

Universidad Nacional de San Martín
Escuela de Bio y Nanotecnologías

Campilobacteriosis Genital Bovina: Aportes de la Genómica y Secretómica para optimizar su Diagnóstico y Control en la Argentina

Tesis para optar al Título de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología

Autor: Lic. Pablo Daniel Farace

Director: Dra. Andrea Karina Gioffré
Co-Director: Dr. Ariel Fernando Amadio

Laboratorio de Brucella, Campylobacter & Microbiota de Rumen,
Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular- IB,
Centro de Investigación en Cs. Veterinarias y Agronómicas (CICVyA)-CNIA,
INTA-CONICET

2022

A mi directora Andrea gracias, por tanto. Por tu confianza, tu enseñanza y dedicación, tu mirada crítica y oído, tu atención, tu disposición, tus momentos divertidos y tus retos, gracias por darme un gran margen de trabajo. ¡Se te va a extrañar! Me has marcado en lo académico y en lo personal.

A Ariel y Matías, gracias por su colaboración, su gran hospitalidad, su mirada crítica y por haberme introducido en el gran mundo de la bioinformática.

A Fernando, Claudia y Juan, gracias por su gran colaboración, su capacidad de trabajo y gran disposición para con la tesis.

A Silvito, Marcos y Bernardo gracias por su apoyo, sus sugerencias, los divertidos momentos y charlas.

A Martin, mi vecino lomense, gracias por tu apoyo, tus sugerencias, tu mirada crítica y por esos viajes en auto de Lomas de Zamora al INTA.

Al Nahue y Wander, dos grandes amistades que coseche durante la tesis, gracias por sus consejos y risas.

A mamá, papá y mi hermano, por todo su amor y apoyo en este camino, gracias por regalarme el microscopio de juguete a los 8 años y ahora la impresora.

A Simón 🐾 mi fiel compañero de tantas noches largas de estudio.

Y a mí.

Resumen

La Campilobacteriosis genital bovina (CGB) es una enfermedad infecciosa reproductiva ocasionada por *Campylobacter fetus* (*C. fetus*). En nuestro país, provoca importantes pérdidas económicas en la producción ganadera y es endémica. Las subespecies de *C. fetus* han sido diferenciadas a lo largo del tiempo por sus características fenotípicas y las distintas estrategias moleculares propuestas junto a los estudios genómicos revelaron inconsistencias entre los resultados. Por otro lado, no existen vacunas efectivas para la enfermedad y se desconocen las moléculas claves para el desarrollo de estrategias de control. Para abordar estos desafíos, el objetivo general de la presente Tesis fue aportar conocimientos derivados de la Genómica y de la Secretómica de *C. fetus* para optimizar el diagnóstico y control de la CGB en nuestro país. El análisis filogenómico a partir de secuencias de genomas completos de aislamientos locales (entre ellos, 3 genomas secuenciados mediante NGS por nosotros) y del mundo (Genbank y ENA) permitió describir una estructura poblacional clonal de cepas, agrupadas en dos *clusters* mayoritarios. El 91% de las cepas argentinas agruparon en un clado filogenético compuesto casi exclusivamente por las cepas locales. Dentro de este clado, se describieron relaciones filogenéticas con cepas aisladas en países limítrofes, sugiriendo así la posible existencia de comercio internacional entre las regiones. Pudimos describir también una única cepa de nuestro país, con características distintivas, distante filogenéticamente del resto y que agrupó dentro del linaje humano. Asimismo, se logró discriminar a un grupo de cepas con características bioquímicas y genéticas coincidentes con *C. fetus* subesp. *venerealis*. También se desarrollaron herramientas moleculares, entre ellas, una PCR multiplex que permite identificar un polimorfismo en el transportador de L-cisteína, asociado a la producción de H₂S. Esta PCR mostró resultados concordantes con la clasificación bioquímica de las cepas. Por otro lado, a partir del análisis de múltiples genomas se identificó una secuencia especie- específica (*yagE*) y se diseñaron protocolos de PCR, tanto de punto final como en tiempo real para detectar a *C. fetus*. Los análisis demostraron su especificidad y su utilidad para el análisis de muestras clínicas tanto en un modelo de infección experimental bovino como con muestras de infecciones naturales. Al analizar computacionalmente el Secretoma de *C. fetus* se identificaron 47 proteínas potencialmente antigénicas, de las cuales 15 se predijeron como esenciales. Entre ellas, proteínas de las familias TolC y OmpA, una

subunidad proteica de la familia Cdt, proteínas de ensamblaje asociadas a la membrana externa, BamA y LptD, y proteínas de la superficie celular y capa S, potencialmente relevantes en la interacción con el hospedador que, de acuerdo con la descripción en otros patógenos, muchas de ellas son valiosas para el diseño de estrategias vacunales. También, se describió por primera vez en la especie la producción espontánea de vesículas de membrana externa, cuya morfología y tamaño fue compatible con el reporte en otras bacterias Gram negativas, describiéndose la conservación de la capa S y la presencia de componentes inmunorreactivos. La presente Tesis contribuye con herramientas de diagnóstico molecular caracterizadas y constituye un punto de partida para el diseño futuro de herramientas de control y prevención de la CGB.

Abstract

Bovine genital campylobacteriosis (BGC) is an infectious reproductive disease caused by *Campylobacter fetus* (*C. fetus*). In our country, this disease is endemic and causes important economic losses in the cattle production. The subspecies of *C. fetus* identified up to date have been differentiated over time according to their phenotypic characteristics. However, the results obtained from the used of different molecular strategies for the analyses of these subspecies, together with their genomic studies, have revealed inconsistencies between them. To date, there are no effective vaccines against the disease. In addition, the key molecules for the development of control strategies keep also elusive. As the general objective of the present Thesis, we used *C. fetus* genomics and secretomics to obtain new information in order to optimize the diagnosis and control of BGC in our country. The phylogenomic analysis from complete genome sequences of local isolates (among them, 3 genomes sequenced by NGS by us) and from the world (Genbank and ENA) allowed us to describe a clonal population structure of strains, grouped in two major *clusters*. Most of the Argentine strains (91%) grouped in a phylogenetic clade composed almost exclusively of local strains. Within this clade, phylogenetic relationships with strains isolated in neighboring countries were evident, suggesting the existence of international trade between the regions. From the samples of our country, we were able to describe a single strain with distinctive characteristics. This strain was phylogenetically distant from the rest and grouped within the human lineage. In addition, a group of strains shared biochemical and genetic characteristics coincident with *C. fetus* subsp. *venerealis*. In this research, we also developed molecular tools, including a multiplex PCR that allows the identification of a polymorphism in the L-cysteine transporter, which is associated with H₂S production. This PCR showed results concordant with the biochemical classification of the strains. On the other hand, from the analysis of multiple genomes, we identified a species-specific sequence (*yagE*) and designed PCR protocols, both end-point and real-time, to detect *C. fetus*. The analyses demonstrated specificity and utility for the analysis of clinical samples both in a bovine experimental infection model and with samples from natural infections. A computational analysis of the *C. fetus* Secretome revealed 47 potentially antigenic proteins, of which 15 were essential, according to predictions. Among them, we identified proteins of the TolC and OmpA families, a protein subunit of the Cdt family, outer

membrane-associated assembly proteins, BamA and LptD, and cell surface and S-layer proteins, which are potentially relevant in the interaction with the host. According to the description in other pathogens, many of these proteins are valuable for the design of vaccine strategies. In addition, this is the first study describing the spontaneous production of outer membrane vesicles in the species. The morphology and size of these vesicles were compatible with those reported in other Gram-negative bacteria and preserved the S-layer and the presence of immunoreactive components. The present Thesis contributes with characterized molecular diagnostic tools and constitutes a starting point for the future design of tools for the control and prevention of BGC.

Publicaciones asociadas al trabajo de tesis

- Farace PD, Morsella CG, Cravero SL, Sioya BA, Amadio AF, Paolicchi FA, Gioffré AK. (2019). L-cysteine transporter-PCR to detect hydrogen sulfide-producing *Campylobacter fetus*. PeerJ 7:e7820 <https://doi.org/10.7717/peerj.7820>
- Farace PD, Irazoqui JM, Morsella CG, García JA, Méndez MA, Paolicchi FA, Amadio AF, Gioffré AK (2021). Phylogenomic analysis for *Campylobacter fetus* occurring in Argentina, Veterinary World, 14(5): 1165-1179. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.06.001>
- Farace PD, Cravero S, Taibo C, Diodati J, Morsella C, Paolicchi F, Sabio y García J, Gioffré AK (2021). *Campylobacter fetus* releases S-layered and immunoreactive outer membrane vesicles, Revista Argentina de Microbiología. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.06.001>

Abreviaturas

(CGB): Campilobacteriosis genital bovina

(Cff): *Campylobacter fetus* subesp. *fetus*

(Cfv): *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis*

(Cfvi): *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis* biovar *intermedius*

(Cft): *Campylobacter fetus* subesp. *testudinum*

(VMEs): vesículas de membrana externa

(PCR): reacción en cadena de la polimerasa

(IFD): inmunofluorescencia directa

(AFLP): polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

(MLST): tipificación multilocus de secuencias

(ST): tipo de secuencia

(SAP): *surface array protein*

Índice

Resumen	ii
Abstract	iv
Publicaciones asociadas al trabajo de tesis	vi
Abreviaturas	vii
Índice	viii
Introducción	1
Las enfermedades reproductivas bovinas en Argentina.....	1
¿Qué es la Campilobacteriosis genital bovina?	2
Taxonomía y filogenia de <i>Campylobacter fetus</i>	3
Características de <i>Campylobacter fetus</i>	5
Genómica de <i>Campylobacter fetus</i>	6
El Secretoma de <i>Campylobacter fetus</i>	10
Identificación de <i>Campylobacter fetus</i> y diagnóstico de la Campilobacteriosis genital bovina	12
Objetivos	16
Materiales y métodos	17
1. Aislamientos locales de <i>Campylobacter fetus</i>	17
2. Cultivo y crecimiento de <i>Campylobacter fetus</i>	17
3. Extracción de ADN genómico a partir de cultivo	17
3.1. Extracción rápida (<i>in house</i>) de ADN genómico	18
3.2. Extracción de ADN genómico con kit comercial	18
4. Electroforesis en gel de agarosa.....	18
5. Cuantificación del ADN genómico	19
6. Secuenciación y ensamblado de genomas locales <i>Campylobacter fetus</i>	19
7. Colección de secuencias de genomas completos de aislamientos locales de <i>Campylobacter fetus</i>	19
8. Colección de secuencias de genomas completos de aislamientos globales de <i>Campylobacter fetus</i>	20
9. Pangenoma de <i>Campylobacter fetus</i>	20
10. Filogenia de <i>Campylobacter fetus</i> en base al <i>core-genoma</i>	21
11. Tipificación de genomas de <i>Campylobacter fetus</i> mediante MLST: Análisis <i>in silico</i>	21
12. Georreferenciación de aislamientos locales de <i>Campylobacter fetus</i>	22
13. Desarrollo de nuevos protocolos moleculares para la identificación de <i>Campylobacter fetus</i>	22
13.1. Búsqueda de potenciales secuencias blanco especie-específicas para <i>Campylobacter fetus</i>	22
13.2. Diseño de oligonucleótidos iniciadores.....	23
13.3. Amplificación génica mediante PCR	24
13.3.1. Evaluación de aislamientos de <i>Campylobacter fetus</i> mediante PCR de punto final	24
13.3.2. PCR <i>in silico</i>	25

14.	PCR- <i>yagE</i> en tiempo real como herramienta diagnóstica molecular	25
14.1.	Modelo de infección experimental bovino	25
14.2.	Muestras de campo	26
14.3.	Ensayo de PCR- <i>yagE</i> en tiempo real	26
15.	Estadística	27
16.	Caracterización del Secretoma	27
16.1.	Prospección <i>in silico</i> del Secretoma de <i>Campylobacter fetus</i>	27
16.2.	Purificación de Vesículas de Membrana Externa (VMEs)	28
16.3.	Microscopía Electrónica de Transmisión	28
16.4.	Ensayos de antigenicidad de las Vesículas de Membrana Externa (Inmuno <i>dot blot</i>)	29
Resultados		30
1.	Genómica de <i>Campylobacter fetus</i>	30
1.1.	Secuenciación de aislamientos locales de <i>Campylobacter fetus</i>	30
1.2.	Pangenoma y filogenómica de los aislamientos locales de <i>Campylobacter fetus</i>	33
1.3.	Georreferenciación de los aislamientos locales de <i>Campylobacter fetus</i>	39
1.4.	Pangenoma y filogenómica de aislamientos globales de <i>Campylobacter fetus</i>	39
1.5.	MLST: Análisis de las cepas de <i>Campylobacter fetus</i> aisladas en Argentina	45
2.	Optimización del diagnóstico molecular de la Campilobacteriosis genital bovina	47
2.1.	Identificación especie- específica de <i>Campylobacter fetus</i>	47
2.1.1.	Busqueda de potenciales secuencias blanco especie- específicas para <i>Campylobacter fetus</i>	47
2.1.2.	Diseño de una PCR especie- específica a partir del gen <i>yagE</i>	51
2.1.3.	Evaluación de aislamientos locales de <i>Campylobacter fetus</i> mediante la PCR- <i>yagE</i>	53
2.1.4.	Análisis <i>in silico</i> de la PCR- <i>yagE</i> sobre secuencias de genomas completos de <i>Campylobacter fetus</i>	55
2.2.	Identificación subespecie- específica de <i>Campylobacter fetus</i>	63
2.2.1.	Diseño racional de una PCR específica para las subespecies de <i>Campylobacter fetus</i>	63
2.2.2.	Estudio de la PCR-transportador L-Cys en aislamientos locales	65
2.2.3.	Análisis <i>in silico</i> de la PCR-transportador L-Cys	67
3.	Diseño y evaluación de la PCR- <i>yagE</i> en tiempo real sobre muestras clínicas	75
3.1.	Aplicación de la PCR- <i>yagE</i> en tiempo real en muestras de smegma prepucial	79
3.2.	Aplicación de la PCR- <i>yagE</i> en tiempo real en muestras de mucus cérvico vaginal	82
4.	Caracterización de los componentes del Secretoma de <i>Campylobacter fetus</i>	84
4.1.1.	Prospección <i>in silico</i> del Secretoma de <i>Campylobacter fetus</i>	85
4.1.2.	Interacciones proteína-proteína y asociaciones funcionales en el Secretoma de <i>Campylobacter fetus</i>	89
4.2.	Evaluación de la producción de Vesículas de Membrana Externa en <i>Campylobacter fetus</i>	91
4.2.1.	Secreción de Vesículas de Membrana Externa en <i>Campylobacter fetus</i>	91
4.2.2.	Inmunorreactividad de las Vesículas de Membrana Externa	94
Discusión		95
	Genómica comparativa y filogenia de los aislamientos locales de <i>Campylobacter fetus</i>	95
	Nuevas herramientas para el diagnóstico molecular de la Campilobacteriosis genital bovina	102

Exploración del Secretoma de <i>Campylobacter fetus</i>	108
Conclusiones	117
Bibliografía	119

Introducción

Las enfermedades reproductivas bovinas en Argentina

Argentina es uno de los mayores exportadores de carne en el mundo, siendo reconocida internacionalmente por la calidad de la carne vacuna que produce. Históricamente, la ganadería es una de las principales actividades en nuestro país y se practica especial y fuertemente en la región Pampeana (provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y Santa Fe), cuya región con clima templado ofrece condiciones naturales de pastoreo (Campero, 2000).

