes únicos de <i>C. fetus</i>	43
Amplificación <i>in silico</i> de genes específicos de <i>C. fetus</i>	44
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS	56
REFERENCIAS.....	57
ANEXO 1.....	70
ANEXO 2.....	78
ANEXO 3.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFLP: *Amplified fragment length polymorphism* / Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado

ARN: Ácido ribonucleico

BBH: *Bidirectional Best Hits* / Mejor éxito bidireccional

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* / Herramienta básica de búsqueda en alineamiento local

BLASTn: *nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* / Herramienta básica de búsqueda en alineamiento local de nucleótidos

Cf: *Campylobacter fetus*

Cff: *Campylobacter fetus* subespecie *fetus*

Cft: *Campylobacter fetus* subespecie *testudinum*

Cfv: *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis*

Cfvi: *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis* biovar *intermedius*

COG: *Clusters of Orthologous Groups* / Agrupaciones de grupos ortólogos

DALY: *Disability Adjusted Life Years* / Años de vida ajustados por discapacidad

DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* / Electroforesis en gel por gradiente desnaturizante

EII: Enfermedades Inflamatorias del Intestino

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* / Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

EPG: Ensayo de Protección con Gentamicina

EUA: Estados Unidos de América

FISH: *Fluorescent in situ Hybridization* / Hibridación fluorescente *in situ*

GO: *Gene Ontology* / Ontología de genes

HMM: *Hidden Markov Models* / Modelos ocultos de Markov

ICT: *Immunochromatographic Tests* / Prueba inmunocromatográfica

ISSR: *Inter Simple Sequence Repeats* / Inter secuencias simples repetidas

MALDI-TOF MS: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry* / Espectrometría de masas por tiempo de vuelo de ionización / desorción láser asistida por matriz

ME: Microscopía Electrónica

NCBI: *National Center of Biotechnology Information* / Centro Nacional de Información Biotecnológica

OMCL: *Ortho Markov Clusters* / Grupos ortólogos de Markov

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: *Open Reading Frame* / Marco abierto de lectura

PCR: *Polimerase Chain Reaction* / Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: *quantitative Polimerase Chain Reaction* / Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RAPD: *Randomly Amplified Polymorphic DNA* / ADN polimórfico amplificado aleatoriamente

RBH: *Reciprocal Best Hits* / Mejores éxitos recíprocos

RUCS: *Rapid Identification of PCR Primers for Unique Core Sequences* / Identificación rápida de cebadores de PCR para secuencias centrales únicas

SLP: *Surface Layer Protein* / Proteína de la capa superficial

SNP: *Single Nucleotide Polimorfism* / Polimorfismo de un solo nucleótido

T-RFLP: *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* / Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal

UE: Unión Europea

RESUMEN

El género *Campylobacter* está conformado por 33 especies de bacterias Gram-negativas genéticamente heterogéneas que han sido aisladas a partir de una gran diversidad de ambientes y un amplio rango de organismos. Algunas especies de *Campylobacter* coexisten en sus hospederos como bacterias comensales, mientras que otras son oportunistas o patógenas que provocan muy diversas patologías y sintomatología. De manera preocupante, las opciones terapéuticas para contrarrestar a bacterias patógenas de *Campylobacter*, son cada vez más limitadas por la alta frecuencia con la que se aíslan cepas resistentes a varios antibióticos. Entre las especies de *Campylobacter*, *C. fetus* es relevante por el impacto que tiene en la salud humana y veterinaria. En los seres humanos, *C. fetus* es el agente etiológico de bacteriemias y sepsis (principalmente en pacientes inmunocomprometidos); en bovinos y ovinos provoca abortos e infertilidad, generando pérdidas económicas en la producción pecuaria. Contar con un diagnóstico molecular eficaz, rápido y de bajo costo para este patógeno es clave para su prevención o tratamiento adecuado. En el presente trabajo, utilizando herramientas bioinformáticas, se realizó un análisis pangenómico para estudiar la diversidad genética del género *Campylobacter*. El análisis de genómica comparativa de 237 genomas cerrados procedentes de 21 especies de *Campylobacter*, reveló un pangenoma de 12,325 genes, con un genoma central o *core* de 261 genes, un genoma accesorio de 4,088 genes y un genoma único de 7,976 genes. El genoma central del género *Campylobacter* incluye principalmente genes necesarios para el crecimiento y reproducción de las bacterias, pero también se encontraron genes involucrados en la interacción con el hospedero, así como determinantes genéticos asociados con la resistencia a antibióticos. La filogenia de máxima parsimonia construida con los datos de presencia/ausencia de los genes, agrupó a las 21 especies en 6 grupos filogenéticos definidos. Adicionalmente, los resultados de genómica comparativa mostraron que *C. fetus* está entre las tres especies de todas las analizadas que contiene el mayor número de genes únicos (454), de los cuales 249 tienen función desconocida. Al realizar diversos análisis *in silico* usando genomas públicamente disponibles, se corroboró la especificidad para 3 de las secuencias de nucleótidos únicas de *C. fetus*, es decir, dichas secuencias se localizaron exclusivamente en genomas de esta especie. Por lo anterior, estas 3 secuencias tienen el potencial de usarse como marcadores moleculares específicos para la detección de *C. fetus*.

ABSTRACT

The genus *Campylobacter* groups 33 Gram-negative bacteria species, which are genetically heterogeneous and have been isolated from a great diversity of environments and a wide range of hosts. Some *Campylobacter* species are commensal bacteria, while others are opportunistic or pathogenic, causing different pathologies and symptoms. Due to the high frequency with which antibiotic resistant *Campylobacter* strains are isolated, the effective use of antibiotics is compromised, restricting the therapeutic options to treat the illness produced by pathogenic *Campylobacter*. Within *Campylobacter* species, *C. fetus* have a relevant impact on human and veterinary health. In humans, *C. fetus* is the etiologic agent of bacteremia and sepsis (mainly in immunocompromised patients); in cattle and sheeps it triggers abortions and infertility, causing economic losses in livestock production. Having an effective, rapid and low-cost molecular diagnosis for this pathogen is the key to its prevention or proper treatment. In the present work, using bioinformatics tools, a pangenomic analysis was performed to investigate the genetic diversity of the genus *Campylobacter*. Comparative genomic analysis of 237 closed genomes from 21 *Campylobacter* species revealed a pangenome of 12,325 genes, with a core genome of 261 genes, an accessory genome of 4,088 genes, and a unique genome of 7,976 genes. The core genome mainly includes genes necessary for the growth and reproduction of bacteria, but genes involved in the interaction with the host were also found, as well as genetic determinants associated with resistance to antibiotics. The maximum parsimony phylogeny constructed with the presence/absence data of the genes, grouped the 21 species into 6 defined phylogenetic groups. Additionally, the comparative genomics results showed that *C. fetus* is in the top three of all analyzed species that contains the highest number of unique genes (454), of which 249 have unknown function. *In silico* analyses using publicly available genomes were conducted to corroborate that 3 unique nucleotide sequences of *C. fetus* are located exclusively on genomes of this species. Therefore, these 3 sequences have the potential to be used as specific molecular markers for the detection of *C. fetus*.

INTRODUCCIÓN

Bacterias patógenas

Diferentes microorganismos, entre los que se incluyen bacterias, protozoarios, hongos y virus, tienen la capacidad de provocar enfermedades o daños a su huésped, por lo que se les domina microorganismos patógenos, los cuales pueden generar distintos grados de daño, o sea distintos niveles de virulencia. Específicamente, las bacterias patógenas utilizan diversos mecanismos moleculares asociados a la virulencia durante el proceso infeccioso, el que tiene diferentes etapas y éstas se presentan, o no, dependiendo de la especie de bacteria, y consisten en: adhesión, colonización, invasión, multiplicación, evasión de la respuesta inmune, diseminación y daño al huésped. Los patógenos bacterianos pueden distribuirse en diferentes nichos tales como el suelo, aguas marinas y estuarinas, el tracto intestinal de los animales, alimentos provenientes de origen animal, agua contaminada con materia fecal, entre otros. Algunas de las enfermedades más comunes provocadas por bacterias patógenas en humanos son listadas en la Tabla 1. Un factor que apoya a la idea antes mencionada es que algunos de estos microorganismos son resistentes a distintas condiciones ambientales, que pueden ser adversas y, al sobrevivir, se convierten en un peligro para la mayoría de la población humana la cual queda susceptible a ellos, generando enfermedades graves con una alta tasa de mortalidad (Ivnitski *et al.*, 1999).

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades infecciosas representaron el 25% (15,000,000) del total (57,000,000) de muertes ocurridas durante el 2002 a nivel mundial (OMS, 2003) y en muchos países en desarrollo, las enfermedades infecciosas microbianas constituyen la principal causa de muerte.

Bacterias patógenas que se transmiten por animales del sector pecuario

En los países industrializados, se han realizado esfuerzos para la erradicación sistemática de algunas enfermedades del ganado y la reducción drástica de la incidencia de otras. Sin embargo, el mantenimiento de esta situación es cada vez más difícil debido a la resistencia que con mayor frecuencia presentan un número creciente de microorganismos a los antimicrobianos en uso. Los antimicrobianos se emplean ampliamente en el sector ganadero y no sólo con fines terapéuticos. Es una práctica común, en los sistemas agrícolas modernos con alta densidad animal, complementar el alimento con dosis subterapéuticas de antimicrobianos a fin de aumentar las tasas de crecimiento. Además, también se usan con fines profilácticos. Debido a la presión de selección natural ejercida por la exposición constante a antimicrobianos, en los últimos años se han seleccionado un mayor número de microorganismos resistentes. La resistencia a antibióticos es un proceso natural en la evolución de las bacterias, la cual está regida por la presión de selección que ejercen los antibióticos y por características biológicas propias de las bacterias como la plasticidad genética y sus altas tasas de replicación, sin embargo, existen factores antropogénicos sin precedente que han contribuido significativamente a la acelerada selección de bacterias resistentes; uno de los principales es el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos en la medicina humana y veterinaria (Holmes *et al.*, 2016).

Tabla 1. Enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas en humanos (Tomado de Ivnitskiet *al.*, 1999).

Bacteria	Enfermedad	Toxina	Fuente de infección	Mortalidad
<i>Bacillus anthracis</i>	Ántrax	Factor de edema	Leche o carne	Fatal
<i>Brucella melitensis</i>	Brucelosis	-	Leche o carne	Baja
<i>Campylobacter jejuni</i>	Diarrea disenterica	-	Carne, hongos	-
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo	Neurotoxina	Alimentos enlatados	-
<i>Coxiella brunetti</i>	Neumonía	-	Polvo de suelo contaminado	Baja
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria	Toxina diftérica	Contacto humano	Baja
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis	Enterotoxina	Carne, pescado, leche, arroz, vegetales	-
<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia	-	Tejido animal infectado	Baja
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	-	Ambientes contaminados	Alta
<i>Rickettsia rickettsi</i>	Fiebre de la montaña	-	-	Alta
<i>Salmonella Paratyphi</i>	Paratifoidea	-	Contaminación fecal, huevos, leche, carnes	-
<i>Salmonella Typhi</i>	Fiebre tifoidea	-	Contaminación fecal	Alta
<i>Shigella dysenteriae</i>	Disenteria bacilar	Neurotoxina	Contaminación fecal	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Neumonía	Enterotoxina	Contacto humano	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Neumonía pneumococal	Toxina eritrogénica	Contacto humano	-
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis	-	Exudados infectados o sangre	-
<i>Vibro cholerae</i>	Cólera	Enterotoxina	Contaminación fecal	Alta
<i>Yersinia pestis</i>	Fiebre bubónica	Toxina	Animales y humanos	Fatal

La OMS define a las enfermedades zoonóticas como un grupo de enfermedades infecciosas que se transmiten de forma natural de los animales a los seres humanos, estos animales pueden ser domésticos o silvestres. El mayor riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas se encuentra en la interfaz entre el ser humano y los animales, a través de la exposición directa (por contacto) o indirecta (consumo de productos derivados de animales como la carne, leche, huevos). En cuanto a las zoonosis provocadas por animales domésticos, existen muchas bacterias patógenas que provienen de animales de producción, entre las que se encuentran *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli*. Las enfermedades producidas por especies del género *Campylobacter* son las de mayor prevalencia en el ganado (Tabla 2) (Pachepsky *et al.*, 2006).

Tabla 2. Principales patógenos bacterianos que producen zoonosis (Tomado de Manyi-Loh *et al.*, 2016).

Especie de bacteria patógena	Prevalencia en ganado (%)	Enfermedades/Síntomas	Referencias
<i>E. coli</i> O157:H7	16	Diarrea leve a sanguinolenta, vómitos, síndrome hemolítico-urémico, colitis hemorrágica	Olson [25] Chekabab <i>et al.</i> [26]
<i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Dublin	0 a 13	Salmonelosis	You <i>et al.</i> [27] Martin [8]
<i>Campylobacter</i> spp.	31.1	Campilobacteriosis, síndrome de Guillain-Barre, artritis reactiva y síndrome de intestino irritable postinfeccioso	Hakkinen <i>et al.</i> [28] Olson [25]
<i>Listeria monocytogenes</i>	24.4	Listeriosis, similar a la gripe, vómitos, diarrea, meningitis, septicemia, abortos espontáneos	Nightingale <i>et al.</i> [29] Nicholson <i>et al.</i> [30] Vivante <i>et al.</i> [31]
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<1	Yersiniosis, diarrea, linfadenitis, neumonía, abortos	Tirzui <i>et al.</i> [32] Olson [25]

Adicionalmente, existe una gran variedad de microorganismos habitando diferentes nichos dentro del procesamiento de los productos cárnicos dentro de la industria: microorganismos provenientes de la microbiota propia de los animales; microorganismos que yacen en los ambientes donde se lleva a cabo el sacrificio de los animales y los cortes de la carne; microorganismos que viajan a través del personal encargado de procesar la carne, así como los que habitan dentro del mismo personal y pueden transmitirse hasta los productos ya procesados. Por lo tanto, además de las bacterias patógenas asociadas a animales que pueden persistir en éstos hasta su consumo por el hombre, existe un riesgo adicional de contaminación de la carne con bacterias patógenas durante su procesamiento y almacenamiento (Bintsis, 2017).

Adicional a la problemática de los patógenos transmitidos por los alimentos, existen bacterias responsables del deterioro de éstos, las cuales pueden ocasionar grandes pérdidas económicas. Su crecimiento y actividad metabólica durante la vida útil de los productos derivados propicia defectos de color, olor, sabor o textura y esto genera pérdidas de dichos productos alimenticios y, por lo tanto, tienen un impacto importante en la economía del sector de producción carnica (Rouger, A., Tresse, O., & Zagorec, M., 2017).

Dos de los principales patógenos transmitidos por el consumo de alimentos (como la carne) y agua contaminada, y que son los responsables de la mayor parte de los casos de gastroenteritis humana son las especies de los géneros *Salmonella* y *Campylobacter*. De éstos, *Campylobacter* ha sido, en años recientes, el patógeno bacteriano gastrointestinal mayormente reportado en humanos dentro de la UE, con 229,213 casos confirmados en el 2016 (Authority E.F.S, 2017). También se ha demostrado que el consumo de aves de corral fue la primera causa de brotes transmitidos por alimentos en los EUA, entre 1998 y 2012 (Chai *et al.*, 2017).

Es por esto que la implementación estratégica de medidas de control biológico multifacéticas para reducir la transmisión de este grupo de patógenos es fundamental para la salud pública.

El género *Campylobacter*

El género *Campylobacter* agrupa especies biológicamente diversas e incluye 33 especies descritas validadas: *C. armoricus*, *C. avium*, *C. blaseri*, *C. canadensis*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. corcagiensis*, *C. cuniculorum*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. geochelonis*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hepaticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis*, *C. iguaniorum*, *C. insulaenigrae*, *C. jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. novaezeelandiae*, *C. ornithocola*, *C. peloridis*, *C. pinnipediorum*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum*, *C. subantarcticus*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus* and *C. volucris* (<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>).

Los organismos integrantes de este género pertenecen al grupo de las Epsilon-proteobacterias; se caracterizan por su forma de espiral (forma de S) y tamaño, que va de 0.2-0.8 x 0.5-5 µm. Varias especies son móviles por el flagelo polar, bipolar o múltiples flagelos, mientras que otras pueden ser inmóviles. Las condiciones óptimas de crecimiento van de 37-42°C, aunque algunas especies (*C. fetus*) pueden crecer entre los 25 y 37°C. Son especies susceptibles al oxígeno (O₂) y requieren una atmósfera microaerófila; la concentración óptima de O₂ es 5%, de dióxido de carbono (CO₂) es 10% y de nitrógeno (N₂) es 85%. Su principal fuente de energía es obtenida a través de los aminoácidos o de intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico, aunque también pueden fermentar algunos carbohidratos, más no oxidarlos. Algunas especies son capaces de reducir nitrógeno (Sahin, Yaeger, Wu & Zhang, 2017).

El contenido de G-C varía de 29-47%; desde la revisión taxonómica del género en 1991, la clasificación de este grupo de bacterias se ha basado en la filogenia, haciendo énfasis que esta taxonomía unificó especies con morfologías celulares extremadamente diferentes y un rango de proporción de G-C que excede al de la mayoría de los géneros de bacterias bien definidos (Bergey's Manual, 2005). Además, estudios de secuenciación masiva de genomas de distintas especies de *Campylobacter* han revelado que existe una variación genética considerable entre las especies, así como dentro de las cepas de una misma especie (Sahin *et al.*, 2017).

Campylobacter se diferencia de otros grupos de bacterias relacionados como *Arcobacter* y *Helicobacter* principalmente por las distintas temperaturas de crecimiento que tienen estos tres grupos, así como la aerotolerancia presentada por *Arcobacter*. Además, el análisis de las quinonas respiratorias permite una clara diferenciación de las cepas de *Campylobacter* con las de este par de géneros, sin embargo, este método sigue siendo limitado (Sahin *et al.*, 2017).

Dado que la clasificación taxonómica ha sido de gran importancia para darle identidad a las especies de este género, se han realizado diversos análisis filogenéticos del género. En los últimos años, las especies de *Campylobacter* se han catalogado de distintas maneras, distribuyéndolas en dos clados definidos, teniendo en un clado a especies como *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* y *C. helveticus* y en otro a *C. fetus* y *C. hyointestinalis*, mientras que las demás especies se presentan dispersas formando otros subclados (Sahin *et al.*, 2017). Sin embargo, en trabajos más recientes, se puede apreciar que las especies de *Campylobacter* se agrupan en cinco grupos filogenéticos, de los cuales todos contienen representantes patógenos (Figura 1), lo que destaca la relevancia clínica de todo el género.

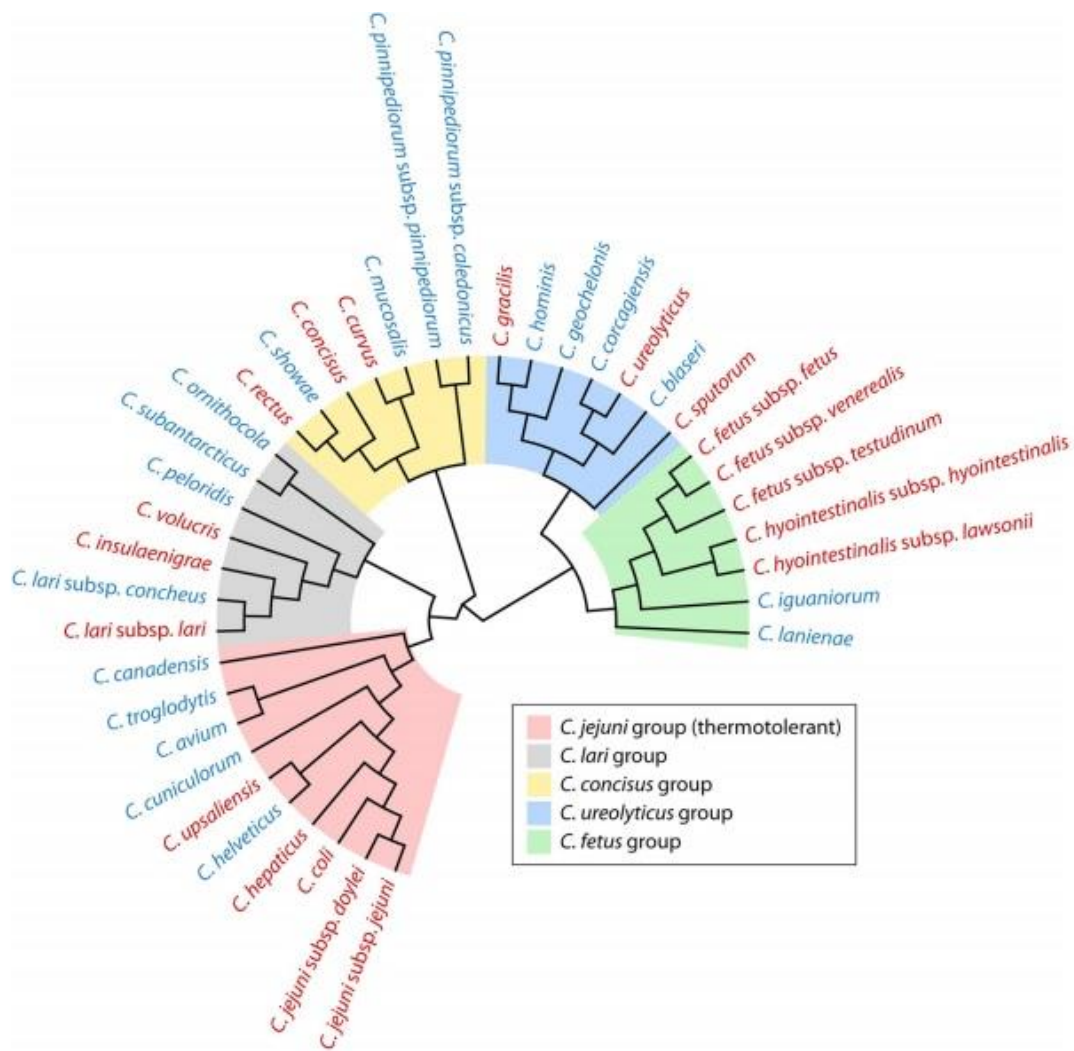


Figura 1. Filogenia de las especies de *Campylobacter* que dividen al género en 5 grupos, nombrados como grupo *C. jejuni* (rojo), grupo *C. lari* (gris), grupo *C. concisus* (amarillo), grupo *C. ureolyticus* (azul) y grupo *C. fetus* (verde). Los grupos fueron nombrados considerando a la especie más relevante a nivel clínico presente en cada grupo. Las especies con nombre en color rojo son aquellas que se han reportado que causan enfermedades en humanos o en otros animales, mientras que las de color azul no se ha reportado que generen una infección (Tomado de Costa & Iraola, 2019).

Importancia epidemiológica de *Campylobacter* spp.

En los humanos, *Campylobacter* spp. causa campilobacteriosis, la cual es considerada la mayor enfermedad zoonótica transmitida a través de los alimentos, así como la causa más común de gastroenteritis en el mundo (EFSA and ECDC, 2018) (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>). *C. jejuni* y *C. coli* son las especies de *Campylobacter* que más frecuentemente se encuentran relacionadas con la gastroenteritis humana, por lo que estas dos especies han sido, por mucho, las más estudiadas (Man, 2011; Kaakoush *et al.*, 2015). No obstante, otras especies como *C. concisus*, *C. lari*, *C. upsaliensis* y *C. ureolyticus*, también han comenzado a ser reconocidas como agentes causantes de campilobacteriosis humana y de animales; siendo así, que son conocidas como especies emergentes de *Campylobacter* (Man, 2011). El término de especies emergentes es usado para describir sus roles poco apreciados en enfermedades humanas y animales; se piensa que estas especies emergentes contribuyen a la

etiología de la gastroenteritis, especialmente en los casos que no tienen asociación conocida con otros patógenos establecidos (Kaakoushet *et al.*, 2015).

La incidencia y la prevalencia de campilobacteriosis han aumentado tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo en los últimos 10 años. En el 2010, la carga global de infecciones causadas por *Campylobacter* fue de 95,613,970 casos clínicos; 21,374 muertes y 2,141,926 DALYs (del inglés *Disability Adjusted Life Years*) (Havelaar *et al.*, 2015). La campilobacteriosis puede causar signos clínicos que van desde leves hasta graves, o incluso asintomáticos. Los síntomas más comunes de las infecciones entéricas causadas por *Campylobacter* incluyen diarrea (en ocasiones sangrienta), fiebre, dolores abdominales, dolor de cabeza, náusea y/o vómito. En la población vulnerable, como niños muy pequeños, pacientes de mayor edad o inmunocomprometidos, esta enfermedad puede ser mortal (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>). Además, pueden aparecer otras manifestaciones gastrointestinales, o incluso, complicaciones extragastrointestinales graves que pongan en riesgo la vida del paciente (Man, 2011; Kaakoush *et al.*, 2015). Debido a que muchas de las infecciones entéricas por *Campylobacter* son autolimitantes, la administración de antibióticos usualmente no se requiere. El tratamiento con antibióticos se recomienda para pacientes con síntomas clínicos graves, recaídas, o cuando presentan un proceso de infección prolongado (Tang *et al.*, 2017). En esos casos, se administran fluoroquinolonas como ciprofloxacino y macrólidos como eritromicina (Ge *et al.*, 2013).

En los seres humanos, además de causar una variedad de afecciones gastrointestinales, que incluyen enfermedades inflamatorias del intestino (EII), gastroenteritis y cáncer colorrectal, también se ha reportado que algunas especies de *Campylobacter* están involucradas en el desarrollo de manifestaciones extragastrointestinales, como bacteriemia, infecciones pulmonares, abscesos cerebrales, meningitis y artritis reactiva, así como el síndrome de Guillain-Barre. Kaakoush y colaboradores presentan una tabla donde se enlistan las especies hasta ahora descritas que causan afecciones a los seres humanos (Tabla 3). No se ha informado asociación de enfermedades en humanos para *C. avium*, *C. canadensis*, *C. corcagiensis*, *C. cuniculorum*, *C. lanienae*, *C. lari* subsp. *concheus*, *C. peloridis*, *C. subantarcticus* o *C. volucris* (Kaakoush *et al.*, 2015). A pesar de que el papel preciso de las especies de *Campylobacter* en el desarrollo de estas condiciones clínicas es en gran parte desconocido, se ha reportado que existe una asociación entre distintas especies emergentes de *Campylobacter* (*C. concisus*, *C. showae*, *C. hominis*, *C. gracilis*, *C. rectus* y *C. ureolyticus*) junto con la enfermedad de Crohn (Zhang L., *et al.*, 2009).

C. jejuni y otras especies relacionadas del género son comensales en muchas aves y mamíferos domésticos y silvestres (Tabla 4). En vacas, ovejas y cerdos, algunas especies de *Campylobacter* pueden causar una gran variedad de trastornos. Por ejemplo, *C. jejuni* y *C. fetus* causaron abortos, mortinatos o nacimiento de corderos débiles en ovejas en algún momento del final del embarazo (Salihu M.D., *et al.*, 2009).

Tabla 3. Especies del género *Campylobacter* y su relevancia clínica para los humanos (Tomado de Kaakoush *et al.*, 2015).

Especie de <i>Campylobacter</i>	Manifestaciones clínicas
<i>C. coli</i>	Patógeno establecido en la gastroenteritis; también se encuentra en la sangre, meningitis y colecistitis aguda
<i>C. concisus</i>	Patógeno emergente asociado con gastroenteritis y EII (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); también se encuentra en la esofagitis de Barrett, la sangre y el absceso cerebral
<i>C. curvus</i>	Presente en la gastroenteritis, colitis ulcerosa, esofagitis de Barrett, sangre, hígado y abscesos bronquiales
<i>C. fetus</i>	Asociada con bacteriemia; también está presente en la gastroenteritis, abscesos cerebrales, absceso epidural aspirado, líquido cefalorraquídeo, celulitis, endocarditis, aneurisma micótico de la aorta abdominal y peritonitis
<i>C. gracilis</i>	Patógeno periodontal potencial; también se encuentra en las EII, infección de cabeza y cuello y absceso cerebral
<i>C. hominis</i>	Se encuentra en la sangre y en las EII (posiblemente un comensal en el intestino)
<i>C. helveticus</i>	Presente en la gastroenteritis
<i>C. hyointestinalis</i>	Se encuentra en la gastroenteritis y en la sangre
<i>C. insulaenigrae</i>	Se encuentra en la gastroenteritis y en la sangre
<i>C. jejuni</i>	Patógeno establecido en la gastroenteritis y posible agente predisponente en la EII, Síndrome de intestino irritable (SII) postinfeccioso y enfermedad celíaca; la infección puede provocar secuelas en las formas del síndrome de Guillain-Barré, el síndrome de Miller Fisher, la parálisis de Bell (parálisis facial unilateral) y la artritis reactiva; se encuentran en las EII, sangre, miocarditis, meningitis, colecistitis aguda, infección del tracto urinario y enfermedades febriles agudas asociadas con leucopenia o trombocitopenia
<i>C. lari</i>	Asociado a la gastroenteritis; también encontrado en sangre
<i>C. mucosalis</i>	Presente en la gastroenteritis
<i>C. rectus</i>	Putativo patógeno periodontal; también se encuentra en gastroenteritis, EII, absceso vertebral, sangre, infección necrotizante de tejidos blandos y pus
<i>C. showae</i>	Se encuentra en las EII, absceso intraorbital y sangre
<i>C. sputorum</i>	Presente en gastroenteritis, absceso axilar y sangre
<i>C. upsaliensis</i>	Patógeno emergente en la gastroenteritis; también se encuentra en el absceso mamario, la sangre y la placenta
<i>C. ureolyticus</i>	Asociado a gastroenteritis y a EII; también se encuentra en los abscesos orales, perianales y de tejidos blandos, infecciones de tejidos blandos o huesos, y úlceras o lesiones gangrenosas de la extremidad inferior

Tabla 4. Principales especies de *Campylobacter* y sus distintos hospederos

	Humano	Aves	Conejo	Bovino	Ovino	Caprino	Porcino	Otros
<i>C. coli</i>	X	X		X	X	X	X	
<i>C. jejuni</i>	X	X	X	X	X	X	X	
<i>C. fetus</i>	X			X	X	X		X
<i>C. hominis</i>	X							
<i>C. upsaliensis</i>	X	X						X
<i>C. helveticus</i>	X	X						X
<i>C. avium</i>		X						
<i>C. hyoilei</i>		X					X	
<i>C. iguaniorum</i>								X

Fuentes: Man, 2011; Huang, Brooks, Lowman & Carrillo, 2015; Kaakoush *et al.*, 2015; Costa & Iraola, 2019.

Métodos de identificación del género *Campylobacter*

La identificación de las campilobacterias como organismos de importancia médica y veterinaria, en relación a enfermedades gastrointestinales ha ido tomando mayor importancia a través del tiempo, por lo que se ha incrementado el desarrollo de métodos de diagnóstico para este tipo de bacterias. Sin embargo, debido a que *C. jejuni* y *C. coli* son las especies que presentan una mayor incidencia en los seres humanos, la gran mayoría de los métodos de diagnóstico se han enfocado a la detección de dichas especies. El resto de las especies del género han sido menos estudiadas, aun así, la implementación de técnicas moleculares y la mejora de los cultivos y condiciones de crecimiento han permitido la descripción e identificación de diversas especies de *Campylobacter* distintas a *C. jejuni* y *C. coli*, como patógenos relevantes para los humanos y otros animales (Costa & Iraola, 2019).

Como ya se ha mencionado, las campilobacterias necesitan condiciones ambientales específicas para poder crecer de manera *in vitro*, lo que ha dificultado su identificación a través de métodos convencionales de identificación bacteriana. Las necesidades para obtener la identificación correcta de estas bacterias van desde los medios de cultivo especializados, temperaturas exactas para el crecimiento, así como varios días dentro de cámaras microaerófilas que satisfagan las necesidades de crecimiento de los microorganismos. Por todo esto, se han intensificado los esfuerzos por lograr una mejor detección a través de distintos métodos. Por ejemplo, el uso de inmunoensayos enzimáticos aplicados a muestras *in vivo*, han identificado con una gran eficiencia algunas especies de *Campylobacter* como *C. jejuni* y *C. coli* (Granato *et al.*, 2010). No obstante, la heterogeneidad en la composición genómica, así como la expresión fenotípica que difiere en las distintas cepas de varios grupos de campilobacterias puede complicar el uso de este tipo de métodos de identificación *in vivo*.

Otra técnica de detección de campilobacterias que se ha utilizado es PCR Múltiple, que en algunos estudios ha demostrado ser deficiente para identificar a *Campylobacter*, en comparación con otras especies como *Salmonella* spp. o *Shigella* spp. (Sawadogo *et al.*, 2017), pero no porque la técnica sea ineficiente *per se*, si no por el uso de oligonucleótidos inespecíficos para detectar específicamente a ciertas especies. Ahora, se han comparado distintos tipos de técnicas para dilucidar la de mayores ventajas a la hora de realizar detecciones prontas en un ambiente hospitalario, y se ha reportado que una de las mejores técnicas, además de la PCR y los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), son las pruebas inmunocromatográficas (ICT) (Bessède *et al.*, 2018), la cual utiliza un sistema simple de captura de antígenos diana (en ocasiones anticuerpos) de las muestras, lo que finalmente formará un patrón de color específico que dará como resultado una prueba positiva o negativa, y así corroborar la detección del patógeno en cuestión (El-Moamly, 2014).

A la fecha existen métodos que aseguran una detección de *Campylobacter* con el 100% de sensibilidad, tal es el caso de la prueba *Orion GenRead Campylobacter*®, la cual es un kit que ofrece obtener resultados precisos en un periodo corto de tiempo (menos de una hora). Con la gran limitante de necesitar aparatos específicos para su aplicación y, lo más importante, sólo detecta campilobacterias termotolerantes como *C. jejuni*, *C. coli* o *C. lari*, pero no detecta a *C. fetus* (Buissonnière *et al.*, 2018).

Si bien se han utilizado técnicas con altos índices de resultados para identificar a las campilobacterias, como la aplicación de la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), las secuencias usadas para realizar la técnica no son específicas para las distintas especies, ya que presentan hasta el 100% de similitud entre subespecies y otras especies. Tal como lo podemos ver en el

estudio de Wolf-Jäckel, Boye, Angen, Müller & Jensen (2020), donde la secuencia usada en la sonda es idéntica entre las subespecies de *C. fetus*, junto con la de *C. avium*, y varía por un nucleótido con la de *C. upsaliensis*.

Patogénesis

La heterogeneidad genética y fenotípica natural de las especies de *Campylobacter* ha hecho que el estudio de la patogenicidad de este agente infeccioso sea particularmente desafiante. Sin embargo, se ha logrado comprender el papel de factores como la toxina citoletal de distensión (Lara-Tejero & Galán, 2000; Ge *et al.*, 2008), así como la glicosilación y los procesos moleculares de mimetismo (Guerry y Szymanski, 2008; Nothaft y Szymanski, 2010). En la mayoría de los estudios se reportan los mecanismos de patogénesis de aquéllas especies que tienen mayor interés debido a su incidencia en el sector salud, es decir, *C. jejuni* y *C. coli*. A pesar de los esfuerzos que se han realizado para entender la patogenicidad de estas especies, aún no se comprende del todo. Algunos de los problemas por los cuales se complica el estudio de la patogénesis de este organismo es que el cuadro clínico que genera puede confundirse con el de otras especies de bacterias. Asimismo, hay pocos modelos que imitan la enfermedad diarreica humana. Otra característica de *C. jejuni*, que probablemente ha confundido los estudios de patogénesis, es la variabilidad que resulta de la variación de fase de genes específicos y las variaciones en el complemento genético entre las cepas (Frédéric Poly & Patricia Guerry, 2008).

Mecanismo de invasión

En uno de los primeros reportes que investigaron las biopsias intestinales de pacientes humanos infectados con especies de *Campylobacter* indicaron que *C. jejuni* puede ingresar a las células del tejido intestinal *in vivo* (van Spreeuwel *et al.*, 1985). Además, se ha demostrado que *C. jejuni* puede invadir y sobrevivir dentro de distintas líneas celulares cultivadas *in vitro*; varios factores moleculares de *C. jejuni* asociados con la motilidad, la glicosilación, la síntesis capsular y la adherencia han sido implicados en el proceso de invasión (Cossart y Sansonetti, 2004).

El método de laboratorio comúnmente usado para monitorear la adherencia y la invasión de las bacterias es el ensayo de protección con gentamicina (EPG), además se han utilizado enfoques de inmunofluorescencia y microscopía electrónica (ME). Sin embargo, aún no está claro qué mecanismo de invasión, "cremallera" o "gatillo", es utilizado por *C. jejuni*. El mecanismo de "cremallera" de invasión implica la unión de alta afinidad de las adhesinas de la superficie bacteriana a sus receptores afines en células de mamíferos, que se requiere para iniciar el cierre de la membrana del citoplasma de la célula huésped alrededor de la bacteria, posteriormente, la bacteria se internaliza en una vacuola. El mecanismo de "gatillo" es utilizado por *Shigella* o *Salmonella* spp. que también colonizan el epitelio intestinal. Estos patógenos utilizan un sistema de secreción tipo III o tipo IV para inyectar varias proteínas efectoras en el citoplasma de la célula huésped. Estos factores manipulan una variedad de eventos de señalización, incluida la activación de las pequeñas GTPasas Rho y la reorganización del citoesqueleto para inducir re-arreglos en la membrana y posteriormente, la captación de la bacteria. Como consecuencia de esta señalización, las bacterias se internalizan en una vacuola, seguida de la inducción de diferentes vías de señalización para la supervivencia y el tráfico intracelular. La investigación de ME de alta resolución no polarizado de células INT-407 infectadas y otras líneas celulares, indicaron que *C. jejuni* induce el movimiento de la membrana de una manera dependiente del contacto, seguida por la entrada en la célula huésped, primero con su punta flagelar, seguida

por el extremo flagelar opuesto, compartiendo algunas características de los mecanismos de “cremallera” y “gatillo” (O Cróinín, 2012).

Campylobacter fetus

La especie *C. fetus* es considerada un patógeno del ganado que causa problemas reproductivos, y más recientemente, un patógeno oportunista que cada vez se reporta con mayor frecuencia en humanos, así como en otro tipo de animales como reptiles.