La producción ganadera es uno de los más importantes contribuyentes de la economía en Argentina. Pese a que uno de los principales objetivos de los productores es mejorar la eficiencia productiva, manteniendo los costos a un nivel bajo para que el sistema resulte rentable y sustentable, en la práctica hay factores que impiden alcanzarlo. Uno de ellos es la incidencia de enfermedades reproductivas en el ganado, las cuales generan pérdidas reproductivas y abortos durante la gestación, al momento del parto y durante y desde la primera semana de vida hasta el destete, siendo así las responsables de importantes pérdidas económicas cada año. Dentro de las principales enfermedades infecciosas identificadas, la Campilobacteriosis genital bovina (CGB) tiene una ocurrencia frecuente en la región de la Pampa húmeda y provoca una disminución en los porcentajes de preñez del 15% al 25% o aún mayores (Gobierno de la Provincia de Buenos Aires, 2021).

En los últimos años, se ha producido un aumento de la demanda local e internacional de proteína animal, lo que ha exigido una mejora sustancial de la productividad ganadera y del cumplimiento de estándares sanitarios que aseguren la inocuidad de este alimento. Por eso, la ejecución de las regulaciones en materia de sanidad animal, la prevención y el control para evitar el ingreso de nuevas enfermedades o brotes de las enfermedades existentes son fundamentales para garantizar la seguridad alimentaria.

¿Qué es la Campilobacteriosis genital bovina?

La CGB es una enfermedad venérea causada por *Campylobacter fetus* subesp. *venerealis* (Cfv) y es la principal causa de abortos bovinos en la región Pampeana (Cobo et al., 2003; Morrell et al., 2019). En Argentina, es considerada endémica y en gran parte está asociada a las prácticas de la cría extensiva. La enfermedad causa la muerte del embrión, abortos esporádicos e infertilidad temporaria en bovinos (Eaglesome & García, 1992; OIE, 2021). Distintos estudios muestran la importancia de la infección por *C. fetus* en nuestro país, siendo uno de los agentes bacterianos identificados con mayor frecuencia a partir de muestras de fetos abortados bovinos de la provincia de Buenos Aires (Campero et al., 2003; Jimenez et al., 2011; Molina et al., 2020; Morrell et al., 2019).

Los toros son los principales diseminadores de la enfermedad debido a que actúan como portadores asintomáticos por largos períodos, siendo más afectados los animales adultos por el hecho de que las mucosas penianas se vuelven irregulares y se profundizan las criptas prepuciales, favoreciendo la persistencia del patógeno (Bier et al., 1977; Cobo et al., 2011; Samuelson & Winter, 1966). Los toros jóvenes, por su parte, no están exentos de infectarse debido a hábitos propios de estos animales (sodomía). De esta manera, el toro transmite la enfermedad a las hembras durante el coito o a través de la práctica de inseminación artificial con semen contaminado (Cagnoli et al., 2020; Stegenga & Terpstra, 1949). Si bien, se reconoce a los toros como portadores, recientemente se ha demostrado que *C. fetus* se une de forma irreversible a los espermatozoides provocando efectos perjudiciales sobre la calidad del semen y la capacidad de fecundación (Figura 1) (Chiapparrone et al., 2016).

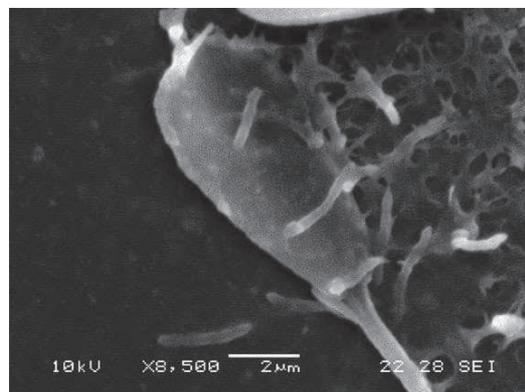


Figura 1. Microfotografía electrónica de *C. fetus* adheridas a un espermatozoide bovino (Chiapparrone et al., 2016).

Las hembras son las más propensas a padecer la enfermedad, especialmente las vaquillonas. La etapa aguda de la CGB suele caracterizarse por repeticiones de celo, infertilidad, endometritis y salpingitis (debido a la baja cantidad de neutrófilos) (Alves et al., 2011; van Bergen et al., 2005a). Luego del coito, en un lapso de 12 a 14 días el microorganismo coloniza el útero (BonDurant, 2005; Corbeil, 1999), evitando la implantación del embrión, seguido de la muerte embrionaria temprana (Campero et al., 2003; Hoffer, 1981; Smibert, 1978). En consecuencia, una vez que se estableció la infección uterina, en un período de 3 a 6 meses, la hembra pierde temporalmente la fertilidad y se convierte en una fuente de infección (Campero et al., 2003; van Bergen et al., 2006). De esta manera, la inmunidad adquirida en los animales infectados principalmente es local (Cobo et al., 2011; Corbeil, 1999).

En cuanto al control de la infección, se ha reportado que las vacunas desarrolladas a la fecha son incapaces de inducir una respuesta inmune efectiva en condiciones de campo, imposibilitando la implementación de un plan de control efectivo en áreas endémicas (Cobo et al., 2004).

Taxonomía y filogenia de *Campylobacter fetus*

El registro del género *Campylobacter* se remonta al año 1886 al ser descubierto por Theodor Escherich (Escherich, 1886), quien describió la presencia de bacterias en forma de espiral no cultivables, en muestras de heces y en la mucosa del intestino grueso asociadas a la diarrea en neonatos. Años más tarde, en 1913 McFaydean y Stockman lograron aislar por primera vez un microorganismo de morfología curva (Figura 2) que causaba abortos en el ganado bovino y ovino, y lo denominaron “*Vibrio*” (Skirrow, 2006; Smibert, 1978). En 1919, la bacteria fue renombrada a *Vibrio fetus* por Smith y Taylor, luego de aislar dicho patógeno en muestras de fluidos fetales bovinos y observar una morfología de “espirilo” en las microfotografías (Smith & Taylor, 1919).

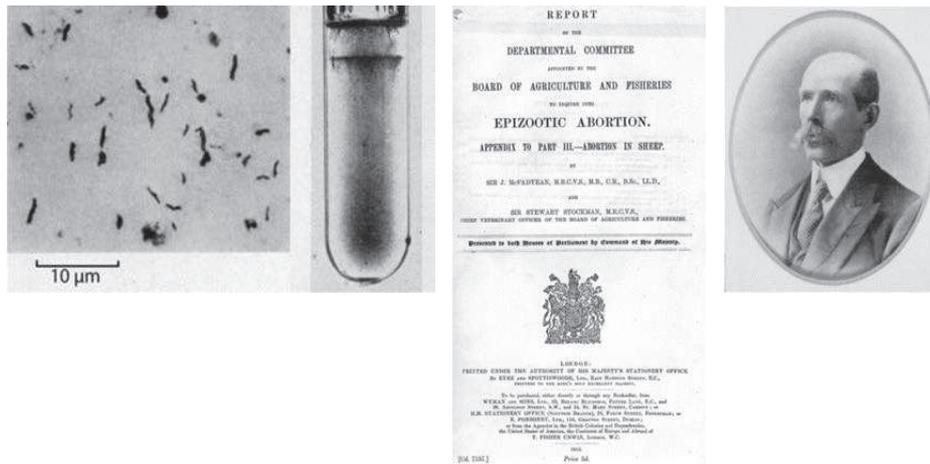


Figura 2. Fotografías de un frotis de exudado uterino de una oveja infectada y un cultivo de la especie *Vibrio* realizado por John McFadyean y Stewart Stockman.

Décadas más tarde, en 1973, Véron y Chatelain reclasificaron a la bacteria bajo el nombre *Campylobacter fetus* luego de realizar una corrección taxonómica del género en base a pruebas bioquímicas e hibridación ADN-ADN (Verón & Chatelain, 1973). Las pruebas bioquímicas incluyeron los ensayos de producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en medio con L-cisteína y crecimiento en medio con glicina 1%.

La revisión taxonómica llevada a cabo por Verón y Chatelain permitió identificar dos subespecies en *C. fetus*: *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cfv), que tiene su tropismo restringido principalmente al tracto genital bovino y es la causante de la CGB (Dekeyser, 2018) y *C. fetus* subsp. *fetus* (Cff), la cual ha sido aislada de distintos mamíferos (bovino, ovino, mono, caprino y humano) siendo el tracto digestivo su nicho de preferencia (Costa & Iraola, 2019). Esta última subespecie es también responsable de abortos esporádicos en bovinos y ovinos (Fiorentino et al., 2017).

Ambas subespecies pueden diferenciarse fenotípicamente: las cepas de Cff muestran resistencia a glicina 1% y producen H₂S en medios enriquecidos con L-cisteína. Por el contrario, las cepas Cfv no crecen en medios que contienen glicina 1% ni producen H₂S (Penner, 1988; van Bergen et al., 2005a; 2005b; van der Graaf-van Bloois et al., 2013, 2014a, 2016a; Verón & Chatelain, 1973). No obstante, en varios países tales como Estados Unidos, Reino Unido, Sudáfrica y Argentina, se ha aislado una variante tolerante a la glicina dentro de la subespecie Cfv: *C. fetus* subsp. *venerealis* biovar *intermedius* (Cfvi) (Iraola et al., 2013; van Bergen, et al., 2005a; van der Graaf-van Bloois et al., 2014b; Venter et al., 2017;

Verón & Chatelain, 1973), a pesar de haber sido asociada a abortos tardíos su relevancia está poco descrita en la literatura (Sprenger et al., 2012; van der Graaf-Van Bloois et al., 2014a). Por lo tanto, si bien estos rasgos permiten la discriminación de las subespecies y el biovar, su identificación precisa es compleja.

En los últimos veinte años, se ha reportado una tercera subespecie de *C. fetus*, *C. fetus* subesp. *testudinum* (Cft), cuyo principal hospedador asociado son los reptiles, aunque también ha sido aislada con frecuencia en humanos (Fitzgerald et al., 2014; Gilbert et al., 2013, 2018, 2019; Tu et al., 2001; Wang et al., 2013). La identificación de esta subespecie y estudios posteriores sugirieron la existencia de dos linajes evolutivos y divergentes en la especie *C. fetus* asociados al tipo de hospedador: el linaje mamífero (humanos, bovinos, ovinos y mono) y el linaje reptiliano (quelonios, lagartos y serpientes u ofidios) (Gilbert et al., 2018; Iraola et al., 2017). A pesar de que Cft ha sido aislado en humanos (heces, sangre, pleura y bilis), en nuestro país aún no hay evidencia de la presencia de esta subespecie y no hay registros de su aislamiento en los bovinos.

Características de *Campylobacter fetus*

C. fetus es una bacteria Gram negativa, tiene un tamaño de 0,5 a 0,8 μm de longitud y de 0,2 a 0,5 μm de grosor, y es microaerófila ya que para su crecimiento y desarrollo requiere una atmósfera de 85% de N_2 , 15% de CO_2 y 5% de O_2 (Verón & Chatelain, 1973). Presenta una morfología curva, espiralada en forma de S y suele poseer uno o dos flagelos polares (Figura 3).

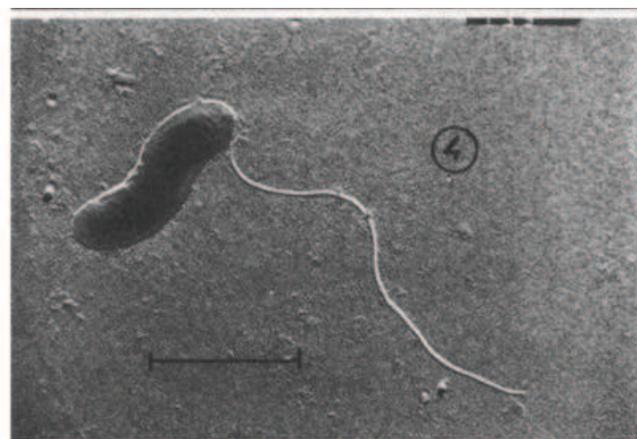


Figura 3. Microfotografía electrónica de la cepa *C. fetus* subesp. *fetus* CIP5396 (Verón & Chatelain, 1973).

Al igual que en otras campilobacterias del género, las bacterias *C. fetus* también presentan un componente superficial más externo que se denomina capa superficial (o capa S) (Figura 4) (Blaser et al., 1994; Casadémont et al., 1998; Fujimoto et al., 1991). Dicha capa, consiste en un conjunto cristalino de subunidades proteicas conocidas como proteínas de la capa superficial o Sap (*Surface array proteins*), las cuales se unen a los lipopolisacáridos de tipo A o B y están codificadas por un número diverso de genes homólogos en cada cepa (Dworkin & Blaser, 1997; García et al., 1995; Wang et al., 1993). Las mismas son transportadas a la superficie celular a través del Sistema de secreción de tipo I (SST1) y son fundamentales en la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Thompson et al., 1998; Thompson, 2002).

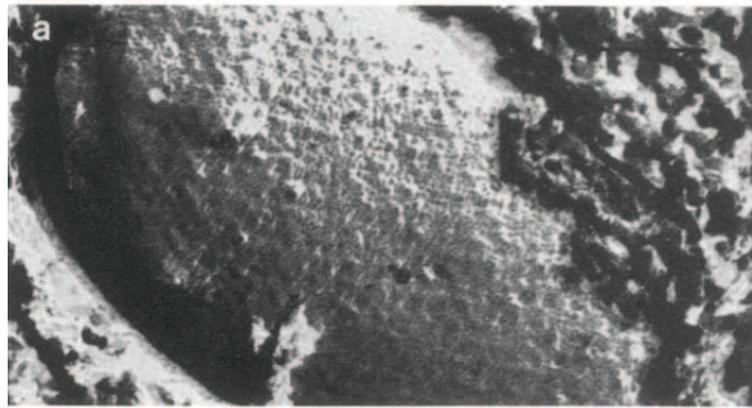


Figura 4. Muestra de criofijación de la capa S de *C. fetus* 82-40LP (Fujimoto et al., 1991).

Genómica de *Campylobacter fetus*

El tamaño reportado de los genomas de *C. fetus* varía entre 1,7 Mb a 1,9 Mb y posee un bajo contenido de GC (33,3%) (Figura 5) (Kienesberger et al., 2014). El primer genoma secuenciado (método de Sanger) y cerrado de *C. fetus* se hizo público en el 2006 y corresponde a la cepa Cff 82-40, la cual fue aislada de un paciente inmunocomprometido en los Estados Unidos (Costa & Iraola, 2019). Esta cepa, hoy en día es considerada como cepa de referencia y ha sido caracterizada ampliamente por Blaser y col. (Blaser et al., 1988; 1993; Pei et al., 1988; Pei & Blaser, 1990).

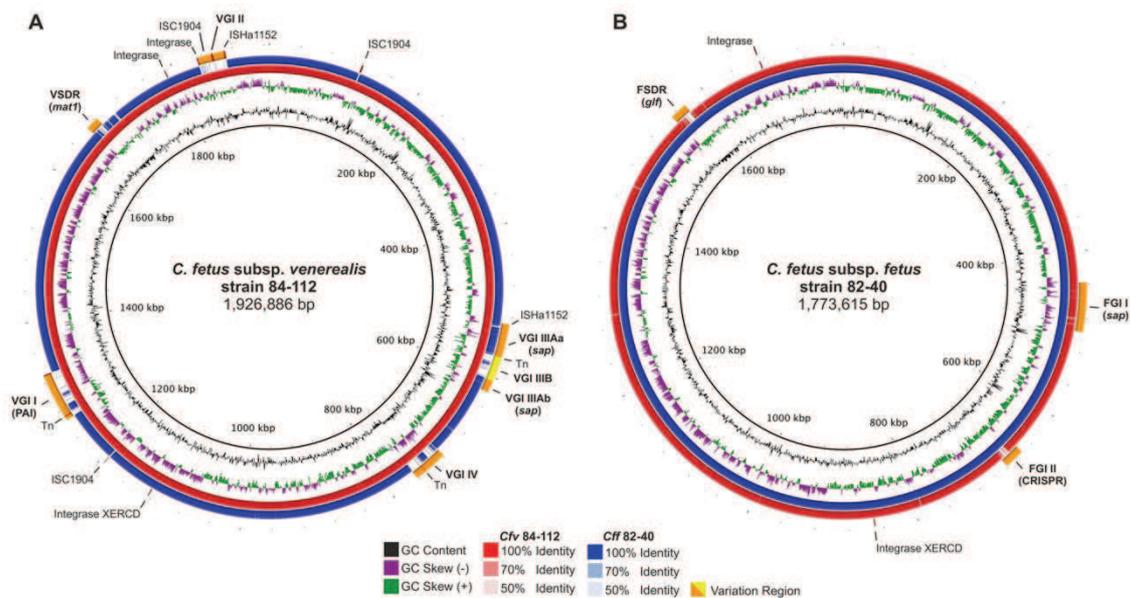


Figura 5. Comparación genómica de dos cepas de distintas subespecies de *C. fetus* empleando una cepa Cfv (anillo rojo) como referencia (A) y una cepa Cff (anillo azul). (B) Ambos gráficos remarcan las regiones genómicas (islas genómicas, secuencias de inserción, transposones y genes importantes) diferenciales respecto al genoma de referencia empleado en cada caso (Kienesberger et al., 2014).

En el año 2009 fue secuenciada parcialmente la primera cepa argentina de *C. fetus*, la cepa Cfv Azul-94 (Moolhuijzen et al., 2009), aislada de un aborto bovino en la localidad de Azul, provincia de Buenos Aires. En ese trabajo pionero de genómica comparativa en *C. fetus*, Moolhuijzen y col. (2009) identificaron componentes y efectores relacionados al sistema de secreción tipo IV (SST4), plásmidos y proteínas de superficie como potenciales secuencias específicas de la subespecie Cfv (Moolhuijzen et al., 2009). Sin embargo, varios estudios posteriores demostraron que la isla genómica que contenía al SST4 era similar y frecuente en ambas subespecies (van der Graaf-van Bloois et al., 2016b).

La secuenciación completa de genomas (WGS) de *C. fetus* marcó un antes y un después en los estudios genómicos a gran escala. A través de los primeros análisis bioinformáticos reportados fue posible conocer y describir diversos marcadores genéticos y regiones vinculadas a la patogenia de *C. fetus* con el fin de diseñar nuevas herramientas diagnósticas y que a su vez, permitan identificar a las subespecies (Abril et al., 2007; Ali et al., 2012; Calleros et al., 2017; Delpiazzi et al., 2021; Gorkiewicz et al., 2010; Iraola et al., 2012, 2016; Kienesberger et al., 2007; Stynen et al., 2011; van der Graaf-van Bloois et al., 2013, 2014a, 2016b).

Con el transcurso del tiempo, el incremento del número de secuencias de genomas completos disponibles y las nuevas herramientas de análisis computacional, dieron lugar a los primeros estudios pangenómicos en *C. fetus*. El término **Pangenoma**, descrito en el 2005 por Tettelin y col., hace referencia al repertorio génico global de un determinado conjunto de microorganismos en estudio (Chung et al., 2018; Rouli et al., 2015). Dicho pangenoma está constituido por un genoma central (o *core-genoma*) que representa el conjunto de genes comunes a todos los genomas estudiados y un genoma accesorio, que involucra a aquellos genes que no se encuentran en el genoma central (Rouli et al., 2015). Estos genes accesorios pueden ser adquiridos mediante transferencia horizontal de genes (Ogata et al., 2001, Ruiz et al., 2011). Por lo cual, este enfoque de estudio permite reflejar la naturaleza de la bacteria y su plasticidad genómica (Gilbert et al., 2016, 2019; Iraola et al., 2017; Kienesberger et al., 2014).

El estilo de vida de la especie de interés dicta fuertemente la forma de distribución del Pangenoma, ya que, de acuerdo con la capacidad de la especie para adquirir ADN exógeno podemos definirlo como un pangenoma abierto (infinito) o cerrado (finito) (Medini et al., 2005). Por lo general, las bacterias con genomas reducidos suelen caracterizarse por tener un bajo contenido de GC, un conjunto de genes muy reducido y una pérdida de funciones metabólicas (Gilbert et al., 2019; Costa & Iraola et al., 2019; Miller et al., 2017; Nadin-Davis et al., 2021). Si bien las especies bacterianas tradicionalmente se definen según la hibridación ADN-ADN, el fenotipo, la naturaleza de su nicho (o entorno) y las secuencias del ARN ribosómico 16S, el Pangenoma ofrece una visión más amplia para definir a una especie y subespecies por el hecho de que no se analiza un solo gen o genes ribosómicos, sino un gran número de genes.

Uno de los primeros estudios pangenómicos descritos en la especie fue el de Ali y col. (2012), en el cual emplearon 2 genomas completos y cerrados de *C. fetus* y otros 13 genomas de distintas especies de *Campylobacter*. En dicho trabajo, describen que varios factores de virulencia están asociados con mecanismos de interacción con el hospedador y tendrían un papel importante en los procesos de invasión, adherencia, motilidad, sistemas de secreción y toxinas. Entre estos se encuentran InvA, CadF, hemolisinas, proteínas de motilidad y la toxina Cdt (toxina de distensión citoletal) (Ali et al., 2012; Kaakoush et al., 2010; Moolhuijzen et al., 2009).

En el año 2014, van der Graaf-van Bloois y col. realizaron el primer estudio genómico comparativo y filogenómico empleando 23 genomas de *C. fetus* (de los cuales 5 genomas se encuentran cerrados). En este estudio, se obtuvo un árbol filogenómico en base al *core-genoma* que mostró a las cepas distribuidas en dos *clusters* filogenéticos que, si bien era coherente con su tipificación molecular mediante MLST, mostraban una inconsistencia entre las características genéticas y fenotípicas de las cepas (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a). Las cepas identificadas fenotípicamente como *C. fetus* subesp. *fetus* agruparon tanto en un *cluster* exclusivo de Cff como también en los *clusters* donde se ubican las cepas Cfv (también determinadas fenotípicamente), resaltando así una inconsistencia entre la genómica y la fenotipificación (Figura 6).

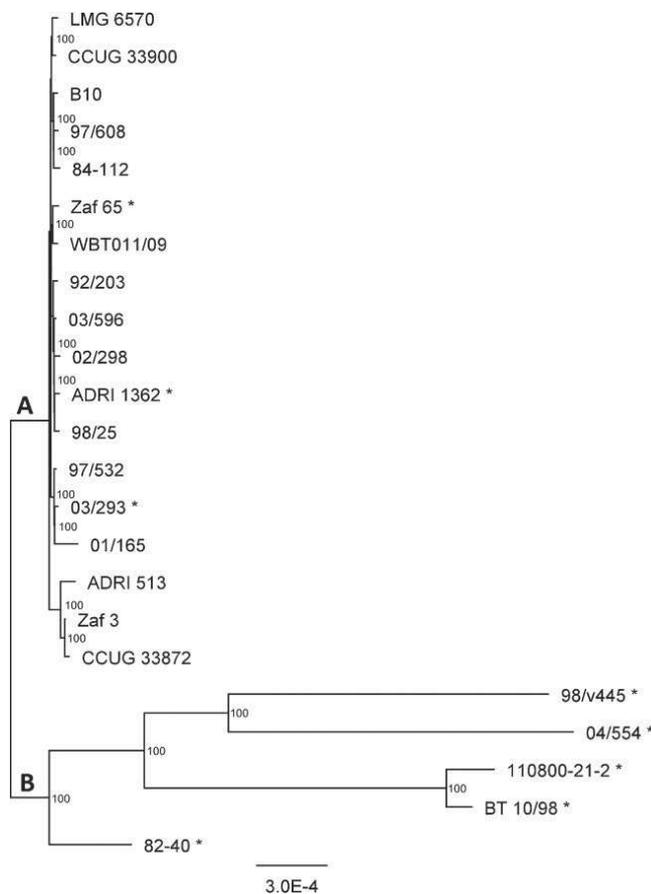


Figura 6. Árbol filogenético de las cepas de *C. fetus* basado en los genomas centrales. Las cepas identificadas fenotípicamente como Cff están marcadas con un asterisco (van der Graaf-Van Bloois et al., 2014a).

El mismo grupo de investigación realizó un estudio genómico poblacional con 42 cepas de *C. fetus* (incluyendo una cepa Cft). La reconstrucción filogenética en base a los polimorfismos de un solo

nucleótido (SNP) en el *core-genoma* evidenció la agrupación de las subespecies Cff y Cfv en 5 *clusters* distintos. También, mostró que el *cluster* Cfv y un *cluster* Cff evolucionaron a partir de un único ancestro Cff y postularon que la eliminación de un transportador de cisteína hipotético es responsable del fenotipo no productor de H₂S en Cfv. Además, este estudio resaltó por primera vez la existencia de un linaje genético asociado a mamíferos. Sin embargo, otro aspecto importante del trabajo fue enfatizar en que la separación de los *clusters* no era concordante con la fenotipificación, cuestionando la necesidad de seguir diferenciando a las subespecies fenotípicamente para el diagnóstico de la CGB (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a).

Posteriormente, Iraola y col. realizaron un estudio filogenómico evolutivo empleando 182 cepas de *C. fetus*. El árbol filogenético evidenció la presencia de 2 linajes evolutivos, el reptiliano y el mamífero, en donde el linaje mamífero a su vez se dividía en dos linajes importantes, uno asociado a humanos y otro a bovinos. Estos linajes se encontraban distribuidos en 8 *clusters* (Iraola et al., 2017). De manera interesante, a partir de la reconstrucción evolutiva realizada por estos autores pudieron inferir que *C. fetus* podría haberse originado en los seres humanos hace unos 10.500 años y haber “saltado” al ganado durante el período de domesticación de los animales.

El Secretoma de *Campylobacter fetus*

El **Secretoma** involucra la totalidad de las proteínas secretadas por la célula al medio extracelular. Por lo general, se postula que las proteínas de cualquier patógeno bacteriano que son presentadas en la superficie celular, ancladas a la membrana o secretadas al entorno extracelular, están implicadas en las interacciones hospedador-patógeno y en la toxicidad (Giombini et al., 2010; Kaakoush et al., 2010). Por lo cual, suelen ser buenos candidatos para el desarrollo de antimicrobianos (Lindahl et al., 2005) y vacunas (Maione et al., 2005; Pacheco et al., 2011, Rodríguez-Ortega et al., 2006).

Los datos relevados demuestran que, a diferencia de otras especies (Kaakoush et al., 2010), el secretoma de *C. fetus* se encuentra parcialmente caracterizado y que representa potencialmente una fuente de moléculas que permitirá incrementar tanto el conocimiento en torno a la patogenia de la bacteria, como así también el mejoramiento del diagnóstico y de las vacunas actualmente disponibles.