En la actualidad, *C. fetus* se divide en tres subespecies: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (Cfv), *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff), y *C. fetus* subsp. *testudinum* (Cft), dos de las cuales (Cff y Cfv) se aíslan principalmente de humanos y bovinos, respectivamente, y se logran caracterizar y diferenciar, a través de pruebas bioquímicas como el crecimiento en 1% de glicina, así como la producción de H₂S. Cabe mencionar que también está descrita una variante bioquímica que difiere de su pariente más cercano en cuanto a tolerar la glicina, la cual está definida como *C. fetus venerealis biovar intermedius* (Cfvi). La subespecie Cft difiere genéticamente de las otras dos y se ha aislado principalmente de reptiles y con menor frecuencia de humanos (Farace *et al.*, 2019; Costa & Iraola, 2019).

La infertilidad enzoótica infecciosa producida en el ganado bovino, así como abortos en ovinos, caprinos y bovinos es debido a Cfv. El aborto séptico, generalmente epizoótico en ovejas, se ha asociado históricamente con Cff y en menor medida con *C. jejuni* (Sahin *et al.*, 2017). Cff exhibe una amplia distribución de hospederos, coloniza el tracto gastrointestinal y generalmente se asocia con abortos transmitidos horizontalmente en ovejas y vacas, mientras que Cfv tiene un rango de hospederos muy estrecho, está restringido al tracto genital bovino y es la causa principal de infertilidad infecciosa transmitida de forma venérea y mortalidad embrionaria en el ganado (Skirrow, 1994). Para Cff, las proteínas de capa superficial (SLP), una familia de proteínas altamente antigénicas con masas moleculares variables en el rango de 97–147 kDa en la superficie bacteriana, representan el único factor bacteriano específico caracterizado hasta ahora como esencial para la patogenia del aborto en ovejas (Grogono-Thomas *et al.*, 2003). Asimismo, recientemente se ha reportado la capacidad de *C. fetus* para internalizarse en células epiteliales del intestino de bovinos y su supervivencia dentro de éstas (Campos-Múzquiz, Méndez-Olvera, Arellano-Reynoso & Martínez-Gómez, 2019).

En humanos, las subespecies Cff y Cft son consideradas patógenos oportunistas y pueden causar bacteriemia y sepsis, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. En los últimos años se han reportado muchos casos de infecciones humanas que refuerzan el papel de *C. fetus* como un agente zoonótico emergente, especialmente en individuos que están en contacto cercano con animales (Wagenaar *et al.*, 2014).

Incidencia y patogénesis

La adquisición inicial de bacterias de esta especie en el ganado, así como su diseminación, puede causarse a través de la introducción de animales que contengan a la bacteria en rebaños donde dependiendo de la susceptibilidad de los animales, pueden causar brotes y epidemias, ya que *Campylobacter* spp. puede pasar como comensal del intestino y desencadenar una infección en un momento distinto que pueden ser hasta varios años después de su ingreso al hospedero (<https://somepomed.org/articulos/contents/mobipreview.htm?21/2/21536/abstract/3>).

En Australia se ha reportado que del total de los abortos que ocurren en un rebaño, aproximadamente 10.3-25.2% de los casos son causados por *Campylobacter*, no sólo *C. fetus*, sino también *C. jejuni*, ya que se ha reportado que esta especie se asocia a las llamadas “tormentas de abortos” en el ganado. En el 2005, esta bacteria se encontró en el 13.8% de los abortos y las muertes perinatales. En 1979, la incidencia de este patógeno fue mayor al 65% en varias regiones de Nueva Zelanda. Debido a que el periodo de gestación de los animales hospederos es de 5 meses, y que el aborto provocado por esta bacteria puede ocurrir en el último trimestre de gestación, la patología causada por esta bacteria provoca pérdidas importantes en cuanto a tiempo y alimento consumido por los animales infectados que no podrán reproducirse (Sahin *et al.*, 2017).

Al igual que para la mayoría de las especies, se desconocen los mecanismos bacterianos exactos que Cff posee para causar su patología. Se sabe que esta bacteria tiene elementos que le proveen de motilidad, quimiotaxis, adquisición de metales, mecanismos de respuesta a estrés, toxinas, lipopolisacáridos, capacidad de adhesión e invasión celular, entre otros. Se sabe bien que esta especie posee proteínas en superficie de membrana (SLP), las cuales son proteínas antigénicas con una variabilidad molecular de 97-147 kDa y representan el único factor de caracterización bacteriano asociado a los abortos en las ovejas. Las SLPs son codificadas por los genes *sap*, y tienen una gran diversidad antigénica. Por otro lado, se ha demostrado que Cff es más resistente a la actividad bactericida del sistema inmune en comparación con *C. jejuni* y *C. coli* (Sahin *et al.*, 2017).

Diagnóstico

Para realizar un diagnóstico efectivo, se recuperan bacterias obtenidas de la placenta y contenido estomacal de los fetos abortados. También se busca, a través de métodos de microscopía, la forma característica de S que tienen estos microorganismos. Para confirmar el diagnóstico se usan algunas técnicas como ensayos fenotípicos, ensayos de PCR o análisis de espectrometría de masas utilizando láseres e ionización (MALDI-TOF MS). En ovejas, se utiliza un PCR estándar para detectar tanto a Cff y *C. jejuni* directamente de tejido y placenta de fetos abortados (H, Hamali *et al.*, 2014).

Prevención y control

La vacunación se usa como el mejor método para prevenir la enfermedad causada por *Campylobacter*, el cual se ha demostrado experimentalmente en modelo de cuyos. No obstante, su aplicación resulta complicada debido a que las vacunas monovalentes están dirigidas a ciertas especies y los abortos se producen por varias especies (Cff, *C. jejuni*, *C. coli*). Las vacunas polivalentes tampoco aseguran protección completa. En Nueva Zelanda se utiliza desde los años 80 una vacuna comercial monovalente (Campylovexin®, Schering-Plough Animal Health Ltd.), que es considerada efectiva en contra de Cff, a pesar de que se han reportado abortos por esta misma especie en rebaños a los que se les aplicó la vacuna (SG, Fenwick, *et al.*, 2000; SA, Mannering, *et al.*, 2003). También existe una vacuna más reciente, la cual es bivalente para las especies de Cff y *C. jejuni* (Campyvax4®, Intervet Schering-Plough Anima Health Ltd.) y se ha reportado como más eficiente en contra de estas dos especies. Finalmente, también existen dos vacunas, utilizadas en Estados Unidos de América, en contra de las mismas dos especies, para prevenir abortos en ovejas, sin embargo, su eficiencia parece variar constantemente, ya que se han reportado abortos en rebaños donde se han utilizado este tipo de vacunas (Sahin *et al.*, 2017).

Identificación de bacterias patógenas en los alimentos

Un gran número de patógenos, que causa enfermedades conocidas, son transmitidos a través de los alimentos. Aproximadamente, más de 200 tipos de enfermedades acontecen en Estados Unidos cada año. Asimismo, se registran aproximadamente 8,000 muertes de más de los 75,000,000 de casos reportados a raíz de la contaminación por alimentos. La vigilancia y detección de bacterias patógenas asociadas a los alimentos y a los animales de producción en general, se complican por las cepas emergentes que habitualmente no se detectan, además de que muchas veces no está totalmente clara la vía de transmisión bacteriana (Gracias & McKillip, 2004).

En un trabajo realizado en 1999 (Mead *et al.*, 1999) se menciona la complejidad de la estimación del número total de enfermedades transmitidas por alimentos causadas por patógenos conocidos. Se sabe que es posible determinar el número de casos reportados por cada patógeno, sin embargo, los cálculos pueden llegar a ser muy complicados debido a la deficiente identificación del agente causante de la enfermedad; estos casos se informan al asociarse con brotes registrados, documentando la transmisión por alimentos, a través de sistemas de vigilancia pasiva, o mediante sistemas de vigilancia activa, como FoodNet (Mead *et al.*, 1999). Las enfermedades esporádicas causadas por algunos patógenos, como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, o *Staphylococcus aureus*, no son reportables a través de sistemas pasivos o activos, por lo que los únicos casos reportados son aquellos relacionados con brotes. Para estos patógenos se asume que, si se informaran casos esporádicos diagnosticados, el número total sería 10 veces el número de casos relacionados con brotes (Mead *et al.*, 1999).

Se ha reportado que el sector de la carne avícola tiende a proporcionar productos listos para el consumo, que son seguros para el consumidor y tienen una larga vida útil. Los peligros biológicos asociados con la producción y el consumo de carne de aves de corral han sido bien identificados, clasificando a *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. como de alto riesgo. Tal clasificación tomó en cuenta la gravedad de las enfermedades causadas por estos patógenos, su impacto en la salud humana, el número de casos y la ocurrencia del riesgo en la cadena de producción de carne de aves de corral (Rouger *et al.*, 2017).

Nuevos métodos y tecnologías innovadoras recientes permiten la enumeración y detección de patógenos en alimentos contaminados. Siendo los métodos moleculares aquellos que son capaces de detectar bacterias en tiempo real, esto debido a que son considerados rápidos, sensibles y específicos para el patógeno en cuestión (Gracias & McKillip, 2004). A través de estudios enfocados en el mejoramiento de la calidad de los productos cárnicos, se ha visto que la combinación de enfoques de secuenciación de alto rendimiento con métodos de cultivo altamente selectivos a lo largo de la cadena de producción, son necesarios para evaluar las fuentes contaminantes de la carne, su identificación y su dinámica durante el procesamiento y almacenamiento. Actualmente se piensa que esto debería ayudar a administrar mejor los sistemas de producción de carne y mejorar la seguridad de los alimentos (Rouger *et al.*, 2017).

El muestreo de una variedad cada vez más diversa de alimentos frescos y procesados requiere que las prácticas de seguridad alimentaria antes y después de la cosecha sean dinámicas, sensibles, específicas, así como versátiles y rentables para grandes cantidades de muestras. Ningún ensayo o método único abordará todos estos criterios de manera óptima, particularmente las técnicas basadas en cultivos. Sin embargo, los métodos moleculares ofrecen

ciertas ventajas para monitorear la calidad microbiológica de los alimentos, incluida la rentabilidad, la facilidad de uso y la familiaridad entre los usuarios (Gracias & McKillip, 2004).

Con la aplicación de la biotecnología, y la biología molecular, podemos resolver algunas de las limitaciones técnicas a través de una mejor prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades animales. Con la aplicación de la genómica, por ejemplo, siendo ésta una rama de la biología molecular, podemos desarrollar nuevas generaciones de vacunas usando antígenos recombinantes para agentes patógenos, realizando estudios en donde se buscan regiones codificantes de dichos antígenos. Asimismo, el desarrollo de diagnósticos rentables y efectivos permite mejorar los servicios veterinarios ofrecidos en países en desarrollo. Sin embargo, los avances tecnológicos deben ir acompañados de estudios epidemiológicos y capacidades logísticas mejoradas, así como de una mejor coordinación de todas las instituciones involucradas en el control de enfermedades animales desde el nivel local hasta el nivel internacional (FAO, 2018).

Marcadores moleculares

Dentro de las tecnologías que se basan en la manipulación genética se encuentra el desarrollo de marcadores moleculares que funcionen como una vía de selección e identificación de patógenos para precisar el tratamiento a seguir en contra de estos, además de inferir de una forma más eficaz los diagnósticos de enfermedades infecciosas y así prevenir epidemias y zoonosis potenciales que podrían afectar en distintos niveles al ser humano (FAO, 2018). Lo anterior entra en la categoría de biomarcador. Un biomarcador se ha definido como una alteración bioquímica, molecular, o celular, la cual puede ser percibida y medible en las entidades biológicas, tales como tejidos, células o fluidos. Básicamente, representan un indicador de procesos normales o patológicos (Agnifili *et al.*, 2015).

Un marcador molecular es un locus genético que puede rastrearse y cuantificarse en una población biológica, y puede estar asociado con un gen o rasgo particular (Hayward, Tollenaere, Dalton-Morgan & Batley, 2015), por ejemplo, un marcador molecular puede contener información sobre trastornos genéticos, genealogía o la historia evolutiva de la vida de alguna población (Bradley, Johnson, Chaparro, Robertson, Ferrie, 1998). Los marcadores moleculares, debido a su estabilidad, rentabilidad y facilidad de uso, proporcionan una herramienta inmensamente popular para una variedad de aplicaciones que incluyen mapeo de genoma, marcado de genes, diversidad genética, análisis filogenético e investigaciones forenses. En las últimas tres décadas, se han desarrollado y explotado varias técnicas de marcadores moleculares en todo el mundo en diferentes sistemas (Grover & Sharma, 2014).

En concreto, para que se pueda considerar como un marcador genético, la secuencia debe representar una alteración en los ácidos nucleicos que la componen; se debe poder detectar y usar fácilmente para identificar individuos, poblaciones o especies. Básicamente, un marcador genético es un gen o secuencia de ADN con una ubicación conocida en un cromosoma y asociado con un gen o rasgo particular. Puede describirse como una variación, que puede surgir debido a una mutación o alteración en los *loci* genómicos que se pueden observar; puede ser una secuencia de ADN corta, como una secuencia que rodea un cambio de un solo par de bases (polimorfismo de un solo nucleótido, SNP), o una larga, como mini y microsatélites (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015). A continuación se mencionan algunas características específicas para un marcador genético (Khan, 2015):

- Debe ser fácil de encontrar
- Debe ser fácil de probar
- No debe tomar mucho tiempo de identificar
- Debe ser altamente reproducible
- Debe ser fenotípicamente neutro
- Debe mostrar polimorfismos

Para la identificación de los marcadores moleculares, es posible utilizar distintas tecnologías y métodos de aislamiento de la muestra. Una manera rápida de identificar bacterias que se encuentran en el intestino de los hospederos es a través de las heces o directamente de un raspado de las paredes del recto, aunque existen estudios que demuestran la recuperación e identificación de los microorganismos patógenos de muestras de saliva, sin embargo, no hubo evidencia de que pudiese correlacionarse el patógeno de saliva con el que se encuentra en el intestino (Zhang *et al.*, 2010); algunos de los métodos para estudiar la microbiota, que se aplican hoy día son: la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), el análisis de microarreglos, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), el polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal (T-RFLP), y los análisis metagenómicos (Mandal, Saha & Das, 2015). Estas técnicas moleculares son independientes de los cultivos y pueden dirigirse a los miembros dominantes de las comunidades microbianas y omitir información para microbios relativamente menos abundantes (Li *et al.*, 2015).

Tipos de marcadores moleculares

Existen distintos tipos de marcadores moleculares (Tabla 5), cada uno con limitaciones y fortalezas particulares. Aun así, la mayoría son efectivos porque identifican una abundancia de relaciones genéticas entre ubicaciones distintas dentro de un cromosoma y se puede reproducir para la verificación. Pueden identificar pequeños cambios dentro del mapeo de una población que permiten la distinción entre especies, lo que contribuye a la segregación de los rasgos y la identidad. Identifican ubicaciones particulares en un cromosoma, esto conlleva a la creación de mapas físicos. Por último, pueden identificar cuántos alelos tiene un organismo para un rasgo particular (bialélico o polialélico) (Maheswaran, 2014).

Sólo algunas de estas técnicas, concretamente RFLP, RAPD, AFLP, ISSR, SSR y SNP, han recibido una aceptación global. Una revolución reciente en las técnicas de secuenciación de ADN ha llevado al descubrimiento y la aplicación de marcadores moleculares más sofisticados. Aunque la elección del marcador dependerá del uso específico. Los microsatélites, los SNP y la genotipificación por secuenciación (GBS) satisfacen en gran medida la mayoría de los requisitos del usuario (Grover & Sharma, 2014).

En menos de medio siglo, los marcadores moleculares han cambiado totalmente nuestra visión de la naturaleza. Sin embargo, todos los métodos moleculares desarrollados a lo largo de los años para detectar la variación genética lo hacen a partir de una de las tres clases de marcadores conceptualmente diferentes: variantes de proteínas (alozimas), polimorfismo de la secuencia de ADN y variación de repetición de ADN (Schlötterer, 2004).

Con los años, los avances en biología molecular han llevado a la introducción de muchos tipos nuevos de marcadores moleculares. La visión general es que el aumento y la disminución de la popularidad de estos diferentes tipos de marcador refleja la mejora continua en la forma en que ensayamos la variación genética; es decir, los últimos sistemas de marcadores son los más informativos (Schlötterer, 2004).

Tabla 5. Tipos de marcadores moleculares (Tomado de Schlötterer, 2004).

Marcadores moleculares	Ventajas	Desventajas
Alozimas	Se pueden diferenciar variantes en enzimas que pueden mostrar un polimorfismo sustancial en las poblaciones naturales en especies	El número de loci de marcadores informativos es demasiado pequeño para usar aloenzimas para el mapeo y estudios de asociación
RFLP (polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción)	Permite el análisis de secuencias no codificantes o cambios silenciosos en una secuencia codificante de proteínas, así como el estudio de cambios en secuencias codificantes	Requiere de una sonda de hibridación adecuada para detectar polimorfismos para una gama aún más amplia de análisis
Minisatélites	Genera un polimorfismo extremadamente alto que permite una mejor identificación genética de individuos	Presenta un patrón complejo de bandas que impide la asignación de alelos a un locus determinado
Microsatélites	La mayoría de los loci de microsatélites se pueden amplificar mediante una PCR estándar. Son altamente polimórficos, abundantes y uniformemente bien distribuidos a lo largo de la eucromatina de los genomas	A pesar del gran número de loci de microsatélites en los genomas de la mayoría de los eucariotas, la densidad de los loci informativos de microsatélites podría ser demasiado baja para algunas aplicaciones de mapeo
RAPD (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente)	No requieren un conocimiento a priori sobre secuencias de cebadores en la especie objetivo	Estos marcadores pueden ser poco confiables. Esto es particularmente cierto para los RAPD, que se ha demostrado que son notoriamente difíciles de reproducir.
AFLP (polimorfismo de longitud de fragmento amplificado)		
ISSR (inter repeticiones de secuencia simple)		
SNP (polimorfismo de un solo nucleótido)	Se centra en una sola posición de nucleótido en el genoma	Ya que suelen ser bialélicos, el contenido de información de un solo SNP es limitado, particularmente si uno de los dos alelos se produce con poca frecuencia. El desarrollo de un conjunto de marcadores de SNP requiere mucho tiempo y dinero

Secuenciación de ADN

La determinación de la secuencia para una región genómica dada en individuos múltiples (a menudo denominada "resecuenciación" en estudios de población humana) proporciona la

información genética más detallada. A pesar de no ser un marcador en el sentido estricto, el análisis de secuencias de ADN también debe incluirse en esta discusión: tiene una larga historia en genética de poblaciones y se ha utilizado con frecuencia para inferir patrones demográficos y de selección. Los primeros estudios de secuenciación son anteriores a la era de la PCR y se basaron en la región de Adh que se clonó a partir de 11 individuos de *D. melanogaster* (Kreitman, 1983). Desde la llegada de la PCR, el número de secuencias ha aumentado continuamente.

Aunque este método inicialmente requirió mucho tiempo y era costoso, los avances recientes en la tecnología de secuenciación masiva permitieron el análisis de la secuencia de muchos fragmentos de ADN para muchos individuos (Meyer *et al.*, 1999; McVean *et al.*, 2002). En comparación con los SNP's, la secuenciación del ADN ofrece la ventaja de no tener un sesgo de verificación. Además, la secuenciación de ADN proporciona información completa de la región analizada. La desventaja es que los sitios invariables también se secuencian innecesariamente. Para las especies con bajo polimorfismo, la secuenciación de una gran fracción de sitios invariantes puede parecer costosa, pero con las herramientas de análisis estadísticos adecuadas, el patrón de sitios invariantes podría ser informativo (Kuhner *et al.*, 2000).

Últimos avances en técnicas para la detección de marcadores filogenéticos

Considerando la información que podemos obtener de cada tipo de marcador molecular, podemos decir que todos los marcadores genéticos dependen crucialmente de los procesos subyacentes de mutación que generan variación. El análisis de los ácidos nucleicos (ARN o ADN) extraídos de las comunidades microbianas es una de las mejores maneras de determinar la diversidad y la capacidad funcional de éstas (Stephens & Donnelly, 2003). Sin embargo, como ya se ha descrito en el presente trabajo, realizar dicha actividad sigue siendo un desafío al utilizar técnicas moleculares para la determinación y cuantificación inequívocas de la composición de especies microbianas y las actividades funcionales.

Las técnicas moleculares han permitido el descubrimiento de perspectivas totalmente nuevas sobre la diversidad, la distribución, la función y la adaptación de las especies microbianas que, de lo contrario, se habrían visto disminuidas por los sesgos y la insensibilidad de los métodos de cultivo. Se ha puesto a disposición una amplia variedad de técnicas moleculares que van desde la toma de "huellas dactilares" basada en la PCR convencional y la detección *in situ* de ácidos nucleicos claves, hasta las plataformas emergentes de micromatrices y microfluidos (Weibel *et al.*, 2007), así como diferentes técnicas "ómicas" (Valenzuela *et al.*, 2006; Mashego *et al.*, 2007).

Las tecnologías de secuenciación de última generación nos han proporcionado una gran cantidad de información sobre la variación genética, pero predecir el significado funcional de esta variación es un reto.

Si bien muchos estudios de genómica comparativa se han centrado en el flujo genético y los cambios a gran escala, se ha prestado relativamente poca atención a la cuantificación de los efectos de los polimorfismos de un solo nucleótido y los *indeles* en la función proteica, particularmente en la genómica bacteriana (Wheeler, Barquist, Kingsley & Gardner, 2016).

La biología computacional como herramienta

Según la definición del diccionario de Collins, la bioinformática se define como "la rama de la ciencia de la información relacionada con grandes bases de datos de información bioquímica o

farmacéutica" (Collins, 1987). De acuerdo con esta definición, podemos deducir que el término bioinformática debe ser el resultado de combinar "bio" a partir de datos bioquímicos o farmacéuticos, e "informática" a partir de la gestión de datos a través del uso de computadoras. Sin embargo, se ha discutido si la bioinformática difiere de la biología computacional como disciplina. A través de un debate precedido por un comité que definió a la biología computacional y la bioinformática como disciplinas similares, más no la misma, se obtuvo que la bioinformática es la investigación, desarrollo o aplicación de herramientas computacionales y enfoques que ayuda a expandir el uso de datos biológicos y médicos, ya sea para adquirir, almacenar, organizar, archivar, analizar o visualizar dichos datos; la biología computacional se definió como el desarrollo y aplicación del análisis de datos y métodos teóricos, modelos matemáticos y simulaciones computacionales al estudio de sistemas biológicos, conductuales y sociales (BISTIC Definition Committee, 2000). Siendo así que, podemos mencionar que la biología computacional es el uso de algoritmos y ordenadores para facilitar el entendimiento de problemas biológicos; rama de las ciencias que estudia sistemas biológicos mediante el diseño y aplicación de algoritmos computacionales.

Existen algoritmos que pueden proporcionar hallazgos o conclusiones relevantes obtenidas de un conjunto de datos, sin que el ser humano tenga que escribir instrucciones o códigos para esto.

Un algoritmo es una secuencia o serie de instrucciones, que representan la solución a un determinado problema. Informalmente, un algoritmo computacional es cualquier procedimiento computacional bien definido que toma algún valor, o conjunto de valores, como entrada y produce algún valor, o conjunto de valores, como salida. Un algoritmo es, por lo tanto, una secuencia de pasos computacionales que transforman la entrada en la salida. De este modo, otra forma de ver un algoritmo, es como una herramienta para resolver un problema computacional bien especificado. La declaración del problema define, en términos generales, la relación de entrada/salida deseada (Cormen, Leiserson, Rivest & Stein, 2009).

Las aplicaciones prácticas de los algoritmos son omnipresentes, por ejemplo, el proyecto del Genoma Humano hizo grandes progresos cumpliendo los objetivos de identificar los 100,000 genes en el ADN humano, determinar las secuencias de los 3 mil millones de pares de bases químicas que conforman el ADN humano, almacenar esta información en bases de datos y desarrollar herramientas para el análisis de datos. Cada uno de estos pasos requiere algoritmos sofisticados. Aunque las soluciones a los diversos problemas involucrados están más allá de los procesos básicos de programación, muchos métodos para resolver estos problemas biológicos utilizan ideas básicas sobre el desarrollo de algoritmos, lo que permite a los científicos realizar tareas mientras utilizan los recursos de manera eficiente. Los ahorros están en tiempo, tanto en humanos como en máquinas, y en dinero, ya que se puede extraer más información de las técnicas de laboratorio (Cormen *et al.*, 2009).

Con la explosión de datos se presenta una oportunidad proporcional para identificar nuevos conocimientos con el potencial de aplicación en distintos ámbitos. Parte de la solución radica en la extracción e integración de información de diversas disciplinas (Philips *et al.*, 2017).

Los modelos ocultos de Markov (HMM) son una herramienta ubicua para modelar datos de series de tiempo. Se utilizan en casi todos los sistemas actuales de reconocimiento de voz, en numerosas aplicaciones en biología molecular computacional, en la compresión de datos y en otras áreas de inteligencia artificial y reconocimiento de patrones. Un modelo oculto de Markov es una herramienta para representar distribuciones de probabilidad sobre secuencias de

observaciones. Denotemos la observación en el tiempo t por la variable Y_t . Este puede ser un símbolo de un alfabeto discreto, una variable de valor real, un valor entero o cualquier otro objeto, siempre que podamos definir una distribución de probabilidad sobre él. Suponemos que las observaciones se muestrean en intervalos de tiempo discretos, espaciados equitativamente, por lo que t puede ser un índice de tiempo de valor entero (Ghahramani, 2001).

La identificación de grupos ortólogos es útil para la anotación del genoma, los estudios sobre la evolución de genes/proteínas, la genómica comparativa y la identificación de secuencias taxonómicamente restringidas. OrthoMCL proporciona un método escalable para construir grupos ortólogos a través de múltiples taxones, utilizando un algoritmo de clúster de Markov para agrupar ortólogos (supuestos) y parálogos, y puede extenderse a ortólogos de grupos de múltiples especies. Los ortólogos y los parálogos constituyen dos tipos principales de homólogos: los primeros evolucionaron a partir de un ancestro común por especiación y los últimos se relacionan mediante eventos de duplicación (Fitch, 1970, 2000). Aunque podemos suponer que es probable que los parálogos derivados de eventos de duplicación antiguos hayan divergido en su función (como en el caso de las tubulinas α y β), es probable que los ortólogos verdaderos (por ejemplo, la tubulina α de la levadura y las moscas) mantengan una función idéntica a lo largo del tiempo evolutivo, haciendo de la identificación del ortólogo una herramienta valiosa para la anotación de genes. En genómica comparativa, el agrupamiento de genes ortólogos proporciona un marco para integrar información de múltiples genomas, destacando la divergencia y conservación de familias de genes y procesos biológicos (Li Li *et al.*, 2003).

La clasificación de los genes y sus productos en familias de homólogos es un componente clave de cualquier estudio en genómica comparativa. El problema central aquí es definir relaciones ortólogas entre genes en dos o más especies. Los ortólogos, es decir, los genes homólogos relacionados por especiación (Fitch, 1970, 2000), tienden a retener la misma función después de la divergencia de su ancestro común, mientras que los parálogos, es decir, los genes homólogos relacionados por duplicación dentro de un linaje, típicamente se diferencian para realizar funciones distintas (Kondrashov *et al.*, 2002; Lynch & Conery, 2000; Lynch & Force, 2000; Ohno, 1970). Los parálogos se subdividen en *in-paralogs*, que se han desviado después de un evento de especiación de referencia (a menudo el último evento de especiación en el clado mínimo que incluye los dos linajes comparados) y los *out-paralogs*, que divergieron antes de este evento (Remm *et al.*, 2001), aunque en algunos casos el estado de la paralogía es difícil de resolver en la práctica, por ejemplo, en caso de pérdida diferencial de parálogos en todas las especies examinadas (Opazo *et al.*, 2008). Debido a la compleja interacción de especiación y duplicación de genes, una familia de *in-paralogs* en un linaje puede ser ortóloga a un solo gen en otro linaje, por lo que el problema de la identificación de ortólogos se ha redefinido a la identificación de grupos ortólogos, así como sus duplicaciones específicas de linaje (Koonin, 2005). El recurso COG se diseñó para este propósito poco después de que los representantes de los tres dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eukarya) se muestrearan mediante secuenciación completa del genoma (Tatusov *et al.*, 1997).

Los métodos de inferencia ortológica pertenecen a dos clases principales de enfoques: aquellos que primero identifican a todos los homólogos en un conjunto de especies y luego intentan distinguir entre ortólogos y parálogos analizando la distribución de los genes de diferentes especies en las puntas del árbol (estos enfoques típicamente incluyen la comparación con otro árbol que representa la visión de consenso de la evolución de esas especies), y aquellos que no reconstruyen los árboles explícitamente, sino que usan una heurística para compilar los pares

de genes, cada uno en un genoma diferente, que son el uno del otro coincidencias de mejor puntuación [SymBets, para los mejores éxitos simétricos (Tatusov *et al.*, 1997), también a veces llamados BBH o RBH, para los mejores éxitos bidireccionales o recíprocos] en sus genomas respectivos (Figura 2) (Kristensen *et al.*, 2010).

Los enfoques basados en árboles a menudo se consideran superiores a los métodos de "vinculación de pares" porque los primeros utilizan algoritmos explícitos para identificar eventos de duplicación y especiación en el árbol genealógico/genético de proteínas, mientras que los métodos de vinculación de pares utilizan la relación de mejor simetría de emparejamiento como criterio sustituto de la ortología (Brenner, 1999; Rost, 2002; Todd *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2005).

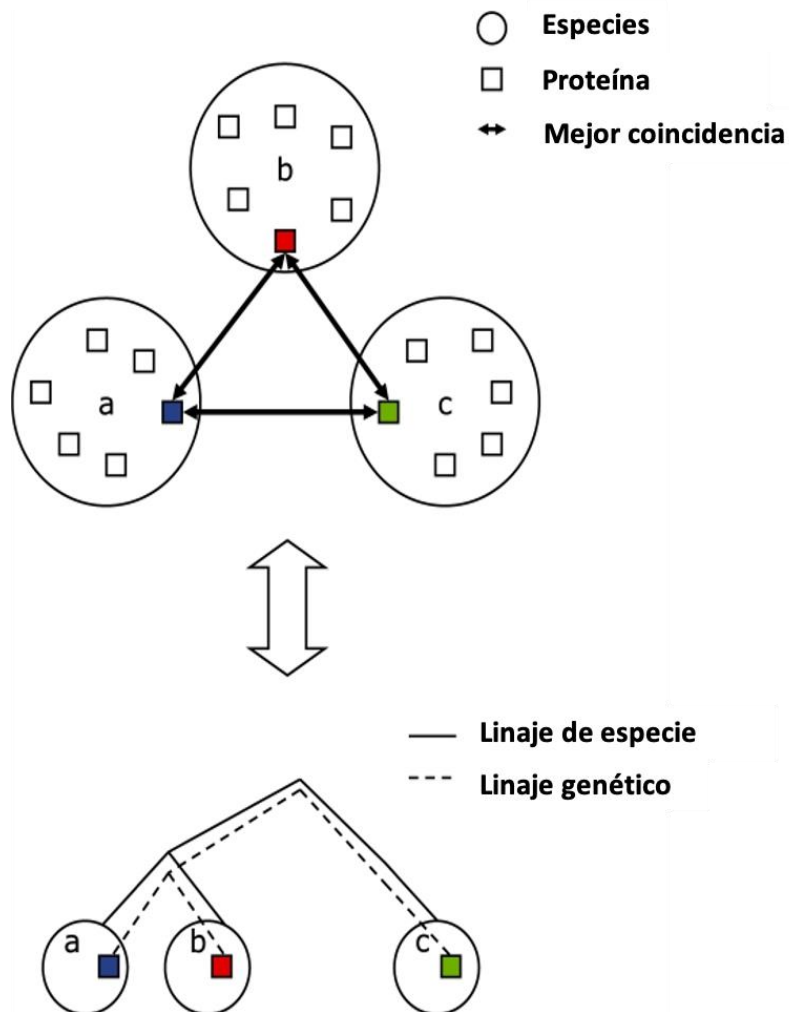


Figura 2. Esquema de las mejores coincidencias simétricas (SymBets) utilizadas para crear COG. Donde las flechas son los lados que representan la relación que hay entre los genes (arriba); se van construyendo triángulos que compartan un lado en común y se unirán según su nivel de coincidencia simétrica (Modificado de Kristensen *et al.*, 2010).

Pangenoma

El desarrollo de la genómica bacteriana ha logrado, entre otras cosas, que podamos comprender de una mejor manera la capacidad que tienen los organismos de llevar a cabo diferentes procesos que se reflejan en los fenotipos propios de cada especie o cepa. Sin embargo, a pesar de que el estudio individual de la carga genómica de los microorganismos nos da información concreta y particular de lo que está sucediendo en ese momento, no se refleja el funcionamiento de la variabilidad genética de algún grupo en cuestión, limitando las posibles inferencias ante lo que ha sucedido a través del tiempo, y lo que posiblemente sucederá. De esta manera, a través de un análisis pangenómico de un grupo de organismos de interés, es posible comparar la vasta información genómica que yace en cada uno de los individuos y trabajar con estos datos desde un punto de vista evolutivo y ecológico, ya que la información biológica que se obtiene a través de estudios genómicos, referente a las poblaciones que se estén estudiando, son de suma importancia para comprender la dinámica evolutiva, tomando en cuenta la transferencia horizontal de elementos de virulencia y resistencia (Abudahab *et al.*, 2019).

Se define como pangenoma al repertorio total de genes pertenecientes a un clado filogenético dado, es decir, el conjunto de material genético presente en los organismos del mismo grupo taxonómico (Tettelin & Medini, 2020). La resolución filogenética del clado de interés dependerá del enfoque del estudio a realizar, según el objetivo, se puede tomar como grupo desde especies y serovares hasta phylum, reino y categorías taxonómicas superiores. El término pangenoma fue acuñado por primera vez hace una década por Tettelin *et al.* (2005) y describe la unión de entidades de secuencia (generalmente genes o marcos de lectura abiertos, ORF) compartidos por los genomas de interés en el grupo estudiado. La literatura describe al pangenoma como la intersección y cualquier combinación de subconjuntos de secuencias como: genes centrales (genoma *core*) que contiene genes compartidos por todas las cepas dentro del clado y típicamente incluye genes responsables de los aspectos básicos de la biología del clado y sus principales rasgos fenotípicos; genoma accesorio o prescindible, que contribuye a la diversidad de la especie y probablemente proporciona funciones que no son esenciales para su estilo de vida básico, pero confieren ventajas selectivas que incluyen adaptación de nicho como resistencia a los antibióticos y la capacidad de colonizar nuevos huéspedes; y genes específicos de la cepa (Vernikos, Medini, Riley & Tettelin, 2015; Tettelin, Riley, Cattuto & Medini, 2008).

Los estudios pangenómicos se han ido implementando cada vez más conforme avanza la tecnología de secuenciación masiva. Después del trabajo pionero en el pangenoma de *Streptococcus agalactiae* en 2005 (Tettelin *et al.*, 2005), donde se menciona la importancia del genoma *core* para la determinación de la esencia de la especie, así como la implicación en el potencial desarrollo de vacunas (a través de la información en la carga genómica de los subconjuntos de genes, tales como los específicos de cada cepa), varios otros proyectos pangenómicos se han desarrollado con distintas variaciones, principalmente en el número de genomas/cepas analizados, la resolución filogenética de interés, el modelo de predicción matemática, los supuestos y parámetros del modelo, el algoritmo de búsqueda de alineación y los parámetros asociados (porcentaje de identidad y porcentaje de longitud de secuencia alineada por pares), umbral de definición de ortología y orden de muestreo del genoma. De este modo, desde el punto de vista de la resolución filogenética, hay proyectos centrados en el nivel de especie, nivel de género e incluso en los niveles de clase, filo o superreino (Vernikos *et al.*, 2015).

ANTECEDENTES

Para el género *Campylobacter*, en la mayoría de los análisis pangenómicos previos se ha comparado la variación genética que existe en especies específicas (intra-especie) como *C. concisus* (Gemmell *et al.*, 2018), *C. fetus* (Ali *et al.*, 2012), *C. hyointestinalis* (Costa *et al.*, 2019), *C. showae* (Hsu *et al.*, 2019), *C. coli* y *C. jejuni* (Lefébure *et al.*, 2010; Méric *et al.*, 2014). A nivel de género, se han reportado sólo dos trabajos como resultado de la comparación genómica entre 6 (Ali *et al.*, 2012) y 11 (Zhou *et al.*, 2013) especies de *Campylobacter*; pangenomas usando un número más grande de especies no han sido reportados. En el 2012, Ali *et al.*, utilizando 15 genomas que pertenecían a las especies *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. hominis*, *C. jejuni* y *C. lari*, identificaron un pangenoma y un genoma *core* de 7,059 y 552 familias genéticas, respectivamente. En otro estudio, al utilizar 34 genomas provenientes de las especies *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. hominis*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. rectus*, *C. showae* y *C. upsaliensis*, se determinó que 64,685 genes conforman al pangenoma y que 12,181 genes son parte del genoma *core* (Zhou *et al.*, 2013). En general, estos estudios han evidenciado la gran diversidad genética que existe en las diferentes especies de *Campylobacter*, así como la presencia de algunos genes únicos que en parte pueden reflejar las diferentes estrategias adaptativas que presentan; algunos de los loci específicos de especie que se han identificado, han sido propuestos como marcadores epidemiológicos potenciales para análisis de genómica poblacional o como factores potenciales para el desarrollo de vacunas en contra de las especies de este género (Lefébure *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012; Méric *et al.*, 2014; Gemmell *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2019; Hsu *et al.*, 2019).