Existen distintos mecanismos para la secreción de proteínas u otras macromoléculas descritos en *C. fetus*. Uno de ellos es el sistema de secreción tipo I (Douglas et al., 2014; Thompson et al., 1998), mediante el cual se secretan las subunidades proteicas SAP (Surface Array Protein). Estas proteínas se localizan en la superficie de la bacteria (cápsula) y son responsables de la variación antigénica. Esta variación antigénica, que ocurre tanto *in vivo* como *in vitro*, es el resultado de re-arreglos genómicos y amplificación de los homólogos SAP. Este antígeno es el más caracterizado de la bacteria, siendo el único antígeno de *C. fetus* que ha sido clonado y expresado en forma recombinante (Blaser et al., 1990). Otro mecanismo de secreción reportado en *C. fetus* es el sistema de secreción tipo IV, identificado en Cfv por Gorkiewicz y col. (Gorkiewicz et al., 2010; Kienesberger et al., 2011; van der Graaf-van Bloois et al., 2016b). Dicho sistema se encuentra en una isla genómica de 57 kb, y se ha reportado que el *pilus* de translocación está codificado por el operón *virB* que consta de once genes (*virB1-virB11*) y su translocación depende de *virD4* (van der Graaf-van Bloois et al., 2016b).

En la actualidad, algunos autores han propuesto a las estructuras extracelulares, tales como las vesículas de membrana externa (VMEs), como un sistema de secreción adicional e independiente, propio de las bacterias Gram negativas, conocido como Sistema de secreción tipo cero (Figura 7).

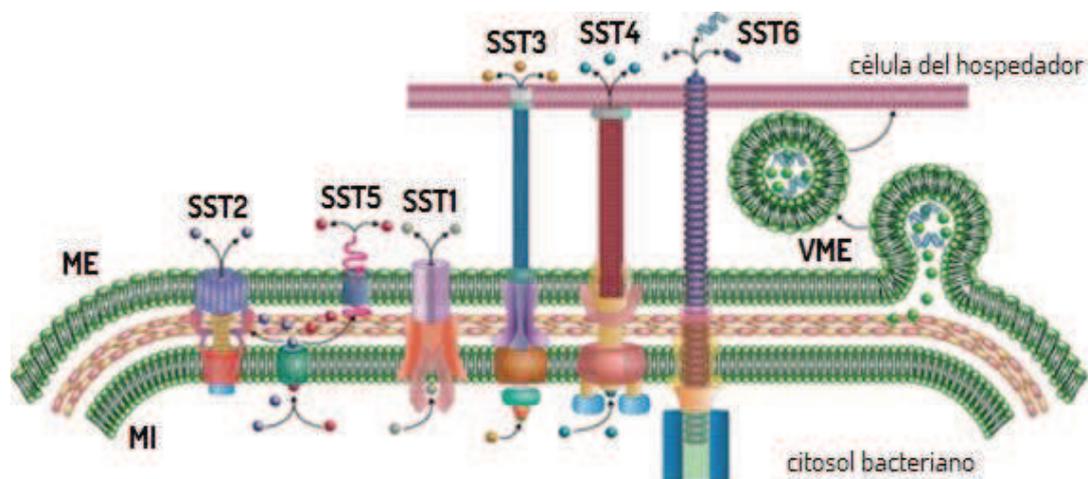


Figura 7. Comparación estructural de los 6 sistemas de secreción y el sistema cero (VMEs) (Guerrero-Mandujano et al., 2017).

Las VMEs son proteoliposomas de membrana externa producidas durante el crecimiento celular (Elmi et al., 2012). Estas estructuras son capaces de transportar diferentes componentes

bacterianos desde el interior de la célula hacia el exterior y funcionan como transportadores de factores de virulencia y moduladores inmunitarios, pudiendo también tener un rol en la transferencia de genes y ARN, entre otros (Kuehn & Kesty, 2005; Sjöström et al., 2015).

En *Campylobacter jejuni* se han descrito ampliamente diferentes estrategias asociadas a virulencia, siendo la bacteria más caracterizada del género. Una de las estrategias más innovadoras es el transporte de la toxina CDT, biológicamente activa a través de las VMEs (Lindmark et al., 2009). Además, las VMEs tienen propiedades inmunológicas que las hace aptas para implementarse en estrategias de vacunación (Tan et al., 2018). Su empleo podría ser una herramienta de gran valor como lo demuestra la vacuna basada en VMEs de *Neisseria meningitidis*, la primera vacuna autorizada basada en estas nanopartículas, que ha demostrado su utilidad en la salud humana (Holst et al., 2009; Santos et al., 2006).

A pesar de estos antecedentes, se desconoce si *C. fetus* es capaz de producir VMEs.

Identificación de *Campylobacter fetus* y diagnóstico de la Campilobacteriosis genital bovina

La especie *C. fetus* comprende varias subespecies con alta identidad a nivel genómico, pero que, según lo reportado en la literatura desde la caracterización de este patógeno, difieren en cuanto a preferencia de hospedador, nicho y características bioquímicas.

Las técnicas de cultivo, las pruebas bioquímicas y la inmunofluorescencia directa han sido de gran utilidad para identificar a la especie y subespecies de *C. fetus*. Entre las pruebas bioquímicas, la resistencia a la glicina y la producción de H₂S, tradicionalmente han sido dos de las pruebas empleadas para su diferenciación y que aún sigue siendo empleada en algunos laboratorios. Por ejemplo, las cepas Cff se caracterizan por ser resistentes al crecimiento en medio con 1% de glicina y producen H₂S en medios enriquecidos con L-cisteína. Por el contrario, las cepas Cfv no crecen en medios con glicina ni producen H₂S (Verón & Chatelain, 1973). Cabe resaltar, que estos métodos dependen del cultivo microbiológico (prueba de oro) y no todos los laboratorios lo implementan, ya sea por la infraestructura o capacidades limitadas del laboratorio (Balzan et al., 2020; Silveira et al., 2018), como también las

características fisiológicas de *C. fetus* (van Bergen et al., 2005b), el cual requiere condiciones especiales de crecimiento en medios enriquecidos con antibióticos para minimizar el crecimiento de contaminantes e incubación en condiciones de microaerofilia.

La inmunofluorescencia directa (IFD) es una técnica ampliamente difundida en los laboratorios en nuestro país para detectar *C. fetus*, dado que es una técnica rápida y de bajo costo (Campero et al., 2003; Marcellino et al., 2015; Morrell et al., 2019; Tedesco et al., 1977), y es una técnica que, junto con otras, está categorizada por la OIE como método de diagnóstico para validar el comercio internacional de toros en la actualidad (OIE, 2021). Sin embargo, el rendimiento de esta técnica depende en gran medida de la calidad de la muestra y sobre todo del entrenamiento del operador.

En los últimos 25 años se ha reportado el desarrollo de varios protocolos que involucran técnicas moleculares para identificar a la especie y subespecies de *C. fetus*: secuenciación del gen 16S (Gorkiewicz et al., 2003; On & Harrington, 2001), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (On & Harrington, 2001), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Wagenaar et al., 2001; van Bergen et al., 2005c) y la tipificación multilocus de secuencias (MLST) (van Bergen et al., 2005a).

El MLST caracteriza los aislamientos bacterianos sobre la base del polimorfismo de nucleótido simple (SNP) dentro de 7 fragmentos de genes constitutivos (o *housekeeping*), los cuales suelen estar presentes en todos los aislamientos de una especie y debido a su variación permite identificar diferentes alelos. A cada secuencia única que se encuentre en un gen *housekeeping* se le asigna un número particular de alelo, y luego cada aislamiento es definido por una combinación particular de alelos, la cual constituye su tipo de secuencia (ST) (Enright et al., 2000). La ventaja de este tipo de técnica es la posibilidad de transferencia y disponibilidad de los resultados para su comparación mediante las bases de datos de dominio público. Por el contrario, el AFLP es un método de tipificación del “genoma completo” que permite explorar el polimorfismo en los sitios de restricción y los nucleótidos adyacentes dichos sitios. Como tal, documenta la variación, las inserciones y las deleciones de la secuencia de nucleótidos en genomas completos (Vos et al., 1995). Sin embargo, las técnicas MLST y AFLP son laboriosas, poco prácticas para el uso rutinario y procesamiento de muestras a gran escala y, de acuerdo

a distintos autores, no son totalmente fiables para la diferenciación de las subespecies de *C. fetus* (On, 2013; van der Graaf-van Bloois et al., 2013), en comparación con la técnica de PCR.

Los métodos basados en la PCR constituyen una herramienta práctica para la identificación y el diagnóstico de la CGB debido a que es una prueba rápida y sencilla, y permite independizarse del cultivo microbiológico (Balzan et al., 2020; Groff et al., 2010; Guerra et al., 2014; Iraola et al., 2012; McMillen et al., 2006; Silveira et al., 2018) considerando que *C. fetus* es una bacteria de crecimiento fastidioso. Además, dicha técnica se destaca por la rapidez a la hora de obtener un resultado (Tabla 1) (Silveira et al., 2018).

Tabla 1. Metodologías empleadas para el diagnóstico de la CGB (adaptada de Silveira et al., 2018).

Técnica de diagnóstico	Muestras	Tiempo para el diagnóstico
Cultivo bacteriano e identificación fenotípica	smegma prepucial; mucus vaginal; tejidos y fluidos fetales	7–10 días
Inmunofluorescencia directa	smegma prepucial; mucus vaginal; tejidos y fluidos fetales	1 día
Métodos basados en PCR	smegma prepucial; mucus vaginal; tejidos y fluidos fetales	4–8 horas

Desde el año 1997, se han diseñado varios ensayos de PCR para identificar tanto a la especie (Abril et al., 2007; Hum et al., 1997; van der Graaf-van Bloois et al., 2013) como a las subespecies de *C. fetus* (Abril et al., 2007; Hum et al., 1997; McMillen et al., 2006; Moolhuijzen et al., 2009; Tu et al., 2005; Wang et al., 2002). Sin embargo, a la fecha no hay un consenso claro sobre cuál es el mejor diseño para identificar a las subespecies de *C. fetus*, principalmente porque el número de cepas evaluadas en los distintos estudios es limitado, la baja concordancia entre las distintas técnicas y, además, ninguna ha podido identificar al biovar intermedium de Cfv.

La PCR múltiple descrita por Hum y col., posee dos secuencias blanco: el gen *csp* (específico para la especie *C. fetus*) y el gen *parA* (específico para la subespecie Cfv) (Hum et al., 1997). A pesar de ser el protocolo de PCR más empleado por la mayoría de los laboratorios en el mundo, esta técnica presenta falsos positivos y falsos negativos (Silveira et al., 2018; van der Graaf-van Bloois et al., 2013). Pese a su diseño y resultados, muchos autores realizaron variantes para este protocolo. Sin embargo, las

discrepancias y ambigüedades en los resultados siguieron estando presentes (On & Harrington, 2001; Schmidt et al., 2010; Schulze et al., 2006; Wagenaar et al., 2001). En un trabajo reportado por Spence y col., esta PCR fue positiva para una cepa de *C. hyointestinalis* (Spence et al., 2011). Asimismo, en un estudio descrito por Iraola y col., la PCR de Hum y col. correspondiente al gen *csp* resultó negativo al analizar un aislamiento bovino de *C. fetus* de nuestro país. Por lo cual, estos resultados resaltan que dicha PCR tiene sus limitaciones y su empleo e interpretación debe realizarse con cautela.

Otra PCR está basada en la detección de la secuencia de inserción ISCfe1, que estaría presente exclusivamente en las cepas Cfv y no en Cff (Abril et al., 2007). Un trabajo demostró que esta PCR fue más sensible respecto de la que emplea la secuencia blanco *parA* de Hum y col. (Hum et al., 1997). Sin embargo, en la actualidad no se emplea para diferenciar a las subespecies, ya que según varios autores la secuencia ISCfe1 está presente en ambas subespecies (McGoldrick et al., 2013; OIE, 2021; Silva et al., 2020; van der Graaf-van Bloois et al., 2013).

A pesar de los avances en los métodos moleculares utilizados para la identificación de la bacteria y diferenciación de las subespecies, las inconsistencias en los resultados siguen siendo un desafío que enfrentar.

Objetivos

Objetivo General

El objetivo general de la presente Tesis doctoral es aportar herramientas para optimizar el diagnóstico/tipificación y la prevención de la Campilobacteriosis genital bovina (CGB).

Hipótesis

El mejoramiento de las técnicas moleculares para la diferenciación de aislamientos de *Campylobacter fetus* (*C. fetus*) y la ampliación del conocimiento del repertorio antigénico del Secretoma involucrado en la inmunología de la GCB para la optimización de las vacunas, son los principales ejes temáticos a abordar, estableciendo como punto de partida las siguientes hipótesis:

- La Genómica comparativa y la Filogenómica pueden dirigir el diseño racional de herramientas para el diagnóstico y tipificación molecular de *C. fetus* en Argentina.
- Los productos secretados por *C. fetus* son importantes mediadores tempranos de la interacción hospedador-patógeno.

Para probar las hipótesis mencionadas, nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Obtener secuencias de genomas completos mediante NGS y estudiar las relaciones filogenéticas entre las cepas locales y del resto del mundo.
2. Identificar nuevas secuencias blanco a partir del análisis de secuencias de genomas completos y desarrollar una técnica molecular de diagnóstico/tipificación rápida, sensible y específica.
3. Evaluar las herramientas desarrolladas en un modelo de infección experimental bovino.
4. Identificar los componentes del Secretoma de *C. fetus* y caracterizarlos *in silico* y bioquímicamente.

Materiales y métodos

1. Aislamientos locales de *Campylobacter fetus*

Se trabajó con una colección de 36 aislamientos de *Campylobacter fetus* obtenidos a partir de fetos bovinos abortados provenientes del Laboratorio de Bacteriología de la EEA-Balcarce (n=30) y del Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CeDIVE) de Chascomús (n=6). La colección representa aislamientos de la región pampeana de más de 30 años.

2. Cultivo y crecimiento de *Campylobacter fetus*

Para el cultivo en medio sólido, los aislamientos fueron crecidos en agar base Columbia (Oxoid) suplementado con 7% de sangre de caballo desfibrinada, 1,25 UI/mL de sulfato de polimixina B, 5 µg/mL de trimetoprima, 10 µg/mL de vancomicina, 0,25 mg/mL de piruvato de sodio, 0,25 mg/mL de sulfato ferroso y 0,25 mg/mL de metabisulfito de sodio (suplementos selectivos y de crecimiento de *Campylobacter* (Oxoid)). Las placas se incubaron en condiciones microaerófilas (85% N₂, 10% CO₂ y 5% O₂) durante 72 h a 37 °C. Para el crecimiento en medio líquido de las campilobacterias, se inocularon colonias en caldo Brucella (BD BBL) y se cultivaron con agitación (100 rpm) en condiciones de microaerofilia a 37 °C durante 72h. La observación de las bacterias crecidas en cultivos sólidos y líquidos se realizó en fresco con un microscopio de campo claro.

3. Extracción de ADN genómico a partir de cultivo

Para la extracción de ADN genómico se emplearon dos metodologías según la finalidad del ADN. Para la puesta a punto de los ensayos de amplificación a partir de cultivo bacteriano se utilizó un protocolo rápido de extracción de ADN (*in house*) mientras que aquellas muestras destinadas a evaluación de sensibilidad y secuenciación genómica se empleó un kit comercial.

3.1. Extracción rápida (*in house*) de ADN genómico

Se aplicó un protocolo rápido (ciclos de congelado-descongelado) para obtener el templado de ADN de la siguiente manera. Se recogió un anzada de cada cultivo y se resuspendió en 250 μL de agua desionizada estéril. Se realizaron dos ciclos de congelación y ebullición por 5 min (-80/95 $^{\circ}\text{C}$) y se descartaron los restos celulares mediante un paso de centrifugación a 12.000 x g durante 5 min. Por último, del sobrenadante obtenido se utilizó una alícuota de 2 μL como templado para las PCR.

3.2. Extracción de ADN genómico con kit comercial

Para secuenciación y ensayos de sensibilidad, se realizó la extracción de ADN genómico con el kit comercial NucleoSpin Tissue Genomic DNA (Macherey-Nagel GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante. El material de partida fue de 1,5 mL de cultivo de *C. fetus*, el mismo se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min y luego se resuspendió el precipitado de campilobacterias en un volumen final de 200 μL de buffer T1, añadiendo 25 μL de Proteinasa K (20 mg/mL) provista por el fabricante y 200 μL de buffer B3, y se incubó la muestra a 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. A continuación, la solución se transfirió a una columna NucleoSpin Tissue, se centrifugó durante 1 min a 11.000 x g y se descartó el eluato, luego se realizó un primer lavado con 500 μL del buffer BW y se centrifugó durante 1 min a 11.000 x g. Se realizó un segundo lavado con 600 μL del buffer B5. Una vez evaporado el alcohol, se agregó 100 μL del buffer BE (precalentado a 70 $^{\circ}\text{C}$) para eluir el ADN de alta pureza.

4. Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar y analizar los productos obtenidos en las extracciones de ADN genómico y productos de PCR, se realizó una separación electroforética en gel de agarosa. La concentración de los geles de agarosa (0,8%, 1%, 1,2% y 2%) se ajustó al tamaño del fragmento a resolver. En todos los casos se empleó buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). La corrida de los geles se realizó con el mismo buffer a 80-120V durante 20-45 minutos y para la visualización se empleó bromuro de etidio (0,5 g/mL). Los geles fueron observados en un transiluminador de luz UV (UVP Benchtop) y en un equipo para captura de imágenes Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories).

5. Cuantificación del ADN genómico

Para la secuenciación, la cuantificación de todas las muestras de ADN genómico de *C. fetus* se realizó espectrofotométricamente utilizando el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). La calidad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa y el fluorímetro Qubit (Invitrogen).

6. Secuenciación y ensamblado de genomas locales *Campylobacter fetus*

Los genomas completos de las cepas *C. fetus* subesp. *fetus* 08-421, *C. fetus* subesp. *fetus* 13-344 y *C. fetus* subesp. *venerealis* bv. *intermedius* 06-341 fueron obtenidos mediante secuenciación de nueva generación (NGS). A partir del ADN purificado, se generó la librería con *paired-end* 2 x 250 pb mediante el sistema comercial Nextera (Illumina). La secuenciación genómica se realizó en una plataforma MiSeq (Illumina) en la Unidad de Genómica del INTA (UGB-INTA). Para el ensamblado de las secuencias, el esquema de trabajo fue el siguiente: se evaluó la calidad de las lecturas con el programa FastQC (Andrews, 2010), luego se eliminaron los adaptadores con Trimmomatic 0.36 (Bolger et al., 2014) y las lecturas resultantes fueron ensambladas con SPAdes 3.11.1 (Bankevich et al., 2012; Prjibelski et al., 2020). Los contigs fueron ordenados con Mauve (Multiple Genome Alignment) (Darling et al., 2004) utilizando como genoma de referencia la cepa argentina *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608 (NZ_CP008810.1-NZ_CP008812.1).

Por último, los genomas secuenciados fueron anotados de forma automática empleando las herramientas RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz et al., 2008), Prokka (Seemann, 2014) y PGAP (Genome Annotation Pipeline) (Tatusova et al., 2016).

7. Colección de secuencias de genomas completos de aislamientos locales de *Campylobacter fetus*

Se descargaron 31 secuencias de genomas completos disponibles públicamente en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/528>) y en el Repositorio Nucleotídico Europeo (ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB8721?show=reads>).

Veinte de estos genomas fueron ensamblados con SPAdes 3.11.1 (Bankevich et al., 2012; Prjibelski et al., 2020) debido a que solo se encontraban disponibles las lecturas. Todas las secuencias genómicas corresponden a cepas aisladas de bovinos de la región pampeana, la zona más productiva del país. En el set de datos, las secuencias representan aislamientos provenientes de cuatro provincias: Buenos Aires (n=27), Santa Fe (n=2), La Pampa (n=2) y Córdoba (n=2). El origen de una cepa es desconocido. Las cepas se aislaron de prepucio, placenta, mucosa vaginal y feto.

8. Colección de secuencias de genomas completos de aislamientos globales de *Campylobacter fetus*

Para el análisis global, se descargaron 231 secuencias de genomas completos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/528>) y ENA (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB8721?show=reads>), de los cuales 216 genomas fueron ensamblados como se mencionan anteriormente. Esta colección representa aislamientos de 19 países y algunos de origen desconocido. Los genomas se anotaron con Prokka (Seemann, 2014) con el fin de normalizar la anotación para los posteriores análisis de genómica comparativa.

9. Pangenoma de *Campylobacter fetus*

Para el análisis del pangenoma de *C. fetus* se utilizó el programa Roary (Page et al., 2015) empleando como archivos de entrada los archivos GFF3 (anotación genómica) generados con Prokka (Seemann, 2014). La construcción del pangenoma fue realizada estableciendo un umbral de identidad de secuencia $\geq 90\%$. El alineamiento múltiple de secuencias en base al *core-genoma* fue realizado con el programa MAFFT (Katoh, 2002). Dicho programa permite realizar un alineamiento de secuencias rápido y efectivo a nivel de secuencia nucleotídica.

A partir del pangenoma local obtenido se construyó un mapa de calor (o *heatmap*) utilizando el paquete de R 'Matrix' (<https://cran.r-project.org/package=Matrix>) para realizar una comparación por pares de todas las cepas en estudio. También se realizó una anotación funcional del pangenoma

(términos GO, ontología de genes) empleando el programa *sma3s* (Casimiro-Soriguer et al., 2017; Muñoz-Mérida et al., 2014) y el paquete de R 'topGO' para su visualización gráfica.

10. Filogenia de *Campylobacter fetus* en base al *core-genoma*

Para el estudio filogenómico de los aislamientos de *C. fetus* se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud en base al *core-genoma* empleando el programa IQ-Tree 1.6.12 (Minh et al., 2020; Nguyen et al., 2015). Se utilizó el modelo de tiempo reversible generalizado (GTR) con distribución gamma (+R) como modelo de sustitución nucleotídica, ya que es uno de los modelos más empleados para realizar la reconstrucción de árboles filogenéticos. El mismo permite evaluar la reversibilidad en el tiempo y asume diferentes tasas de sustitución para cada par de nucleótidos, además de las diferentes frecuencias de ocurrencia nucleotídica. Al representar las distintas tasas de variación como una distribución gamma, permite suponer que todos los sitios evolucionan independientemente. El soporte de los nodos se evaluó con un *bootstrap* de 1.000 pseudoreplicaciones. Luego, para visualizar el árbol filogenético junto a los metadatos de los aislamientos se empleó el programa iTol v5 (Letunic & Bork, 2021).

11. Tipificación de genomas de *Campylobacter fetus* mediante MLST: Análisis *in silico*

Se realizó un MLST *in silico* (<https://github.com/tseemann/mlst>) para obtener el ST de cada cepa argentina de *C. fetus* estudiada a partir de las secuencias genómicas de cada aislamiento. Cada genoma fue escaneado contra el esquema de tipificación *C. fetus* de la base de datos PubMLST (https://rest.pubmlst.org/db/pubmlst_campylobacter_nonjejuni_seqdef/schemes/9/profiles_csv). También se empleó la pipeline MLST 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) para los casos de resultados no concluyentes.

Las nuevas variantes alélicas y sus respectivos ST se depositaron en la base de datos PubMLST.

12. Georreferenciación de aislamientos locales de *Campylobacter fetus*

Se utilizó el programa Microreact (Argimón et al., 2016) para visualizar el árbol filogenético construido a partir de los genomas de *C. fetus* locales en un contexto espacial y temporal. Los metadatos se recopilaron a partir de la colección de datos históricos del INTA (hospedador, origen, año de aislamiento, rasgos bioquímicos y moleculares de las cepas). La genotipificación y fenotipificación de las cepas se realizó en la EEA-Balcarce según protocolos previamente publicados. Para la georreferenciación se empleó Google Maps (<https://maps.google.com>).

13. Desarrollo de nuevos protocolos moleculares para la identificación de

Campylobacter fetus

13.1. Búsqueda de potenciales secuencias blanco especie-específicas para *Campylobacter fetus*

Se seleccionó una secuencia de genoma completo representativa de cada especie de *Campylobacter*, disponibles en Genbank. Las cepas fueron las siguientes: *C. armoricus* CCUG73571 (GCA_013372105.1), *C. avium* LMG24591 (GCA_002238335.1), *C. blaseri* LMG30333 (GCA_013201895.1), *C. coli* AR-0411 (GCA_008727495.1), *C. concisus* 13826 (GCA_000017725.2), *C. corcagiensis* LMG27932 (GCA_013201645.1), *C. cuniculorum* DSM23162=LMG24588 (GCA_002104335.1), *C. curvus* 525-92 (GCA_000017465.2), *C. geochelonis* LMG29375 (GCA_013201685.1), *C. gracili* ATCC33236 (GCA_001190745.1), *C. helveticus* 2013D-9613 (GCA_004345065.1), *C. hepaticus* HV10 (GCA_001687475.2), *C. hominis* ATCC-BAA-381 (GCA_000017585.1), *C. hyointestinalis* subesp. *hlawsonii* CHY5 (GCA_013372165.1), *C. iguaniorum* 1485E (GCA_000736415.1), *C. insulaenigrae* NCTC12927 (GCA_000816185.1), *C. jejuni* subesp. *jejuni* NCTC11168=ATCC700819 (GCA_900475265.1), *C. lanienae* NCTC13004 (GCA_002139935.1), *C. lari* RM2100 (GCA_000019205.1), *C. mucosalis* CCUG21559 (GCA_004803775.1), *C. ornithocola* MG29815 (GCA_013201605.1), *C. peloridis* LMG23910 (GCA_000816785.1), *C. pinnipediorum* subesp. *caledonicus* RM18020 (GCA_002021985.1), *C. rectus* RM3267 (GCA_000174175.1), *C. showae* B91_SC (GCA_900699785.1), *C. sputorum* RM8705 (GCA_002220775.1), *C. subantarcticus* LMG24377

(GCA_000816305.1), *C. upsaliensis* RM3940 (GCA_013372245.1), *C. ureolyticus* RIGS 9880 (GCA_001190755.1) y *C. volucris* LMG24379 (GCA_000816345.1). Asimismo, se emplearon cuatro genomas representativos de *C. fetus*: *C. fetus* subesp. *fetus* 04-554 (GCA_000759485.1), *C. fetus* subesp. *testudinum* 03-427 (NC_022759), *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608 (GCA_000759515.1), *C. fetus* subesp. *venerealis* bv. *intermedius* 03-293 (GCA_000512745.2), como también los genomas de *Arcobacter butzleri* ED-1 (GCA_007005625.1), *Arcobacter nitrofigilis* DSM7299 (GCA_000092245.1), *Arcobacter skirrowii* A2S6 (GCA_003939045.1), *Helicobacter hepaticus* ATCC51449 (GCA_000007905.1), *Helicobacter pylori* 26695 (GCA_000307795.1) y *Wolinella succinogenes* DSM1740 (GCA_000196135.1) debido a su estrecha relación con la familia *Campylobacteraceae*.

Los genomas fueron anotados con Prokka (Seemann, 2014) y los archivos .gbk se emplearon como entrada para realizar un alineamiento múltiple global con el programa progressiveMauve (Darling et al., 2004; 2010). Los parámetros se establecieron por defecto. Luego, se realizó un alineamiento múltiple local de la región blanco presente en todos los genomas de *C. fetus* (y ausente en el resto) utilizando MUSCLE (Edgar, 2004) para localizar las regiones conservadas (ver sección Resultados). A partir de la secuencia seleccionada, se diseñaron los oligonucleótidos con el programa Clone Manager (https://www.scied.com/pr_cmpro.htm).

13.2. Diseño de oligonucleótidos iniciadores

Los oligonucleótidos iniciadores para amplificar las diferentes regiones blanco de interés fueron diseñados empleando el mismo flujo trabajo en todos los casos. Inicialmente, se alinearon las secuencias de ADN con el programa MUSCLE (Edgar, 2004) y luego a partir de las secuencias conservadas se empleó el programa Clone Manager (https://www.scied.com/pr_cmpro.htm) con el fin de obtener el mejor par de oligonucleótidos iniciadores. En la Tabla 1 se listan los oligonucleótidos iniciadores diseñados que se emplearon en este trabajo, los mismos fueron adquiridos a la empresa GenBiotech S.R.L.