En cuanto a la identificación de *C. fetus*, las pruebas bioquímicas siguen siendo la prueba estándar para este propósito, sin embargo, su realización es un procedimiento lento y laborioso, lo cual no resulta práctico cuando se tiene que procesar un gran número de muestras o se requiere obtener un diagnóstico rápido. Adicionalmente, los ensayos fenotípicos no siempre son reproducibles y/o específicos, por lo que regularmente se tienen que utilizar pruebas moleculares adicionales para confirmar la identificación de la especie (Mshelia *et al.*, 2010). Entre las pruebas moleculares aplicadas se encuentran la amplificación por PCR convencional o tiempo real, de los siguientes genes: *cstA*, el cual codifica para la proteína A de inanición de carbón (Hum *et al.*, 1997); gen *cpn60*, que codifica para la chaperonina de 60 kDa (Chaban *et al.*, 2009); *nahE*, el cual codifica para la proteína intercambiadora de sodio/hidrógeno (Abril *et al.*, 2007; van der Graaf-van-Bloois *et al.*, 2013); *virB11*, que codifica para un homólogo del activador transcripcional del regulón de virulencia de *Shigella flexneri* (Moulhuijzen *et al.*, 2009); y el gen RNA ribosomal 16S (Iraola *et al.*, 2016). Cabe resaltar que para la selección de todos estos genes como marcadores específicos de *C. fetus*, en su mayoría se emplearon secuencias genómicas derivadas de cepas aisladas de animales de granja, principalmente bovinos, dejando fuera a otros hospederos como los humanos, de donde se le aísla cada vez con más frecuencia, y reptiles, donde también se le encuentra. Este hecho es muy significativo, ya que existe una importante variabilidad genética intra-específica en *C. fetus*, donde los aislados asociados a reptiles son genéticamente distantes de los aislados de mamíferos (Costa & Iraola, 2019). Consistente con lo anterior, recientemente se ha determinado que, al utilizar ADN de cepas asociadas a reptiles, no se obtuvo ningún amplificado de algunos marcadores moleculares previamente reportados como específicos de *C. fetus*, lo cual se puede atribuir a que las secuencias genéticas que se usaron para definir dichos marcadores moleculares fueron obtenidas únicamente de aislados bovinos (Iraola *et al.*, 2016). De manera relevante, se ha

reportado que cepas de *C. fetus* asociadas a reptiles también pueden causar enfermedades en humanos (Costa & Iraola, 2019), por lo que es necesario tener métodos de diagnóstico que puedan identificar a todas las subespecies de esta especie en cualquier hospedero potencial. Asimismo, en la mayoría de los estudios mencionados, para la determinación de los marcadores moleculares de *C. fetus* se emplearon secuencias genéticas obtenidas de cepas aisladas de regiones geográficas muy delimitadas, donde la variabilidad genética puede ser baja (Moolhuijzen *et al.*, 2009). Por todo esto, nuevos marcadores moleculares para la identificación de *C. fetus* con el potencial de ser universales y con la capacidad de detectar a todas las subespecies deben ser determinados, lo cual puede lograrse mediante el análisis de secuencias genómicas derivadas de cepas asociadas a mamíferos y a reptiles, así como aisladas de diferentes regiones geográficas. Estudios anteriores han demostrado la utilidad de los estudios pangenómicos en la identificación de marcadores específicos de especies, subespecies o serovares, tal es el caso de bacterias del género *Salmonella* (Laing *et al.*, 2017).

Con el fin de contribuir al estudio de la diversidad genética del género *Campylobacter* y proponer nuevos marcadores moleculares para la identificación específica de cepas de *C. fetus*, en el presente trabajo realizamos un análisis bioinformático de genómica comparativa utilizando 237 genomas disponibles en las bases de datos que fueron obtenidos a partir de 21 especies del género *Campylobacter*.

JUSTIFICACIÓN

Campylobacter fetus es un patógeno de animales del sector pecuario y de humanos, su diagnóstico certero y oportuno puede ayudar a la prevención de su propagación y con ello evitar los efectos dañinos sobre la salud veterinaria y de la comunidad. La identificación de diversas especies de *Campylobacter*, incluida *C. fetus*, a través de métodos convencionales como las pruebas bioquímicas es un proceso costoso, lento y complicado, por lo que es necesario desarrollar protocolos de identificación más accesibles. Dentro de estos se encuentra el diagnóstico molecular; actualmente, se han reportado diversos marcadores moleculares para la identificación de la especie *C. fetus*, sin embargo, muchos han mostrado ser inespecíficos al aumentar el número de cepas evaluadas. Por lo tanto, la búsqueda de marcadores genéticos específicos de *C. fetus* alternativos es necesaria.

HIPÓTESIS

El análisis pangenómico de distintas especies de *Campylobacter* permitirá diferenciar genes únicos en los genomas de *Campylobacter fetus*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un análisis pangenómico del género *Campylobacter* e identificar marcadores moleculares potenciales para la detección específica de *Campylobacter fetus*.

Objetivos específicos

- Caracterizar el pangenoma (genoma central, genoma accesorio y genes únicos) de 21 especies del género *Campylobacter*.
- Determinar la relación filogenética de 21 especies del género *Campylobacter*.
- Identificar y seleccionar secuencias únicas de *Campylobacter fetus* como marcadores moleculares candidatos.
- Determinar por análisis *in silico*, la especificidad de los marcadores moleculares candidatos para la identificación de *Campylobacter fetus*.

MÉTODOS

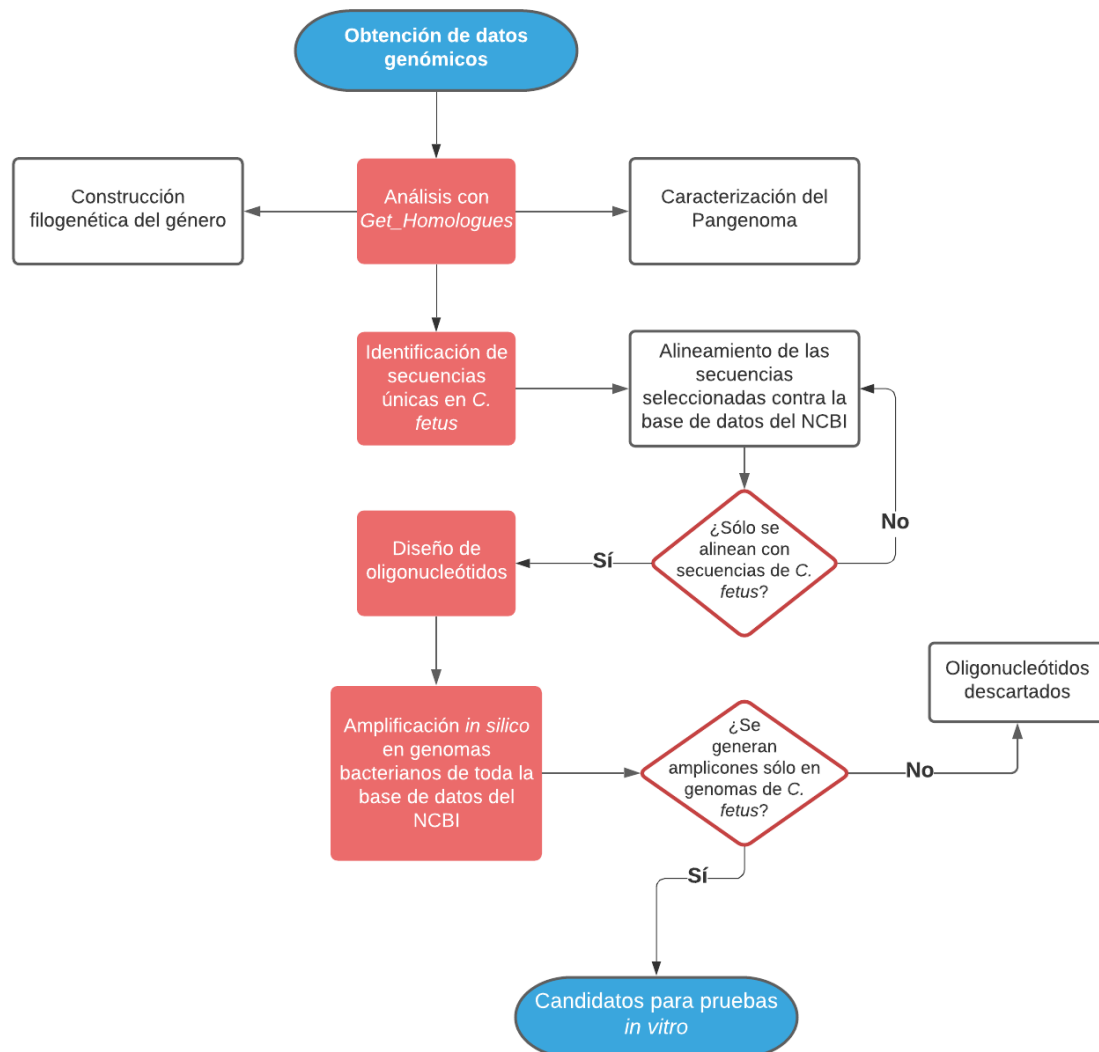


Figura 3. Diagrama de flujo que representa la metodología que se siguió durante el presente estudio.

Obtención de datos genómicos

En la base de datos pública del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se realizó una búsqueda de todos los genomas disponibles que se hubieran obtenido a partir de especies del género *Campylobacter* (consultado por primera vez en marzo de 2018, última actualización marzo de 2019) y se seleccionaron únicamente aquellos que estuvieran completamente cerrados, es decir, que no tuvieran ningún *gap* (del inglés hueco), con el fin de tener la posibilidad de analizar toda la información genética y no generar interpretaciones erróneas por la falta de información genómica. Las secuencias de los genomas fueron descargadas en 3 formatos: fasta de nucleótidos (.fna), fasta de aminoácidos (.faa) y GenBank (.gbk). Para cada genoma se obtuvo una serie de metadatos, los cuales incluyeron su número de acceso del NCBI, fuente (hospedero) y lugar de aislamiento, año de colecta (ANEXO 1), así como la longitud total de los genomas, su contenido de GC, número de genes, número de proteínas que codifican, número de pseudogenes y número de RNA's (ANEXO 2).

Pangenoma de *Campylobacter*

Para realizar el análisis pangenómico se utilizó el programa *Get_Homologues* (Vinuesa & Contreras-Moreira, 2015), a través del servidor del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Get_Homologues está escrito principalmente en el lenguaje de programación *Perl* e incluye varios algoritmos diseñados para tres tareas principales:

- Agrupación de secuencias de proteínas y nucleótidos en grupos homólogos (posiblemente ortólogos), sobre la base de la similitud de secuencias.
- Identificación de grupos ortólogos de regiones intergénicas, flanqueados por marcos de lectura abiertos (ORF) ortólogos, conservados en genomas relacionados.
- Definición del pan-genoma y genoma *core* mediante el cálculo de conjuntos de proteínas superpuestos.

Los valores utilizados para la corrida del *script* principal, el *get_homologues.pl* se muestran en la Tabla 6.

Usando los archivos de las secuencias de los 237 genomas en formato GenBank y el *script* (del inglés "rutina") auxiliar *parse_pangenome_matrix.pl* se realizó el análisis de genómica comparativa, lo cual permitió la identificación de familias genéticas específicas de linaje y las compartidas, además de poder computar y graficar los compartimentos correspondientes al *core*, *cloud* y *shell genome* o genoma central (*core*) y específico (*cloud* y *shell*). El *core genome* está definido como el conjunto de genes que están contenidos en todos los genomas/taxa analizados; el *soft core* son los genes que se encuentran en el 95% de los genomas/taxa estudiados; el *cloud genome* son los genes que están presentes sólo en unos pocos genomas/taxa y el *shell genome* agrupa a los genes restantes, que se encuentran en muchos genomas/taxa (Vinuesa & Contreras-Moreira, 2015).

Con el *script* auxiliar *compare_clusters.pl* se generó una matriz pangenómica de la presencia o ausencia de los genes, la cual fue usada para construir un árbol pangenómico de máxima parsimonia.

Inferencia de función genética putativa

Una vez que se obtuvieron los grupos de genes, para algunos de los que conforman al *core genome* del género, así como los del *cloud genome* de *C. fetus*, se realizó la búsqueda de su función putativa usando las bases de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), Kegg (<https://www.genome.jp/kegg/>) y GO (<http://geneontology.org/>).

Tabla 6. Parámetros utilizados para correr el *pipeline* en el programa *Get_Homologues*.

Parámetro	Función	Valor usado
-C	Porcentaje mínimo de cobertura en alineaciones BLAST por pares	90
-E	Valor de expectancia máximo para que se considere un hit	1e-05
-S	Porcentaje mínimo de identidad en un par de secuencias durante un BLAST	1
-t	Muestra los grupos de secuencias de todos los tamaños	0
-M	Indica el uso de orthoMCL	0
-G	Indica el uso de COGtriangles	1

Alineamiento de las secuencias únicas de *C. fetus* contra la base de datos del NCBI

Del grupo de secuencias únicas de *C. fetus*, se seleccionaron 10 al azar, cuyas funciones putativas se mencionan a continuación. Seq 1 = proteína hipotética; Seq 2 = gen *mprA*, el cual es un miembro del sistema regulador de dos componentes MprB/MprA; Seq 3 = gen *glnQ*, que codifica para una ATPasa transportadora de glutamina; Seq 4 = gen *pulG*, el cual codifica una proteína secretada por el sistema de secreción tipo II; Seq 5 = proteína hipotética; Seq 6 = gen relacionado a una proteína de membrana; Seq 7 = gen *ansB*, presente en vías que se activan durante la anaerobiosis; Seq 8 = proteína hipotética; Seq 9 = UDP-glucosa; y Seq 10 = proteína hipotética.

Con el fin de tener una primera aproximación de si las secuencias que se obtuvieron a partir del análisis pangenómico con *Get_Homologues* eran únicas del clado de *C. fetus*, con 7 de las 10 secuencias seleccionadas se realizó un BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra toda la base de datos del NCBI, aplicando parámetros permisivos: número esperado de coincidencias al azar en un modelo aleatorio = 10; longitud de la secuencia de alineación = 6; límite del número de coincidencias = 0.

Diseño de oligonucleótidos para la amplificación *in silico* de secuencias únicas de *C. fetus*

Se diseñaron pares de oligonucleótidos para la amplificación de los genes correspondientes a las secuencias Seq 1-Seq 10. Estas secuencias fueron usadas como templado para generar oligonucleótidos específicos en el programa *RUCS* (Thomsen *et al.*, 2017), del inglés *Rapid Identification of PCR Primers for Unique Core Sequences*. En este programa es posible seleccionar un grupo de genomas positivos, que son aquéllos en donde se espera obtener un amplicón con los oligos diseñados y un grupo de genomas que funcionarán como control negativo de la amplificación *in silico*. Asimismo, el programa puede generar más de un par de oligonucleótidos a partir de cada secuencia templado.

Amplificación *in silico* de secuencias específicas de *C. fetus*

Una vez teniendo la secuencia adecuada de los oligonucleótidos, se realizó una PCR *in silico* en dos plataformas distintas usando como templado las secuencias genómicas de distintas especies de *Campylobacter*, incluida *C. fetus*. Uno de los programas empleados fue el PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>), que posee, además de genomas de otras especies de organismos, 26 genomas correspondientes a 7 especies del género *Campylobacter*. El objetivo de la PCR *in silico* es inferir cuál sería el comportamiento de un experimento *in vitro* sin la necesidad de llevarlo a cabo, mediante el uso de genomas bacterianos secuenciados actualizados (incluidos opcionalmente plásmidos cuando estén disponibles). Una vez que se generan los amplicones *in silico* en este programa, se puede recurrir a la opción de realizar un BLAST con las secuencias de los amplicones obtenidos. Para 3 de los 5 amplicones que se obtuvieron, se realizó este BLAST y con las secuencias obtenidas a partir de este BLAST, se hizo un alineamiento con el algoritmo MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). El otro programa utilizado fue *Primer BLAST* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=reset), el cual nos permite realizar una simulación de una PCR usando como templado las secuencias de todos

los genomas disponibles en la base de datos. Esta herramienta fue desarrollada en NCBI para ayudar a los usuarios en el diseño de oligonucleótidos específicos, así como realizar la simulación de una PCR. Se utiliza el programa Primer3 (Ye *et al.*, 2012) para el diseño de los oligonucleótidos y luego se utiliza BLAST junto con el algoritmo de alineación global para seleccionar los oligonucleótidos. Para realizar las PCR *in silico*, en ambos programas se introducen las secuencias del par de oligonucleótidos con los que se desea determinar la amplificación de un producto.

RESULTADOS

Obtención de datos genómicos

El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) es la base de datos pública con la mayor cantidad de información de libre acceso, la cual tiene como objetivo desarrollar nuevas tecnologías de la información para ayudar a comprender los procesos moleculares y genéticos fundamentales que controlan la salud y la enfermedad (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dado lo anterior, esta fue nuestra fuente de información para obtener los genomas con los que se realizaría el análisis pangenómico.

En esta base de datos se encontraron un total de 7,188 genomas anotados para el género *Campylobacter*, sin embargo, la mayoría de éstos no estaban cerrados, se encontraban en *contigs* o *scaffolds*. Idealmente, para la búsqueda de genes específicos de cada especie, se requiere trabajar con genomas cerrados, con el fin de poder analizar la información completa de lo que está presente en las secuencias genómicas. Por lo que, a pesar de que existe un gran número de genomas de varias especies de *Campylobacter* disponibles en la base de datos del NCBI, sólo tomamos aquellos que estuvieran cerrados.

Se obtuvo un total de 237 genomas completamente cerrados que representan a 21 especies del género *Campylobacter* (Tabla 7). Aunque existen aún más especies, como ya se mencionó antes, se seleccionaron sólo los genomas cerrados de cada especie, habiendo algunas especies para las que los genomas disponibles se encontraban en *contigs* o *scaffolds* y otras que ni siquiera tienen proyectos de genomas secuenciados. La especie con mayor número de genomas disponibles fue *C. jejuni*. Las siguientes dos especies con el mayor número de genomas cerrados disponibles en el NCBI son *C. coli* y *C. fetus*, con 21 y 10 genomas, respectivamente.

En la Tabla 7 se muestra el número de genomas que se obtuvo por cada especie de *Campylobacter*, así como la longitud, el contenido de GC y el número de genes y proteínas promedio contenidos en dichos genomas. En los 237 genomas obtenidos, el contenido de G-C varió de 28-46.6 %, mientras que la longitud de los genomas está entre 1.47-2.28 Mb, lo cual se refleja también en la variación en el número de genes y proteínas, que van de 1,520-2,262 y 1,433-2,167, respectivamente. El promedio de los valores de la longitud de tres genomas de *C. insulaenigrae* constituye el genoma más pequeño (1.47 Mb), mientras que el único genoma disponible para *C. gracilis* representa el genoma de mayor tamaño (2.28 Mb) (Tabla 7).

Pangenoma del género *Campylobacter*

La composición del pangenoma obtenido a partir del consenso de los algoritmos COG (*Clusters of Orthologous Groups*), OMCL (*Ortho Markov Clusters*) y BDBH (*Bidirectional Best Hit*) generó un total de 12,325 *clusters* de genes, cada *cluster* corresponde a una secuencia de gen distinta, por lo que podemos definir al pangenoma de *Campylobacter* con un total de 12,325 genes (Figura 4). De éstos, 261 están presentes en el total de los 237 genomas de las 21 especies de *Campylobacter* analizados (genoma central o *core genome*), 806 están en el 95% de los genomas analizados (*soft core genome*), 3,282 se encuentran sólo en algunos genomas (*shell genome*) y 7,976 únicamente se localizan en 1 o 2 genomas (genoma único o *cloud genome*) (Figura 4). El *soft core genome* y el *shell genome* conforman al genoma accesorio (4,088 genes). Por lo tanto,

de los 1,520-2,262 genes que en promedio contienen los genomas analizados de las diferentes especies de *Campylobacter* (Tabla 7), poco más del 10% de éstos, es decir, 261 (valor del *core genome*) están conservados a través de todo el género, por lo que la mayoría son genes específicos de especies.

Tabla 7. Número y características de los genomas seleccionados de 21 especies del género *Campylobacter* obtenidos de la base de datos NCBI. Para aquellas especies para las que se encontró más de un genoma, los valores mostrados representan el promedio de los valores de cada uno de esos genomas.

Especie	Número de genomas	Longitud (Mb)	% GC	Genes	Proteínas
<i>C. avium</i>	1	1.74	34.2	1,767	1,693
<i>C. coli</i>	22	1.75	31.3	1,834	1,718
<i>C. concisus</i>	3	1.95	38.9	1,964	1,864
<i>C. curvus</i>	1	1.97	44.5	2,012	1,910
<i>C. cuniculorum</i>	1	1.93	31.2	1,899	1,806
<i>C. fetus</i>	11	1.83	33.2	1,845	1,761
<i>C. gracilis</i>	1	2.28	46.6	2,262	2,167
<i>C. helveticus</i>	1	1.87	34.34	1,994	1,870
<i>C. hepaticus</i>	1	1.52	28.0	1,511	1,385
<i>C. hominis</i>	1	1.71	31.7	1,668	1,574
<i>C. hyointestinalis</i>	2	1.75	33.75	1,818	1,723
<i>C. iguanorium</i>	3	1.67	35.8	1,753	1,673
<i>C. insulaenigrae</i>	3	1.47	28.2	1,520	1,433
<i>C. jejuni</i>	164	1.67	30.4	1,754	1,629
<i>C. laeniae</i>	1	1.59	34.6	1,641	1,570
<i>C. lari</i>	8	1.57	29.7	1,602	1,520
<i>C. peloridis</i>	1	1.71	28.5	1,688	1,579
<i>C. pinnipediorum</i>	5	1.72	30.4	1,726	1,640
<i>C. sputorum</i>	4	1.72	29.5	1,761	1,674
<i>C. ureolyticus</i>	2	1.64	29.2	1,684	1,594
<i>C. volucris</i>	1	1.52	28.6	1,568	1,488
Rango	-	1.47 - 2.28	28.0 - 46.6	1,520 – 2,262	1,433 – 2,167

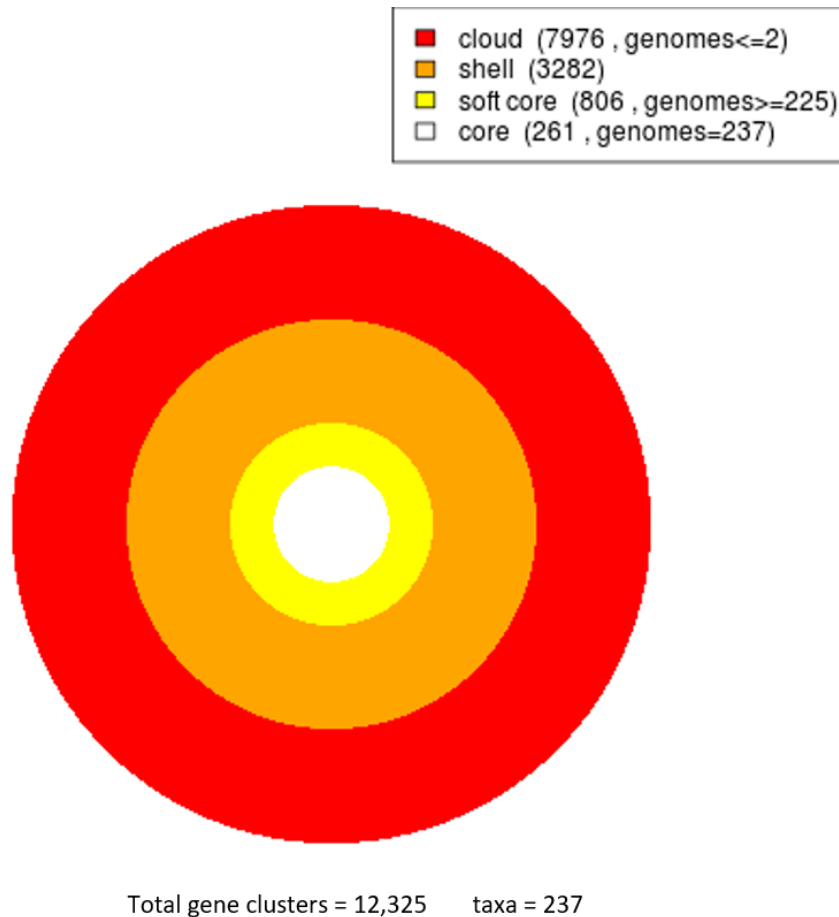


Figura 4. Fraccionamiento de la matriz pangenómica en sus distintos compartimentos (*cloud genome*, *shell genome*, *soft core genome* y *core genome*). Se muestra el número de clusters y la distribución de éstos de acuerdo a su presencia en el número de genomas.

Análisis filogenético del género *Campylobacter*

Para determinar las relaciones filogenéticas inter-especies, se generó un árbol pangenómico basado en la presencia/ausencia de genes en los diferentes genomas. El árbol mostrado en la Figura 5 se generó usando todos los genomas analizados, mientras que en el de la Figura 6 se incluyó solamente un genoma de cada especie, excepto de *C. cuniculorum*, debido a que se presentaron problemas al momento del manejo del archivo con el único genoma de esta especie. En ambos árboles, se observa que la composición genética de los genomas de las especies *C. coli*, *C. jejuni*, *C. hepaticus*, *C. cuniculorum* y *C. helveticus* es similar, ya que dichas especies se agruparon en un mismo clado (Figuras 5 y 6). La relación cercana entre las especies *C. concisus*, *C. curvus* y *C. pinnipediorum* es aparente, así como entre *C. gracilis*, *C. hominis*, *C. ureolyticus* y *C. sputorum* (Figuras 5 y 6). El agrupamiento de las especies *C. insulaenigrae*, *C. lari*, *C. peloridis* y *C. volucris* refleja una relación cercana entre ellas; un clado adicional agrupa a las especies *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. iguaniorum* y *C. lanienae* (Figuras 5 y 6). El único genoma disponible para la especie *C. avium* formó un clado que se separó de todas las demás especies de *Campylobacter* (Figuras 5 y 6).



- Grupo de *C. avium*
- Grupo de *C. jejuni*
- Grupo de *C. concisus*
- Grupo de *C. ureolyticus*
- Grupo de *C. fetus*
- Grupo de *C. lari*

Figura 5. Árbol pangenómico de máxima parsimonia del género *Campylobacter*. La construcción del árbol se realizó con los datos de presencia/ausencia de genes contenidos en la matriz generada para el análisis pangenómico, utilizando 237 genomas completos de 21 especies del género *Campylobacter*. La distinción de los diferentes grupos (excepto el grupo de *C. avium*) está basada en la clasificación reportada por Costa & Iraola, 2019.

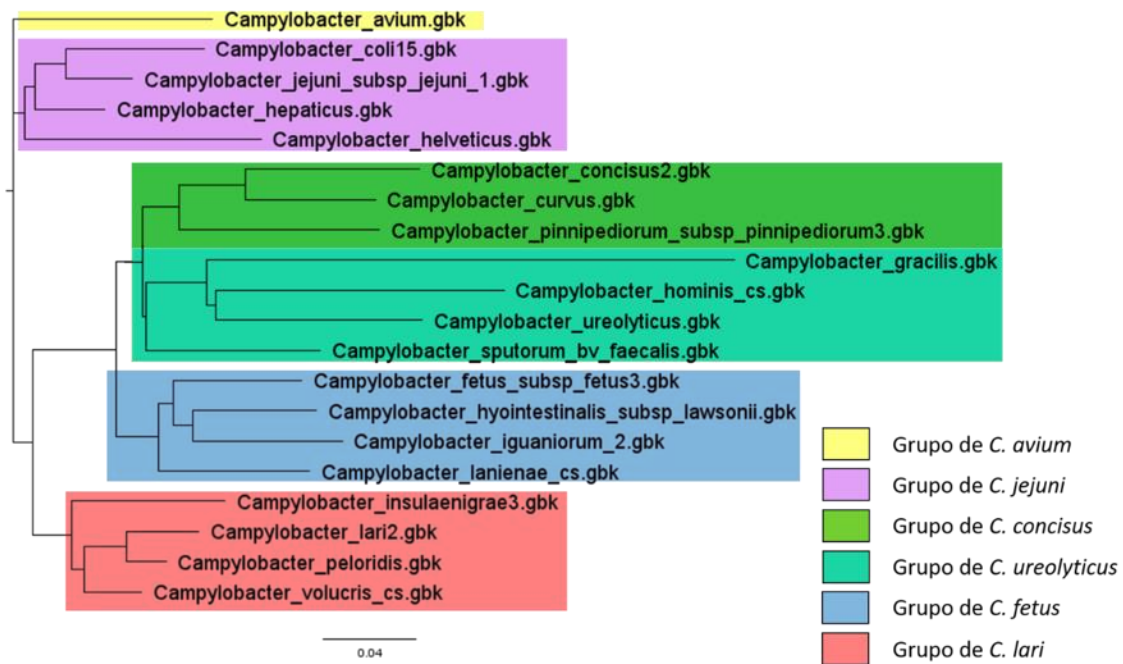


Figura 6. Árbol pangenómico de máxima parsimonia del género *Campylobacter*. La construcción del árbol se realizó con los datos de presencia/ausencia de genes contenidos en la matriz generada para el análisis pangenómico, utilizando un genoma completo por cada una de las 20 diferentes especies del género *Campylobacter*. La distinción de los diferentes grupos (excepto el grupo de *C. avium*) está basada en la clasificación reportada por Costa & Iraola, 2019.

Identificación funcional putativa de los genes que conforman al genoma *core* del género *Campylobacter*

Al realizar el análisis de la inferencia funcional de los genes que componen al *core genome*, se observó que éste está compuesto en mayor frecuencia por secuencias que principalmente están relacionadas con las funciones básicas de los microorganismos, tales como la biosíntesis de macromoléculas (ADN, ARN, proteínas), los procesos necesarios para el crecimiento como la replicación, transcripción y traducción y la presencia de factores involucrados en regulación de estos procesos (Figura 7). Cabe mencionar que también hubo secuencias para las que no se pudo encontrar una posible función, por lo que se consideraron “proteínas hipotéticas”, o “dominios sin una función”. De manera interesante, secuencias que putativamente codifican para proteínas cuya actividad en otras bacterias o en *Campylobacter* ha sido asociada con la interacción patógeno-hospedero, así como en la supervivencia al ambiente o resistencia a antibióticos, también forman parte del genoma *core* (Tabla 8).

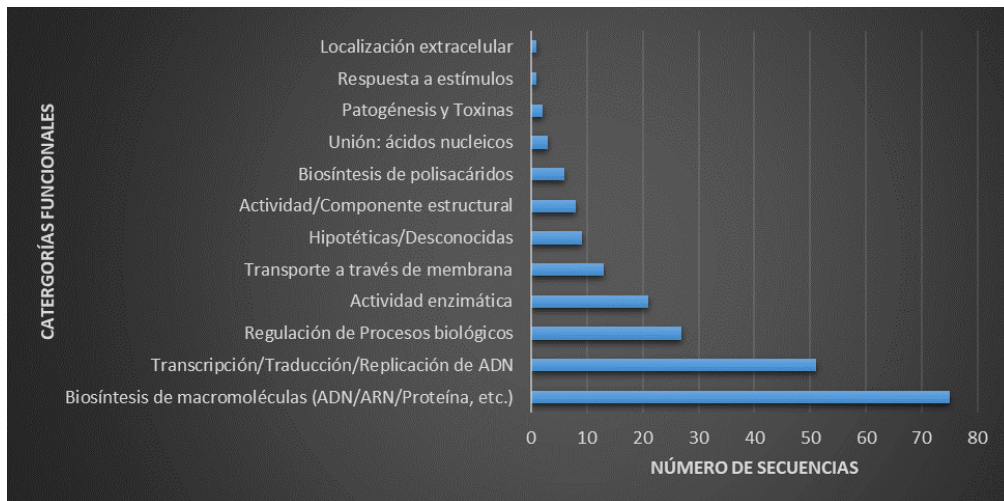


Figura 7. Categorías funcionales de *Gene Ontology* asociadas a los genes que conforman el genoma *core* de *Campylobacter*. Se muestra la frecuencia de los genes según la etiqueta que tiene cada secuencia en la anotación del genoma. Localización extracelular: GO:0005576; Respuesta a estímulos: GO:0050896; Patogénesis y Toxinas: GO:0009405, GO:0009404; Unión: ácidos nucleicos: GO:0003676; Biosíntesis de polisacáridos: GO:0000271; Actividad/Componente estructural: GO:0005198; Transporte a través de membrana: GO:0005215; Actividad enzimática: GO:0003824; Regulación de Procesos biológicos: GO:0050789, GO:0065007; Transcripción/Traducción/Replicación de ADN: GO:0045182, GO:0006412, GO:0006351, GO:0006260; Biosíntesis de macromoléculas (ADN/ARN/Proteína, etc.): GO:0009059.

Tabla 8. Anotación relacionada a algunas secuencias que conformaron el genoma *core* de *Campylobacter*.

Nombre	Función anotada	Referencia
Fibronectina de unión	<i>Staphylococcus aureus</i> produce dos proteínas de unión a fibronectina (FnBP) estrechamente relacionadas, las cuales facilitan la unión al hospedero.	Josse, Laurent & Diot, 2017
Peptidasa de la familia M23	Las peptidasas de la familia M23 son utilizadas por ciertas bacterias para lisar las paredes celulares de otras bacterias, ya sea como mecanismo de defensa o de alimentación.	Baba & Schneewind, 1996
Agamatin deiminasa	Sintetiza putrescina a partir de agmatina. Tiene un papel en la resistencia al estrés ácido, lo cual quizá ayude a la supervivencia en el tracto digestivo.	Griswold, Jameson-Lee & Burne, 2006
Peptidasa de la familia U32	Se clasifican como colagenasas, implicadas en la infección bacteriana.	Kato, Takahashi & Kuramitsu, 1992
nspC	Necesaria para la síntesis de norespirimidina, que es una poliamina. Las poliaminas, son importantes para las interacciones patógeno-hospedero durante las infecciones bacterianas.	(Nakmya <i>et al.</i> , 2018)
Hidrolasa de la familia HD	Las proteínas del dominio HD desempeñan papeles importantes en el metabolismo de los nucleótidos y en la señalización por las actividades de nucleotidasa y fosfodiesterasa, respectivamente. Posible rol en la virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i> .	Reddy, Turaga, Lawrence & Baner, 2013
Transportador de flujo RND	Los transportadores de la familia de la división de resistencia a la nodulación (RND) son una categoría de bombas de flujo bacteriano, especialmente identificadas en bacterias Gram negativas y ubicadas en la membrana citoplasmática, cuya función es transportar activamente sustratos que incluyen iones metálicos, xenobióticos o medicamentos.	Shahini Shams Abadi, Gholipour & Hadi, 2018
Transportador de la familia DMT	Transportador de drogas/metabolitos, posible relación con la resistencia a antimicrobianos.	Jack, Yang & H. Saier, 2001
Proteína de la familia CvpA	Las proteínas efectoras Cvp (<i>Coxiella vacuolar protein</i>) tienen una implicación en la patogenia de <i>Coxiella burnetii</i> . Se ha reportado que la expresión de CvpA aumenta durante la patogénesis en <i>Campylobacter coli</i> .	Backert & Grohmann, 2018

Genes específicos de especies de *Campylobacter*

Posteriormente, a partir del *cloud genome* se determinó el número de genes únicos que pertenecen a cada una de las 21 especies de *Campylobacter* analizadas. De los 7,976 *clusters* (genes) totales que conformaron el *cloud genome*, 3,926 contuvieron secuencias de genes

hipotéticos, mientras que para 4,050 secuencias se encontró una función putativa asignada. Dada la gran representatividad de genomas de *C. jejuni* utilizados en el análisis (164 genomas), esta fue la especie para la que se encontró el mayor número de genes únicos: 2,379. De las especies restantes, para las que se analizó un número de genomas mucho menor (entre 1-22 genomas), *C. gracilis* fue la especie que tuvo el mayor número de genes únicos, con un total de 656, seguida de *C. fetus*, con 454 genes únicos (Figura 8). Para *C. gracilis* sólo un genoma fue analizado, que coincidentemente es el genoma con el tamaño más grande. Para la gran mayoría de las especies, el número de genes únicos osciló entre 134-454 (Figura 8). Las especies para las que se encontraron el menor número de genes únicos son *C. peloridis*, *C. volucris* y *C. hepaticus*, con 35, 38 y 47 genes, respectivamente (Figura 8).

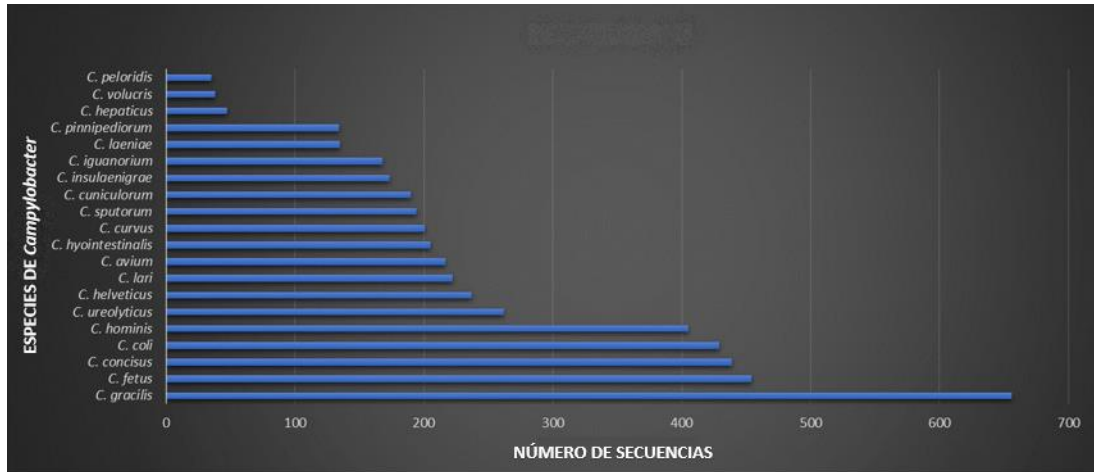


Figura 8. Número de genes únicos encontrados en los genomas correspondientes de cada especie de *Campylobacter*. Se muestra la frecuencia de las secuencias únicas presentes en los genomas analizados. El número de secuencias únicas para la especie *C. jejuni* fue de 2,379, no incluida en el gráfico.

Identificación funcional putativa de los genes específicos de *C. fetus*

A partir de los datos obtenidos del genoma *cloud*, se encontraron 454 genes únicos (a nivel de secuencia de nucleótidos) para la especie *C. fetus* (Figura 8), de los cuales, un poco más de la mitad (249) corresponden a genes que codifican para proteínas hipotéticas. De los genes con funciones anotadas putativas, la mayoría se agrupó en la categoría funcional de regulación de procesos biológicos, seguido del transporte a través de la membrana, asociados con la patogénesis y la presencia de toxinas, y en menor frecuencia aquéllos involucrados en la biosíntesis de macromoléculas (Figura 9).