Tabla 1. Oligonucleótidos iniciadores.

Región blanco	Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'
Operón de transportador de cisteína	H ₂ S-agpf-Fwd	GTCCATTTACTTATCACGATAACAGTGG
	H ₂ S-agpf-Rev1	GATATTAGGCTAAGAGGAATGGTGTATTG
	H ₂ S-agpf-Rev2	CTCCCGTATCTACATGAAAGCTAATATC
Gen <i>yagE</i>	scooby-Fwd	GTATCTTTGCGAATTTAGCTTAGATGG
	scooby-Rev	GTATCTTTGCGAATTTAGCTTAGATGG

13.3. Amplificación génica mediante PCR

13.3.1. Evaluación de aislamientos de *Campylobacter fetus*

mediante PCR de punto final

Para todas las PCR de punto final realizadas, la mix de reacción de amplificación se preparó con las siguientes concentraciones finales: 1X buffer GoTaq Green (1,5 mM MgCl₂), 0,25 mM de cada dNTP, 0,1 μM de cada oligonucleótido iniciador y 1,25U de Taq polimerasa (Promega Corp.), 2 μL de ADN de *Campylobacter* y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 25 μL. Los programas de ciclado para cada una de las PCRs empleadas en este trabajo se detallan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Protocolo de amplificación de la PCR-*yagE* (desarrollada en esta tesis), PCR-*csp* y PCR-*parA* (Hum et al., 1997)

	PCR- <i>yagE</i> (esta tesis)	PCR- <i>csp</i> (Hum et al., 1997)	PCR- <i>parA</i> (Hum et al., 1997)	
Desnaturalización inicial	94°C, 4 min	94°C, 4 min	94°C, 4 min	
Desnaturalización	94°C, 45 seg	94°C, 1 min	94°C, 1 min	
Hibridación	47°C, 45 seg	45°C, 1min	46°C, 1min	x 30 ciclos
Extensión	72°C, 45 seg	72°C, 1 min	72°C, 1 min	
Extensión final	72°C, 5 min	72°C, 5 min	72°C, 5 min	

Tabla 3. Protocolo de amplificación “*touchdown*” de la PCR Multiplex-transportador L-cys.

PCR-transportador L-Cys	
Desnaturalización inicial	94°C, 4 min
Desnaturalización	94°C, 1 min
Hibridación	55°C, 45°C, 1°/ciclo x 10 ciclos
Extensión	72°C, 1 min
Desnaturalización	94°C, 1 min
Hibridación	51°C, 1 min x 25 ciclos
Extensión	72°C, 1 min
Extensión final	72°C, 5 min

13.3.2. PCR *in silico*

Todas las PCR *in silico* llevadas a cabo en esta tesis se realizaron a partir de las secuencias de genomas completos (archivo formato “.fasta”) de los distintas cepas de *C. fetus*, empleando los programas PrimerMap (http://www.bioinformatics.org/sms2/primer_map.html) y UGENE (<http://ugene.net/>). PrimerMap permite obtener un mapa textual de las posiciones de hibridación de los oligonucleótidos iniciadores de la PCR diseñada, mientras que UGENE permite el análisis de los oligonucleótidos diseñados con la herramienta Primer3.

14. PCR-*yagE* en tiempo real como herramienta diagnóstica molecular

Se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores detallados en la tabla 1 para evaluar la eficiencia de la PCR-*yagE* en formato de PCR en tiempo real con SYBR Green, a partir de dos fuentes distintas: muestras clínicas de smegma prepucial de un modelo de infección experimental bovino y muestras clínicas de mucus cérvico vaginal de rodeos con problemas reproductivos.

14.1. Modelo de infección experimental bovino

Las muestras clínicas de smegma prepucial fueron recolectadas a partir de un ensayo de infección experimental en toros. Este trabajo fue realizado por el grupo del Dr. Fernando Paolicchi (Estación Experimental Agropecuaria– INTA Balcarce) como parte de la tesis doctoral del Vet. MSc. Juan Agustín García.

En el modelo de infección experimental se emplearon 3 toros de raza Aberdeen Angus (de 4 a 5 años), los cuales fueron expuestos a vaquillonas vírgenes de raza Aberdeen Angus (y sus cruzas) infectadas con distintas cepas de *C. fetus* mediante inoculación intrauterina. Previamente al desafío, las vaquillonas y los toros fueron analizados para enfermedades de transmisión sexual (tricomonosis, campilobacteriosis y brucelosis), resultando negativos. Luego del apareamiento (día cero) los animales fueron monitoreados mediante la recolección de muestras de smegma prepucial (por raspado) cada 20-30 días. Las muestras fueron analizadas mediante inmunofluorescencia directa con el Kit Conjugado Campy (Laboratorio Biológico de Tandil S.R.L.) en un microscopio epifluorescente Olympus CX31 y por cultivo bacteriológico (García et al., 2021). La extracción de ADN genómico bacteriano para cada muestra clínica fue realizada con el kit comercial ADN Puriprep S-Kit (Inbio-Highway), según las instrucciones del fabricante.

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo tras aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE, INTA-CeRBAS, Argentina): Aval 163/2018.

14.2. Muestras de campo

El grupo del Dr. Paolicchi realizó visitas a diferentes establecimientos de cría bovina de la provincia de Buenos Aires con diagnóstico de *C. fetus* por aislamiento a partir de fetos abortados remitidos a la Estación Experimental Agropecuaria-INTA Balcarce. Se recolectaron un total de 29 muestras de mucus cérvico vaginal, las cuales fueron analizadas mediante inmunofluorescencia directa y cultivo bacteriológico.

14.3. Ensayo de PCR-*γ*agE en tiempo real

Para la evaluar el desempeño de la PCR-*γ*agE en tiempo real se empleó un equipo StepOne Plus (Applied Biosystems) y el kit comercial Master Mix qPCR 2X (Inbio-Highway), y se analizaron 27 muestras de smegma prepucial y 29 muestras de mucus cérvico vaginal de posibles infecciones naturales.

Para la puesta a punto de la PCR-*yagE* en tiempo real, se generó una curva estándar con diluciones seriadas 1:10 a partir de una alícuota de ADN genómico purificado de la cepa *C. fetus* subesp. *fetus* 04-554 (rango 50 pg/ μ L a 5 fg/ μ L).

La PCR-*yagE* se llevó a cabo en un volumen de reacción de 10 μ L de reacción que contenía 5 μ L de 2 \times Máster Mix, 0,3 μ L de cada oligonucleótido iniciador (0,3 μ M final), 0,1 μ L de ROX (500 nM final), 1,0 μ L de ADNg y 3,3 μ L de H₂O ultrapura libre de ARNasas.

El programa de ciclado consistió en una activación inicial o pre-desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 seg y extensión a 60°C durante 1 min, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Luego se realizó la curva de disociación controlando la fluorescencia de la señal de SYBR Green desde 60°C 1 min a 95°C (15 seg). Todas las reacciones, incluidas las de los controles negativos, se realizaron por duplicado.

15. Estadística

La concordancia entre las distintas pruebas se evaluó mediante el cálculo del índice de concordancia de Cohen (kappa).

16. Caracterización del Secretoma

16.1. Prospección *in silico* del Secretoma de *Campylobacter fetus*

La prospección *in silico* del secretoma de *C. fetus* se llevó a cabo empleando las siguientes herramientas bioinformáticas a partir del proteoma de referencia de la cepa *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608 (UniProt: UP000029503). Primeramente, se utilizó el servidor Vaxign2 (Ong et al., 2021) para analizar la localización subcelular con PSORTb (Yu et al., 2010), la presencia de adhesinas con SPAAN 1.0 (Sachdeva et al., 2005) y la presencia de α -hélices transmembranas con TMHMM 2.0 (Krogh et al., 2001). También, se utilizó el programa VaxiJen 2.0 (Doytchinova & Flower, 2007) para predecir la antigenicidad de las proteínas.

Se seleccionaron aquellas proteínas con localización extracelular y de membrana externa a partir de las características mencionadas y luego se realizó una red de interacciones proteína-proteína

(PPI) con la base de datos STRING (Szklarczyk et al., 2019) a fin de explorar las interacciones-asociaciones funcionales en el exoproteoma de la cepa *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608.

16.2. Purificación de Vesículas de Membrana Externa (VMEs)

Las VMEs se obtuvieron por centrifugación diferencial a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos según lo descrito previamente por Elmi y col. para la especie *C. jejuni* (Elmi et al., 2012) con algunas modificaciones, tal como se describe a continuación.

Los aislamientos *C. fetus* subesp. *venerealis* NCTC 10354, *C. fetus* subesp. *fetus* 08-421, *C. fetus* subesp. *fetus* 13-344 y *C. fetus* subesp. *venerealis* bv. *intermedius* 06-341 se cultivaron a 37 °C durante 72 hs en placas de agar Skirrow y luego se inocularon en 10 mL de caldo Brucella (cultivo inicial). Este cultivo inicial se utilizó como inóculo para un cultivo de 500 mL en caldo Brucella. Dado que *C. fetus* es una bacteria de crecimiento lento, se realizaron cultivos a largo tiempo para obtener una densidad celular entre $DO_{600nm}=0,3-0,4$, alcanzada tras 72-96 hs de cultivo.

El cultivo bacteriano se centrifugó a 10.000 x g durante 30 min a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-5C (Sorvall) y los sobrenadantes resultantes se filtraron primero a través de una membrana de 0,22 μ m (Millipore) y luego mediante filtración tangencial empleando un *cassette* Pellicon XL 50 (Millipore) con el fin de concentrar el sobrenadante de interés. A continuación, se llevó a cabo una ultracentrifugación a 150.000 x g durante 3 horas a 4°C utilizando un rotor 45Ti (Beckman Instruments). El precipitado que contenía las VMEs se resuspendió en 100 μ L de *buffer* fosfato salino estéril pH 7,4 (PBS) y se almacenaron a -20°C. Para los inmunoensayos, se aplicaron dos pasos de lavado con PBS, repitiendo las condiciones de ultracentrifugación.

16.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

Para observar las muestras conteniendo las VMEs en el microscopio electrónico de transmisión, se fijaron las fracciones con 1 volumen de paraformaldehído 4%, se montó en rejillas y se tñó negativamente con ácido fosfotúngstico (PTA) al 1% ajustado a pH 7,5 con NaOH 1N. Para comprobar la producción de VMEs en medios sólidos, se tomaron colonias con anza y se resuspendieron en una

solución 50:50 de paraformaldehído 4%: PBS 1X. Todas las muestras se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200 EX-II a 80 kV (Jeol Ltd.) en el Servicio del Laboratorio Integral de Microscopía, CICVyA, INTA, Argentina.

16.4. Ensayos de antigenicidad de las Vesículas de Membrana Externa

(Inmuno dot blot)

Para detectar la presencia de componentes inmunorreactivos en las muestras de VMEs de *C. fetus*, se sembró una fracción de VMEs (80 µL) en una membrana de nitrocelulosa empleando el equipo Bio-Dot (Bio-Rad Laboratories). Se utilizó el mismo volumen de medio de cultivo caldo Brucella y PBS 1X estéril como controles negativos y un extracto de proteínas totales de *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608 como control positivo. A continuación, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% e incubada con una dilución 1:100 de un suero policlonal dirigido a proteínas totales de *C. fetus* producido en conejo. Dicho suero fue donado gentilmente por el laboratorio Azul de Argentina, el mismo fue obtenido por inmunización de conejos con dos cepas de *C. fetus* (ambas subespecies). Después de tres lavados, la membrana se incubó con una dilución 1:3.000 de IgG anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich). Luego de tres lavados adicionales, se reveló la actividad enzimática mediante la adición del sustrato NBT/BCIP (Promega).

Resultados

1. Genómica de *Campylobacter fetus*

El auge de las técnicas de secuenciación masiva y el incremento del número de secuencias de genomas completos disponibles de *C. fetus* representa una oportunidad única para explorar el genoma de *C. fetus* y comprender mejor su patogénesis y la dinámica de transmisión.

1.1. Secuenciación de aislamientos locales de *Campylobacter fetus*

Para la secuenciación de los genomas de aislamientos locales de *C. fetus* se seleccionaron tres aislamientos procedentes de abortos bovinos: *C. fetus* subesp. *venerealis* bv. *intermedius* 06-341, *C. fetus* subesp. *fetus* 08-421 y *C. fetus* subesp. *fetus* 13-344 todos de la región agropecuaria más productiva de Argentina (Tabla 1). Estos aislamientos fueron obtenidos en el laboratorio de Bacteriología de la Estación Experimental Agropecuaria-INTA Balcarce. Para el análisis de las lecturas y el ensamblado de las mismas se trabajó en el entorno de Linux, de acuerdo a lo detallado en la sección Materiales y Métodos. Si bien en una primera instancia los genomas fueron anotados con el programa Prokka (Rapid Prokaryotic Genome Annotation) (Seemann, 2014) y mediante RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz et al., 2008), la anotación que se consideró finalmente para los estudios posteriores, fue la brindada por el NCBI una vez remitidos los genomas. La misma emplea la *pipeline* PGAAP (Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline) (Tatusova et al., 2016).

Los proyectos de secuenciación de genoma completo correspondientes a las cepas Cfvi 06-341, Cff 08-421 y Cff 13-344 fueron depositados en la base de datos GenBank con los siguientes códigos de acceso: GCA_008526355.1, GCA_008526335.1 y GCA_008527615.1, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Estadísticas de la secuenciación de aislamientos locales de *C. fetus*.