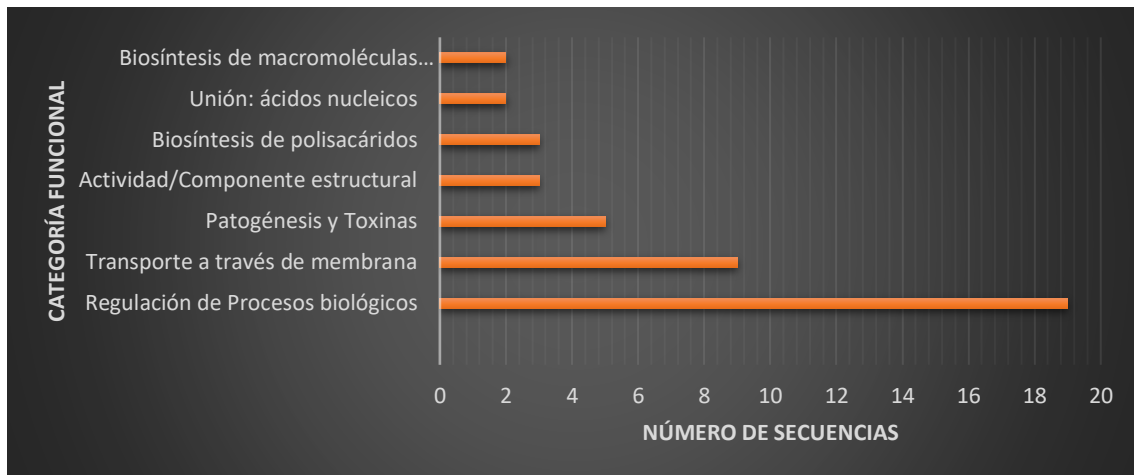


Figura 9. Función asociada a categorías de *Gene Ontology* de algunos de los genes únicos para la especie *C. fetus*. Se muestra la frecuencia de los genes o según la etiqueta que tiene cada secuencia en la anotación del genoma. Patogénesis y Toxinas: GO:0009405, GO:0009404; Unión: ácidos nucleicos: GO:0003676; Biosíntesis de polisacáridos: GO:0000271; Actividad/Componente estructural: GO:0005198; Transporte a través de membrana: GO:0005215; Regulación de Procesos biológicos: GO:0050789, GO:0065007; Biosíntesis de macromoléculas (ADN/ARN/Proteína, etc.): GO:0009059. El número de secuencias hipotéticas que se encontró dentro de este *cluster* fue de 249 (no incluidas en el gráfico).

Validación de la presencia de secuencias exclusivas en *C. fetus*

El siguiente paso fue corroborar que algunos de los genes clasificados como únicos de *C. fetus* por el análisis pangenómico, efectivamente no se encontraran en ninguna otra especie de *Campylobacter* u otra especie bacteriana. Para esto, se seleccionaron 10 secuencias al azar, listadas a continuación:

Seq 1 = proteína hipotética.

Seq 2 = gen *mprA*, el cual es un miembro del sistema regulador de dos componentes MprB/MprA que contribuye a mantener estabilidad en sistemas involucrados con la resistencia al estrés, es necesario para el establecimiento y mantenimiento de una infección persistente en el hospedero por *Mycobacterium tuberculosis* (He, Hovey, Kane, Singh & Zahrt, 2006).

Seq 3 = gen *glnQ*, codifica para una ATPasa transportadora de glutamina. Se ha reportado una disminución en la expresión génica cuando se somete *C. jejuni* y *C. coli* a estrés por calor (Riedel *et al.*, 2020).

Seq 4 = gen *pulG*, codifica una proteína secretada por el sistema de secreción tipo II (GO:0015628).

Seq 5 = proteína hipotética.

Seq 6 = gen relacionado a una proteína de membrana.

Seq 7 = gen *ansB*, está presente en vías que se activan durante la anaerobiosis (Jennings & Beacham, 1990).

Seq 8 = proteína hipotética.

Seq 9 = UDP-glucosa, participa en la vía del metabolismo de la galactosa (GO:0003978).

Seq 10 = proteína hipotética.

Con cada una de estas secuencias se realizó un alineamiento en BLASTn (ajustado con parámetros no estrictos) contra toda la base de datos del NCBI, encontrándose que efectivamente, las 10 secuencias analizadas alinearon únicamente con secuencias genómicas de *C. fetus* y no de ninguna otra especie de *Campylobacter* o género de bacteria. Tras la obtención de estos resultados, se analizó de manera más específica la presencia de 7 de estas secuencias (Seq 1-Seq 7) en genomas de *C. fetus* y de otras especies de *Campylobacter* utilizados en el análisis pangenómico, así como en genomas pertenecientes a otras especies de bacterias emparentadas (*Helicobacter* spp.) o no (*Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Salmonella* spp.) con *Campylobacter*. Para esto, a través de diversos alineamientos, cada una de las 7 secuencias se comparó con secuencias de genomas completos de diferentes bacterias y se obtuvieron los porcentajes de identidad (Figura 10).

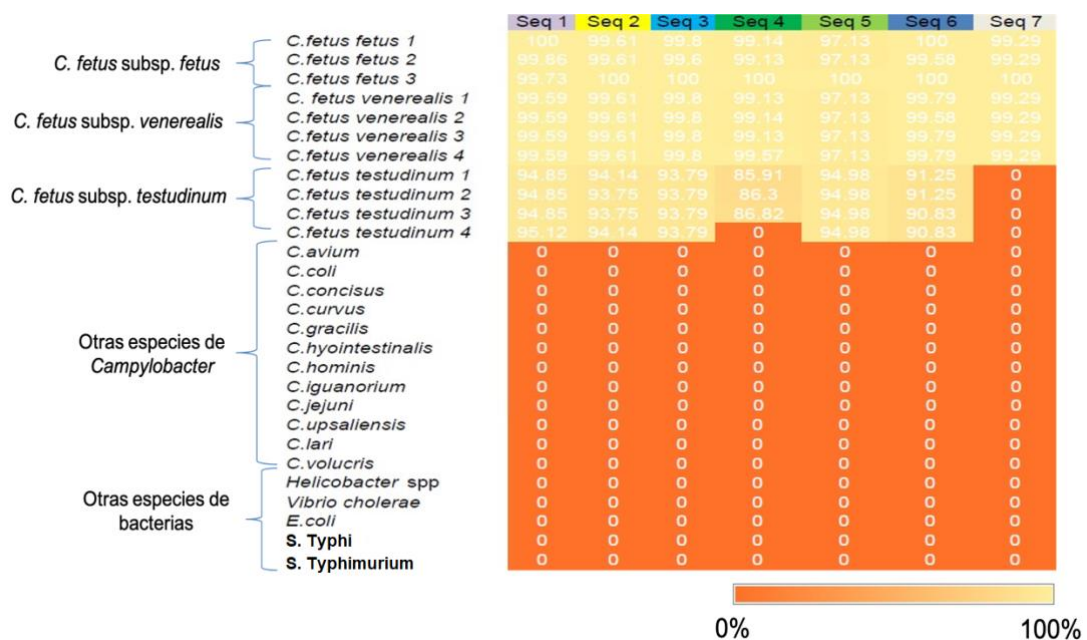


Figura 10. Análisis de la presencia de secuencias genéticas exclusivamente en genomas de *C. fetus*. Se seleccionaron 7 secuencias al azar (Seq 1-Seq 7) que de acuerdo con el análisis pangenómico utilizando *Get_Homologues*, fueron clasificadas como únicas de la especie *C. fetus*, cada una de éstas fue alineada con la secuencia completa de genomas provenientes de varias especies de *Campylobacter*, así como de otras especies de bacterias (*Helicobacter* spp., *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Thyphi y *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium). Mapa de calor donde se muestra el porcentaje de identidad (0-100, donde 0 indica ausencia) obtenido de los correspondientes alineamientos. Seq 1 = proteína hipotética; Seq 2 = *mprA*; Seq 3 = *glnQ*; Seq 4 = *pulG*; Seq 5 = proteína hipotética; Seq 6 = gen relacionado a proteína de membrana; y Seq 7 = *ansB*.

Diseño de oligonucleótidos para la amplificación *in silico* de genes únicos de *C. fetus*

Para la generación de los oligonucleótidos, se tomaron como templatado 7 (Seq 1, Seq 5, Seq 6, Seq 7, Seq 8, Seq 9 y Seq 10) de las 10 secuencias que por un análisis de BLASTn se comprobó que se encuentran exclusivamente en genomas de *C. fetus*. Así, estas secuencias fueron usadas como templatado para generar oligonucleótidos a través del programa *RUCS* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/rucs/>), generándose 20 pares de oligonucleótidos (Tabla 9). El grupo de genomas “positivos” estuvo constituido por 11 genomas de *C. fetus*: 3 obtenidos de *C.*

fetus subsp. *fetus*, 4 de *C. fetus* subsp. *testudinum* y 4 de *C. fetus* subsp. *Venerealis*, a partir de los cuales se esperaba que se amplificara *in silico*, un fragmento de 100 a 400 pares de bases., El grupo de genomas “negativos”, en los cuales no se esperaba obtener una amplificación *in silico*, estuvo conformado por 18 genomas de diferentes especies de *Campylobacter*: *C. avium*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. cuniculorum*, *C. curvus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hepaticus*, *C. hominis*, *C. iguanorium*, *C. insulenigrae*, *C. jejuni*, *C. laeniae*, *C. lari*, *C. peloridis*, *C. sputorum*, *C. ureolyticus* y *C. volucris*. Cabe mencionar que el programa *RUCS* analiza las secuencias templado y determina distintos segmentos que pueden tener el potencial de ser oligonucleótidos que funcionen para la amplificación de un fragmento solamente a partir de la secuencia templado en cuestión, buscando que ésta no se encuentre dentro del grupo de genomas “negativos”, pero sí en todos los genomas “positivos”, por lo que nos devolvió más de un par de oligos para algunas secuencias.

Amplificación *in silico* de genes específicos de *C. fetus*

Para corroborar que la amplificación de los genes candidatos se obtuviera únicamente al utilizar como templado genomas pertenecientes a la especie *C. fetus*, los 20 pares de oligonucleótidos generados fueron ensayados a través de simulaciones de PCR *in silico* usando las plataformas *in silico* PCR amplification (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) y *Primer-BLAST* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=reset). Ambas pruebas revelaron que únicamente 5 de los 20 pares de oligonucleótidos evaluados generaron amplicones exclusivamente en secuencias genómicas derivadas de *C. fetus*, los 15 restantes produjeron amplificadores en otras especies de *Campylobacter* además de *C. fetus*. En la Tabla 10 se muestran los 5 pares de oligonucleótidos que únicamente amplificaron secuencias de *C. fetus*, los cuales corresponden a tres genes distintos, nombrados de aquí en adelante Cf-1, Cf-2 y Cf-3, que están anotados como proteínas hipotéticas. Dichos oligonucleótidos amplificaron solamente un fragmento del gen completo. Como se muestra en la Figura 11, la utilización de esos 5 pares de oligonucleótidos en una PCR *in silico* generó amplicones únicamente en las reacciones simuladas donde la secuencia de ADN templado provenía de cepas de la especie *C. fetus*. La amplificación *in silico* del gen Cf-1 generó un fragmento de 351 pb (Figura 11A). Tres distintos pares de oligonucleótidos (nombrados 1, 2 y 3 en la Tabla 10) amplificaron al gen Cf-2, generándose amplicones de 171, 386 y 380 pb al utilizar el par de oligos 1, 2 y 3, respectivamente (Figura 11B); para los siguientes análisis de este gen, ya sólo se trabajó con el amplicón de 380 pb. La amplificación del gen Cf-3 produjo un producto de 137 pb (Figura 11C). Resultados similares fueron encontrados al utilizar el programa *Primer-BLAST* (datos no mostrados). Al analizar el contenido de GC de los amplicones generados, se obtuvieron valores de 30%, 33% y 35% para los genes Cf-1, Cf-2 y Cf-3, respectivamente (Figuras 12-14), los cuales son muy similares al contenido de GC promedio que está presente en los genomas de cepas de *C. fetus*, que es del 33.2% (Tabla 7).

Tabla 9. Pares de oligonucleótidos obtenidos como resultado del análisis en el programa *RUCS*. Se utilizaron como templado secuencias de los genes nombrados como Seq 1 = proteína hipotética; Seq 5 = proteína hipotética; Seq 6 = gen relacionado a proteína de membrana; Seq 7 = *ansB*; Seq 8 = secuencia de proteína hipotética; Seq 9 = UDP-glucosa; y Seq 10 = proteína hipotética. Para cada oligonucleótido se muestra la temperatura de alineamiento (Tm).

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tm
Seq 9		
Forward	ACGCGACTCATCTTATCAAAGTAGCCA	64.3
Reverse	TCTCGCGAGTCGGTTTCCAAC	64.1
Forward	GCTACTTATGGGGAGCCTAGTAGCG	64.1
Reverse	CCGATAAGCCCCTCCGTGCT	64.7
Forward	GGAGGAGCTGGATATATCGGCTCTCA	64.9
Reverse	ACTAGGCTCCCATAAGTAGCAGCA	64.9
Forward	TAAAAGACGCCGCGCTTGCA	64.3
Reverse	TGGCTACTTTGATAAGATGAGTCGCGTT	64.6
Forward	GCCTTAGGGAGATTTTAGAGGGCGTA	64.1
Reverse	CCGATAAGCCCCTCCGTGCT	64.7
Forward	CGTAGCTGGAGCAAGCACGGA	65
Reverse	ACGACTTCTTTACGCTAAATCCTCTACCA	64.1
Forward	AGCTGTTGAACACGGTGTGAGTAAGT	64.7
Reverse	CGCGGCGTCTTTAAGATCCACTC	64.2
Forward	AAATGCTCATTTGGCCGACTTGAA	62
Reverse	CTCGCGAGTCGGTTTCCAAC	62.9
Seq 1		
Forward	TCGCGCGTGGTTAGTTTAGGAGACGTG	68.6
Reverse	CTGCCAAACTCTGCAGCTACCGCTTCT	69.1
Seq 6		
Forward	TGAGGGTGGAGATCTTATTAGTGGGGTGGT	67.8
Reverse	ACCTTAAGCACATCATTACCAGCACCA	68
Seq 8		
Forward	AACACCATTTAACAGCTTGCGCCGTA	67.6
Reverse	GAGAGGAGATCGGACTACTTTCATCAGCGT	67.1
Seq 7		
Forward	TCCGGGTGAAATAGACGATGCAAATATGG	65.4
Reverse	ACTCCAAATCTTTTAGGATCGCTTGCA	65.4
Seq 10		
Forward	CGCTTGTTGCATCGTGCTTGATAAAC	64.1
Reverse	GCCACTTCAAGCATTCCAACGCT	64.5
Forward	GCACCTACTTACGATAAAGCCAACCGT	65.2
Reverse	CATATCGCCTGTTCCACATGCAACATCTA	65.4
Forward	CGTTGGAATGCTTGAAGTGGCTAAAGA	64.2
Reverse	CGAATCCGGCTTTTATAAGTTCATCGCA	64.2
Forward	AACGCTTGTTGCATCGTGCTT	62.3
Reverse	AATCCACCTTGCTCTCTTTTGTAATTCT	62.1
Seq 5		
Forward	GCCTGAAAGTGGCGAATTTGTCTAGGAC	64.3
Reverse	GTCATTCTATGATAGCTGCGTGAGTAAGA	64.2
Forward	TCTTACTCACGCAGCTATCATAGGAATGAC	64.2
Reverse	AGCATAAATTCGCATATCGCCTTTGGG	64.3

Tabla 10. Pares de oligonucleótidos que generan amplicones *in silico* específicos de *C. fetus*. Para cada oligonucleótido se muestra el nombre del gen que amplifican, el nombre del oligonucleótido, así como su secuencia, la longitud en nucleótidos, la temperatura de alineamiento (Tm) y el porcentaje de contenido de GC.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Longitud	Tm	% GC
Gen: Cf-1				
Forward	TCGCGCGTGGTTAGTTTAGGAGACGTG	27	68.61	55.56
Reverse	CTGCCAAACTCTGCAGCTACCGCTTTCT	28	69.08	53.57
Gen: Cf-2				
Forward	CGCTTGTTGCATCGTGCTTGATAAAC	26	64.12	46.15
Reverse	GCCACTTCAAGCATTCCAACGCT	23	64.55	52.17
Forward	CGTTGGAATGCTTGAAGTGGCTAAAGA	27	64.18	44.44
Reverse	CGAATCCGGCTTTTATAAGTTCATCGCA	28	64.22	42.86
Forward	AACGCTTGTTGCATCGTGCTT	21	62.27	47.62
Reverse	AATCCACCTTGCTCTCTTTTTGTAAATTCT	30	62.11	33.33
Gen: Cf-3				
Forward	TCTTACTCACGCAGCTATCATAGGAATGAC	30	64.24	43.33
Reverse	AGCATAAATTCGTCATATCGCCTTTTGGG	29	64.35	41.38

Finalmente, las secuencias obtenidas a partir de los amplicones de los genes Cf-1, Cf-2 y Cf-3 se alinearon en el programa MUSCLE y tomando como molde la secuencia de los oligonucleótidos diseñados, se determinó el porcentaje de identidad existente en la región de los oligonucleótidos, con el fin de teorizar su posibilidad de apareamiento con las secuencias blanco, lo cual es un proceso necesario y fundamental para que se consiga la amplificación de los fragmentos. Para el caso del gen Cf-1, se determinó que el porcentaje de identidad tuvo un rango de 93.45-99.72% (Figura 15), para el gen Cf-2 la identidad fue de 92.06-100% (Figura 16) y para el gen Cf-3 fue de 95.62-100%, (Figura 17); estos valores de identidad altos respaldan fuertemente la idea de que también en un experimento *in vitro*, los oligonucleótidos podrán unirse al templado y promover su amplificación.

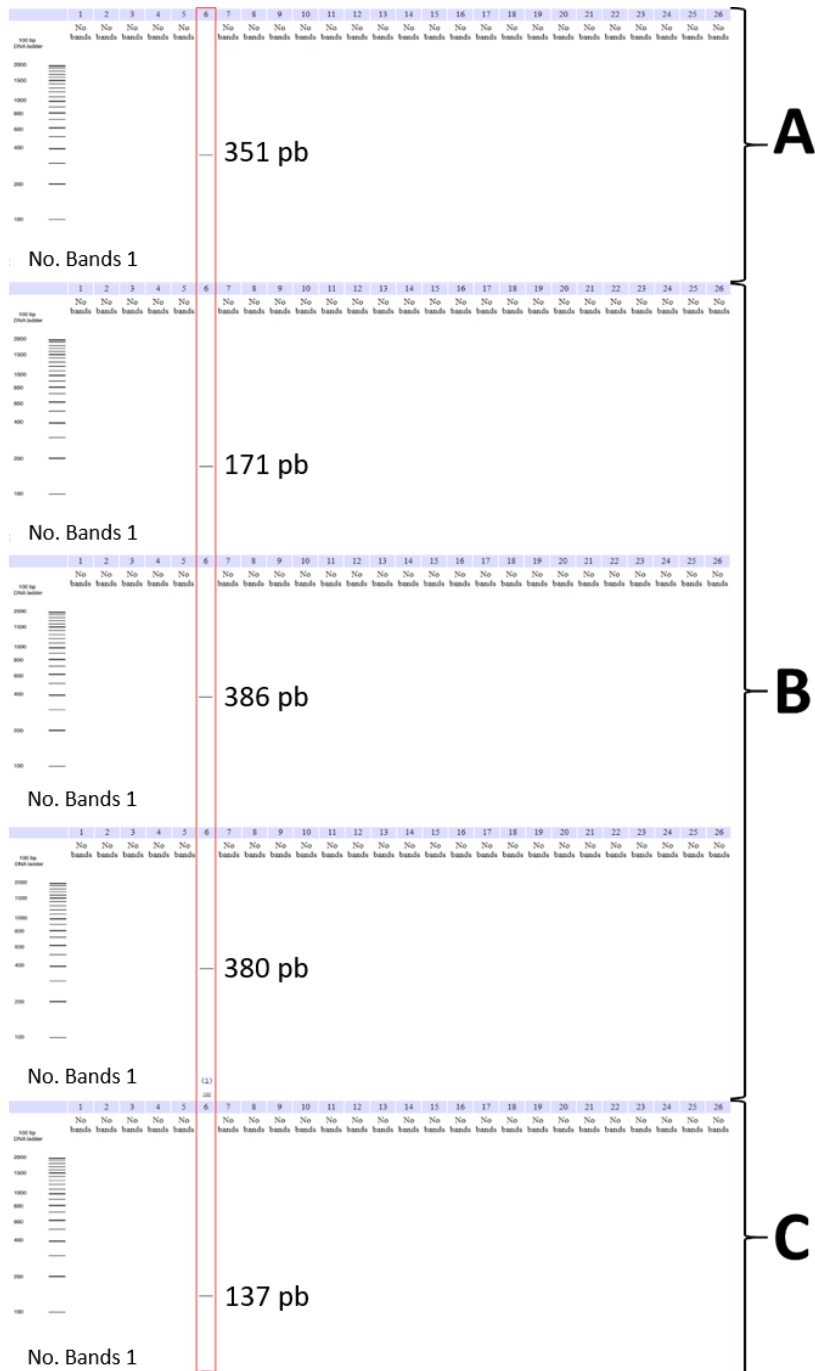


Figura 11. Amplificación *in silico* de genes específicos de *C. fetus*. Simulaciones de PCRs fueron corridas en el servidor *In silico PCR amplification* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>), utilizando diferentes pares de oligonucleótidos para la amplificación de los genes Cf-1 (A), Cf-2 (B) y Cf-3 (C). Como templado de ADN se utilizaron secuencias genómicas de diferentes especies de *Campylobacter*, dispuestas en los diferentes carriles: 1: *Campylobacter coli* 15-537360, 2: *Campylobacter coli* 76339, 3: *Campylobacter coli* CVM N29710, 4: *Campylobacter concisus* 13826, 5: *Campylobacter curvus* 525.92, 6: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* 82-40, 7: *Campylobacter hominis* ATCC BAA-381, 8: *Campylobacter jejuni* 32488, 9: *Campylobacter jejuni* 4031, 10: *Campylobacter jejuni* RM1221, 11: *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* 269.97, 12: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 00-2425, 13: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 00-2426, 14: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 00-2538, 15: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 00-2544, 16: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 81-176, 17: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 81116, 18: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* IA3902, 19: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ICDCJ07001, 20: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* M1, 21: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11168, 22: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11168-BN148, 23: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* PT14, 24: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* S3, 25: *Campylobacter lari* RM2100, 26: *Campylobacter* sp. 03-427.

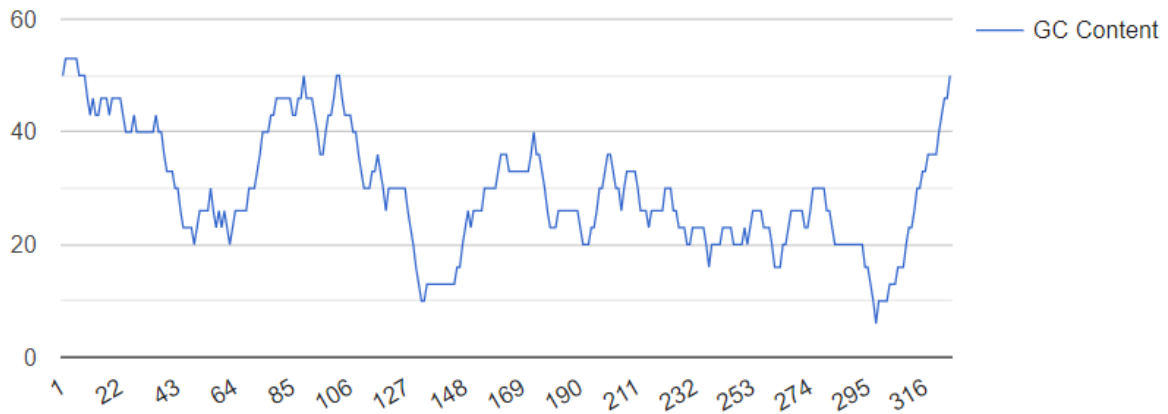


Figura 12. Distribución del contenido de GC en la secuencia del amplicón generado (351 pb) con el par de oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen Cf-1. El contenido de GC promedio es de 30%. La gráfica fue generada con *GC Content Calculator* (<https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/>).

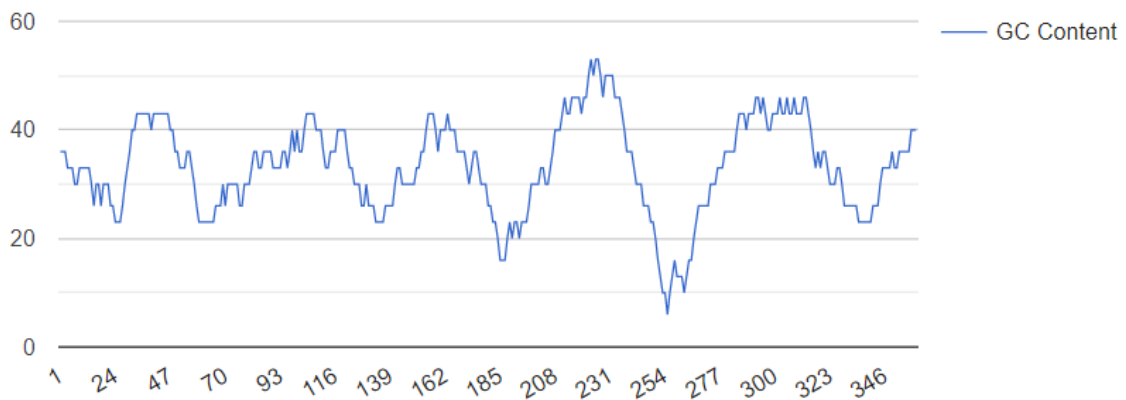


Figura 13. Distribución del contenido de GC en la secuencia del amplicón generado (380 pb) con el par de oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen Cf-2. El contenido de GC promedio es de 33%. La gráfica fue generada con *GC Content Calculator* (<https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/>).

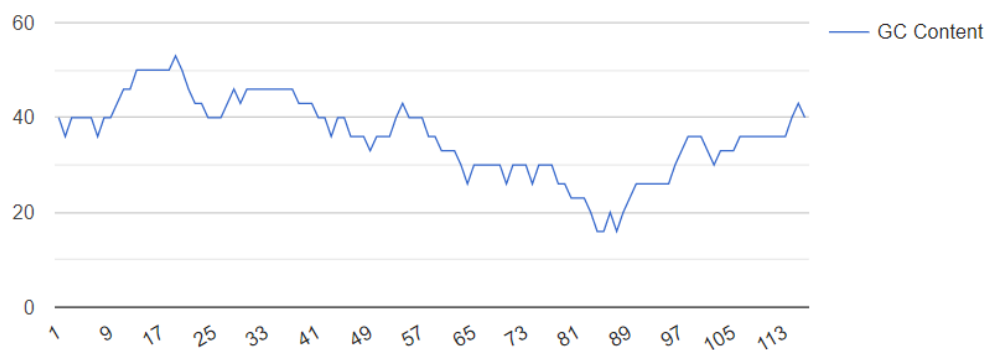


Figura 14. Distribución del contenido de GC en la secuencia del amplicón generado (137 pb) con el par de oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen Cf-3. El contenido de GC promedio es de 35%. La gráfica fue generada con *GC Content Calculator* (<https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/>).

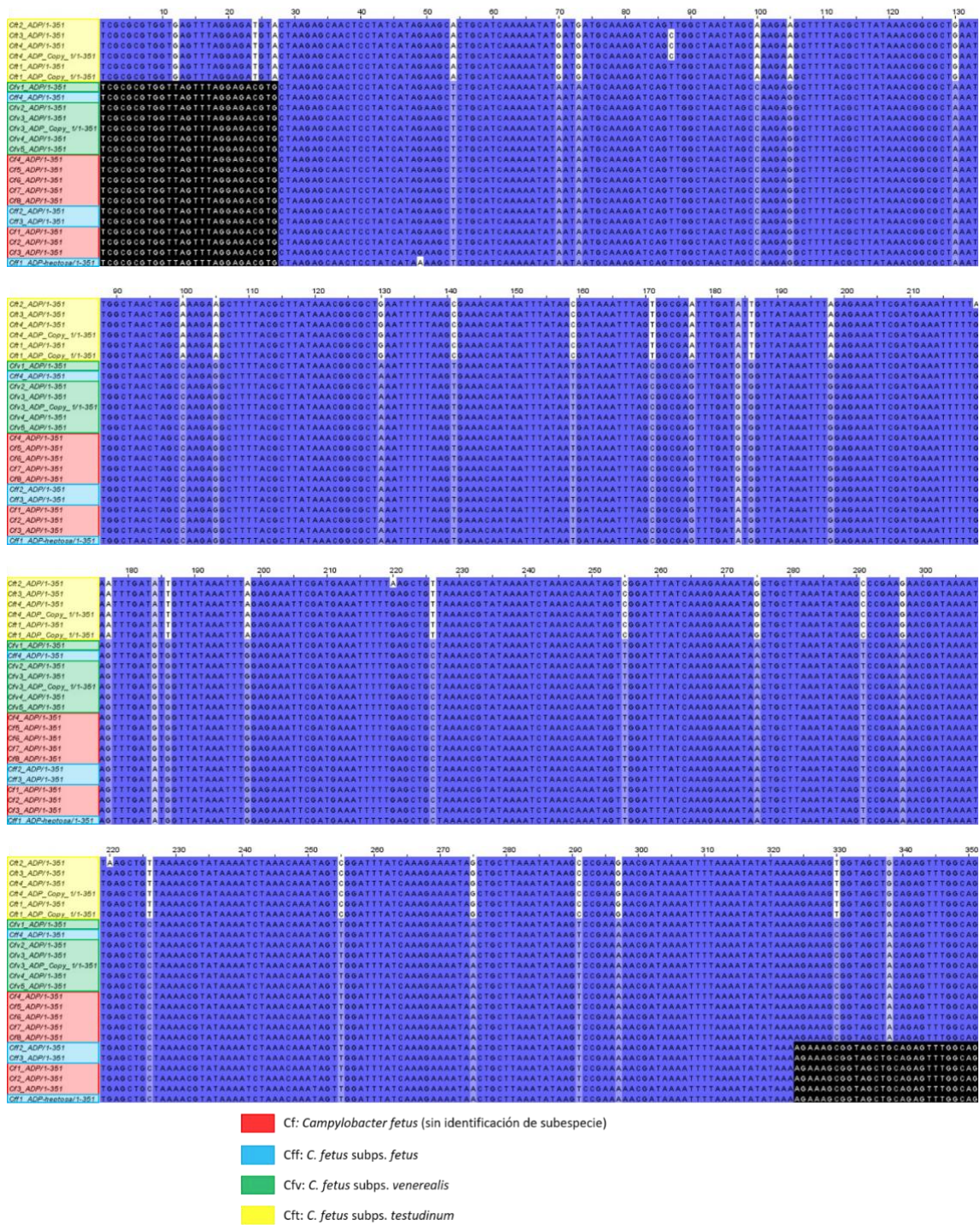


Figura 15. Alineamiento en MUSCLE de las secuencias identificadas a partir del amplicón generado (351 pb) con el par de oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen Cf-1. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en fondo negro. Los nucleótidos conservados en $\geq 90\%$ de las secuencias se muestran en fondo azul fuerte, aquellos conservados en el 40-80% de las secuencias tienen un fondo azul claro y los presentes en el 30% de las secuencias están en fondo blanco. El rango de los porcentajes de identidad en la región de los oligonucleótidos es de 93.45-99.72%. El nombre de la subespecie a partir de la cual proceden las diferentes secuencias está indicado por un color determinado.

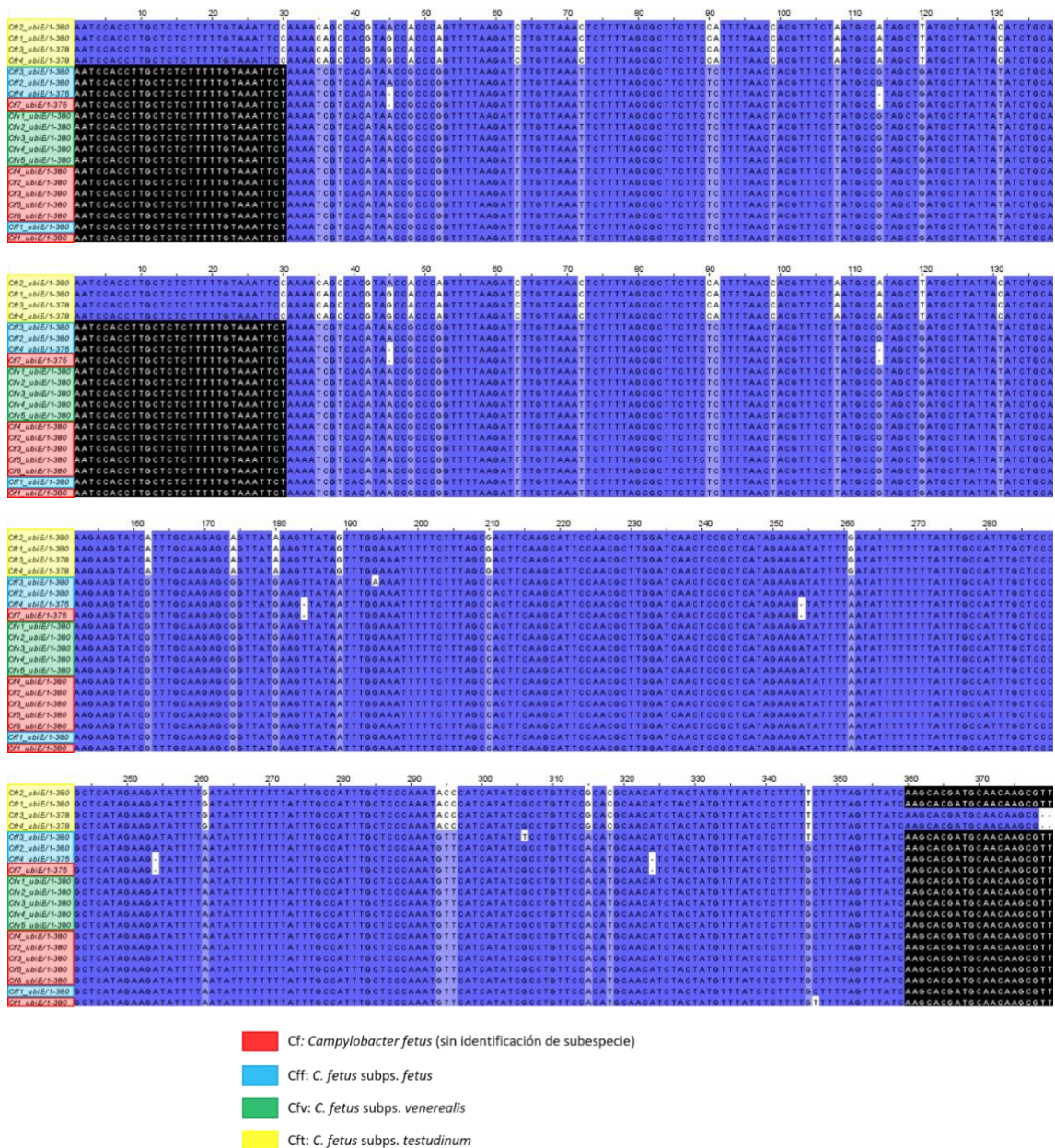


Figura 16. Alineamiento en MUSCLE de las secuencias obtenidas a partir del amplicón generado (380 pb) con el par de oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen Cf-2. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en fondo negro. Los nucleótidos conservados en $\geq 90\%$ de las secuencias se muestran en fondo azul fuerte, aquéllos conservados en el 40-80% de las secuencias tienen un fondo azul claro y los presentes en el 30% de las secuencias están en fondo blanco. El rango de los porcentajes de identidad en la región de los oligonucleótidos es de 92.06-100%. El nombre de la subespecie a partir de la cual proceden las diferentes secuencias está indicado por un color determinado.

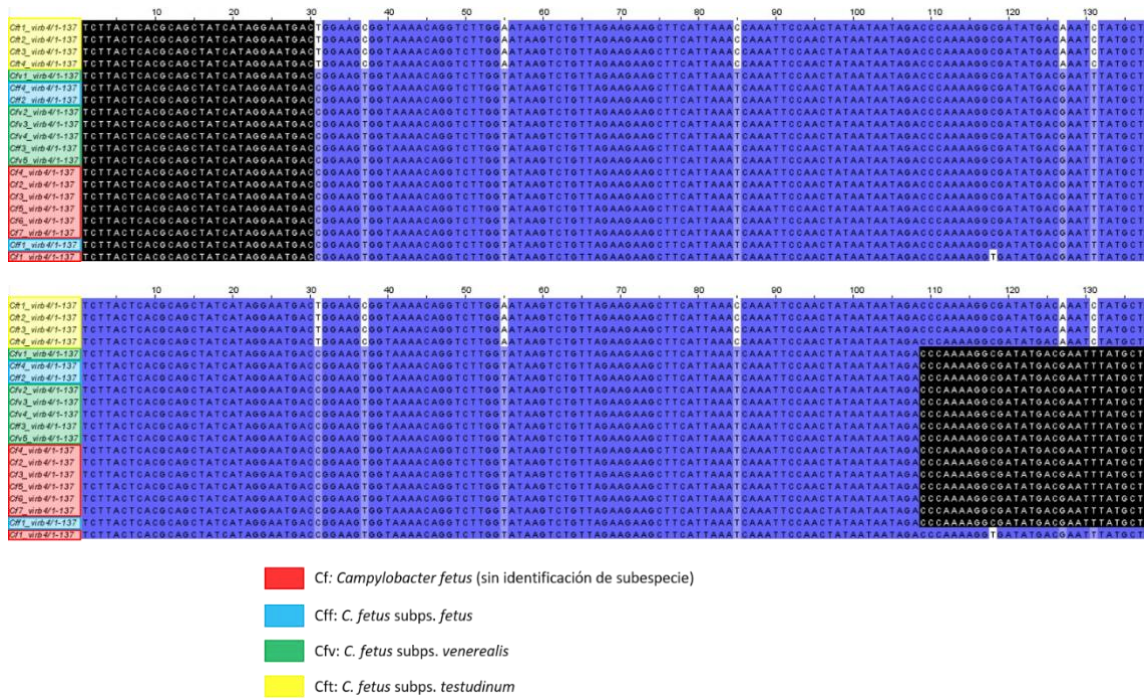


Figura 17. Alineamiento en MUSCLE de las secuencias obtenidas a partir del amplicón generado (137 pb) con el par de oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen Cf-3. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en fondo negro. Los nucleótidos conservados en $\geq 90\%$ de las secuencias se muestran en fondo azul fuerte, aquéllos conservados en el 40-80% de las secuencias tienen un fondo azul claro y los presentes en el 30% de las secuencias están en fondo blanco. El rango de los porcentajes de identidad en la región de los oligonucleótidos es de 95.62-100%. El nombre de la subespecie a partir de la cual proceden las diferentes secuencias está indicado por un color determinado.

DISCUSIÓN

Actualmente, el género *Campylobacter* incluye 33 especies de bacterias que tienen la capacidad de sobrevivir en múltiples y variadas condiciones ambientales e interactuar con un amplio rango de hospederos. La extensa diversidad funcional y de nicho que presentan estas especies, genera preguntas acerca del fondo genético que determina esta diversidad fenotípica, o que delimita y separa a las diferentes especies. Asimismo, y de manera relevante, el conocimiento de la composición genética de las diferentes especies de *Campylobacter* puede revelar la presencia de genes específicos con el potencial de ser usados como marcadores moleculares o blancos terapéuticos.

En el presente trabajo, usando un enfoque pangenómico, se realizó un análisis de genómica comparativa de 237 genomas procedentes de 21 especies del género *Campylobacter*, el cual, hasta nuestro conocimiento, constituye el estudio pangenómico con el mayor número de especies de *Campylobacter* analizadas hasta el momento. El pangenoma resultante consistió de 12,325 genes, de los cuales sólo 261 (aproximadamente el 2%), pertenecen al genoma *core* o núcleo estricto, es decir que están presentes en todas las especies analizadas; 806 genes son parte del genoma *soft core* o núcleo no estricto, los cuales se encuentran en al menos el 95% de los genomas estudiados; y 3,282 genes sólo se encuentran presentes en algunos genomas. La gran mayoría de los genes, es decir, 7,976 (aproximadamente el 65% del total), son genes accesorios o específicos de especie. En estudios previos, donde se comparó la secuencia de 15 genomas procedentes de las especies *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. hominis*, *C. jejuni* y *C. lari* (Ali *et al.*, 2012) y de 34 genomas obtenidos de *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. hominis*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. rectus*, *C. showae* y *C. upsaliensis* (Zhou *et al.*, 2013), un pangenoma de 7,059 familias génicas (Ali *et al.*, 2012) y 64,686 genes (Zhou *et al.*, 2013) fue definido, así como un genoma *core* de 552 familias genéticas (Ali *et al.*, 2012) y 12,181 genes (Zhou *et al.*, 2013). En comparación, nuestro análisis con 237 genomas reveló un tamaño del genoma *core* menor. Este hecho es consistente con lo reportado por Méric *et al.* en 2014, donde tras analizar genomas provenientes de *C. coli* y *C. jejuni*, se observó que, en las gráficas del número de genomas versus el número de genes compartidos, no se alcanzó una meseta en la curva de acumulación, lo que los llevó a sugerir que entre más genomas de especies de *Campylobacter* sean comparados, un menor número de genes se compartirán, un fenómeno también observado al analizar genomas de *E. coli* (Rasko *et al.*, 2008).

De acuerdo con el tamaño del genoma *core* encontrado (261 genes) y considerando que el número promedio de genes que están presentes en el genoma de las especies de *Campylobacter* es de alrededor de 1,900, se concluye que sólo alrededor del 13% de los genes de cada bacteria se comparten entre todas las especies. La gran proporción de genes accesorios o específicos de especie que está presente en *Campylobacter*, es indicativo de una amplia diversidad genómica en el género, lo cual es consistente con lo reportado previamente para diferentes especies de *Campylobacter* (Zhou *et al.*, 2013; Gemmell *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2019; Hsu *et al.*, 2019). Anteriormente también se había sugerido que la enorme diversidad genética que está presente en *Campylobacter* desafía a la teoría, ya que, de manera general se espera que en genomas pequeños, como los característicos de las especies de *Campylobacter*, exista una mayor proporción de genes conservados (genoma *core*) y pocos genes conformen al genoma accesorio (Hepworth *et al.*, 2011). Una gran cantidad de genes accesorios o únicos puede reflejar la adaptabilidad o especialización de la bacteria a diferentes nichos y funciones.

En cuanto a la filogenia obtenida tras comparar la presencia/ausencia de genes en los 237 genomas, las 21 especies de *Campylobacter* se agruparon en los 5 grupos filogenéticos discretos que habían sido reportados previamente: grupo de *C. jejuni*, grupo de *C. concisus*, grupo de *C. ureolyticus*, grupo de *C. fetus* y grupo de *C. lari* (Costa & Iraola, 2019), más un clado adicional (*C. avium*), lo que refleja la diversidad taxonómica del género. De destacar es el hecho que la especie *C. avium* formó un clado notoriamente separado del resto de las especies, lo cual es consistente con lo reportado cuando se describió a *C. avium*, donde usando la secuencia genética del RNA ribosomal 16S se determinó que había una marcada divergencia entre *C. avium* y varias especies del género (Rossi *et al.*, 2009). Esta separación filogenética podría ser el resultado de la adaptación a nichos ecológicos restringidos. Hasta el momento, el único hospedero del que se ha aislado a esta especie son las aves, por lo que se desconoce si tiene un limitado o amplio rango de hospederos.

No sorprendente fue el hecho de encontrar que las funciones de las proteínas para las que putativamente codifican los genes que conforman al genoma *core*, principalmente están relacionadas con procesos básicos de las bacterias como la biosíntesis de macromoléculas, transporte, almacenamiento y procesamiento de la información genética, entre otras. Formando parte del genoma *core* también hay genes que codifican para proteínas relacionadas con la resistencia a antibióticos, entre ellas las bombas de eflujo de las familias RND y CmeABC. Estos resultados concuerdan con un trabajo previo donde se estableció que CmeABC funciona como una bomba de eflujo multidroga que contribuye a la resistencia intrínseca de un amplio rango de antibióticos en *C. jejuni* (Lin *et al.*, 2002). Asimismo, en un estudio realizado de manera paralela a este trabajo en nuestro grupo de investigación, utilizando los 237 genomas que se analizaron aquí, se determinó el resistoma del género *Campylobacter*, confirmándose que las bombas de eflujo RND y CmeABC, están presentes en todos los genomas analizados (Rivera-Mendoza *et al.*, 2020, ANEXO 3).

Interesantemente, dentro de los genes que conforman al genoma *core*, también se encontraron varios con funciones anotadas que en otras especies bacterianas se han asociado con la virulencia. Tal es el caso de la secuencia anotada como fibronectina de unión, reportada en *Staphylococcus aureus* como una proteína de importancia crítica para la interacción hospedero-patógeno (Menzies, 2003). Otro ejemplo es el gen que putativamente codifica para peptidasas de la familia U32, las cuales están clasificadas como colagenasas y que se ha reportado que están implicadas en la infección bacteriana de patógenos como *Porphyromonas gingivalis* y *Helicobacter pylori* HP0169 (Kato, Takahashi & Kuramitsu, 1992). También se encontraron genes putativos para peptidasas de la familia M23, las cuales se ha reportado que pueden ser usadas para lisar las paredes celulares de otras bacterias con el fin de obtener nutrientes o como mecanismo de defensa (Baba & Schneewind, 1996). Al ser bacterias que habitan el tracto gastrointestinal, las campilobacterias deben de poseer mecanismos que les permitan sobrevivir a las condiciones hostiles que imperan en este nicho, a este respecto, otro de los genes encontrados en el genoma *core* codifica putativamente para enzimas que participan en la síntesis de putrescina, la cual es una proteína que tiene un papel en la resistencia al estrés ácido (Landete *et al.*, 2010). También se encontró al gen *nspC*, el cual codifica para una enzima que es necesaria en la síntesis de espidimidina y que, junto con la putrescina, se ha reportado que son importantes en la interacción patógeno-hospedero (Murray-Stewart, 2019). La presencia de estos genes en todos los genomas analizados supone un papel importante en la biología de estas bacterias, si está directamente relacionado o no con la virulencia es algo que se debe determinar; una interacción con el hospedero es necesaria aún en cepas no patógenas o comensales. Si la función de alguno de estos genes se relaciona con funciones importantes para

la sobrevivencia, transmisión o patogénesis, tendrían el potencial de usarse como blancos terapéuticos en beneficio de la salud humana y veterinaria.

En cuanto a las secuencias que son específicas de especie, es decir, que están presentes únicamente en un genoma o que son altamente divergentes, las cepas de *C. jejuni* presentaron el número más grande de estas secuencias, con 2,379 genes, lo cual puede atribuirse en parte al gran número de genomas de *C. jejuni* analizado, en comparación con el de las otras especies. No obstante, la extensa diversidad genómica detectada también es consistente con lo reportado previamente en 2001 por Dorrell *et al.*, donde sus análisis revelaron que había una gran diversidad genética entre las cepas de *C. jejuni* estudiadas; al comparar sólo 12 genomas de esta especie, el 21.4% de los genes (porcentaje de genes variables) no se encontraron en al menos una de las cepas analizadas (Dorrell *et al.*, 2001).

Dentro del género *Campylobacter*, *C. fetus* es una de las especies patógenas relevantes por el impacto negativo que ocasiona en la industria pecuaria y la salud pública. La detección oportuna de patógenos en ambientes clínicos o en alimentos es una de las principales medidas para prevenir su diseminación y potenciales daños a la salud, así como para la elección del tratamiento adecuado, por lo que la disponibilidad de métodos de diagnóstico rápidos, sencillos, baratos, efectivos y/o sensibles, es crítica. Las subespecies *C. fetus fetus* (asociada a mamíferos) y *C. fetus testudinum* (asociada a reptiles) son patógenos potenciales de humanos, sin embargo, su detección se dificulta debido a la gran variabilidad genética que existe entre ellas. En este trabajo, mediante un análisis pangenómico, se buscaron genes que sólo estuvieran presentes en genomas procedentes de cepas de *C. fetus* o que fueran altamente divergentes en secuencia para que se consideraran únicos de la especie, con el objetivo de proponerlos como marcadores moleculares para la identificación de *C. fetus* mediante un método de PCR convencional o punto final. En trabajos previos se han identificado marcadores genéticos para la detección de *C. fetus* (Hum *et al.*, 1997; Abril *et al.*, 2007; Chaban *et al.*, 2009; Moolhuijzen *et al.*, 2009; van der Graaf-van-Bloois *et al.*, 2013), sin embargo, la determinación de dichos marcadores estuvo basada en la comparación de genomas que provenían de cepas de *C. fetus* aisladas principalmente de bovinos y de regiones geográficas muy locales, lo cual supone limitaciones en la representatividad de la variabilidad genética que se ha determinado que existe en los genomas de las subespecies de *C. fetus*. En comparación, con el fin de proponer nuevos candidatos de marcadores moleculares para mejorar los métodos de identificación actuales, en el presente trabajo se buscó tener una mayor representatividad en la variabilidad de los genomas estudiados, por lo que se analizaron genomas de *C. fetus* disponibles públicamente en las bases de datos que hubieran sido obtenidos a partir de cepas aisladas de distintos hospederos (seres humanos, bovinos y reptiles), de diferentes partes del mundo y que abarcaran a las 3 subespecies de la especie. En un estudio previo, la búsqueda de un posible marcador para la identificación de *C. fetus* también estuvo basada en la comparación de genomas de esta especie usando los criterios anteriores; en dicho trabajo, el método de diagnóstico propuesto implica la amplificación del gen RNA ribosomal 16S por la técnica de PCR tiempo real (Iraola *et al.*, 2016). Aquí, a partir de los resultados del análisis pangenómico se identificaron 454 secuencias que, de acuerdo con los parámetros utilizados, únicamente están presentes en los genomas provenientes de cepas de *C. fetus*. De éstas, se escogieron algunas para confirmar que efectivamente fueran exclusivas de *C. fetus* para finalmente determinarse que las secuencias de tres genes hipotéticos son específicas de la especie *C. fetus* y por lo tanto, podrían usarse como pruebas moleculares para su identificación, ya que los diversos alineamientos y los ensayos de PCR *in silico* revelaron que su amplificación es positiva únicamente en genomas obtenidos de cepas de las tres subespecies de *C. fetus* y negativa para otras especies de *Campylobacter* o

bacterias de otros géneros. Además, el alto nivel de conservación que hay en la región donde aparecen las secuencias de los diferentes oligonucleótidos diseñados, apoyan la gran posibilidad de amplificación usando ADNs de *C. fetus* de diferentes fuentes como molde. El análisis de la secuencia de nucleótidos de estos genes corroboró que constituyen marcos de lectura abiertos, sin embargo, ninguna función putativa pudo ser asignada de manera confiable. Asimismo, se determinó que el contenido de GC de cada uno de estos genes es muy parecido al del resto del genoma de cepas de *C. fetus* (aproximadamente 30%), lo cual sugiere que no fueron adquiridos por eventos de transferencia horizontal. Por lo tanto, nosotros proponemos a estos genes como candidatos potenciales para usarse como marcadores moleculares en la detección de *C. fetus* mediante su amplificación por PCR de punto final. La técnica de PCR convencional es una herramienta de relativamente fácil acceso en cualquier laboratorio del mundo, por lo que en este trabajo proponemos su uso como un método de diagnóstico simple y barato, a diferencia del PCR tiempo real, el cual requiere de un equipo especializado e insumos de mayor costo. Las pruebas diagnósticas rápidas y simples para la detección de diferentes especies de *Campylobacter* pueden tener usos tanto en la seguridad alimentaria como en la salud pública.

CONCLUSIONES

- Se determinó que el pangenoma de 21 especies del género *Campylobacter* está constituido por 12,325 genes, de los cuales 261 conforman al genoma *core* y 7,976 genes constituyen al genoma *cloud*.
- Con base en la comparación de 237 genomas completos derivados de 21 especies de *Campylobacter*, se estableció que las diferentes especies se agrupan en 6 grupos filogenéticos.
- Las funciones putativas de algunas de las proteínas que forman parte del genoma *core* de *Campylobacter* están asociadas con la interacción con el hospedero y la resistencia a antibióticos, los cuales tienen el potencial de ser usados como blancos terapéuticos.
- Mediante distintos análisis *in silico*, se determinó la especificidad de 3 genes en genomas de *C. fetus*, los cuales podrían usarse como marcadores moleculares para la detección de esta especie.

PERSPECTIVAS

- Validar los marcadores moleculares propuestos mediante la realización de PCRs usando ADN extraído de muestras de especies de *Campylobacter* aisladas de humanos y animales.
- Ampliar el análisis *in silico* a un mayor número de secuencias para dilucidar otros posibles marcadores genéticos.

REFERENCIAS

1. Abril, C., Vilei, E., 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. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01787.x.
2. Abudahab, K., Prada, J., Yang, Z., Bentley, S., Croucher, N., Corander, J., & Aanensen, D. (2019). PANINI: Pangenome Neighbour Identification for Bacterial Populations. *Microbial Genomics*, 5(4). doi: 10.1099/mgen.0.000220.
3. Agnifili, L., Pieragostino, D., Mastropasqua, A., Fasanella, V., Brescia, L., & Tosi, G. *et al.* (2015). Molecular biomarkers in primary open-angle glaucoma. *Progress in Brain Research*, 1-32. doi: 10.1016/bs.pbr.2015.05.006.
4. Al-Samarai, F., & Al-Kazaz, A. (2015). Molecular Markers: An Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118-130. doi: 10.13187/ejmb.2015.9.118.
5. Ali, A., Soares, S., Santos, A., Guimarães, L., Barbosa, E., & Almeida, S. *et al.* (2012). *Campylobacter fetus* subspecies: Comparative genomics and prediction of potential virulence targets. *Gene*, 508(2), 145-156. doi: 10.1016/j.gene.2012.07.070.
6. Authority E.F.S. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. (2017). *EFSA Journal*, 15(12). doi: 10.2903/j.efsa.2017.5077.
7. Baba, T., & Schneewind, O. (1996). Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *The EMBO Journal*, 15(18), 4789-4797. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00859.x.
8. Grohmann, E., Christie, P.J., Waksman, G., & Backert, S. (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 107(4):455-471.
9. Bergey's Manual of Systematics of *Archaea* and *Bacteria*, Online © 2015 Bergey's Manual Trust. This article is © 2005 Bergey's Manual Trust. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01071. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
10. Bessède, E., Asselineau, J., Perez, P., Valdenaire, G., Richer, O., Lehours, P., & Mégraud, F. (2018). Evaluation of the Diagnostic Accuracy of Two Immunochromatographic Tests Detecting *Campylobacter* in Stools and Their Role in *Campylobacter* Infection Diagnosis. *Journal Of Clinical Microbiology*, 56(4), e01567-17. doi: 10.1128/jcm.01567-17.
11. Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529-563. doi: 10.3934/microbiol.2017.3.529.
12. BISTIC Definition Committee. (2000). NIH working definition of bioinformatics and computational biology (p. 1). BISTIC Definition Committee. Retrieved from <https://web.archive.org/web/20160307152253/https://www.bisti.nih.gov/docs/co>.

13. Bradley, Linda A., Johnson, Dorene A., Chaparro, Carlos A., Robertson, Nancy H., Ferrie, Richard M. (January 1998). "A Multiplex ARMS Test for 10 Cystic Fibrosis (CF) Mutations: Evaluation in a Prenatal CF Screening Program". *Genetic Testing*. 2 (4): 337–341. doi:10.1089/gte.1998.2.337.
14. Brenner, S. (1999). Errors in genome annotation. *Trends in Genetics*, 15(4), 132-133. doi: 10.1016/s0168-9525(99)01706-0.
15. Buissonnière, A., Bénéjat, L., Charron, P., Bessède, E., Lehours, P., & Valdenaire, G. *et al.* (2018). A new kit to detect *Campylobacter* species in stool specimens: the Orion GenRead *Campylobacter*[®]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(8), 1585-1587. doi: 10.1007/s10096-018-3288-5.
16. Campos-Múzquiz, L., Méndez-Olvera, E., Arellano-Reynoso, B., & Martínez-Gómez, D. (2019). *Campylobacter fetus* is Internalized by Bovine Endometrial Epithelial Cells. *Polish Journal of Microbiology*, 68(2), 214-224. doi: 10.33073/pjm-2019-022.
17. Chaban, B., Musil, K., Himsworth, C., & Hill, J. (2009). Development of cpn60-Based Real-Time Quantitative PCR Assays for the Detection of 14 *Campylobacter* Species and Application to Screening of Canine Fecal Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3055-3061. doi: 10.1128/aem.00101-09.
18. Chai, S., Cole, D., Nisler, A., & Mahon, B. (2017). Poultry: The most common food in outbreaks with known pathogens, United States, 1998–2012. *Epidemiology and Infection*, 145(2), 316-325. doi:10.1017/S0950268816002375 Collins' Dictionary available at <http://www.collinsdictionary.com/> Revisado 29 Dic 2018.
19. Cormen, T., Leiserson, C., Rivest, R., & Stein, C. (2009). *Introduction to algorithms* (3rd ed., pp. 5-6). London, England: Massachusetts Institute of Technology.
20. Cossart, P., & Sansonetti, P. (2004). Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science*, 304(5668), 242-248. doi: 10.1126/science.1090124.
21. Costa, D., & Iraola, G. (2019). Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4). doi: 10.1128/cmr.00072-1810.1016/j.mimet.2016.11.012.
22. Costa, D., Lévesque, S., Kumar, N., Fresia, P., Ferrés, I., Lawley, T., & Iraola, G. (2019). Pangenome analysis reveals genetic isolation in *Campylobacter hyointestinalis* subspecies adapted to different mammalian hosts. bioRxiv. doi: 10.1101/600403.
23. Datta, S., Niwa, H., & Itoh, K. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *Journal of Medical Microbiology*, 52(4), 345-348. doi: 10.1099/jmm.0.05056-0.
24. Dorrell, N. (2001). Whole Genome Comparison of *Campylobacter jejuni* Human Isolates Using a Low-Cost Microarray Reveals Extensive Genetic Diversity. *Genome Research*, 11(10), 1706-1715. doi: 10.1101/gr.185801.

25. EFSA, and ECDC (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16(12:5500), 262. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500.
26. El-Moamly, A. (2014). Immunochromatographic Techniques: Benefits for the Diagnosis of Parasitic Infections. *Austin Chromatography.*, 4(8), 1.
27. Farace, P., Morsella, C., Cravero, S., Sioya, B., Amadio, A., Paolicchi, F., & Gioffré, A. (2019). L-cysteine transporter-PCR to detect hydrogen sulfide-producing *Campylobacter fetus*. *Peerj*, 7, e7820. doi: 10.7717/peerj.7820.
28. Fenwick, S., West, D., Hunter, J., Sargison, N., Ahmed, F., Lumsden, J., & Collett, M. (2000). *Campylobacter fetus fetus* abortions in vaccinated ewes. *New Zealand Veterinary Journal*, 48(5), 155-157. doi: 10.1080/00480169.2000.36184.
29. Fitch, W. (1970). Distinguishing Homologous from Analogous Proteins. *Systematic Zoology*, 19(2), 99. doi: 10.2307/2412448.
30. Fitch, W. (2000). Homology. *Trends in Genetics*, 16(5), 227-231. doi: 10.1016/s0168-9525(00)02005-9.
31. Ge, Z., Schauer, D., & Fox, J. (2008). *In vivo* virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cellular Microbiology*, 10(8), 1599-1607. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01173.x.
32. Ge, B., Wang, F., Sjolund-Karlsson, M., and McDermott, P.F. (2013). Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of Microbiology Methods*, 95(1), 57-67. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.021.
33. Gemmell, M., Berry, S., Mukhopadhyaya, I., Hansen, R., Nielsen, H., & Bajaj-Elliott, M. et al. (2018). Comparative genomics of *Campylobacter concisus*: Analysis of clinical strains reveals genome diversity and pathogenic potential. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1-17. doi: 10.1038/s41426-018-0118-x.
34. Ghahramani, Z. (2001) An Introduction to Hidden Markov Models and Bayesian Networks. *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence*, 15(1): 9-42.
35. Gracias, K., & McKillip, J. (2004). A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(11), 883-890. doi: 10.1139/w04-080.
36. Granato, P., Chen, L., Holiday, I., Rawling, R., Novak-Weekley, S., Quinlan, T., & Musser, K. (2010). Comparison of Premier CAMPY Enzyme Immunoassay (EIA), ProSpecT *Campylobacter* EIA, and ImmunoCard STAT! CAMPY Tests with Culture for Laboratory Diagnosis of *Campylobacter* Enteric Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 4022-4027. doi: 10.1128/jcm.00486-10.
37. Griswold, A., Jameson-Lee, M., & Burne, R. (2006). Regulation and Physiologic Significance of the Agmatine Deiminase System of *Streptococcus mutans* UA159. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 834-841. doi: 10.1128/jb.188.3.834-841.2006.
38. Grogono-Thomas R, BlaserMJ, AhmadiM, Newell DG. (2003). Role of S-layer protein antigenic diversity in the immune responses of sheep experimentally

- challenged with *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Infection and Immunity, 71:147–54.
39. Grover, A., & Sharma, P. (2014). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290-302. doi: 10.3109/07388551.2014.959891.
 40. Guerry P., Szymanski C. M. (2008). *Campylobacter* sugars sticking out. *Trends in Microbiology*, 16, 428–435. doi: 10.1016/j.tim.2008.07.002.
 41. Hamali H, Fallah S, Joozani RJ, Zare P, Noorsaadat G. 2014. Detection of *Campylobacter* spp. in sheep aborted fetuses by PCR. *Trends Life Science*, 3:49-56.
 42. Hayward, A., Tollenaere, R., Dalton-Morgan, J., & Batley, J. (2015). Molecular Marker Applications in Plants. *Methods in Molecular Biology*, 13-27. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6_2.
 43. Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., et al. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Medicine*, 12(12), e1001923. doi: 10.1371/journal.pmed.1001923.
 44. He, H., Hovey, R., Kane, J., Singh, V., & Zahrt, T. (2006). MprAB Is a Stress-Responsive Two-Component System That Directly Regulates Expression of Sigma Factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 188(6), 2134-2143. doi: 10.1128/jb.188.6.2134-2143.2006.
 45. Hepworth, P., Ashelford, K., Hinds, J., Gould, K., Witney, A., & Williams, N. et al. (2011). Genomic variations define divergence of water/wildlife-associated *Campylobacter jejuni* niche specialists from common clonal complexes. *Environmental Microbiology*, 13(6), 1549-1560. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02461.x.
 46. Holmes, A.H., L.S.P. Moore, A. Sundsfjord, M. Steinbakk, S. Regmi, A. Karkey, P.J. Guerin & L.J.V. Piddock, (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 387: 176-187.
 47. Hsu, T., Gemmell, M., Franzosa, E., Berry, S., Mukhopadhyay, I., & Hansen, R. et al. (2019). Comparative genomics and genome biology of *Campylobacter showae*. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 827-840. doi: 10.1080/22221751.2019.1622455.
 48. Huang, H., Brooks, B., Lowman, R., & Carrillo, C. (2015). *Campylobacter* species in animal, food, and environmental sources, and relevant testing programs in Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(10), 701-721. doi: 10.1139/cjm-2014-0770.
 49. Hue, O., Allain, V., Laisney, M., Le Bouquin, S., Lalande, F., & Petetin, I. et al. (2011). *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. *Food Microbiology*, 28(5), 862-868. doi: 10.1016/j.fm.2010.11.003.
 50. Hum, S., Quinn, K., Brunner, J., & On, S. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Australian Veterinary Journal*, 75(11), 827-831. doi: 10.1111/j.1751-0813.1997.tb15665.x.
 51. Iraola, G., Forster, S., Kumar, N., Lehours, P., Bekal, S., & García-Peña, F. et al. (2017). Distinct *Campylobacter fetus* lineages adapted as livestock pathogens

- and human pathobionts in the intestinal microbiota. *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01449-9.
52. Iraola, G., Pérez, R., Betancor, L., Marandino, A., Morsella, C., & Méndez, A. et al. (2016). A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Veterinary Research*, 12(1). doi: 10.1186/s12917-016-0913-3.
 53. Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., & Wilkins, E. (1999). Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(7), 599-624. doi: 10.1016/s0956-5663(99)00039-1.
 54. Russell C. Eberhart. Yuhui Shi. James Kennedy. (2001). *Swarm Intelligence (Morgan Kaufmann series in evolutionary computation)*. Morgan Kaufmann Publishers.
 55. Jack, D., Yang, N., & H. Saier, M. (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *European Journal Of Biochemistry*, 268(13), 3620-3639. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02265.x.
 56. Jäderlund, L., Sessitsch, A., & Arthurson, V. (2011). Persistence of Two *Campylobacter jejuni* Strains in Soil and on Spinach Plants. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011, 1-7. doi: 10.1155/2011/836271.
 57. Janda, J., & Abbott, S. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764. doi: 10.1128/jcm.01228-07.
 58. Jennings, M., & Beacham, I. (1990). Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L-asparaginase II, ansB, and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins. *Journal of Bacteriology*, 172(3), 1491-1498. doi: 10.1128/jb.172.3.1491-1498.1990.
 59. Jin S., Joe A., Lynett J., Hani E. K., Sherman P., Chan V. L. (2001). JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 39, 1225–1236. doi: 10.1111/j.1365-2958.2001.02294.x.
 60. Josse, J., Laurent, F., & Diot, A. (2017). Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02433.
 61. Kaakoush, N.O., Castano-Rodriguez, N., Mitchell, H.M., and Man, S.M. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 28(3), 687-720. doi: 10.1128/CMR.00006-15.
 62. Kale A., Phansopa C., Suwannachart C., Craven C. J., Rafferty J. B., Kelly D. J. (2011). The virulence factor PEB4 (CJ0596) and the periplasmic protein Cj1289 are two structurally related SurA-like chaperones in the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 21254–21265. doi: 10.1074/jbc.M111.220442.
 63. Kato, T., Takahashi, N., & Kuramitsu, H. (1992). Sequence analysis and characterization of the *Porphyromonas gingivalis prtC* gene, which expresses a novel collagenase activity. *Journal of Bacteriology*, 174(12), 3889-3895. doi: 10.1128/jb.174.12.3889-3895.1992.
 64. Khan, F. (2015). Molecular Markers: An Excellent Tool for Genetic Analysis. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, 06(03). doi: 10.4172/2155-9929.1000233.

65. Koonin EV. (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, 39:309–338.
66. Kondrashov, F., Rogozin, I., Wolf, Y., & Koonin, E. (2002). *Genome Biology*, 3(2), research0008.1. doi: 10.1186/gb-2002-3-2-research0008.
67. Konkel M. E., Kim B. J., Rivera-Amill V., Garvis S. G. (1999). Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Molecular Microbiology*, 32, 691–701. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01376.x.
68. Kreitman, M. (1983). Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 304(5925), 412–417. doi: 10.1038/304412a0.
69. Kristensen, D. M., Kannan, L., Coleman, M. K., Wolf, Y. I., Sorokin, A., Koonin, E. V., & Mushegian, A. (2010). A low-polynomial algorithm for assembling clusters of orthologous groups from intergenomic symmetric best matches. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(12), 1481–7.
70. Kuhner, M. K., Beerli, P., Yamato, J., & Felsenstein, J. (2000). Usefulness of single nucleotide polymorphism data for estimating population parameters. *Genetics*, 156(1), 439–447.
71. Laing, C., Whiteside, M., & Gannon, V. (2017). Pan-genome Analyses of the Species *Salmonella enterica*, and Identification of Genomic Markers Predictive for Species, Subspecies, and Serovar. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01345.
72. Landers, T., Cohen, B., Wittum, T., & Larson, E. (2012). A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Reports*, 127(1), 4–22. doi: 10.1177/003335491212700103.
73. Landete, J. M., Arena, M. E., Pardo, I., Manca de Nadra, M. C., & Ferrer, S. (2010). The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 13(4), 169–177. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.123>.
74. Lara-Tejero M., Galán J. E. (2000). A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*, 290, 354–357. doi: 10.1126/science.290.5490.354.
75. Lefébure, T., Pavinski Bitar, P., Suzuki, H., & Stanhope, M. (2010). Evolutionary Dynamics of Complete *Campylobacter* Pan-Genomes and the Bacterial Species Concept. *Genome Biology And Evolution*, 2, 646–655. doi: 10.1093/gbe/evq048.
76. Li, G., Yang, M., Zhou, K., Zhang, L., Jin, Y., & Lin, R. et al. (2015). Mo1812 Diversity of Duodenal and Rectal Microbiota in Biopsy Tissues and Luminal Contents in the Healthy Volunteers. *Gastroenterology*, 148(4), S-717. doi: 10.1016/s0016-5085(15)32442-2.
77. Li, L. (2003). OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Research*, 13(9), pp.2178–2189.
78. Lin, J., Michel, L., & Zhang, Q. (2002). CmeABC Functions as a Multidrug Efflux System in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7), 2124–2131. doi: 10.1128/aac.46.7.2124-2131.2002.

79. Lynch M, Conery JS. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*. 2000;290:1151–1155.
80. Lynch M, Force A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*. 2000;154:459–473.
81. Islam, M., Khanam, S., & Mohanta, M. (2017). Isolation, characterization and identification of bacterial isolates from the poultry environment at Rajshahi Metropolis, Bangladesh. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(4), 918-926.
82. Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock, Biología de los microorganismos* (10th ed., p. 729). [Madrid]: Pearson.
83. Maheswaran, M. (August 2014). *Molecular Markers: History, Features and Applications*. Advanced Biotech.
84. Man, S.M. (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Reviews of Gastroenterology and Hepatology*, 8(12), 669-685. doi: 10.1038/nrgastro.2011.191.
85. Mandal, R., Saha, S., & Das, S. (2015). Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(3), 148-158. doi: 10.1016/j.gpb.2015.02.005.
86. Mannering, S., Marchant, R., Middelberg, A., Perkins, N., West, D., & Fenwick, S. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* from sheep abortions in the Hawke's Bay region of New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 51(1), 33-37. doi: 10.1080/00480169.2003.36327.
87. Manyi-Loh, C. E., Mamphweli, S. N., Meyer, E. L., Makaka, G., Simon, M., & Okoh, A. I. (2016). An Overview of the Control of Bacterial Pathogens in Cattle Manure. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(9), 843. <http://doi.org/10.3390/ijerph13090843>.
88. Thomsen, M., Hasman, H., Westh, H., Kaya, H., & Lund, O. (2017). RUCS: rapid identification of PCR primers for unique core sequences. *Bioinformatics*, 33(24), 3917-3921. doi: 10.1093/bioinformatics/btx526.
89. Mashego, M.R. Rumbold K. Mey M.D. Vandamme E. Soetaert W. Heijnen J.J. (2007) Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters*, 29: 1–16.
90. McVean, G., Awadalla, P., & Fearnhead, P. (2002). A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics*, 160(3), 1231–1241.
91. Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L., Bresee, J., & Shapiro, C. *et al.* (1999). Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 607-625. doi: 10.3201/eid0505.990502.
92. Meat Consumption (Indicator) [(accessed on 24 July 2017)]; Available online:<https://data.oecd.org/agrooutput/meat-consumption.htm>.
93. Menzies, B. (2003). The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16(3), 225-229. doi: 10.1097/00001432-200306000-00007.
94. Méric, G., Yahara, K., Mageiros, L., Pascoe, B., Maiden, M., Jolley, K., & Sheppard, S. (2014). A Reference Pan-Genome Approach to Comparative

- Bacterial Genomics: Identification of Novel Epidemiological Markers in Pathogenic *Campylobacter*. Plos ONE, 9(3), e92798. doi: 10.1371/journal.pone.0092798.
95. Meyer, S., Weiss, G., & von Haeseler, A. (1999). Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics*, 152(3), 1103–1110.
 96. Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>.
 97. Moolhuijzen, P., Lew-Tabor, A., Wlodek, B., Agüero, F., Comerci, D., & Ugalde, R. *et al.* (2020). Genomic analysis of *Campylobacter fetus* subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets. *BMC Microbiology*, 9(1):86.
 98. Mshelia, G., Amin, J., Woldehiwet, Z., Murray, R., & Egwu, G. (2009). Epidemiology of Bovine Venereal Campylobacteriosis: Geographic Distribution and Recent Advances in Molecular Diagnostic Techniques. *Reproduction in Domestic Animals*. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01546.x.
 99. Murray-Stewart, T. (Ed.) (2019). *Polyamine Metabolism in Disease and Polyamine-Targeted Therapies*.
 100. Nagshetty, K., Channappa, S., & Gaddad, S. (2010). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Typhi in India. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4(02), 070-073. doi: 10.3855/jidc.109.
 101. Nakamya, M., Ayoola, M., Park, S., Shack, L., Swiatlo, E., & Nanduri, B. (2018). The Role of Cadaverine Synthesis on Pneumococcal Capsule and Protein Expression. *Medical Sciences*, 6(1), 8. doi: 10.3390/medsci6010008.
 102. Natale, D.A., Shankavaram, U.T., Galperin, M.Y., Wolf, Y.I., Aravind, L., and Koonin, E.V. (2000). Towards understanding the first genome sequence of a crenarchaeon by genome annotation using clusters of orthologous groups of proteins (COGs). *Genome Biology*, 1: research0009.1–0009.19.
 103. Nothaft H., Szymanski C. M. (2010). Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nature Review of Microbiology*, 8, 765–778. doi: 10.1038/nrmicro2383.
 104. Novik V., Hofreuter D., Galan J. E. (2010). Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in its interaction with epithelial cells. *Infection and Immunity*, 78, 3540–3553. doi: 10.1128/IAI.00109-10.
 105. Oakley, B., Morales, C., Line, J., Seal, B., & Hiett, K. (2011). Application of high-throughput sequencing to measure the performance of commonly used selective cultivation methods for the foodborne pathogen *Campylobacter*. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(2), 327-336. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01219.x.
 106. Ohno, S. (1970). *Evolution by Gene Duplication*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg.
 107. OIE Terrestrial Manual Salmonellosis. [(accessed on 28 May 2014)]. Available online: http://www.oie.int/chapter_2.9.9. 2008.
 108. O Cróinín, T., & Backert, S. (2012). Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 25. doi:10.3389/fcimb.2012.00025.

109. Pachepsky, Y., Sadeghi, A., Bradford, S., Shelton, D., Guber, A., & Dao, T. (2006). Transport and fate of manure-borne pathogens: Modeling perspective. *Agricultural Water Management*, 86(1-2), 81-92. doi: 10.1016/j.agwat.2006.06.010.
110. Pérez Espejo, R. (1988). El sector pecuario en México: características y perspectivas. *Comercio Exterior*, (vol. 38 núm. 8), 686-693.
111. Phillips, I. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), 28-52. doi: 10.1093/jac/dkg483.
112. Philips, S., Wu, H. Y., & Li, L. (2017). Using machine learning algorithms to identify genes essential for cell survival. *BMC Bioinformatics*, 18(Suppl 11), 397. doi:10.1186/s12859-017-1799-1.
113. Picoult-Newberg, L., Ideker, T. E., Pohl, M. G., Taylor, S. L., Donaldson, M. A., Nickerson, D. A., & Boyce-Jacino, M. (1999). Mining SNPs from EST databases. *Genome Research*, 9(2), 167-174.
114. Praja, R., Handijatno, D., Koesdarto, S., & Yudhana, A. (2018). Characterization of VirB4 protein of local isolate *Brucella abortus* with western blotting technique. *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 12(1). doi: 10.21157/j.ked.hewan.v12i1.8091.
115. Prajapati BM, Gupta JP, Pandey DP, Parmar GA, Chaudhari JD., (2017). Molecular markers for resistance against infectious diseases of economic importance. *Veterinary World*, Jan;10(1):112-120. doi: 10.14202/vetworld.2017.112-120. Epub 2017 Jan 25.
116. Rasko, D., Rosovitz, M., Myers, G., Mongodin, E., Fricke, W., & Gajer, P. et al. (2008). The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *Journal of Bacteriology*, 190(20), 6881-6893. doi: 10.1128/jb.00619-08.
117. Reddy, S., Turaga, G., Lawrence, M., & Banes, M. (2013). HD superfamily putative hydrolase plays a role in *Listeria monocytogenes* virulence. Conference ISOPOL. doi: 10.13140/RG.2.2.30671.07840.
118. Remm, M., Storm, C., & Sonnhammer, E. (2001). Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons. *Journal of Molecular Biology*, 314(5), 1041-1052. doi: 10.1006/jmbi.2000.5197.
119. Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131. doi: 10.1073/pnas.0906412106.
120. Riedel, C., Förstner, K., Püning, C., Alter, T., Sharma, C., & Götz, G. (2020). Differences in the Transcriptomic Response of *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* to Heat Stress. *Frontiers In Microbiology*, 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00523.
121. Rokosz, N., Rastawicki, W., & Wołkowicz, T. (2014). Microbiological diagnosis of infections caused by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in humans. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej*, 68, 48-56. doi: 10.5604/17322693.1086079.
122. Rossi, M., Debryne, L., Zaroni, R., Manfreda, G., Revez, J., & Vandamme, P. (2009). *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated

- from poultry. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(9), 2364-2369. doi: 10.1099/ijs.0.007419-0.
123. Rost, B. (2002). Enzyme Function Less Conserved than Anticipated. *Journal of Molecular Biology*, 318(2), 595-608. doi: 10.1016/s0022-2836(02)00016-5.
 124. Rouger, A., Tresse, O., & Zagorec, M. (2017). Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms*, 5(3), 50. <http://doi.org/10.3390/microorganisms5030050>.
 125. Sahin, O., Yaeger, M., Wu, Z., & Zhang, Q. (2017). *Campylobacter*-Associated Diseases in Animals. *Annual Review Of Animal Biosciences*, 5(1), 21-42. doi: 10.1146/annurev-animal-022516-022826.
 126. Shahini Shams Abadi, M., Gholipour, A., & Hadi, N. (2018). The highly conserved domain of RND multidrug efflux pumps in pathogenic Gram-negative bacteria. *Cellular and Molecular Biology*, 64(13), 79. doi: 10.14715/cmb/2018.64.13.15.
 127. Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980.
 128. Salihi, M., Junaidu, A., Oboegbulem, S., & Egwu, G. (2009). Prevalence of *Campylobacter* spp. in Nigerian Indigenous Chicken in Sokoto State Northwestern Nigeria. *The Internet Journal of Veterinary Medicine*, 7(1). doi: 10.5580/a6c.
 129. Sawadogo, S., Diarra, B., Blisseye, C., Compaore, T., Djigma, F., & Ouermi, D. et al. (2017). Molecular diagnosis of *Shigella*, *Salmonella* and *Campylobacter* by multiplex Real-time PCR in stool culture samples in Ouagadougou (Burkina Faso). *Sudan Journal Of Medical Sciences*, 12(3), 163. doi: 10.18502/sjms.v12i3.931.
 130. Schierwater, B., & Ender, A. (1993). Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research*, 21(19), 4647–4648. <https://doi.org/10.1093/nar/21.19.4647>.
 131. Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5(1), 63-69. doi: 10.1038/nrg1249.
 132. Scott N. E., Bogema D. R., Connolly A. M., Falconer L., Djordjevic S. P., Cordwell S. J. (2009). Mass spectrometric characterization of the surface expressed 42kDa lipoprotein JlpA as a glycosylated antigen in strains of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Proteome Research*, 8, 4654–4664. doi: 10.1021/pr900544x.
 133. Shea K.M. (2003). Antibiotic Resistance: What Is the Impact of Agricultural Uses of Antibiotics on Children’s Health? *Pediatrics*, 112: 253–2584.
 134. Sheppard, S., Dallas, J., Strachan, N., MacRae, M., McCarthy, N., & Wilson, D. et al. (2009). *Campylobacter* Genotyping to Determine the Source of Human Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 48(8), 1072-1078. doi: 10.1086/597402Skirrow.
 135. M. B. (1994). Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *Journal of comparative pathology*, 111(2), 113–149. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(05\)80046-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(05)80046-5).