	Cfvi 06-341	Cff 08-421	Cff 13-344
Hospedador	Bovino	Bovino	Bovino
Fuente de aislamiento	pulmón fetal	abomaso fetal	abomaso fetal
Año de aislamiento	2006	2008	2013
Ubicación geográfica	Pehuajó, BA	Gral. López, SF	Balcarce, BA
Métricas de secuenciación			
Illumina MiSeq			
No. de reads (<i>paired-end</i>)	316.130	1.087.855	199.520
No. de bases	139 Mb	454,1 Mb	90,7 Mb
Cobertura (X)	47,9	366,4	74
Métricas de ensamblado			
SPAdes 3.10.1			
Tamaño del genoma (pb)	1.983.751	1.912.627	1.911.396
No. de <i>contigs</i>	89	90	217
<i>Contig</i> más largo	148.040	306.850	68.880
Promedio de longitud de <i>contigs</i>	22.289,34	21.251,41	8.808,28
N50	98.240	225.870	22.930
L50	8	4	26
Contenido GC	32,9	33,2	33,2
Métricas de anotación			
NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline			
Código de acceso	GCA_008526355.1	GCA_008526335.1	GCA_008527615.1
Genes (total)	2.078	1.992	2.033
CDSs (total)	2.029 (97,6 %)	1.946 (97,7 %)	1.988 (97,7 %)
Genes (codificantes)	1.985 (95,5 %)	1.904 (95,5 %)	1.940 (94,4 %)
Pseudo Genes (total)	44 (2,1 %)	42 (2,1 %)	48 (2,3 %)
Genes (RNA)	49	46	45
rRNAs	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)
rRNAs completos	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)
tRNAs	43	40	39
ncRNAs	3	3	3

A modo ilustrativo, el empleo de la herramienta BRIG permitió realizar una comparación genómica circular de los límites de los *contigs*, la cobertura y mapeo de las lecturas entre la cepa de referencia Cfvi 97/608 y los tres genomas secuenciados (Figura 1). Este programa realiza todas las comparaciones mediante BLAST.

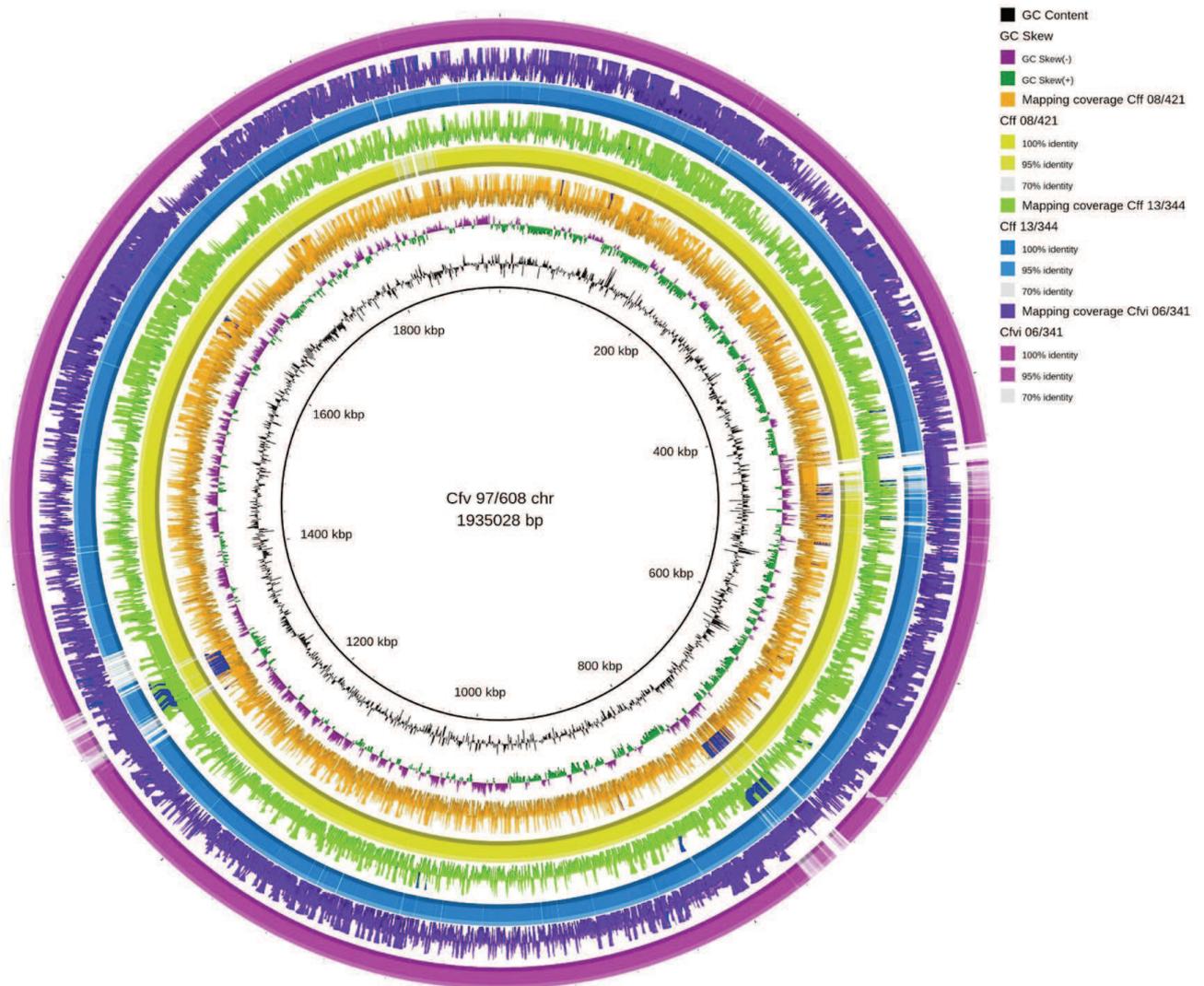


Figura 1. Representación comparativa circular con BRIG de los genomas secuenciados de *C. fetus*. El anillo central representa al genoma de referencia Cfv 97/608. Del segundo al sexto anillo (hacia afuera) se muestra el contenido de GC (negro), sesgo de GC (púrpura/verde), el porcentaje de identidad, cobertura y mapeo de las lecturas para los genomas secuenciados, respectivamente.

Las estadísticas de secuenciación obtenidas (Tabla 1) y la figura comparativa de BRIG nos permite afirmar que el rendimiento de la secuenciación y la calidad de las secuencias fueron satisfactorios y con métricas acordes a los datos de referencia del Genbank para la especie *C. fetus*, sin presencia de contaminantes y artefactos.

1.2. Pangenoma y filogenómica de los aislamientos locales de *Campylobacter fetus*

Con el objetivo de estudiar las relaciones filogenéticas entre las cepas de *C. fetus* aisladas en la región pampeana, se realizó un análisis pangenómico y filogenético centrado en los aislamientos locales. Este análisis se realizó a nivel local y global. Para el estudio local se utilizaron las secuencias de genomas completos de 31 cepas de *C. fetus* aisladas del ganado en la región pampeana y disponibles en el Genbank, junto con las 3 cepas secuenciadas en nuestro laboratorio.

El análisis del pangenoma de las cepas argentinas mostró que está constituido por 3.310 genes y que el conjunto de genes centrales o conservados (*core-genoma*) y genes accesorios está representado por 1.462 y 1.748, respectivamente (Figura 2A). De acuerdo a lo esperado, a medida que se incorporan genomas al pangenoma, aumenta la cantidad de genes únicos y hay una tendencia a estabilizarse la cantidad de genes conservados (Figura 2B). La Figura 2C muestra de forma esquemática los 3.310 genes totales del pangenoma y los distintos perfiles genéticos presentes en los aislamientos, donde la región delimitada en color oscuro representa a los genes del *core-genoma* mientras que el color claro representa a la región de los genes accesorios. Si bien se visualizan diferencias entre las cepas, no hay perfiles exclusivos o característicos por subespecie.

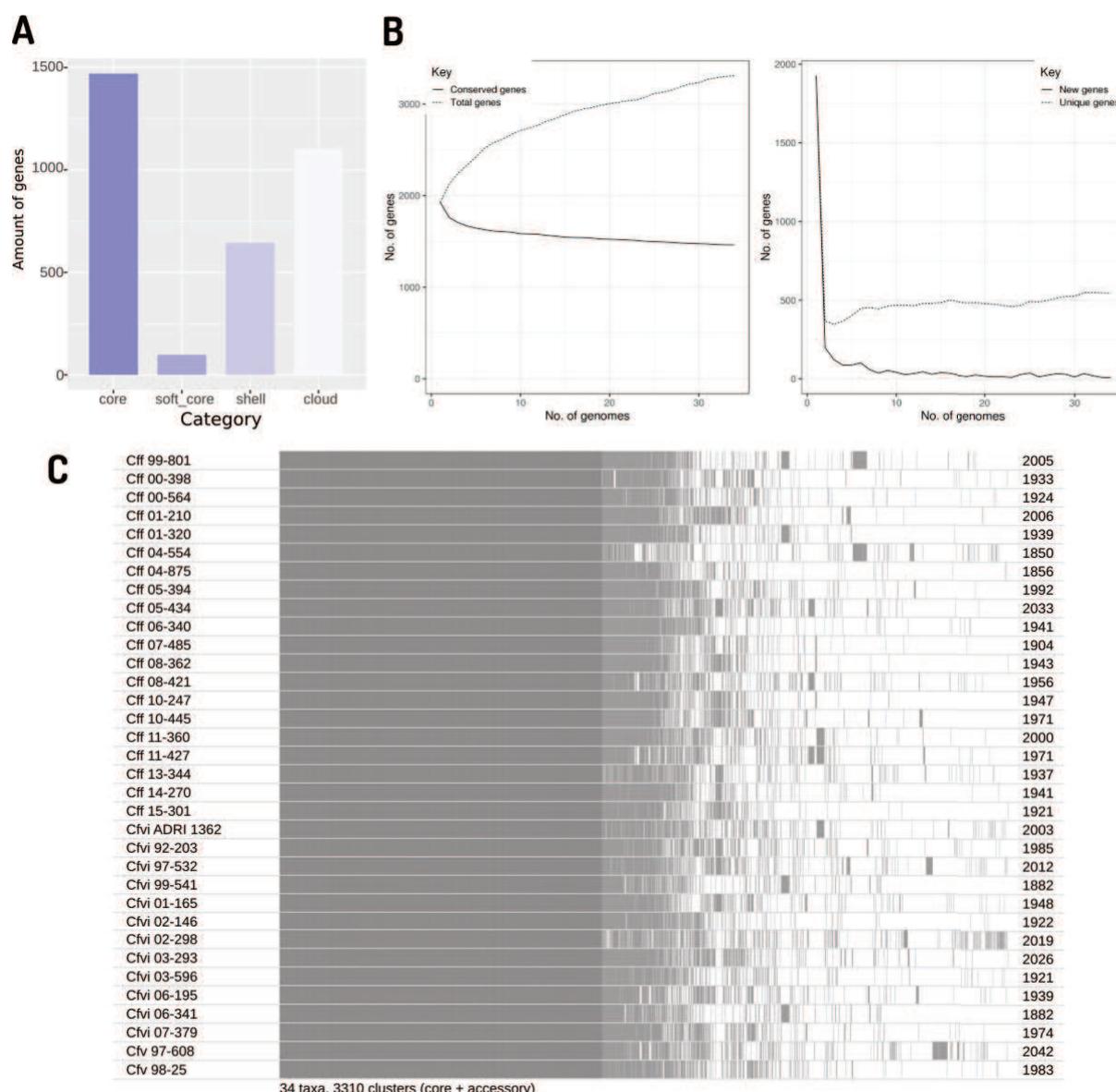


Figura 2. Características del pangenoma de cepas locales de *C. fetus*. (A) Visualización del número de genes según las diferentes categorías de Roary (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>). (B) Curva de acumulación de genes totales y estabilización de genes conservados frente a la adición de genomas al pangenoma de *C. fetus* (izquierda). Las curvas representan la probabilidad de encontrar genes nuevos a medida que se agregan genomas al pangenoma (derecha). (C) Perfil de presencia-ausencia de genes en cada cepa y número de genes pertenecientes a cada cepa.

Dentro de este marco, se realizó también la anotación funcional de las proteínas con la *pipeline* Sma3s para asociar la información biológica a las secuencias codificantes que conforman los genes del *core-genoma* y accesorios, ya sea la función potencial y/o el proceso biológico involucrado (Figura 3).

La anotación funcional del pangenoma (3.310 genes) permitió asignar una función al 75,95 % de los genes. También, mostró que en el *core-genoma* hay una gran abundancia de genes implicados en

el metabolismo y en la biosíntesis proteica. Específicamente, más de 400 genes están involucrados en procesos metabólicos de sustancias orgánicas y compuestos organo-nitrogenados, y casi 400 en procesos metabólicos de moléculas pequeñas (Figura 3A). Contrariamente, en el genoma accesorio se observó una gran abundancia de genes involucrados en procesos biológicos de regulación y en la patogénesis e interacción intraespecífica entre organismos (Figura 3B). Esto está de acuerdo con la definición de *core-genoma* y genoma accesorio (Mangas et al., 2019).