136. Stephens, M., & Donnelly, P. (2003). A Comparison of Bayesian Methods for Haplotype Reconstruction from Population Genotype Data. *The American Journal of Human Genetics*, 73(5), 1162-1169. doi: 10.1086/379378.
137. Tang, Y., Fang, L., Xu, C., and Zhang, Q. (2017). Antibiotic resistance trends and mechanisms in the foodborne pathogen, *Campylobacter*. *Animal Health Research Reviews*, 18(2), 87-98. doi: 10.1017/S1466252317000135.
138. Tatusov, R. L., Koonin, E. V., & Lipman, D. J. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5338), 631–637. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.631>.
139. Tettelin, H., & Medini, D. (2020). *Pan-genome* (p. V). Cham: Springer.
140. Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M., Donati, C., Medini, D., & Ward, N. et al. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13950-13955. doi: 10.1073/pnas.0506758102.
141. Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., & Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 472-477. doi: 10.1016/j.mib.2008.09.006.
142. Thomsen, M., Hasman, H., Westh, H., Kaya, H., & Lund, O. (2017). RUCS: rapid identification of PCR primers for unique core sequences. *Bioinformatics*, 33(24), 3917-3921. doi: 10.1093/bioinformatics/btx526.
143. Todd, A. E., Orengo, C. A., & Thornton, J. M. (2001). Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *Journal of Molecular Biology*, 307(4), 1113–1143. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4513>.
144. van der Graaf–van Bloois, L., Duim, B., Miller, W., Forbes, K., Wagenaar, J., & Zomer, A. (2016). Whole genome sequence analysis indicates recent diversification of mammal-associated *Campylobacter fetus* and implicates a genetic factor associated with H2S production. *BMC Genomics*, 17(1). doi: 10.1186/s12864-016-3058-7.
145. van der Graaf-van Bloois, L., Miller, W., Yee, E., Rijnsburger, M., Wagenaar, J., & Duim, B. (2014). Inconsistency of Phenotypic and Genomic Characteristics of *Campylobacter fetus* Subspecies Requires Reevaluation of Current Diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4183-4188. doi: 10.1128/jcm.01837-14.
146. van der Graaf-van Bloois, L., van Bergen, M., van der Wal, F., de Boer, A., Duim, B., Schmidt, T., & Wagenaar, J. (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 Microbiology Methods*, 95(1), 93-97. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.005.
147. van Spreuwel J. P., Duursma G. C., Meijer C. J., Bax R., Rosekrans P. C., Lindeman J. (1985). *Campylobacter colitis*: histological immunohistochemical and ultrastructural findings. *Gut*, 26, 945–951. doi: 10.1136/gut.26.9.945.
148. Valenzuela L. Chi A. Beard S. Orell A. Guiliani N. Shabanowitz J. Hunt D.F. Jerez C.A. (2006). Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnology Advances*, 24: 197–211.

149. Vernikos, G., Medini, D., Riley, D., & Tettelin, H. (2015). Ten years of pan-genome analyses. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 148-154. doi: 10.1016/j.mib.2014.11.016.
150. Vinuesa P., Contreras-Moreira B. (2015) Robust Identification of Orthologues and Paralogues for Microbial Pan-Genomics Using GET_HOMOLOGUES: A Case Study of plncA/C Plasmids. In: Mengoni A., Galardini M., Fondi M. (eds) *Bacterial Pangenomics*. Methods in Molecular Biology, vol 1231. Humana Press, New York, NY.
151. Vos, P. *et al.* (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407–4414.
152. Waclaw, B. (2016). Evolution of Drug Resistance in Bacteria. *Biophysics of Infection*, 49-67. doi: 10.1007/978-3-319-32189-9_5.
153. Wagenaar, J., van Bergen, M., Blaser, M., Tauxe, R., Newell, D., & van Putten, J. (2014). *Campylobacter fetus* Infections in Humans: Exposure and Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 58(11), 1579-1586. doi: 10.1093/cid/ciu085.
154. Wakeley, J., Nielsen, R., Liu-Cordero, S. N., & Ardlie, K. (2001). The discovery of single-nucleotide polymorphisms--and inferences about human demographic history. *American Journal of Human Genetics*, 69(6), 1332–1347. <https://doi.org/10.1086/324521>.
155. Warren R.E., V.M. Ensor and P. O'Neill. (2008). Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 504–508.
156. Watson, J. D., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (2005). Predicting protein function from sequence and structural data. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.04.003>.
157. Weibel D.B. DiLuzio W.R. Whitesides G.M. (2007) Microfabrication meets microbiology. *Nature Review of Microbiology*, 5: 209–218.
158. Wheeler, N., Barquist, L., Kingsley, R., & Gardner, P. (2016). A profile-based method for identifying functional divergence of orthologous genes in bacterial genomes. *Bioinformatics*, btw518. doi: 10.1093/bioinformatics/btw518.
159. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>.
160. Wilson, M., Lane, A., Law, B., Miller, W., Joens, L., Konkel, M., & White, B. (2009). Analysis of the Pan Genome of *Campylobacter jejuni* Isolates Recovered from Poultry by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Multilocus Sequence Typing (MLST), and Repetitive Sequence Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) Reveals Different Discriminatory Capabilities. *Microbial Ecology*, 58(4), 843-855. doi: 10.1007/s00248-009-9571-3.
161. Wolf-Jäckel, G., Boye, M., Angen, Ø., Müller, M., & Jensen, T. (2020). Fluorescence in situ hybridization in species-specific diagnosis of ovine *Campylobacter* abortions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(3), 413-419. doi: 10.1177/1040638720915678.

162. World Agriculture: Towards 2015/2030 - An FAO perspective. (2020). Retrieved 5 December 2020, from <http://www.fao.org/docrep/005/y4252e/y4252e07a.htm#TopOfPage>.
163. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134.
164. Zhang, L., Budiman, V., Day, A., Mitchell, H., Lemberg, D., & Riordan, S. et al. (2010). Isolation and Detection of *Campylobacter concisus* from Saliva of Healthy Individuals and Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Journal Of Clinical Microbiology*, 48(8), 2965-2967. doi: 10.1128/jcm.02391-09.
165. Zhang, L., Man, S., Day, A., Leach, S., Lemberg, D., & Dutt, S. et al. (2009). Detection and Isolation of *Campylobacter* Species Other than *C. jejuni* from Children with Crohn's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), 453-455. doi: 10.1128/jcm.01949-08.
166. Zhou, Y., Bu, L., Guo, M., Zhou, C., Wang, Y., Chen, L., & Liu, J. (2013). Comprehensive Genomic Characterization of *Campylobacter* Genus Reveals Some Underlying Mechanisms for its Genomic Diversification. *Plos ONE*, 8(8), e70241. doi: 10.1371/journal.pone.0070241.
167. Ziprin R. L., Young C. R., Stanker L. H., Hume M. E., Konkel M. E. (1999). The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Diseases*, 43, 586-589. doi: 10.2307/1592660.
168. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183. doi: 10.1006/geno.1994.1151.

ANEXO 1

RefSeq FTP	Species	Collection date	Geographic location	Host	Plasmids
GCF_001687475.2	<i>Campylobacter hepaticus</i>	2015	Australia, Victoria	Gallus gallus	0
GCF_002080395.1	<i>Campylobacter helveticus</i>	1992	Switzerland: Berne	Cat	5
GCF_000736415.1	<i>Campylobacter iguaniorum</i>	Unknown	Unknown	Bearded dragon	1
GCF_001483985.1	<i>Campylobacter iguaniorum</i>	2003	Netherlands	Iguana iguana	0
GCF_001643995.1	<i>Campylobacter iguaniorum</i>	2010	USA: California	Alpaca	0
GCF_000816785.1	<i>Campylobacter peloridis</i>	Unknown	Netherlands	Shellfish	2
GCF_000816185.1	<i>Campylobacter insulaenigrae</i>	Unknown	United Kingdom: Scotland	Marine mammal	0
GCF_002238335.1	<i>Campylobacter avium</i>	2006	Italy: Bologna	Chicken	0
GCF_002104335.1	<i>Campylobacter cuniculorum</i>	2005	Italy: Bologna	Rabbit	2
GCF_002139935.1	<i>Campylobacter lanienae</i>	Unknown	Switzerland	Homo sapiens	0
GCF_000816345.1	<i>Campylobacter volucris</i>	Unknown	Sweden	Black headed gull	0
GCF_000017585.1	<i>Campylobacter hominis</i>	Unknown	Unknown	Healthy human	1
GCF_001190745.1	<i>Campylobacter gracilis</i>	1977	USA	Homo sapiens	0
GCF_002022005.1	<i>Campylobacter pinnipediorum</i>	2014	United Kingdom: Scotland	Seal	0
GCF_002021985.1	<i>Campylobacter pinnipediorum</i>	2014	United Kingdom: Scotland	Seal	0
GCF_002021965.1	<i>Campylobacter pinnipediorum</i>	2013	USA: California	Sea lion	0
GCF_002021945.1	<i>Campylobacter pinnipediorum</i>	2013	USA: California	Sea lion	0
GCF_002021925.1	<i>Campylobacter pinnipediorum</i>	2013	USA: California	Sea lion	0
GCF_000816265.1	<i>Campylobacter subantarcticus</i>	Unknown	South Georgia and the South Sandwich Islands	Gentoo penguin	0
GCF_000816305.1	<i>Campylobacter subantarcticus</i>	Unknown	South Georgia and the South Sandwich Islands	Grey headed albatross	0
GCF_000017465.2	<i>Campylobacter curvus</i>	Unknown	Unknown	Gastrointestinal clinical isolate	0
GCF_001190755.1	<i>Campylobacter ureolyticus</i>	Unknown	Denmark	Homo sapiens	0
GCF_001643955.1	<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	1986	Belgium: Brussels	Homo sapiens	0
GCF_001643975.1	<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	1990	Sweden: Molndal	Pig	0
GCF_002220735.1	<i>Campylobacter sputorum</i>	Unknown	United Kingdom: Preston	Cow	0
GCF_002220755.1	<i>Campylobacter sputorum</i>	1990	Canada: Ottawa	Human	0
GCF_002220775.1	<i>Campylobacter sputorum</i>	2009	USA: California	Cow	0

GCF_002220795.1	<i>Campylobacter sputorum</i>	Unknown	Unknown	Unknown	0
GCF_000019205.1	<i>Campylobacter lari</i>	Unknown	Unknown	Human	1
GCF_000816225.1	<i>Campylobacter lari</i>	Unknown	Canada: Ontario	Human	0
GCF_000816365.1	<i>Campylobacter lari</i>	Unknown	United Kingdom	River water	0
GCF_000816385.2	<i>Campylobacter lari</i>	Unknown	France	Human	0
GCF_000816405.1	<i>Campylobacter lari</i>	2013	USA: California	River water	0
GCF_000816425.1	<i>Campylobacter lari</i>	2013	USA: California	River water	0
GCF_001017575.1	<i>Campylobacter lari</i>	Unknown	USA: Slaughter Beach, DE	Water-estuary (24 cm depth)	0
GCF_001298465.1	<i>Campylobacter concisus</i>	1974	USA	Homo sapiens-periodontal disease	0
GCF_000017725.2	<i>Campylobacter concisus</i>	Unknown	Unknown	Unknown	2
GCF_003048375.1	<i>Campylobacter concisus</i>	2009	Australia	Homo sapiens-Crohn's disease	1
GCF_000495505.1	<i>Campylobacter fetus</i>	Unknown	Unknown	Human	0
GCF_000015085.1	<i>Campylobacter fetus</i>	Unknown	Unknown	Human patient with renal transplant	0
GCF_000512745.2	<i>Campylobacter fetus</i>	1994-2000	Argentina	Aborted bovine fetus	3
GCF_000759485.1	<i>Campylobacter fetus</i>	Unknown	Unknown	Bovine	1
GCF_000759515.1	<i>Campylobacter fetus</i>	Unknown	Argentina	Bovine	2
GCF_000814265.1	<i>Campylobacter fetus</i>	2009	Taiwan, Veterinary hospital	Lizard with gastroenteritis	0
GCF_000967135.1	<i>Campylobacter fetus</i>	Unknown	Unknown	Bovine	1
GCF_001484645.1	<i>Campylobacter fetus</i>	2006	United Kingdom: England	Heterodon nasicus	0
GCF_001686885.1	<i>Campylobacter fetus</i>	2001	Argentina	Bovine	2
GCF_002973655.1	<i>Campylobacter fetus</i>	2015	China: Guangzhou	Patient with peritonitis	0
GCF_900475935.1	<i>Campylobacter fetus</i>	1900-1972	Unknown	Mammal fetus (sheep)	0
GCF_900638335.1	<i>Campylobacter lari</i>	1900-1984	Unknown	Unknown	0
GCF_900637885.1	<i>Campylobacter insulaenigrae</i>	1900-2004	United Kingdom	Marine	0
GCF_900638675.1	<i>Campylobacter insulaenigrae</i>	1993	Unknown	Wild seal	0
GCF_002024185.1	<i>Campylobacter coli</i>	2003	United Kingdom: Lincolnshire	Organic chicken farm	0
GCF_000465235.1	<i>Campylobacter coli</i>	2011	USA: California	Chicken purchased	2
GCF_000494775.1	<i>Campylobacter coli</i>	2001	Unknown	Patient with gastroenteritis	1
GCF_000583755.1	<i>Campylobacter coli</i>	Unknown	Unknown	Swine	4
GCF_000583795.1	<i>Campylobacter coli</i>	Unknown	Unknown	Bovine	1
GCF_000954195.1	<i>Campylobacter coli</i>	1992	United Kingdom: Cambridge	Homo sapiens	2

GCF_001417635.1	<i>Campylobacter coli</i>	2009	USA: Tulsa	Retail beef liver	1
GCF_001483845.1	<i>Campylobacter coli</i>	2003	United Kingdom: Lincolnshire	Retail organic chicken farm	3
GCF_001639125.1	<i>Campylobacter coli</i>	2014	USA: Pennsylvania	Retail chicken	0
GCF_001717605.1	<i>Campylobacter coli</i>	2014	USA: North Carolina	Housefly	3
GCF_001865455.1	<i>Campylobacter coli</i>	2009	USA: Tulsa	Chicken liver	2
GCF_001865475.1	<i>Campylobacter coli</i>	2009	USA: Tulsa	Chicken liver	2
GCF_001865495.1	<i>Campylobacter coli</i>	2009	USA: Tulsa	Chicken liver	1
GCF_001865515.1	<i>Campylobacter coli</i>	2009	USA: Tulsa	Chicken liver	1
GCF_001865535.1	<i>Campylobacter coli</i>	2009	USA: Tulsa	Pork	2
GCF_001865555.1	<i>Campylobacter coli</i>	2009	USA: Tulsa	Chicken liver	2
GCF_001936355.1	<i>Campylobacter coli</i>	2014	USA: Pennsylvania	Retail chicken	1
GCF_002407145.1	<i>Campylobacter coli</i>	2012	USA: California	Chicken breast	2
GCF_002843985.1	<i>Campylobacter coli</i>	2011	USA: Pennsylvania	Retail chicken	1
GCF_003030205.1	<i>Campylobacter coli</i>	2009	Denmark	Unknown	1
GCF_000583775.1	<i>Campylobacter coli</i>	Unknown	Unknown	Turkey carcass	1
GCF_001305715.1	<i>Campylobacter coli</i>	2011	Germany: Berlin	Chicken	0
GCF_000009085.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1977	Unknown	Patient with diarrhea	0
GCF_000011865.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Retail chicken	0
GCF_000015525.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1981	USA: Minnesota	Patient with campylobacteriosis	2
GCF_000017905.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1981	England	Homo sapiens	0
GCF_000025425.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2003-2007	USA	Sheep	1
GCF_000148705.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Homo sapiens	0
GCF_000171795.2	<i>Campylobacter jejuni</i>	1999	Thailand	Clinical isolate	0
GCF_000184205.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Chicken	1
GCF_000302555.5	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996-1997	United Kingdom: Wales	Clinical isolate	0
GCF_000304375.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1979	Unknown	Unknown	0
GCF_000430385.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2004	USA: New York	Homo sapiens	0
GCF_000466065.2	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Canada	Homo sapiens	0
GCF_000466075.2	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Canada	Homo sapiens	1
GCF_000466105.2	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Canada	Homo sapiens	0
GCF_000468915.2	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Canada	Homo sapiens	0

GCF_000493495.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Unknown	0
GCF_000737085.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2013	USA: Michigan	Chicken farm	0
GCF_000772225.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Unknown	0
GCF_000830775.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2003	USA	Patient with campylobacteriosis	0
GCF_000830805.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2003	USA	Patient with campylobacteriosis	0
GCF_000830825.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2003	USA	Patient with campylobacteriosis	0
GCF_000830845.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2004	USA	Patient with campylobacteriosis	0
GCF_000830865.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2005	USA	Patient with campylobacteriosis	0
GCF_000835285.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Canada: Alberta	Patient with campylobacteriosis	0
GCF_000835305.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Canada: Ontario	Patient with campylobacteriosis	0
GCF_000835345.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2001	Canada: New Brunswick	Patient with campylobacteriosis	2
GCF_000835365.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Canada: Quebec	Patient with campylobacteriosis	2
GCF_000934305.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1985	Sweden: Gothenberg	Clinical	0
GCF_001299565.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1995	South Africa: Cape Town	Patient with Guillain-Barré syndrome	0
GCF_001299595.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1994	South Africa: Cape Town	Patient with Guillain-Barré syndrome	0
GCF_001314285.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1997	USA: Albany	Chicken breast purchased at a retail location	0
GCF_001412295.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	United Kingdom	Homo sapiens	0
GCF_001457695.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1980	Belgium: Brussels	Unknown	0
GCF_001506185.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506205.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2005	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506225.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506245.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2003	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506265.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1999	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506285.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506305.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1999	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506345.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2004	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506365.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506385.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506405.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2001	Finland	Homo sapiens	0

GCF_001506425.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2003	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506445.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2004	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506465.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506485.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2003	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506505.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506525.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2003	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506545.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2004	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506565.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2004	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506585.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2001	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506605.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506625.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2003	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506645.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506665.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506685.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2006	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506705.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506725.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1999	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506745.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2001	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506765.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1998	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506785.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2007	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506805.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506825.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2005	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506845.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506865.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506885.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2001	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506905.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2004	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506925.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506945.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506965.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2004	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001506985.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2004	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507005.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2007	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507025.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2006	Finland	Homo sapiens	0

GCF_001507045.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507065.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2006	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507085.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2001	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507105.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507125.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2006	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507145.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507165.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507185.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1998	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507205.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507225.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1999	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507245.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2007	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001507265.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2007	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001563565.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1994	South Africa: Cape Town	Homo sapiens with enteritis	1
GCF_001587015.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2009	USA	Chicken	2
GCF_001587035.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2009	USA	Chicken	1
GCF_001686905.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1997	USA:California	Chicken	0
GCF_001717625.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2014	USA:California	Turkey	1
GCF_001721945.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2013	USA:Michigan	Chicken	0
GCF_001721965.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2013	USA:Michigan	Chicken	0
GCF_001721985.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2013	USA:Michigan	Chicken	0
GCF_001767215.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1980	Canada:Toronto	Homo sapiens	0
GCF_001865395.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2009	USA:Tulsa	Chicken	0
GCF_001865415.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2009	USA:Tulsa	Chicken	1
GCF_001865435.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2009	USA:Tulsa	Chicken	1
GCF_001865595.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1990	USA:Tucson	Homo sapiens	1
GCF_001870085.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2009	USA:Tulsa	Turkey	2
GCF_001870105.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2009	USA:Tulsa	Chicken	2
GCF_001951235.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2012	United Kingdom	Unknown	0
GCF_001951255.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2012	United Kingdom	Unknown	0
GCF_001951275.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2012	United Kingdom	Unknown	0
GCF_001951295.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2012	United Kingdom	Unknown	0

GCF_001951315.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2012	United Kingdom	Unknown	0
GCF_001951335.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2012	United Kingdom	Unknown	0
GCF_002024325.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1992	United Kingdom	Unknown	0
GCF_002028305.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1984	Suecia	Pigeon	0
GCF_002101355.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2014	USA:Philadelphia	Tenera	1
GCF_002209005.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	USA	Bovino	0
GCF_002209025.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1977	USA	Homo sapiens	0
GCF_002209045.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	USA	Homo sapiens	1
GCF_002209065.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	USA	Unknown	0
GCF_002214785.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2016	South Korea:Seoul	Homo sapiens	2
GCF_002224325.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Homo sapiens	0
GCF_002224385.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Homo sapiens	0
GCF_002234455.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	USA:California	Homo sapiens	1
GCF_002238375.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Homo sapiens	0
GCF_002407125.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2012	USA	Chicken	1
GCF_002587105.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	USA	Homo sapiens	0
GCF_002587225.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1997	USA	Chicken	0
GCF_003030185.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2014	Tailandia	Unknown	1
GCF_003060725.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2005	United Kingdom	Chicken	0
GCF_003060745.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1992	United Kingdom	Chicken	0
GCF_003060765.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1992	United Kingdom	Avian	0
GCF_003060785.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1992	United Kingdom	Chicken	0
GCF_003368045.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Finland	Homo sapiens	0
GCF_003368065.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2006	Finland	Homo sapiens	0
GCF_003368085.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1999	Finland	Homo sapiens	0
GCF_003368105.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2001	Finland	Homo sapiens	0
GCF_003368125.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2006	Finland	Homo sapiens	0
GCF_003368145.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Finland	Homo sapiens	0
GCF_003368165.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1998	Finland	Homo sapiens	0
GCF_003368185.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1999	Finland	Homo sapiens	0
GCF_003368205.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2001	Finland	Homo sapiens	0

GCF_003368225.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2002	Finland	Homo sapiens	0
GCF_003368245.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Finland	Homo sapiens	0
GCF_900475265.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-1977	United Kingdom	Homo sapiens	0
GCF_000017485.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Unknown	0
GCF_000632435.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Unknown	0
GCF_000807355.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2014	USA:Philadelphia	Bovino	0
GCA_001506325.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2007	Finland	Homo sapiens	0
GCF_001865615.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2007	USA	Chicken	1
GCA_002238355.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	Unknown	Unknown	Homo sapiens	0
GCA_002983725.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1997	South Africa: Cape Town	Homo sapiens	0
GCA_900474415.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-1988	Australia:Adelaide	Human child	0
GCF_003999645.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1970	Bélgica:Brucelas	Bovino	0
GCF_003971585.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2000	Alemania	Homo sapiens	1
GCF_900638165.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-1985	Unknown	Unknown	0
GCF_900638175.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-2007	Unknown	Unknown	0
GCF_900638185.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-2007	Unknown	Unknown	0
GCF_900638195.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-2007	Unknown	Unknown	0
GCF_900638205.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-2007	Unknown	Unknown	0
GCF_900638225.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1999	United Kingdom	Homo sapiens	0
GCF_900638235.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-2003	Unknown	Unknown	0
GCF_900638285.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-1993	United Kingdom	Chicken	0
GCF_900638365.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1974	Unknown	Homo sapiens	0
GCA_900637255.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-1986	Unknown	Unknown	0
GCA_900638625.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	1900-1999	Unknown	Human child	0
GCF_003950275.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2015	United Kingdom	Chicken	0
GCF_003574945.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	2001	United Kingdom	Chicken	0

ANEXO 2

Especie	No. de genomas	Longitud (Mb)	%GC	Genes	Proteínas	Pseudo-genes	rRNA	tRNA	Otros RNA
<i>C. avium</i>	1	1.74	34.2	1,767	1,693	26	6	39	3
<i>C. coli</i>	21	1.75	31.3	1,834	1,718	61	8	43	3
<i>C. concisus</i>	3	1.95	38.9	1,964	1,864	42	9	46	3
<i>C. curvus</i>	1	1.97	44.5	2,012	1,910	44	9	46	3
<i>C. cuniculorum</i>	1	1.93	31.2	1,899	1,806	46	6	38	3
<i>C. fetus</i>	10	1.83	33.2	1,845	1,761	31	9	42	3
<i>C. gracilis</i>	1	2.28	46.6	2,262	2,167	42	9	41	3
<i>C. helveticus</i>	1	1.87	34.3	1,994	1,870	66	9	41	3
<i>C. hepaticus</i>	1	1.52	28	1,511	1,385	71	9	43	3
<i>C. hominis</i>	1	1.71	31.7	1,668	1,574	38	9	44	3
<i>C. hyointestinalis</i>	2	1.75	33.7	1,818	1,723	40	9	43	3
<i>C. iguanorium</i>	3	1.67	35.8	1,753	1,673	25	9	43	3
<i>C. insulaenigrae</i>	3	1.47	28.2	1,520	1,433	33	9	42	3
<i>C. jejuni</i>	164	1.67	30.4	1,754	1,629	75	7	42	3
<i>C. laeniae</i>	1	1.59	34.6	1,641	1,570	20	9	39	3
<i>C. lari</i>	8	1.57	29.7	1,602	1,520	25	9	46	3
<i>C. peloridis</i>	1	1.71	28.5	1,688	1,579	51	9	46	3
<i>C. pinnipediorum</i>	5	1.72	30.4	1,726	1,640	30	9	44	3
<i>C. sputorum</i>	4	1.72	29.5	1,761	1,674	30	9	45	3
<i>C. ureolyticus</i>	2	1.64	29.2	1,684	1,594	35	9	43	3
<i>C. volucris</i>	1	1.52	28.6	1,568	1,488	25	9	43	3
Rango	-	1.47-2.28	28-46.6	1,520-2,262	1,433-2,167	20-75	6-9	38-46	3

ANEXO 3



Genomic Analysis Reveals the Genetic Determinants Associated With Antibiotic Resistance in the Zoonotic Pathogen *Campylobacter* spp. Distributed Globally

OPEN ACCESS

Daniel Rivera-Mendoza^{1†}, Irma Martínez-Flores^{2†}, Rosa I. Santamaría², Luis Lozano², Víctor H. Bustamante^{3*} and Deyanira Pérez-Morales^{4*}

Edited by:

Octavio Luiz Franco,
Catholic University of Brasília (UCB),
Brazil

Reviewed by:

Jonathan Gray Frye,
US National Poultry Research Center
(USDA-ARS), United States
Mónica Oleastro,
Instituto Nacional de Saúde Doutor
Ricardo Jorge (INSA), Portugal

*Correspondence:

Victor H. Bustamante
victor@ibt.unam.mx
Deyanira Pérez-Morales
deyapemo@gmail.com

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 19 November 2019

Accepted: 21 August 2020

Published: 11 September 2020

Citation:

Rivera-Mendoza D,
Martínez-Flores I, Santamaría RI,
Lozano L, Bustamante VH and
Pérez-Morales D (2020) Genomic
Analysis Reveals the Genetic
Determinants Associated With
Antibiotic Resistance in the Zoonotic
Pathogen *Campylobacter* spp.
Distributed Globally.
Front. Microbiol. 11:513070.
doi: 10.3389/fmicb.2020.513070

¹ Programa de Maestría en Biotecnología, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico, ² Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ³ Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ⁴ CONACYT-Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico

The genus *Campylobacter* groups 32 Gram-negative bacteria species, several being zoonotic pathogens and a major cause of human gastroenteritis worldwide. Antibiotic resistant *Campylobacter* is considered by the World Health Organization as a high priority pathogen for research and development of new antibiotics. Genetic elements related to antibiotic resistance in the classical *C. coli* and *C. jejuni* species, which infect humans and livestock, have been analyzed in numerous studies, mainly focused on local geographical areas. However, the presence of these resistance determinants in other *Campylobacter* species, as well as in *C. jejuni* and *C. coli* strains distributed globally, remains poorly studied. In this work, we analyzed the occurrence and distribution of antibiotic resistance factors in 237 *Campylobacter* closed genomes available in NCBI, obtained from isolates collected worldwide, in different dates, from distinct hosts and comprising 22 *Campylobacter* species. Our data revealed 18 distinct genetic determinants, genes or point mutations in housekeeping genes, associated with resistance to antibiotics from aminoglycosides, β -lactams, fluoroquinolones, lincosamides, macrolides, phenicols or tetracyclines classes, which are differentially distributed among the *Campylobacter* species tested, on chromosomes or plasmids. Three resistance determinants, the *bla*_{OXA-493} and *bla*_{OXA-576} genes, putatively related to β -lactams resistance, as well as the *Inu*(AN2) gene, putatively related to lincosamides resistance, had not been reported in *Campylobacter*; thus, they represent novel determinants for antibiotic resistance in *Campylobacter* spp., which expands the insight on the *Campylobacter* resistome. Interestingly, we found that some of the genetic determinants associated with antibiotic resistance are *Campylobacter* species-specific; e.g., the *bla*_{OXA-493} gene and the T86V mutation in *gyrA* were found only in the *C. lari* group, whereas genes associated with aminoglycosides resistance were found only in *C. jejuni* and *C. coli*. Additional analyses revealed how are distributed the

resistance and multidrug resistance *Campylobacter* genotypes assessed, with respect to hosts, geographical locations, and collection dates. Thus, our findings further expand the knowledge on the factors that can determine or favor the antibiotic resistance in *Campylobacter* species distributed globally, which can be useful to choose a suitable antibiotic treatment to control the zoonotic infections by these bacteria.

Keywords: *Campylobacter*, zoonotic bacteria, antibiotic resistance, resistance genes, genomic analysis, resistome

INTRODUCTION

The discovery and consequent therapeutic use of antibiotics was a remarkable advance in human medicine, which prevented the mortal outcomes of bacterial infections, saving millions of lives during the last century. However, bacteria have evolved through diverse mechanisms, intrinsic and acquired, to withstand the harmful activity of antibiotics. The antibiotic resistance (AR) is mainly generated by the presence of specific resistance genes or point mutations in some housekeeping genes; likewise, the AR can be transferred between bacteria through different mechanisms of DNA exchange, which has greatly increased the occurrence and spread of antibiotic-resistant bacteria worldwide. The development of AR has progressively compromised the effective use of antibiotics, restricting the therapeutic options available to treat the illness produced by antibiotic-resistant pathogenic bacteria. Nowadays, pathogenic bacteria that show resistance to a great diversity of antibiotics represent a serious threat to health worldwide. It has been estimated that infections produced by these bacteria could cause 10 million annual deaths by 2050 (O'Neill, 2014). Faced with this risk to human health, the World Health Organization (WHO) issued a priority global list of antibiotic-resistant pathogenic bacteria for which there is an urgent need to direct research for discovery and development new antibiotics (WHO, 2017). Importantly, in this WHO report, and also in a published analysis from the United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC), antibiotic-resistant *Campylobacter* spp. were cataloged as a serious health hazard in the world (CDC, 2013; WHO, 2017).

The genus *Campylobacter* groups biologically diverse species. These are Gram-negative, chemoorganotrophic, non-sporeforming epsilonproteobacteria. Depending on the species, these can be slender, spirally curved-, curved- or straight-rods; with a single polar flagellum, bipolar or multiple flagella, or no flagellum; and microaerobic or anaerobic bacteria (Vandamme et al., 2015). At the time of writing this paper, the genus *Campylobacter* comprised 32 species and 13 subspecies with validly published names¹. Twenty *Campylobacter* species have been isolated from symptomatic or healthy humans: *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis*, *C. insulaenigrae*, *C. jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. peloridis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus* and *C. volucris* (Man, 2011; Kweon et al., 2015). Some of these *Campylobacter* species have also been isolated from the gastrointestinal tract of animals,

mainly farm animals (poultry, pigs, cattle, and sheep), where *Campylobacter* spp. reside usually as commensal microorganisms (Silva et al., 2011).

In humans, *Campylobacter* spp. can cause campylobacteriosis, which is considered the leading food-borne zoonosis and the most common cause of gastroenteritis in the world (EFSA and ECDC, 2018)². *C. jejuni* and *C. coli* are the *Campylobacter* species more frequently involved in human gastroenteritis, hence, these two species have been by far the most studied (Man, 2011; Kaakoush et al., 2015). However, other species such as *C. concisus*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. ureolyticus*, have also begun to be recognized as causative agents of human and animal campylobacteriosis; therefore, they are known as emerging *Campylobacter* species (Man, 2011).

In 2010, the global burden of *Campylobacter* infections was 95,613,970 clinical cases; 21,374 deaths and 2,141,926 DALYs (Disability Adjusted Life Years) (Havelaar et al., 2015). Campylobacteriosis may cause mild to severe clinical signs, or even be asymptomatic. The common symptoms of *Campylobacter* enteric infections include diarrhea (often bloody), fever, abdominal cramps, headache, nausea and/or vomiting. In vulnerable populations, such as very young children, elderly or immunologically compromised patients, this illness can be mortal². Furthermore, other gastrointestinal manifestations or severe life threatening extragastrointestinal complications may appear (Man, 2011; Kaakoush et al., 2015). Because most *Campylobacter* enteric infections are self-limiting, antibiotic administration is usually not required. Antibiotic therapy is recommended in patients with severe clinical symptoms, relapses, or a prolonged course of infection (Tang et al., 2017). In these cases, fluoroquinolones such as ciprofloxacin, and macrolides such as erythromycin, are the drugs of choice (Ge et al., 2013).

A rapid and constant increase in the frequency of antibiotic-resistant *Campylobacter* strains isolated from humans and animals has been recognized worldwide (Luangtongkum et al., 2009; Cody et al., 2010; Tang et al., 2017; Signorini et al., 2018). It has been reported a wide-ranging prevalence of *Campylobacter* strains resistant to the following antibiotic families: aminoglycosides, β -lactams, cephalosporins, fluoroquinolones, fosfomycins, lincosamides, macrolides, phenicols, quinolones, sulfonamides, and tetracyclines (Ishihara et al., 2004; Karikari et al., 2017; Lee et al., 2017; Premarathne et al., 2017; Agunos et al., 2018; Bailey et al., 2018; Ewers et al., 2018; Iglesias-Torrens et al., 2018; Khan et al., 2018;

¹ www.bacterio.net/campylobacter.html

² <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>

Signorini et al., 2018; Wei and Kang, 2018; Zhang et al., 2018; Nowaczek et al., 2019; Schiaffino et al., 2019). Moreover, a prevalence of up to 94% of multidrug resistant (MDR; resistant to three or more antibiotic families) *Campylobacter* isolates, in different parts of the world, has been reported (Zhang et al., 2018). A lot of relevant information about the genetic determinants mediating AR in *C. coli* and *C. jejuni* has been reported (Taylor and Courvalin, 1988; Payot et al., 2006; Alfredson and Korolik, 2007; Luangtongkum et al., 2009; Smith and Fratamico, 2010; Iovine, 2013; Tang et al., 2017; Shen et al., 2018); however, the genetic determinants for AR in the rest of the *Campylobacter* species, including the emerging species, are greatly unknown.

By its importance for public health and food safety, it is necessary to know the resistome of the genus *Campylobacter*; the resistome is defined as the collection of AR determinants in a specific bacteria or ecological niche (D'Costa et al., 2006; Wright, 2007; Hu et al., 2017). A very high correlation between the genotype and phenotype for AR has been observed in *Campylobacter* (Zhao et al., 2016; de Vries et al., 2018; Whitehouse et al., 2018). Therefore, the identification of the *Campylobacter* genotypes associated with AR could help to choose the best antibiotic treatment against infections by *Campylobacter* species.

The aim of this study was to gain insight into the genetic determinants that constitute the *Campylobacter* resistome.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Genomes

A total of 237 closed genomes (chromosome and plasmid) of *Campylobacter* spp. were retrieved from the open-access RefSeq: NCBI Reference Sequence Database³ in March 2019. NCBI accession numbers of the 237 genomes, the information about the host, collection date and geographic location of the strains from which the DNA was extracted, sequenced and annotated, as well as the number of plasmids annotated as an assembly unit, are registered in **Supplementary File S1**.

In silico Identification of Genes Associated With Antibiotic Resistance

Datasets from publicly available resistance gene databases Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD⁴) (Jia et al., 2017) and the National Database of Antibiotic Resistant Organisms (NDARO⁵), were downloaded (March 2019) and used to identify the presence of genes associated with AR in the 237 *Campylobacter* genomes, by following two different approaches. In the first one, the BPGA software (Chaudhari et al., 2016) was applied to clustering the resistance genes from CARD and NDARO with those of the *Campylobacter* genomes, using the USEARCH clustering tool with default parameters (a cutoff set of 50% amino acid identity and 20 random permutations). In

the second approach, a BLASTp search was performed⁶ with all predicted ORFs from the *Campylobacter* genomes, against the products of resistance genes from CARD and NDARO, using an *E* value cutoff of 10E-5, a selected threshold of 50% amino acid identity and minimum coverage of 60% of the query sequence length. Both approaches were compared to ensure the identification of the respective gene associated with AR, on the base of the best hit.

In silico Identification of Point Mutations Associated With Antibiotic Resistance

Specific point mutations known to mediate resistance to fluoroquinolones (*gyrA*), macrolides (*rplD*, *rplV* and 23S rRNA) and streptomycin (*rpsL*), in *C. coli* or *C. jejuni*, were sought in the 237 *Campylobacter* spp. genomes by using publicly available ResFinder database version 3.2⁷ (April 2019) (Zankari et al., 2012). To confirm the point mutations identified by ResFinder, the amino acid sequence of GyrA or RpsL, as well as the nucleotide sequence of 23S rRNA, were aligned and examined using the MEGA X software version 10.1 with the MUSCLE algorithm⁸.

RESULTS

Identification of Genetic Determinants Associated With AR in *Campylobacter*

Genetic elements associated with AR, i.e., specific genes and point mutations in housekeeping genes, were sought by *in silico* analysis in a total of 237 closed publicly available *Campylobacter* genomes, as described in the “Materials and Methods” section. The 237 genomes assessed spanned 22 species of *Campylobacter*: *C. avium* (1), *C. coli* (22), *C. concisus* (3), *C. cuniculorum* (1), *C. curvus* (1), *C. fetus* (11), *C. gracilis* (1), *C. helveticus* (1), *C. hepaticus* (1), *C. hominis* (1), *C. hyointestinalis* (2), *C. iguaniorum* (3), *C. insulaenigrae* (3), *C. jejuni* (163), *C. lanienae* (1), *C. lari* (8), *C. peloridis* (1), *C. pinnipediorum* (5), *C. sputorum* (4), *C. subantarcticus* (2), *C. ureolyticus* (1) and *C. volucris* (1); the number of genomes tested for each species is indicated between parenthesis. Most genomes analyzed were from *C. jejuni* (68.8%) and *C. coli* (9.3%); genomes from the 20 remaining *Campylobacter* species denoted 21.9% of the total. Important to note, in our analysis, we considered a genome as that including the sequence of both the chromosome and plasmids, when present, from the respective strain.

As depicted in **Figure 1**, 15 acquired genes associated with resistance to 5 distinct antibiotic classes were identified. Those more frequently found were *bla*_{OXA-61} and *bla*_{OXA-184}, showing a prevalence of 32.5% (77/237 genomes) and 27.8% (66/237 genomes), respectively, both coding class D oxacillinase (OXA)-type β -lactamases (**Figure 1**). Acquired resistance to some β -lactams antibiotics has been associated with β -lactamases production in many organisms, including *Campylobacter*

³<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>

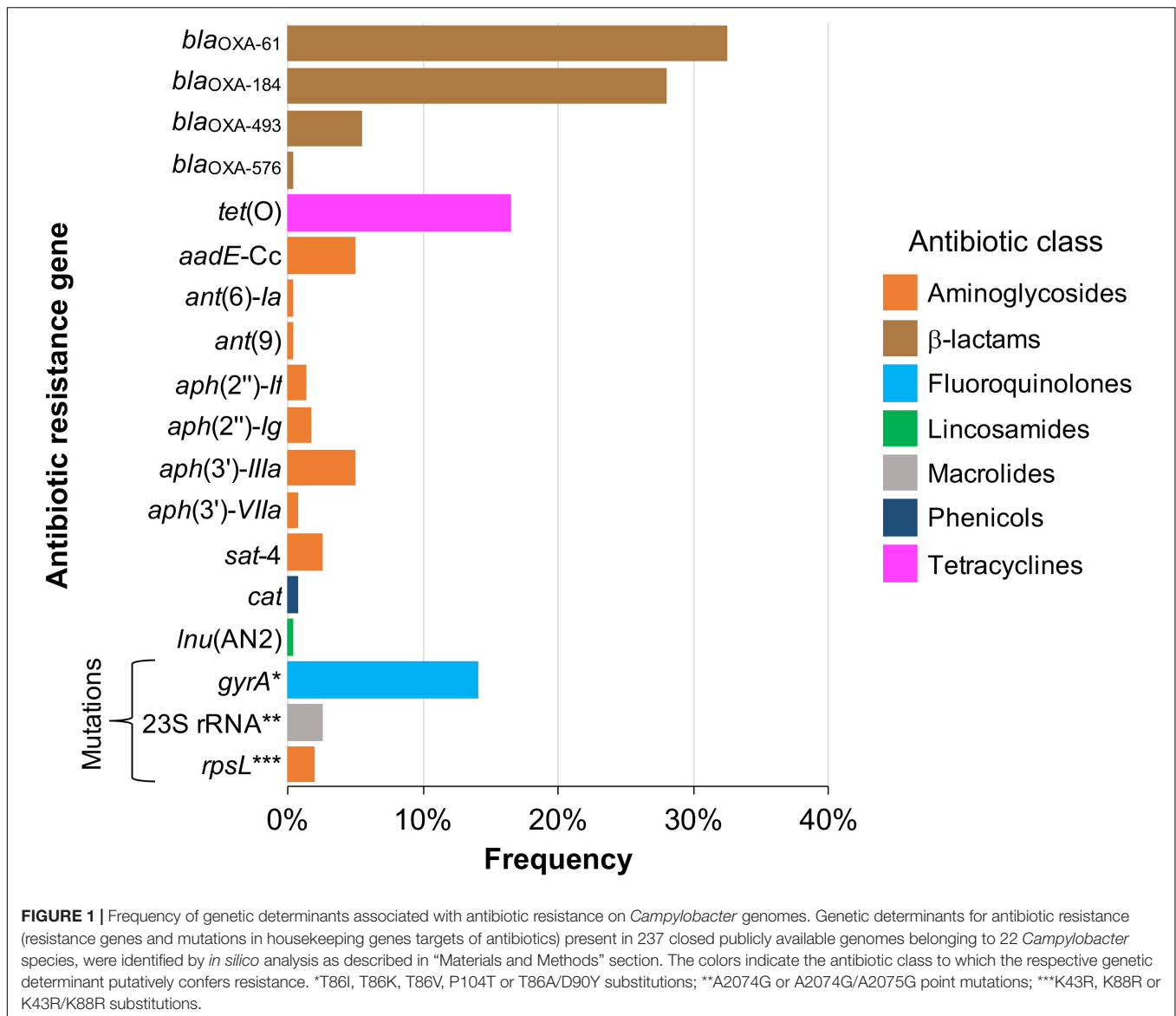
⁴<https://card.mcmaster.ca/>

⁵<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/>

⁶<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁷<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>

⁸<https://www.megasoftware.net>



(Taylor and Courvalin, 1988; Alfredson and Korolik, 2005; Griggs et al., 2009). Notably, our analysis revealed 2 additional putative OXA-type β-lactamase genes, *bla*_{OXA-493} (prevalence of 5.49%; 13/237 genomes) and *bla*_{OXA-576} (prevalence of 0.42%; 1/237 genomes) (Figure 1), which are annotated in the respective genomes, but had not been previously reported. All these genes for β-lactamases are located on chromosome (Table 1), which is consistent with the fact that plasmids coding β-lactamases have not been described in *Campylobacter*.

In addition to genes for β-lactamases, we found that 16.5% of analyzed genomes (39/237 genomes) harbor the *tet*(O) gene (Figure 1), which codes for the ribosomal protection protein involved in resistance to tetracyclines (Sougakoff et al., 1987). Consistent with previous reports indicating the presence of *tet*(O) either on plasmid or chromosome (Pratt and Korolik, 2005; Dasti et al., 2007), we found that 30 and 9 of the analyzed genomes carry this resistance gene on plasmid and chromosome,

respectively (Table 1). It should be noted that *Campylobacter* plasmids are usually classified according to the genes they carry, those harboring the *tet*(O) gene have been called pTet plasmids (Marasini et al., 2018). From 87 plasmids annotated as an assembly unit separated from chromosome in the total of *Campylobacter* genomes tested, 30 were pTet and only one plasmid containing an AR gene other than *tet*(O) was found; the 31 plasmids harboring AR genes show sizes ranging from 29,115 to 180,543 bp (Figure 2). These pTet plasmids carry the *tet*(O) gene alone or together with other AR genes; interestingly, all of them, including that no pTet, are present only on genomes from *C. coli* and *C. jejuni* (Figure 2).

On another hand, genes conferring resistance to phenicol or lincosamides were detected in a very small proportion of the analyzed genomes. Only 2 genomes harbor the *cat* gene (prevalence of 0.84%), which codes for a chloramphenicol acetyltransferase that is associated with resistance to

TABLE 1 | Location (chromosome or plasmid) of 15 antibiotic resistance genes detected on *Campylobacter* closed genomes.

Antibiotic class	Gen	Genomes ^a	Location	
			Chromosome	Plasmid
β-lactams	<i>bla_{OXA-61}</i>	77	77	0
β-lactams	<i>bla_{OXA-184}</i>	66	66	0
β-lactams	<i>bla_{OXA-493}</i>	13	13	0
β-lactams	<i>bla_{OXA-576}</i>	1	1	0
Tetracyclines	<i>tet(O)</i>	39	9	30
Phenicol	<i>cat</i>	2	2	0
Lincosamides	<i>lnu(AN2)</i>	1	0	1
Aminoglycosides	<i>aph(2'')-If</i>	3	2	1
Aminoglycosides	<i>aph(2'')-Ig</i>	4	0	4
Aminoglycosides	<i>ant(6)-Ia</i>	1	0	1
Aminoglycosides	<i>aadE-Cc</i>	12	12	0
Aminoglycosides	<i>ant(9)</i>	1	0	1
Aminoglycosides	<i>aph(3')-IIIa</i>	12	0	12
Aminoglycosides	<i>aph(3')-VIIa</i>	2	0	2
Aminoglycosides	<i>sat-4</i>	6	0	6

^aNumber of genomes where the genes were located.

chloramphenicol (Wang and Taylor, 1990); in both cases, this gene was located on chromosome (**Figure 1** and **Table 1**). Regarding lincosamides resistance, a putative *lnu(AN2)* gene, coding an O-nucleotidyltransferase that mediates resistance to lincomycin (Wang et al., 2000), was only identified in one genome (prevalence of 0.42%) (**Figure 1**). Previous reports detected the *lnu(C)* and *lnu(D)* lincosamides resistance genes in genomes from *Campylobacter* (Zhao et al., 2016; Fabre et al., 2018), but to the best of our knowledge, this is the first study identifying the *lnu(AN2)* gene in this genus; specifically in the *C. coli* strain RM5611. The deduced amino acid sequence from this *lnu(AN2)* gene shares 64% identity to that from the *lnu(AN2)* gene of *Bacteroides fragilis* (NCBI Reference Sequence: NG_047920.1). In *B. fragilis*, this gene is found on chromosome; in contrast, in *C. coli* RM5611 the *lnu(AN2)* gene is located on a plasmid of 48,422 bp, which also contains the *tet(O)* gene (**Figure 3A**). Comparative analysis indicated that there is not synteny for the *lnu(AN2)* gene between *C. coli* and *B. fragilis* (data not shown).

Furthermore, our analysis also identified 8 different genes that code for distinct aminoglycoside-modifying enzymes associated with resistance to diverse aminoglycosides: *aph(2'')-If* and *aph(2'')-Ig* (gentamicin); *aph(3')-IIIa* and *aph(3')-VIIa* (kanamycin); *ant(9)* (spectinomycin); *ant(6)-Ia* and *aadE-Cc* (streptomycin); and *sat-4* (streptothricin) (Jacob et al., 1994; Zhao et al., 2015; Fabre et al., 2018). In general, the prevalence of all these aminoglycoside resistance genes was low in the *Campylobacter* genomes tested, ranging from 0.42% (1/237 genomes) to 5.06% (12/237 genomes), being the *aadE-Cc* and *aph(3')-IIIa* genes those showing the highest prevalence; *ant(6)-Ia*, *ant(9)*, *aph(2'')-If*, *aph(2'')-Ig*, *aph(3')-VIIa* and *sat-4* were found with a prevalence of 0.42, 0.42, 1.27, 1.69, 0.84, and 2.53%, respectively (**Figure 1**). It is worth mentioning that 5 additional

genomes carried a truncated *ant(6)-Ia* gene and for this reason they were not considered in the final results; these truncated genes were located on plasmids forming a resistance cluster with the *sat-4* and *aph(3')-IIIa* genes (**Figure 3B**). In contrast, the full-length *ant(6)-Ia* gene was not found close to the *sat-4* and *aph(3')-IIIa* genes, instead, it was located close to the *tet(O)* gene (**Figure 3B**). Regarding the other aminoglycoside resistance genes, most of them were located on plasmids as single units, with exception of *aadE-Cc* (12/12 genomes) and *aph(2'')-If* (2/3 genomes) that were situated on chromosome (**Table 1**).

Additionally, our analysis revealed mutations in 3 housekeeping genes: *gyrA*, *rpsL*, and 23S rRNA (**Figure 1**), which confer resistance to fluoroquinolones (Wang et al., 1993; Charvalos et al., 1996), streptomycin (aminoglycosides) (Olkkola et al., 2010) and macrolides (Jensen and Aarestrup, 2001), respectively. Several point mutations in the *gyrA* gene have been associated with resistance to fluoroquinolones in *Campylobacter* spp., the predominant being T86I, caused by the C257T change in *gyrA*; other mutations include T86A, T86K, T86V, D90N, D90Y, A70T and the double mutation T86I/P104S and T86I/D90N (Wang et al., 1993; Bachoual et al., 2001; Hakanen et al., 2002; Piddock et al., 2003; McIver et al., 2004; Ruiz et al., 2005; Hanninen and Hannula, 2007; Tang et al., 2017). Mutations in *gyrA* were identified in 13.9% (33/237 genomes) of the *Campylobacter* genomes analyzed (**Figure 1**). These mutations are T86I (22/237 genomes), T86K (1/237 genomes), T86V (8/237 genomes), P104T (1/237 genomes) and the combination T86A/D90Y (1/237 genomes). On the other hand, in *C. coli* and *C. jejuni*, resistance to macrolides has been attributed to point mutations in domain V of the 23S rRNA gene, at positions 2074 and 2075 (A2074C, A2074G and A2075G), being the A2075G transition the most frequent in *Campylobacter* (Jensen and Aarestrup, 2001; Vacher et al., 2003; Ren et al., 2011). The bulk of *Campylobacter* macrolide-resistant isolates have mutations in the 3 copies of the 23S rRNA gene, but some present only 2 mutated copies (Gibree et al., 2005). Our analysis revealed the presence of point mutations in the 23S rRNA gene in 2.53% (6/237 genomes) of the *Campylobacter* genomes tested (**Figure 1**), including A2074G (5/237 genomes) and A2074G/A2075G transitions (1/237 genomes). In 5 genomes, these point mutations were present in the 3 copies of the 23S rRNA gene, whereas in one genome, the A2074G mutation was found only in 2 copies of this gene. Finally, our analysis also revealed mutations in the *rpsL* gene, which codes for the S12 ribosomal protein, a component of the 30S ribosomal subunit. The K43R, K88E, K88Q and K88R mutations in RpsL have been associated with streptomycin resistance, being the K43R mutation the most commonly found in *Campylobacter* (Olkkola et al., 2010). We identified some of these mutations in RpsL, in 2.11% (5/237 genomes) of the *Campylobacter* genomes analyzed: K43R (1/237 genomes), K88R (3/237 genomes) and K43R/K88R (1/237 genomes) (**Figure 1**).

AR genotypes were identified according to the different combinations of the genetic determinants associated with AR found in the *Campylobacter* genomes analyzed. A total of 37 AR genotypes were recognized, being the AR genotypes conferring resistance to β-lactams the most predominant

<i>Campylobacter</i> spp.	ID_Plasmid	Antibiotic resistance gene(s)	Size (bp)
<i>C. coli</i>	NZ_CP017879.1	<i>tet(O)</i>	46,186
<i>C. coli</i>	NZ_CP017866.1	<i>tet(O)</i>	46,193
<i>C. coli</i>	NZ_CP011017.1	<i>tet(O)</i>	29,115
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP014745.1	<i>tet(O)</i>	116,883
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP014743.1	<i>tet(O)</i>	119,543
<i>C. jejuni</i>	NC_008790.1	<i>tet(O)</i>	45,025
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP007750.1	<i>tet(O)</i>	46,448
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP017857.1	<i>tet(O)</i>	44,808
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP017854.1	<i>tet(O)</i>	44,436
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP022078.1	<i>tet(O)</i>	46,746
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP022471.1	<i>tet(O)</i>	45,197
<i>C. jejuni</i>	NC_017282.1	<i>tet(O)</i>	43,222
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP010073.1	<i>tet(O)</i>	48,872
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP010302.1	<i>tet(O)</i>	48,872
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP017230.1	<i>tet(O)</i>	51,522
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP017861.1	<i>tet(O)</i>	43,077
<i>C. coli</i>	NZ_CP017877.1	<i>tet(O)/aph(3")-IIIa</i>	55,234
<i>C. coli</i>	NZ_CP013035.1	<i>tet(O)/aph(3")-IIIa</i>	44,064
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP007752.1	<i>tet(O)/aph(3")-IIIa</i>	46,761
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP020775.1	<i>tet(O)/aph(3")-IIIa</i>	45,904
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP017030.1	<i>tet(O)/aph(3")-IIIa</i>	50,689
<i>C. jejuni</i>	NC_022354.1	<i>tet(O)/aph(3")-IIIa</i>	46,902
<i>C. coli</i>	NZ_CP017872.1	<i>tet(O)/aph(2")-Ilg/aph(3")-IIIa/sat-4</i>	55,122
<i>C. coli</i>	NZ_CP023546.1	<i>tet(O)/aph(2")-Ilg/aph(3")-IIIa/sat-4</i>	55,122
<i>C. coli</i>	NC_022355.1	<i>tet(O)/aph(2")-Ilg/aph(3")-IIIa/sat-4</i>	55,127
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP023544.1	<i>tet(O)/aph(2")-Ilg/aph(3")-IIIa/sat-4</i>	55,132
<i>C. coli</i>	NZ_CP017026.1	<i>tet(O)/aph(3")-VIIa</i>	180,543
<i>C. coli</i>	NZ_CP007180.1	<i>tet(O)/Inu(AN2)</i>	48,422
<i>C. coli</i>	NZ_CP007182.1	<i>tet(O)/aph(3")-IIIa/sat-4</i>	47,962
<i>C. jejuni</i>	NZ_CP028186.1	<i>tet(O)/aph(2")-Iflant(9)/ant(6)-Ial/aph(3")-IIIa/sat-4</i>	66,602
<i>C. coli</i>	NZ_CP018901.1	<i>aph(3")-VIIa</i>	125,964

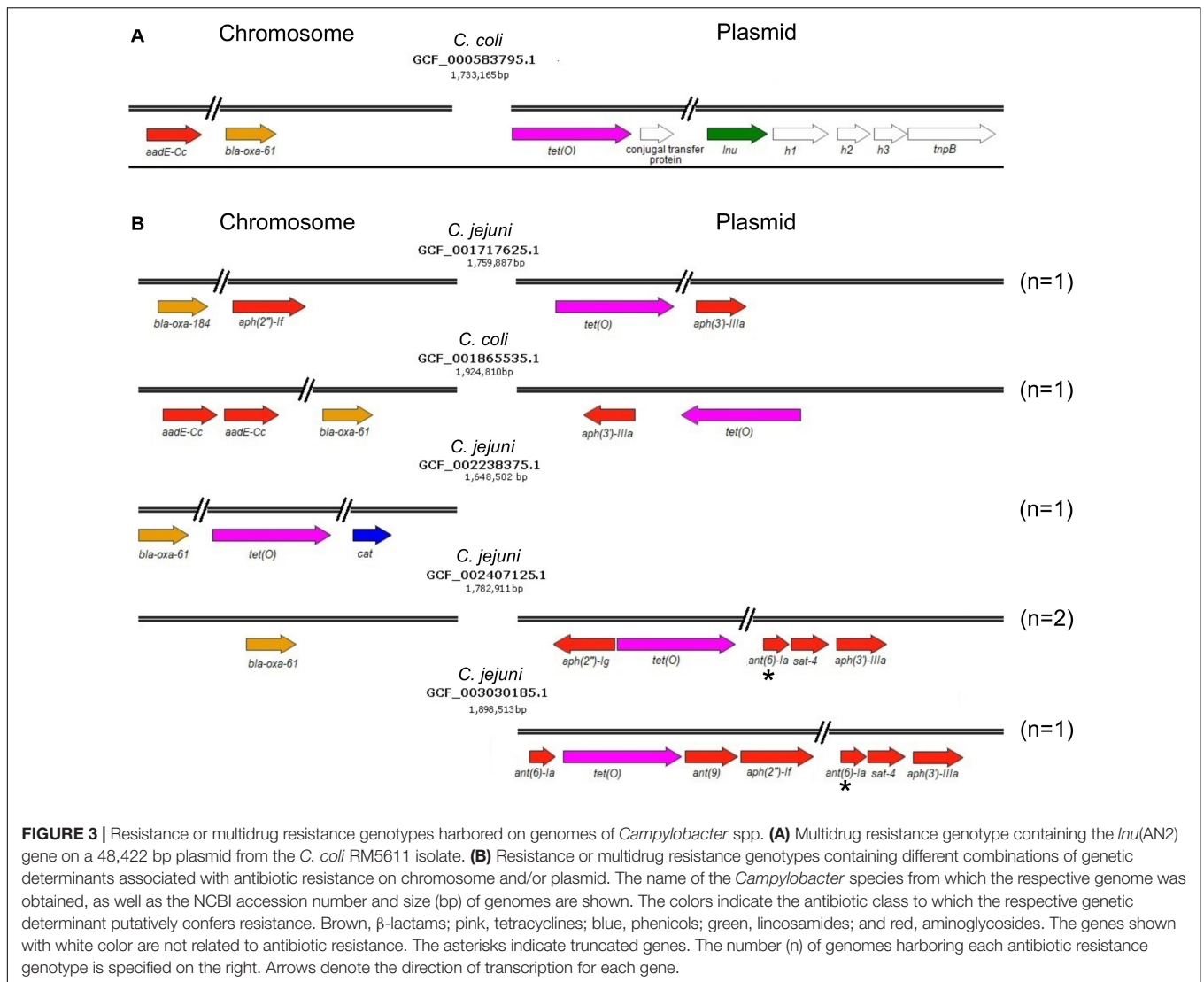
FIGURE 2 | Antibiotic resistance patterns from *Campylobacter* plasmids. *Campylobacter* species harboring the respective plasmid, NCBI accession number for each plasmid, genes for antibiotic resistance, and size (bp) for each plasmid, are indicated. Distinct antibiotic resistance patterns are displayed in different color.

found. The different AR genotypes and their prevalence on genomes from *C. coli*, *C. jejuni*, and other *Campylobacter* species, are shown in **Supplementary Figures S1–S3**. *bla*_{OXA-61} and *tet(O)* were the most common AR genotypes present on genomes from *C. coli*, with a prevalence of 23.8% (5/21 genomes) and 14.3% (3/21 genomes), respectively; whereas *bla*_{OXA-184} (prevalence of 41.1%; 58/141 genomes) and *bla*_{OXA-61} (prevalence of 28.4%; 40/141 genomes) were the predominant AR genotypes on genomes from *C. jejuni*; and *bla*_{OXA-493}/*gyrA* T86V and *bla*_{OXA-493} were the AR genotypes more common on genomes from other *Campylobacter* species, with a prevalence of 31.8% (7/22 genomes) and 27.3% (6/22 genomes), respectively (**Figure 4**). Location (chromosome or plasmid) of the AR determinants for

some of the AR genotypes is shown in **Figure 3B**. All AR genotypes present in the *Campylobacter* plasmids are displayed in **Figure 2**.

Genetic Determinants Associated With AR That Are *Campylobacter* Species-Specific

Interestingly, our analysis revealed that some genetic determinants for AR are present only in particular *Campylobacter* species. For instance, despite the great representativeness of genomes from *C. jejuni* (163 genomes), and with less abundance from *C. coli* (22 genomes), the *bla*_{OXA-493} gene was only found on genomes from 4 of the 6 species that integrate the *C. lari* group



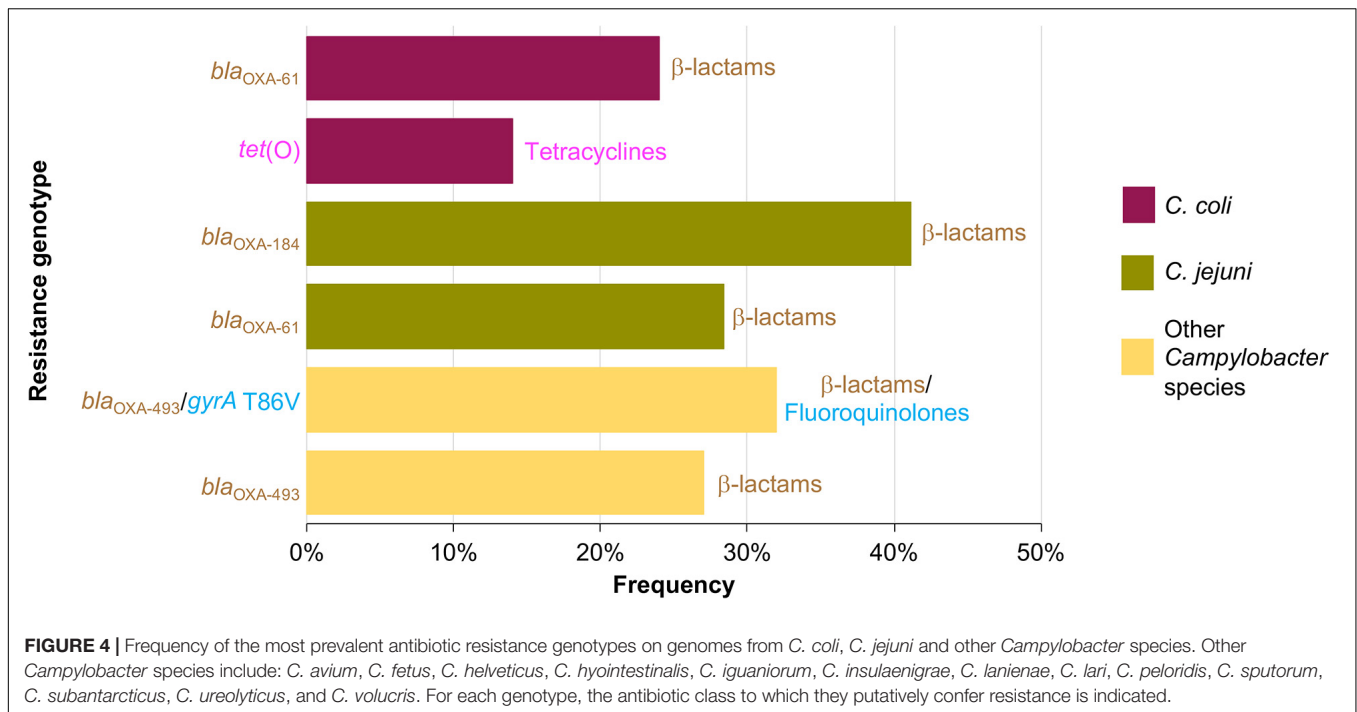
(Miller et al., 2014; Costa and Iraola, 2019): *C. insulaenigrae* (3/3 genomes), *C. lari* (7/8 genomes), *C. subantarcticus* (2/2 genomes) and *C. volucris* (1/1 genomes) (**Supplementary File S1**); the number of genomes carrying the *bla*_{OXA-493} gene with respect to the total of genomes tested for each species, is indicated between parenthesis. Hence, *bla*_{OXA-493} was the predominant gene for β -lactamases that was identified in the *C. lari* group (prevalence of 92.9%, 13/14 genomes); only one genome from this group presents the *bla*_{OXA-184} gene and none carries the *bla*_{OXA-61} or *bla*_{OXA-576} genes. In contrast, the *bla*_{OXA-61} gene was confined to *C. jejuni* (63/163 genomes) and *C. coli* (14/22 genomes) species, as well as the *bla*_{OXA-184} gene (66 genomes) was mostly present in *C. jejuni* (65/163 genomes); only one genome of *C. helveticus* also carries the *bla*_{OXA-184} gene (1/1 genomes) (**Supplementary File S1**). Furthermore, aminoglycoside resistance genes were only detected in *C. coli* (12/22 genomes) and *C. jejuni* (11/163 genomes) (**Supplementary File S1**).

On another hand, the T86V substitution in *GyrA* (with a prevalence of 24.2% with respect to the total of

GyrA substitutions, 8/33 genomes) was detected only in species of the *C. lari* group: *C. insulaenigrae* (3/3 genomes), *C. lari* (1/8 genomes), *C. peloridis* (1/1 genomes), *C. subantarcticus* (2/2 genomes) and *C. volucris* (1/1 genomes) (**Supplementary File S1**). In contrast, the T86I mutation in *GyrA* (with a prevalence of 66.7% with respect to the total of *GyrA* substitutions, 22/33 genomes) was identified mostly in genomes of *C. jejuni* (18/22), but not in those from the *C. lari* group (**Supplementary File S1**).

Prevalence of AR Genotypes in *Campylobacter* and Its Association With Collection Date, Host and Geographic Location

Genetic factors associated with AR (genes or point mutations) were identified in 77.6% of the *Campylobacter* genomes analyzed (184/237 genomes; 1 to 8 factors per genome). No genetic determinants associated with AR were found on genomes from



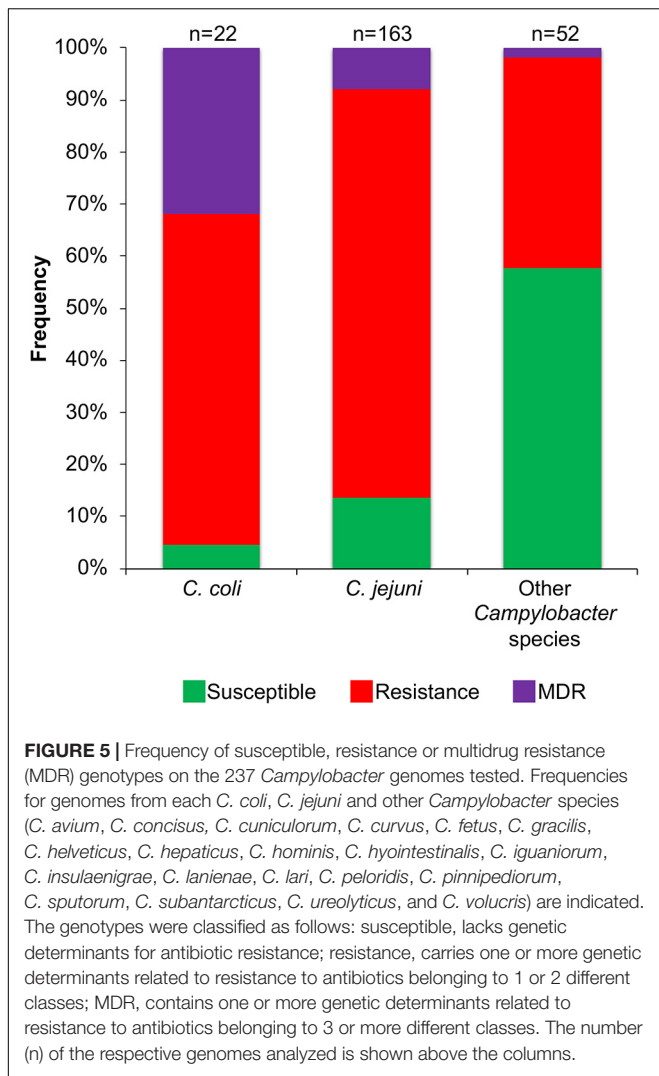
C. concisus, *C. cuniculorum*, *C. curvus*, *C. gracilis*, *C. hepaticus*, *C. hominis*, and *C. pinnipediorum*. Genomes carrying factors that putatively confer resistance to 1 or 2 classes of antibiotics were considered to represent a resistance genotype, those carrying factors related with resistance to 3 or more antibiotic classes were considered to be a multidrug resistance (MDR) genotype, and those lacking factors for AR were taken as susceptible genotypes. Most studies on AR in *Campylobacter* have been performed on the *C. coli* and *C. jejuni* species, whereas this phenomenon remains poorly explored for the other *Campylobacter* species. Thus, to gain more insight about the AR in *C. coli* and *C. jejuni*, as well as in the *Campylobacter* species less studied, we decided to compare the prevalence of resistance or MDR genotypes between genomes from *C. coli* (22 genomes), *C. jejuni* (163 genomes) and the other *Campylobacter* species analyzed (52 genomes). For the genomes from *C. coli*, the resistance genotype is the most represented (prevalence of 63.6%; 14/22 genomes), followed by the MDR genotype (prevalence of 31.8%; 7/22 genomes) and finally the susceptible genotype (prevalence of 4.6%; 1/22 genomes) (Figure 5). For genomes from *C. jejuni*, the resistance genotype is also the predominant (prevalence of 78.5%; 128/163 genomes), then the susceptible genotype (prevalence of 13.5%, 22/163 genomes) and at last the MDR genotype (prevalence of 8%; 13/163 genomes) (Figure 5). In contrast, for the genomes from the other *Campylobacter* species, the susceptible genotype is predominant (prevalence of 57.7%; 30/52 genomes), followed by the resistance genotype (prevalence of 40.4%; 21/52 genomes) and only one MDR genotype was found (prevalence of 1.9%; 1/52 genomes) (Figure 5).

Then, we analyzed the prevalence of the *Campylobacter* AR genotypes according to the host, collection date and geographical location from where the respective bacteria were

isolated (Supplementary File S1). The *C. coli* isolates from farm animals carry resistance or MDR genotypes, with prevalence of 61.1% (11/18 genomes) and 33.3% (6/18 genomes), respectively, whereas the only 2 *C. coli* isolates from humans present the resistance genotype (Figure 6A). For *C. jejuni*, the MDR genotype has a higher prevalence in isolates from farm animals (25.8%; 8/31 genomes) compared with those from humans (3.7%; 4/109 genomes); the opposite was observed for the resistance genotype (Figure 6B). For the other *Campylobacter* species, the resistance genotype is predominant in bacteria isolated from marine animals (58.3%; 7/12 genomes), whereas the only MDR genotype found in this group is present in the *C. lanienae* NCTC 13004 strain isolated from a human (6.7%; 1/15 genomes) (Figure 6C). Notably, our analyses show a considerable increase in the presence of MDR genotypes from *C. coli* (Figure 7A) and *C. jejuni* (Figure 7B), as well as in the presence of resistance genotypes from the other *Campylobacter* species group (Figure 7C), in bacteria collected in the last decade (2010–2018), compared with previous decades. Additionally, our results indicate a very high prevalence of AR genotypes in *C. coli* and *C. jejuni* isolates from both Europe and North America (88–100%); being the MDR genotype from both *C. coli* and *C. jejuni* more predominant in North America (Figures 8A,B). Likewise, our analyses indicate a higher prevalence of AR genotypes from the other *Campylobacter* species group in Europe (56.3%) with respect to North America (35.7%) (Figure 8C).

DISCUSSION

Previous studies have analyzed the prevalence of genetic determinants for AR in genomes from *C. coli* and *C. jejuni*



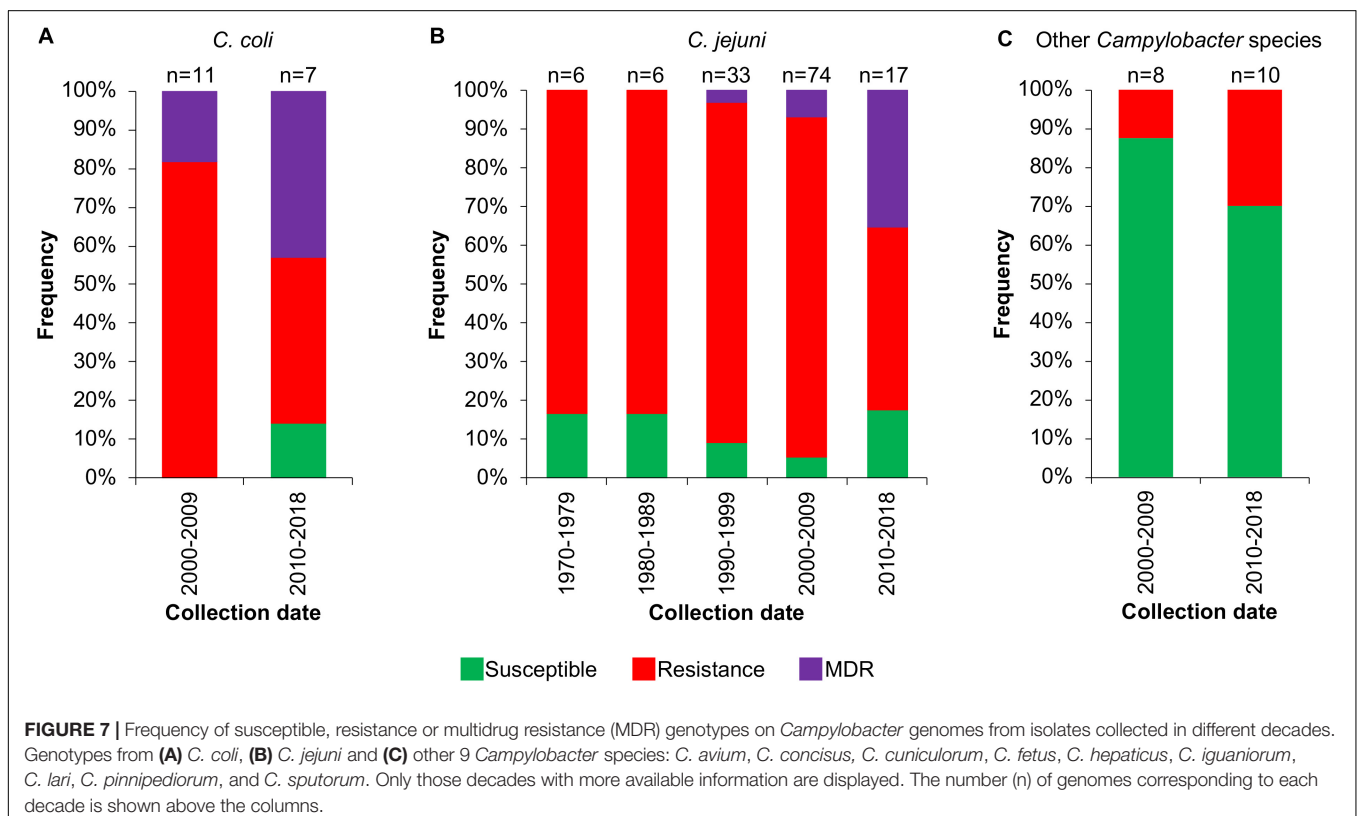
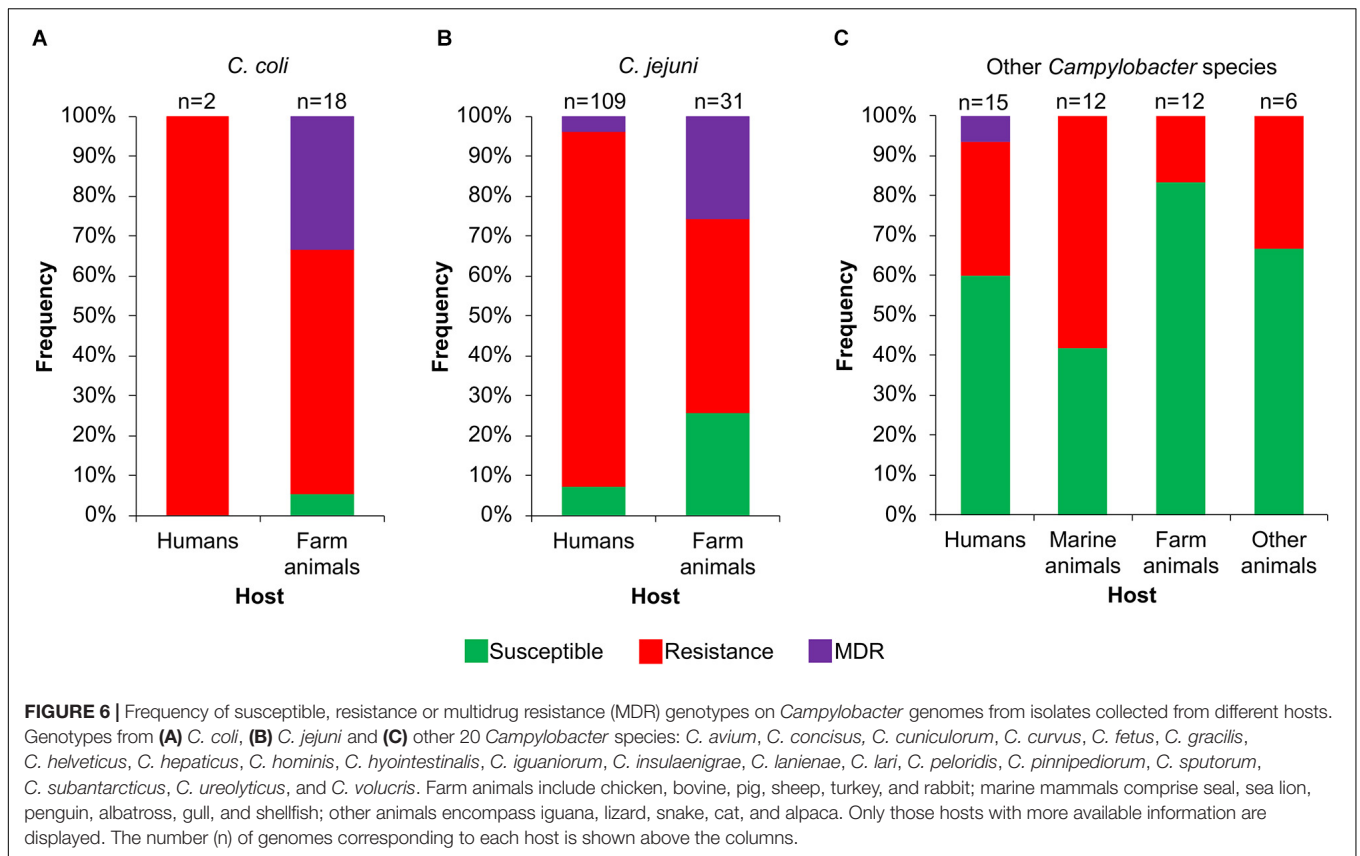
strains isolated in specific geographic regions (Weis et al., 2016; Zhao et al., 2016; Cantero et al., 2018; de Vries et al., 2018; Fabre et al., 2018; Whitehouse et al., 2018). In the present study, we identified genetic determinants associated with AR in 237 genomes from 22 different *Campylobacter* species with global distribution.

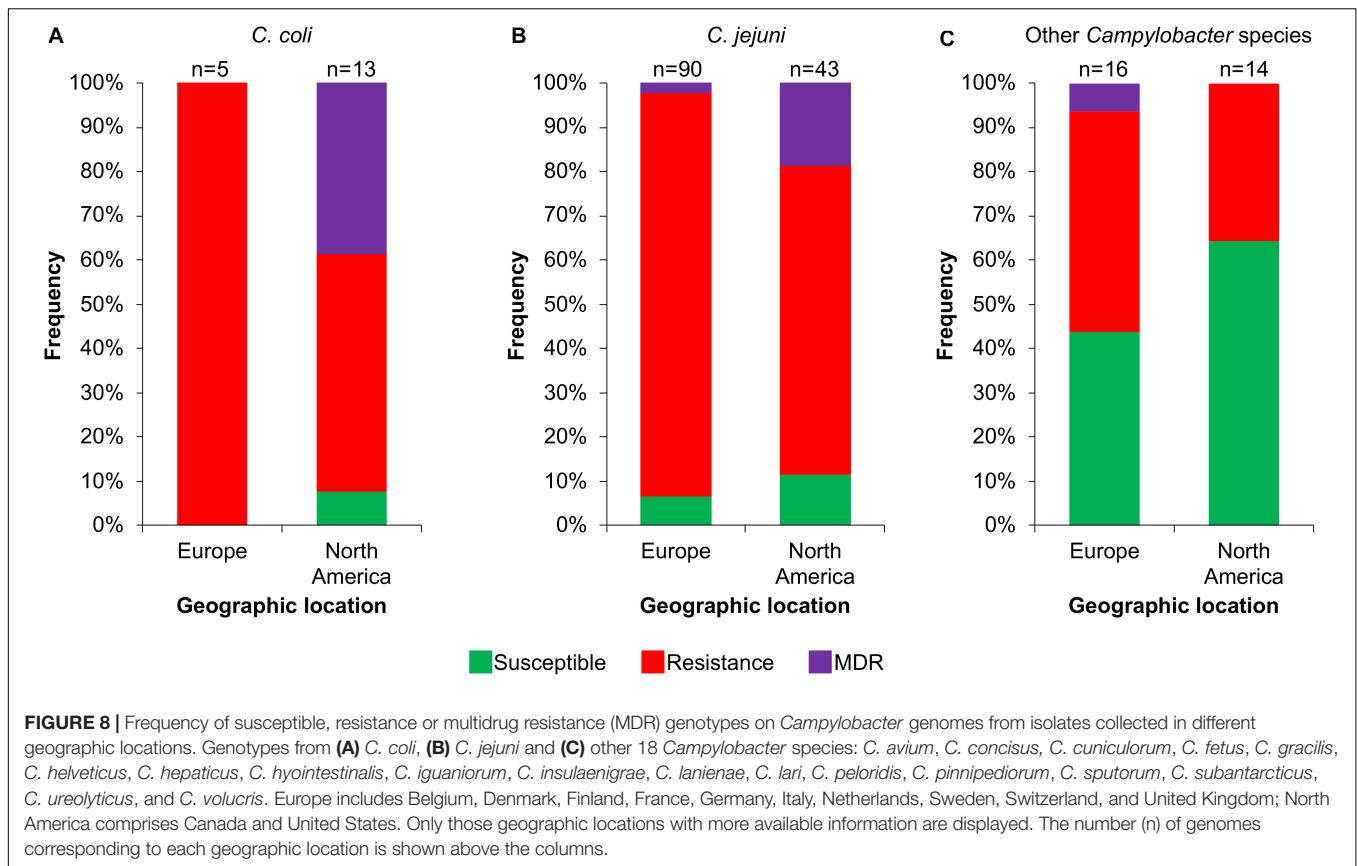
We found 15 distinct AR genes and point mutations related to AR in 3 housekeeping genes in the *Campylobacter* genomes tested (Figure 1). Notably, 3 of the AR genes had not been previously reported in *Campylobacter*: *lnu*(AN2), putatively associated with lincosamides resistance, and 2 putative β -lactams resistance genes, *bla*_{OXA-493} and *bla*_{OXA-576}. Two β -lactamases coding genes, *bla*_{OXA-61} and *bla*_{OXA-184}, were the most abundant AR genes in the analyzed genomes from *C. coli* and *C. jejuni*, which is consistent with the results from previous studies (Griggs et al., 2009; Weis et al., 2016; Zhao et al., 2016; de Vries et al., 2018; Fabre et al., 2018; Whitehouse et al., 2018). In contrast, in the analyzed genomes from species other than *C. coli* and *C. jejuni*, the *bla*_{OXA-493} β -lactamase coding gene was the predominant (Supplementary File S1). On another hand, even though our

study indicates a low occurrence of determinants associated with aminoglycoside resistance in the *Campylobacter* genomes tested, these determinants displayed a great diversity, since 9 different aminoglycoside resistance genes, as well as point mutations in *rpsL*, were found (Figure 1). These findings are in agreement with those reported previously (Qin et al., 2012; Zhao et al., 2015, 2016; Cantero et al., 2018; Fabre et al., 2018; Hormeno et al., 2018; Whitehouse et al., 2018).

A high global incidence of *Campylobacter* isolates resistant to ciprofloxacin (fluoroquinolones) and erythromycin (macrolides) has been reported before (Luangtongkum et al., 2009; Signorini et al., 2018; Sproston et al., 2018). However, our analysis showed a low occurrence of mutations in the *gyrA* and 23S rRNA genes (Figure 1), which are associated with resistance to fluoroquinolones and macrolides, respectively. Nevertheless, multidrug efflux pumps can also mediate resistance to antibiotics of different classes, such as aminoglycosides, β -lactams, chloramphenicol, fluoroquinolones, macrolides and tetracyclines, among others (Blair et al., 2014). The efflux pumps are ancient elements that play important physiological roles in bacteria; but notably, they can also export antibiotics out of the cell, thus reducing their intracellular concentration and, as consequence, confer AR (Blair et al., 2014; Blanco et al., 2016). CmeABC is the only multidrug efflux pump characterized in *Campylobacter*; it was shown to be involved in resistance to structurally different antibiotics including β -lactams, fluoroquinolones, macrolides, and tetracyclines (Lin et al., 2002; Luangtongkum et al., 2009; Guo et al., 2010; Shen et al., 2018). In addition to specific genes and point mutations for AR, we also detected genes that code for multiple efflux pumps in *Campylobacter* (Supplementary File S2). Genes for the CmeABC system, MacB family, macrolide ABC transporter and TolC family efflux pumps, were found in the bulk of analyzed genomes. Besides, genes for other efflux pumps were found only in some genomes, such as those for the AcrB/AcrD/AcrF family, hydrophobe/amphiphile efflux-1 family and multidrug efflux SMR transport efflux pumps. Important to note, given that the efflux pumps can confer resistance to multiple antibiotics, to facilitate interpretation, they were not considered in our analysis as determinants for AR.

A major finding of our work was the *Campylobacter* species-specific distribution of some genetic determinants for AR. *Campylobacter* species cluster in 5 discrete phylogenetic clades (Costa and Iraola, 2019). One is the *C. lari* group, which is composed of six species: *C. insulaenigrae*, *C. lari*, *C. ornithocola*, *C. peloridis*, *C. subantarcticus*, and *C. volucris* (Miller et al., 2014; Costa and Iraola, 2019). These species are highly related at the genome level and have been isolated from similar hosts and environments (Miller et al., 2014). We found the *bla*_{OXA-493} gene and the T86V substitution in GyrA, exclusively in species from the *C. lari* group (Supplementary File S1). The T86V mutation in GyrA had also been previously reported in the *C. lari* species (Pidcock et al., 2003; Weis et al., 2016). In contrast, aminoglycoside resistance genes were only detected in the classical *C. coli* and *C. jejuni* species (Supplementary File S1). Previous studies also have indicated the presence of aminoglycoside resistance genes in





C. jejuni and *C. coli* (Qin et al., 2012; Zhao et al., 2015, 2016; Cantero et al., 2018; Fabre et al., 2018; Whitehouse et al., 2018); however, the presence of these genes in species other than *C. jejuni* and *C. coli* had not been analyzed. Thus, our data show that the genetic variability between the different clades of *Campylobacter* also involves the determinants for AR. Due to the limited number of genomes from non-*C. coli/C. jejuni* species (52 genomes), we cannot discard the possibility that aminoglycoside resistance genes are present in these species, but in very low prevalence.

Consistent with previous reports (NARMS, 2012; de Vries et al., 2018; Whitehouse et al., 2018), we found that the *C. coli* genomes harbor the highest number of AR determinants, compared with the other *Campylobacter* species analyzed (Supplementary File S1). Furthermore, in agreement with previous studies (Thakur et al., 2010; Wiczorek et al., 2015), our results show a higher prevalence of MDR genotypes in *C. coli* (31.8%; 7/22 genomes) with respect to *C. jejuni* (8%; 13/163 genomes). Notably, 86.4% (19/22 genomes) of the *C. coli* genomes possess 1–4 plasmids; in contrast, only 14.1% (23/163 genomes) of the *C. jejuni* genomes carry 1 or 2 plasmids, and 25% (13/52 genomes) of the genomes from the remaining 20 *Campylobacter* species tested contain 1–5 plasmids (Supplementary File S1). Interestingly, most genes associated with AR in *C. coli* are located on plasmids, whereas in the other *Campylobacter* species are placed on chromosome (Supplementary File S1), which could explain, at least in part, the higher number of AR

determinants and MDR genotypes in *C. coli* compared with the other *Campylobacter* species. Remarkably, in non-*C. coli/C. jejuni* species, AR genes located on plasmids were not identified (Figure 2 and Supplementary File S1), *Campylobacter* spp. have mechanisms for conjugation and natural transformation, and transferrable AR has been documented in this genus (Taylor and Courvalin, 1988). Moreover, it has been proposed that *Campylobacter* gained some AR genes from Gram-positive bacteria (Taylor and Courvalin, 1988; Zilhao et al., 1988; Alfredson and Korolik, 2007). Thus, the AR genes located on plasmids, or on other mobile elements, imply a threat for the appearance of new *Campylobacter* strains resistant to antibiotics.

We found a reduced number of genetic determinants for AR in *Campylobacter*, in comparison with the huge number of genetic determinants for AR present in other bacteria such as *Enterococcus* spp. (Torres et al., 2018), *Escherichia coli* (Poirel et al., 2018) or *Salmonella enterica* (McDermott et al., 2018), which share hosts and niches with *Campylobacter* spp. The reason why *Campylobacter* spp. maintain in general a low number of genetic determinants for AR remains to be determined.

Our results, together with previous studies, reveal a high prevalence of *Campylobacter* AR genotypes worldwide, not only from the classical *C. jejuni* and *C. coli* species, but also, although still with less extent, from emerging *Campylobacter* species; these AR genotypes can be present in bacteria residing in different hosts such as humans and different animals (Figures 5, 6, 8 and Supplementary File S1). Even more worryingly, our data support

that the prevalence of these bacteria carrying AR genotypes has been increasing with time (Figure 7).

Although the phenotype conferred by all the resistance genetic determinants identified in this study needs to be tested, a very high correlation between the presence of genetic determinants for AR and the respective phenotype has been reported in *Campylobacter* spp., which reaches up to 100% of correspondence for some specific antibiotics (Nirdnoy et al., 2005; Chen et al., 2013; Zhao et al., 2015, 2016; Fabre et al., 2018; Whitehouse et al., 2018). Hence, it has been suggested that analysis of genomic data, for the identification of genetic determinants associated with AR, has the potential to reliably predict resistance phenotypes (Zhao et al., 2016; Whitehouse et al., 2018; Feldgarden et al., 2019).

Thus, our study, together with other reports, provide genetic determinants that can be used to predict AR in *Campylobacter* spp., which could greatly help to select the best antibiotic therapy against infections caused by these bacteria. Additionally, our study further expands the knowledge on the genetic elements that shape the resistome of the genus *Campylobacter* and on the scattering of these AR genetic determinants between the *Campylobacter* species.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/Supplementary Material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DP-M and VB contributed to the conception and design of the study, as well as the discussion of the results. DR-M, IM-F, RS,

and LL carried out the bioinformatics work. DP-M analyzed the bioinformatics results, created the figures, and wrote the manuscript. VB edited the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)/México (2017-01-5182) to VB. DR-M was supported by a master fellowship from CONACYT (grant 771346).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.513070/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Frequency of resistance or multidrug resistance (MDR) genotypes on *C. coli* genomes. Thirteen antibiotic resistance genotypes were detected in 21 genomes from *C. coli* isolates. For each genotype, the antibiotic class to which they putatively confer resistance is indicated.

FIGURE S2 | Frequency of resistance or multidrug resistance (MDR) genotypes on *C. jejuni* genomes. Twenty antibiotic resistance genotypes were detected in 141 genomes from *C. jejuni* isolates. For each genotype, the antibiotic class to which they putatively confer resistance is indicated.

FIGURE S3 | Frequency of resistance or multidrug resistance (MDR) genotypes on genomes from other *Campylobacter* species. Eleven antibiotic resistance genotypes were detected in 22 genomes from other *Campylobacter* species isolates: *C. avium*, *C. fetus*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis*, *C. iguaniorum*, *C. insulaenigrae*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. peloridis*, *C. sputorum*, *C. subantarcticus*, *C. ureolyticus*, and *C. volucris*. For each genotype, the antibiotic class to which they putatively confer resistance is indicated.

REFERENCES

- Agunos, A., Arsenaault, R. K., Avery, B. P., Deckert, A. E., Gow, S. P., Janecko, N., et al. (2018). Changes in antimicrobial resistance levels among *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Campylobacter* in Ontario broiler chickens between 2003 and 2015. *Can. J. Vet. Res.* 82, 163–177.
- Alfredson, D. A., and Korolik, V. (2005). Isolation and expression of a novel molecular class D beta-lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2515–2518. doi: 10.1128/AAC.49.6.2515-2518.2005
- Alfredson, D. A., and Korolik, V. (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 123–132. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x
- Bachoual, R., Ouabdesselam, S., Mory, F., Lascols, C., Soussy, C. J., and Tankovic, J. (2001). Single or double mutational alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microb. Drug Resist.* 7, 257–261. doi: 10.1089/10766290152652800
- Bailey, R. A., Kranis, A., Psifidi, A., Watson, K. A., Rothwell, L., Hocking, P. M., et al. (2018). Colonization of a commercial broiler line by *Campylobacter* is under limited genetic control and does not significantly impair performance or intestinal health. *Poult. Sci.* 97, 4167–4176. doi: 10.3382/ps/pey295
- Blair, J. M., Richmond, G. E., and Piddock, L. J. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 9, 1165–1177. doi: 10.2217/fmb.14.66
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., et al. (2016). Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* 4:14. doi: 10.3390/microorganisms4010014
- Cantero, G., Correa-Fiz, F., Ronco, T., Strube, M., Cerda-Cuellar, M., and Pedersen, K. (2018). Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* broiler isolates by whole-genome sequencing. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 145–152. doi: 10.1089/fpd.2017.2325
- CDC (2013). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention.
- Charvalos, E., Peteinaki, E., Spyridaki, I., Manetas, S., and Tselentis, Y. (1996). Detection of ciprofloxacin resistance mutations in *Campylobacter jejuni gyrA* by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism and direct DNA sequencing. *J. Clin. Lab. Anal.* 10, 129–133. doi: 10.1002/(sici)1098-2825(1996)10:3<129::aid-jcla3>3.0.co;2-6
- Chaudhari, N. M., Gupta, V. K., and Dutta, C. (2016). BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Sci. Rep.* 6:24373. doi: 10.1038/srep24373
- Chen, Y., Mukherjee, S., Hoffmann, M., Kotewicz, M. L., Young, S., Abbott, J., et al. (2013). Whole-genome sequencing of gentamicin-resistant *Campylobacter coli* isolated from U.S. retail meats reveals novel plasmid-mediated aminoglycoside resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5398–5405. doi: 10.1128/aac.00669-13
- Cody, A. J., Clarke, L., Bowler, I. C., and Dingle, K. E. (2010). Ciprofloxacin-resistant *Campylobacteriosis* in the UK. *Lancet* 376:1987. doi: 10.1016/s0140-6736(10)62261-1
- Costa, D., and Iraola, G. (2019). Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 32:e00072-18.

- Dasti, J. I., Gross, U., Pohl, S., Lugert, R., Weig, M., and Schmidt-Ott, R. (2007). Role of the plasmid-encoded *tet(O)* gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Med. Microbiol.* 56(Pt 6), 833–837. doi: 10.1099/jmm.0.47103-0
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374–377. doi: 10.1126/science.1120800
- de Vries, S. P. W., Vurayai, M., Holmes, M., Gupta, S., Bateman, M., Goldfarb, D., et al. (2018). Phylogenetic analyses and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter* spp. from diarrhoeal patients and chickens in Botswana. *PLoS One* 13:e0194481. doi: 10.1371/journal.pone.0194481
- EFSA and ECDC (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* 16:5500. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500
- Ewers, E. C., Anisowicz, S. K., Ferguson, T. M., Seronello, S. E., Barnhill, J. C., Lustik, M. B., et al. (2018). Antibiotic resistance, molecular characterizations, and clinical manifestations of Campylobacteriosis at a military medical center in Hawaii from 2012–2016: a retrospective analysis. *Sci. Rep.* 8:11736. doi: 10.1038/s41598-018-29461-z
- Fabre, A., Oleastro, M., Nunes, A., Santos, A., Sifre, E., Ducournau, A., et al. (2018). Whole-genome sequence analysis of multidrug-resistant *Campylobacter* isolates: a focus on aminoglycoside resistance determinants. *J. Clin. Microbiol.* 56:e00390-18.
- Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D. H., Prasad, A. B., Slotta, D. J., Tolstoy, I., et al. (2019). Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63:e00483-19.
- Ge, B., Wang, F., Sjolund-Karlsson, M., and McDermott, P. F. (2013). Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: susceptibility testing methods and resistance trends. *J. Microbiol. Methods* 95, 57–67. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.021
- Gibreel, A., Kos, V. N., Keelan, M., Trieber, C. A., Levesque, S., Michaud, S., et al. (2005). Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2753–2759. doi: 10.1128/AAC.49.7.2753-2759.2005
- Griggs, D. J., Peake, L., Johnson, M. M., Ghorri, S., Mott, A., and Piddock, L. J. (2009). Beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance in *Campylobacter* species: prevalence of Cj0299 (bla OXA-61) and evidence for a novel beta-lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3357–3364. doi: 10.1128/aac.01655-08
- Guo, B., Lin, J., Reynolds, D. L., and Zhang, Q. (2010). Contribution of the multidrug efflux transporter CmeABC to antibiotic resistance in different *Campylobacter* species. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 77–83. doi: 10.1089/fpd.2009.0354
- Hakanen, A., Jalava, J., Kotilainen, P., Jousimies-Somer, H., Siitonen, A., and Huovinen, P. (2002). *gyrA* polymorphism in *Campylobacter jejuni*: detection of *gyrA* mutations in 162 *C. jejuni* isolates by single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2644–2647. doi: 10.1128/aac.46.8.2644-2647.2002
- Hanninen, M. L., and Hannula, M. (2007). Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1251–1257. doi: 10.1093/jac/dkm345
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., et al. (2015). World health organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Med.* 12:e1001923. doi: 10.1371/journal.pmed.1001923
- Hormeno, L., Ugarte-Ruiz, M., Palomo, G., Borge, C., Florez-Cuadrado, D., Vadiillo, S., et al. (2018). *ant(6)-I* genes encoding aminoglycoside o-nucleotidyltransferases are widely spread among streptomycin resistant strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Front. Microbiol.* 9:2515. doi: 10.3389/fmicb.2018.02515
- Hu, Y., Gao, G. F., and Zhu, B. (2017). The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. *Front. Med.* 11, 161–168. doi: 10.1007/s11684-017-0531-x
- Iglesias-Torrens, Y., Miro, E., Guirado, P., Llovet, T., Munoz, C., Cerda-Cuellar, M., et al. (2018). Population structure, antimicrobial resistance, and virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* isolated from three ecological niches: gastroenteritis patients, broilers, and wild birds. *Front. Microbiol.* 9:1676. doi: 10.3389/fmicb.2018.01676
- Iovine, N. M. (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence* 4, 230–240. doi: 10.4161/viru.23753
- Ishihara, K., Kira, T., Ogikubo, K., Morioka, A., Kojima, A., Kijima-Tanaka, M., et al. (2004). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on farms (1999–2001): results from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 261–267. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.03.017
- Jacob, J., Evers, S., Bischoff, K., Carlier, C., and Courvalin, P. (1994). Characterization of the *sat4* gene encoding a streptothricin acetyltransferase in *Campylobacter coli* BE/G4. *FEMS Microbiol. Lett.* 120, 13–17. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07000.x
- Jensen, L. B., and Aarestrup, F. M. (2001). Macrolide resistance in *Campylobacter coli* of animal origin in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 371–372. doi: 10.1128/aac.45.1.371-372.2001
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., et al. (2017). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 45, D566–D573. doi: 10.1093/nar/gkw1004
- Kaakoush, N. O., Castano-Rodriguez, N., Mitchell, H. M., and Man, S. M. (2015). Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 687–720. doi: 10.1128/cmr.00006-15
- Karikari, A. B., Obiri-Danso, K., Frimpong, E. H., and Krogfelt, K. A. (2017). Antibiotic resistance of *Campylobacter* recovered from faeces and carcasses of healthy livestock. *Biomed Res. Int.* 2017:4091856. doi: 10.1155/2017/4091856
- Khan, J. A., Rathore, R. S., Abulreesh, H. H., Qais, F. A., and Ahmad, I. (2018). Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry meat and related samples at retail shops in Northern India. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 218–225. doi: 10.1089/fpd.2017.2344
- Kweon, O. J., Lim, Y. K., Yoo, B., Kim, H. R., Kim, T. H., and Lee, M. K. (2015). First case report of *Campylobacter volucris* bacteremia in an immunocompromised patient. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1976–1978. doi: 10.1128/jcm.00442-15
- Lee, M. H. M., Pan, D. S. T., Huang, J. H., Chen, M. I., Chong, J. W. C., Goh, E. H., et al. (2017). Results from a patient-based health education intervention in reducing antibiotic use for acute upper respiratory tract infections in the private sector primary care setting in Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61:e02257-16.
- Lin, J., Michel, L. O., and Zhang, Q. (2002). CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2124–2131. doi: 10.1128/aac.46.7.2124-2131.2002
- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C. M., and Zhang, Q. (2009). Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol.* 4, 189–200. doi: 10.2217/17460913.4.2.189
- Man, S. M. (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 669–685. doi: 10.1038/nrgastro.2011.191
- Marasini, D., Karki, A. B., Buchheim, M. A., and Fakhr, M. K. (2018). Phylogenetic relatedness among plasmids harbored by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from retail meats. *Front. Microbiol.* 9:2167. doi: 10.3389/fmicb.2018.02167
- McDermott, P. F., Zhao, S., and Tate, H. (2018). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiol. Spectr.* 6:ARBA-0014-2017.
- McIver, C., Hogan, T., White, P., and Tapsall, J. (2004). Patterns of quinolone susceptibility in *Campylobacter jejuni* associated with different *gyrA* mutations. *Pathology* 36, 166–169. doi: 10.1080/00313020410001672019
- Miller, W. G., Yee, E., Chapman, M. H., Smith, T. P., Bono, J. L., Huynh, S., et al. (2014). Comparative genomics of the *Campylobacter lari* group. *Genome Biol. Evol.* 6, 3252–3266. doi: 10.1093/gbe/evu249
- NARMS (2012). *Retail Meat Report*. Atlanta, GA: National Antimicrobial Resistance Monitoring System.

- Nirdnoy, W., Mason, C. J., and Guerry, P. (2005). Mosaic structure of a multiple-drug-resistant, conjugative plasmid from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2454–2459. doi: 10.1128/AAC.49.6.2454-2459.2005
- Nowaczek, A., Urban-Chmiel, R., Dec, M., Puchalski, A., Stepien-Pysniak, D., Marek, A., et al. (2019). *Campylobacter* spp. and bacteriophages from broiler chickens: characterization of antibiotic susceptibility profiles and lytic bacteriophages. *Microbiologyopen* 8:e00784. doi: 10.1002/mbo3.784
- Olkkola, S., Juntunen, P., Heiska, H., Hyytiäinen, H., and Hanninen, M. L. (2010). Mutations in the *rpsL* gene are involved in streptomycin resistance in *Campylobacter coli*. *Microb. Drug Resist.* 16, 105–110. doi: 10.1089/mdr.2009.0128
- O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*. London: The Review on Antimicrobial Resistance.
- Payot, S., Bolla, J. M., Corcoran, D., Fanning, S., Megraud, F., and Zhang, Q. (2006). Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect.* 8, 1967–1971. doi: 10.1016/j.micinf.2005.12.032
- Piddock, L. J., Ricci, V., Pumbwe, L., Everett, M. J., and Griggs, D. J. (2003). Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 19–26. doi: 10.1093/jac/dkg033
- Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., et al. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 6:ARBA-0026-2017. doi: 10.1016/b978-0-12-801214-7.00002-8
- Pratt, A., and Korolik, V. (2005). Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 452–460. doi: 10.1093/jac/dki040
- Premarathne, J., Anuar, A. S., Thung, T. Y., Satharasinghe, D. A., Jambari, N. N., Abdul-Mutalib, N. A., et al. (2017). Prevalence and antibiotic resistance against tetracycline in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in cattle and beef meat from Selangor, Malaysia. *Front. Microbiol.* 8:2254. doi: 10.3389/fmicb.2017.02254
- Qin, S., Wang, Y., Zhang, Q., Chen, X., Shen, Z., Deng, F., et al. (2012). Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5332–5339. doi: 10.1128/aac.00809-12
- Ren, G. W., Wang, Y., Shen, Z., Chen, X., Shen, J., and Wu, C. (2011). Rapid detection of point mutations in domain V of the 23S rRNA gene in erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates by pyrosequencing. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 375–379. doi: 10.1089/fpd.2010.0676
- Ruiz, J., Moreno, A., Jimenez de Anta, M. T., and Vila, J. (2005). A double mutation in the *gyrA* gene is necessary to produce high levels of resistance to moxifloxacin in *Campylobacter* spp. clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 542–545. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.10.016
- Schiaffino, F., Colston, J. M., Paredes-Olortegui, M., Francois, R., Pisanic, N., Burga, R., et al. (2019). Antibiotic resistance of *Campylobacter* species in a pediatric cohort study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63:e01911-18.
- Shen, Z., Wang, Y., Zhang, Q., and Shen, J. (2018). Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. *Microbiol. Spectr.* 6:ARBA-0013-2017.
- Signorini, M. L., Rossler, E., Diaz David, D. C., Olivero, C. R., Romero-Scharpen, A., Soto, L. P., et al. (2018). Antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* species isolated from humans, food-producing animals, and products of animal origin: a worldwide meta-analysis. *Microb. Drug Resist.* 24, 1174–1190. doi: 10.1089/mdr.2017.0310
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., and Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* 2:200. doi: 10.3389/fmicb.2011.00200
- Smith, J. L., and Fratamico, P. M. (2010). Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *J. Food Prot.* 73, 1141–1152. doi: 10.4315/0362-028x-73.6.1141
- Sougakoff, W., Papadopoulou, B., Nordmann, P., and Courvalin, P. (1987). Nucleotide sequence and distribution of gene *tetO* encoding tetracycline resistance in *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 44, 153–159.
- Sproston, E. L., Wimalarathna, H. M. L., and Sheppard, S. K. (2018). Trends in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *Microb. Genom.* 4:e000198. doi: 10.1099/mgen.0.000198
- Tang, Y., Fang, L., Xu, C., and Zhang, Q. (2017). Antibiotic resistance trends and mechanisms in the foodborne pathogen, *Campylobacter*. *Anim. Health Res. Rev.* 18, 87–98. doi: 10.1017/S1466252317000135
- Taylor, D. E., and Courvalin, P. (1988). Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1107–1112. doi: 10.1128/aac.32.8.1107
- Thakur, S., Zhao, S., McDermott, P. F., Harbottle, H., Abbott, J., English, L., et al. (2010). Antimicrobial resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 835–844. doi: 10.1089/fpd.2009.0487
- Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., Leon-Sampedro, R., Del Campo, R., and Coque, T. M. (2018). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol. Spectr.* 6:ARBA-0032-2018.
- Vacher, S., Menard, A., Bernard, E., and Megraud, F. (2003). PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for detection of point mutations associated with macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1125–1128. doi: 10.1128/aac.47.3.1125-1128.2003
- Vandamme, P., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., and On, S. L. W. (2015). “*Campylobacter*,” in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Online*, ed. W. B. Whitman (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc).
- Wang, J., Shoemaker, N. B., Wang, G. R., and Salyers, A. A. (2000). Characterization of a *Bacteroides* mobilizable transposon, NBU2, which carries a functional lincomycin resistance gene. *J. Bacteriol.* 182, 3559–3571. doi: 10.1128/jb.182.12.3559-3571.2000
- Wang, Y., Huang, W. M., and Taylor, D. E. (1993). Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 457–463. doi: 10.1128/aac.37.3.457
- Wang, Y., and Taylor, D. E. (1990). Chloramphenicol resistance in *Campylobacter coli*: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction. *Gene* 94, 23–28. doi: 10.1016/0378-1119(90)90463-2
- Wei, B., and Kang, M. (2018). *In vitro* activity of fosfomycin against *Campylobacter* isolates from poultry and wild birds. *PLoS One* 13:e0200853. doi: 10.1371/journal.pone.0200853
- Weis, A. M., Storey, D. B., Taff, C. C., Townsend, A. K., Huang, B. C., Kong, N. T., et al. (2016). Genomic comparison of *Campylobacter* spp. and their potential for zoonotic transmission between birds, primates, and livestock. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 7165–7175. doi: 10.1128/aem.01746-16
- Whitehouse, C. A., Young, S., Li, C., Hsu, C. H., Martin, G., and Zhao, S. (2018). Use of whole-genome sequencing for *Campylobacter* surveillance from NARMS retail poultry in the United States in 2015. *Food Microbiol.* 73, 122–128. doi: 10.1016/j.fm.2018.01.018
- WHO (2017). *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics*. Geneva: WHO.
- Wieczorek, K., Denis, E., and Osek, J. (2015). Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* from broilers slaughtered in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* 210, 24–32. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.006
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 175–186. doi: 10.1038/nrmicr01614
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644. doi: 10.1093/jac/dks261
- Zhang, X., Tang, M., Zhou, Q., Zhang, J., Yang, X., and Gao, Y. (2018). Prevalence and characteristics of *Campylobacter* throughout the slaughter process of different broiler batches. *Front. Microbiol.* 9:2092. doi: 10.3389/fmicb.2018.02092

- Zhao, S., Mukherjee, S., Chen, Y., Li, C., Young, S., Warren, M., et al. (2015). Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1314–1321. doi: 10.1093/jac/dkv001
- Zhao, S., Tyson, G. H., Chen, Y., Li, C., Mukherjee, S., Young, S., et al. (2016). Whole-genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 459–466. doi: 10.1128/aem.02873-15
- Zilhao, R., Papadopoulou, B., and Courvalin, P. (1988). Occurrence of the *Campylobacter* resistance gene *tetO* in *Enterococcus* and *Streptococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1793–1796. doi: 10.1128/aac.32.12.1793

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Rivera-Mendoza, Martínez-Flores, Santamaría, Lozano, Bustamante and Pérez-Morales. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Cuernavaca, Morelos, a 11 de agosto del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Deyanira Pérez Morales (Tutor CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB UAEM)

Dr. Gabriel del Río Guerra (IFC UNAM)

Dr. Enrique Merino Pérez (IBT UNAM)

Tesis: **Análisis pangenómico del género *Campylobacter* y su aplicación en la determinación de marcadores moleculares para la detección de *C. fetus*.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Rivera Mendoza**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO



ATENTAMENTE

DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de agosto del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Deyanira Pérez Morales (Tutor CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB UAEM)

Dr. Gabriel del Río Guerra (IFC UNAM)

Dr. Enrique Merino Pérez (IBT UNAM)

Tesis: **Análisis pangenómico del género *Campylobacter* y su aplicación en la determinación de marcadores moleculares para la detección de *C. fetus*.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Rivera Mendoza**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO



ATENTAMENTE

DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 11 de agosto del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Deyanira Pérez Morales (Tutor CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB UAEM)

Dr. Gabriel del Río Guerra (IFC UNAM)

Dr. Enrique Merino Pérez (IBT UNAM)

Tesis: **Análisis pangenómico del género *Campylobacter* y su aplicación en la determinación de marcadores moleculares para la detección de *C. fetus*.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Rivera Mendoza**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO



ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de agosto del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Deyanira Pérez Morales (Tutor CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB UAEM)

Dr. Gabriel del Río Guerra (IFC UNAM)

Dr. Enrique Merino Pérez (IBT UNAM)

Tesis: **Análisis pangenómico del género *Campylobacter* y su aplicación en la determinación de marcadores moleculares para la detección de *C. fetus*.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Rivera Mendoza**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2020-11-30 20:48:46 | Firmante

TAT04vBk1JFNv7jQGoaS4hCB4RjeNT3yLZaaW5kuW2sTOPFnAq0cqu9iiGvpJs6keaCv02ZW+ammnWnz6Qdm1LMJEb4eugg/Kjy+h6QJQ19UPMj9zUYs9Z2nGaqv46y7W8tljh
oiPINyP7WwbyZ47LvGMKKOvyzK3zfyAi97iXFP782fFklFVLHCcZjTqiy0E+bWTIPt6wkqRRsgAwgt3gzRTNbc1M1SjsnpBs7bZmCAi+NPGRSdsndPjLG+yFluivrhgLL6g19d5eX+Azj
zWsVfTsGLahZ4hPuV/bcNpNwfMzf4QL34eYTvVYy5uplhWz+23Z6y9gMMIkx81BZO4sQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



5bzZHu

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dC5JNJCePnQPc9kw20zLlxAejcku87WE>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 11 de agosto del 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Deyanira Pérez Morales (Tutor CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB UAEM)

Dr. Gabriel del Río Guerra (IFC UNAM)

Dr. Enrique Merino Pérez (IBT UNAM)

Tesis: Análisis pangenómico del género *Campylobacter* y su aplicación en la determinación de marcadores moleculares para la detección de *C. fetus*.

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Rivera Mendoza**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. GABRIEL DEL RÍO GUERRA