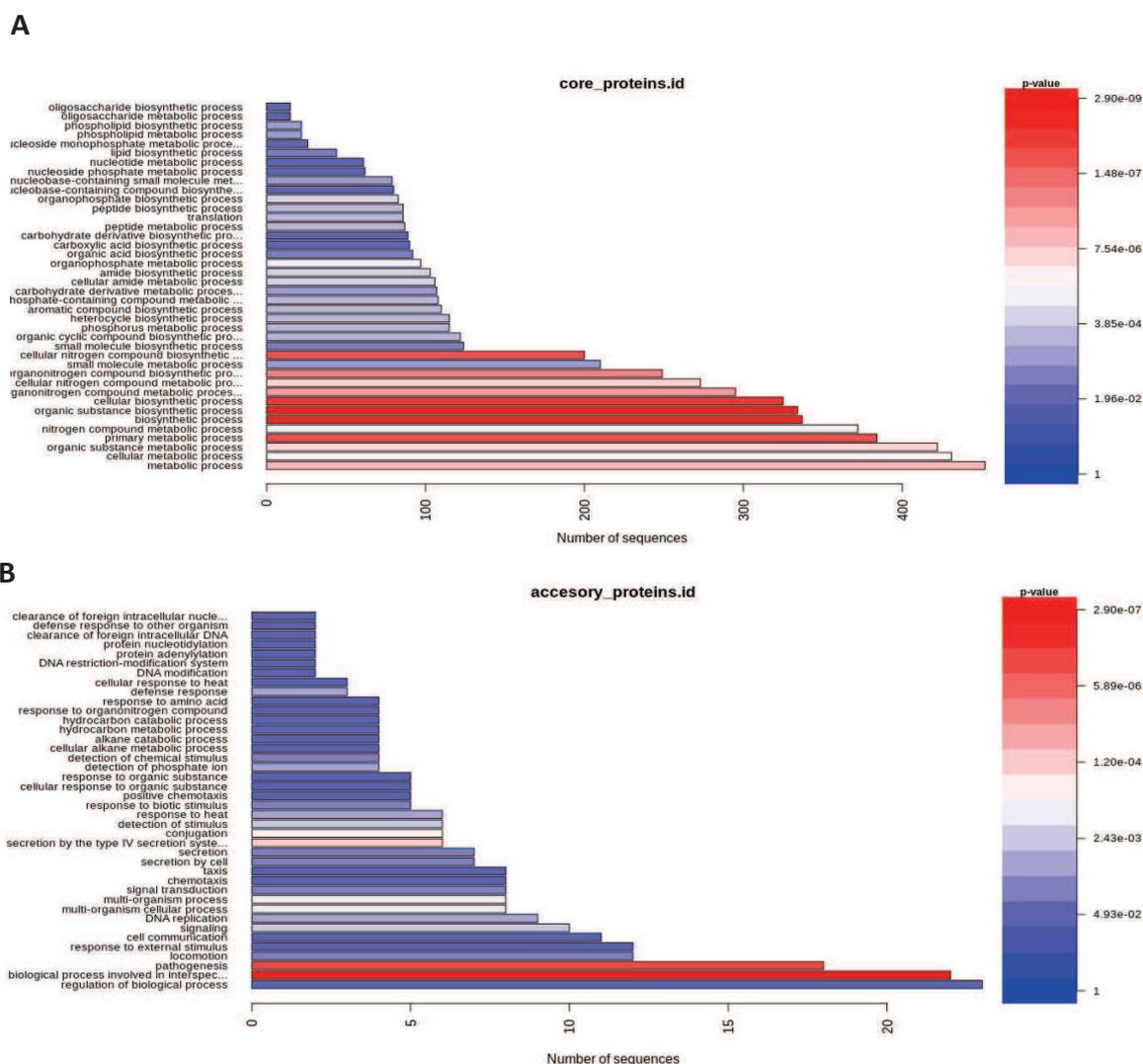


Figura 3. Anotación funcional del pangenoma local de *C. fetus*. Gráfico de enriquecimiento de términos GO con Sma3s (http://www.bioinfocabd.upo.es/web_bioinfo/sma3s) para el *core-genoma* (A) y el genoma accesorio (B).

Adicionalmente, a fin de comparar las relaciones filogenéticas entre las distintas cepas se generó un mapa de calor que representa el porcentaje de genes compartidos entre pares de cepas. Las cepas *C. fetus* subesp. *fetus* 04-554 (Cff 04-554, Buenos Aires), *C. fetus* subesp. *venerealis* bv. *intermedius* 02-298 (Cfvi 02-298, Córdoba) y *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608 (Cfv 97/608, La Pampa) se caracterizaron por tener un 84,5%, 85,5% y 86,1% de genes compartidos con el resto de las cepas, respectivamente. Estos porcentajes fueron los más bajos en comparación con el resto de las cepas (Figura 4).

Para profundizar el análisis del mapa de calor, se calculó el porcentaje medio de genes compartidos agrupando las cepas como Cff, Cfv y Cfvi. Las cepas Cff, Cfvi y Cfv compartieron individualmente una media del 91,1%, 90,6% y 88,1% de genes con el conjunto completo de genes de las otras dos variantes, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre la constitución genómica central de las subespecies y variantes, y éstas se caracterizaron por una similitud global significativa.

Por otra parte, con el objetivo de estudiar las relaciones filogenéticas, se generó un árbol filogenético de máxima verosimilitud (“*Maximum Likelihood*”, ML por sus siglas en inglés) en base al core-genoma. En este árbol-ML se pudo observar la presencia de dos *clusters* principales (A y B) y un *cluster* menor (C). Veintiocho aislamientos conformaron los *clusters* mayores (A, n=11 y B, n=17), mientras que sólo dos aislamientos (Cff 08-421 y Cff 11-427) agruparon en el *cluster* menor C (Figura 4).

Las cepas Cff 04-554, Cfv 97/608, Cfvi 06-195 y Cff 11-360 representaron ramificaciones por fuera de estos tres *clusters* sin observarse ninguna relación entre ellas.

Curiosamente, el análisis mostró que la cepa Cff 04-554 es una cepa filogenéticamente distante ya que divergió del resto de los aislamientos. Probablemente, esto pueda deberse a que esta cepa posee la mayor cantidad de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) dentro del *pool* de aislamientos (Figura 5). La secuencia del genoma de esta cepa se verificó manualmente para descartar cualquier posible problema de quimeras u otros artefactos de ensamblado.

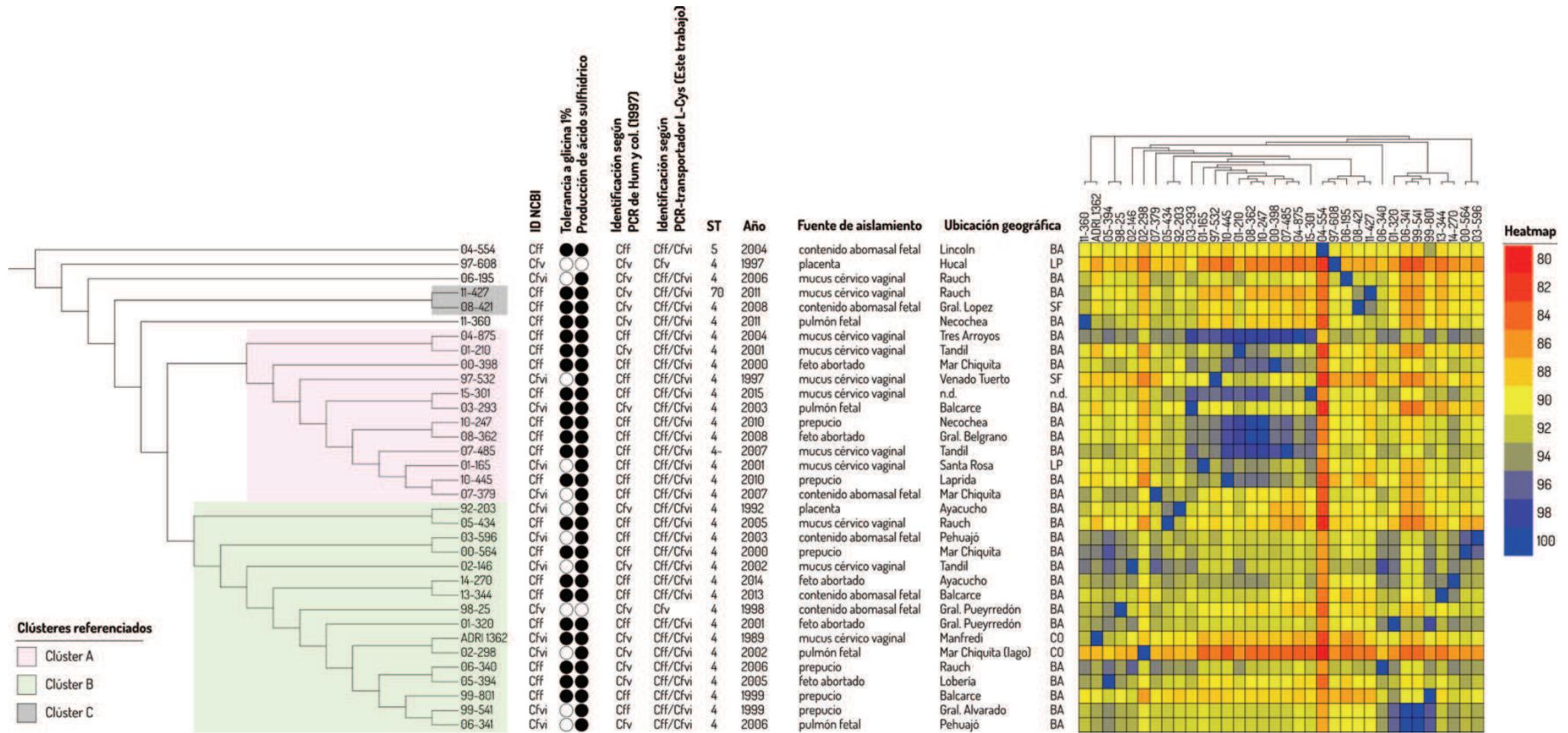


Figura 4. Filogenia local basada en el genoma central y análisis del mapa de calor. El árbol de máxima verosimilitud se construyó con el programa IQ-Tree basándose en 1.462 genes de una sola copia compartidos por las 34 cepas de *Campylobacter fetus*. El mapa de calor representa el porcentaje de pares de genes compartidos y está ordenado en base a un árbol binario de presencia y ausencia de genes accesorios. Los colores del mapa de calor van del azul (mayor porcentaje de genes compartidos) al rojo oscuro (menor porcentaje de genes compartidos). Códigos de provincia: BA=Buenos Aires, SF=Santa Fe, CO=Córdoba, LP=La Pampa, n.d: no disponible. En la sección 2.2 de Resultados se detalla la PCR-transportador L-cys empleada. Se muestran los metadatos disponibles para cada cepa.

Cepas	00-398	00-564	01-165	01-210	01-320	02-146	02-298	03-293	03-596	04-554	04-875	05-394	05-434	06-195	06-340	06-341	07-379	07-485	08-362	08-421	10-247	10-445	11-360	11-427	13-344	14-270	15-301	92-203	97-532	97-608	98-25	99-541	99-801	ADRI 1362
00-398	0	49	62	27	50	54	163	30	51	3340	27	50	59	130	52	49	98	56	27	115	27	86	64	136	59	59	18	62	23	171	81	49	46	88
00-564	49	0	87	50	13	17	126	55	4	3328	50	12	27	121	15	16	60	79	51	106	51	109	55	126	22	22	43	30	47	162	44	16	9	51
01-165	62	87	0	63	88	92	200	62	89	4162	65	88	97	317	116	88	48	76	47	303	47	36	264	330	97	97	50	100	61	388	119	88	84	126
01-210	27	50	63	0	51	55	164	33	52	3335	26	51	60	130	53	43	97	57	30	115	30	85	64	136	60	60	21	63	26	169	82	43	47	85
01-320	50	13	88	51	0	16	124	56	15	3327	51	12	29	122	14	15	60	80	53	107	53	110	56	128	20	21	44	32	49	163	43	15	8	50
02-146	54	17	92	55	16	0	128	60	19	3334	55	16	33	126	18	19	63	84	57	111	57	114	60	127	25	25	48	36	53	167	47	19	12	53
02-298	163	126	200	164	124	128	0	169	128	3317	164	124	141	235	127	126	172	192	166	213	166	223	174	236	132	134	156	142	157	279	154	126	120	149
03-293	30	55	62	33	56	60	169	0	57	4137	33	56	65	292	84	56	104	62	33	277	33	92	232	298	65	65	18	68	29	386	87	56	52	94
03-596	51	4	89	52	15	19	128	57	0	3334	52	14	29	123	17	18	62	81	53	107	53	111	63	127	24	24	45	32	49	166	46	18	11	53
04-554	3340	3328	4162	3335	3327	3334	3317	4137	3334	0	3341	3328	3332	3360	3547	3287	3372	3362	3340	3389	3338	3396	3524	3367	3371	3336	3489	3344	3339	3756	3373	3287	3250	3344
04-875	27	50	65	26	51	55	164	33	52	3341	0	51	60	131	53	51	99	57	30	116	30	87	65	137	60	60	21	63	26	172	82	51	47	89
05-394	50	12	88	51	12	16	124	56	14	3328	51	0	28	121	14	15	58	80	53	106	53	110	54	126	21	21	44	31	49	162	43	15	8	50
05-434	59	27	97	60	29	33	141	65	29	3332	60	28	0	130	31	32	76	89	62	115	62	119	63	134	38	38	53	13	58	171	60	32	25	67
06-195	130	121	317	130	122	126	235	292	123	3360	131	121	130	0	124	120	163	157	131	138	130	183	116	162	131	131	280	134	129	202	152	120	118	160
06-340	52	15	116	53	14	18	127	84	17	3547	53	14	31	124	0	17	62	82	55	109	55	112	90	130	23	23	46	34	51	206	45	17	10	52
06-341	49	16	88	43	15	19	126	56	18	3287	51	15	32	120	17	0	61	80	53	102	53	110	55	122	24	24	44	35	49	150	46	0	6	49
07-379	98	60	48	97	60	63	172	104	62	3372	99	58	76	163	62	61	0	110	83	149	83	70	103	175	69	69	92	78	96	181	91	61	56	97
07-485	56	79	76	57	80	84	192	62	81	3362	57	80	89	157	82	80	110	0	41	142	41	50	91	163	89	89	50	92	55	198	111	80	76	117
08-362	27	51	47	30	53	57	166	33	53	3340	30	53	62	131	55	53	83	41	0	116	0	71	66	139	62	62	21	65	20	172	84	53	49	91
08-421	115	106	303	115	107	111	213	277	107	3389	116	106	115	138	109	102	149	142	116	0	115	169	99	83	116	116	265	118	114	198	137	102	103	145
10-247	27	51	47	30	53	57	166	33	53	3338	30	53	62	130	55	53	83	41	0	115	0	71	65	138	62	62	21	65	20	171	84	53	49	91
10-445	86	109	36	85	110	114	223	92	111	3396	87	110	119	183	112	110	70	50	71	169	71	0	122	194	119	119	80	122	85	201	141	110	106	146
11-360	64	55	264	64	56	60	174	232	63	3524	65	54	63	116	90	55	103	91	66	99	65	122	0	117	65	65	214	73	68	224	92	55	52	100
11-427	136	126	330	136	128	127	236	298	127	3367	137	126	134	162	130	122	175	163	139	83	138	194	117	0	136	137	286	137	135	223	158	122	124	166
13-344	59	22	97	60	20	25	132	65	24	3371	60	21	38	131	23	24	69	89	62	116	62	119	65	136	0	22	53	41	58	172	52	24	17	59
14-270	59	22	97	60	21	25	134	65	24	3336	60	21	38	131	23	24	69	89	62	116	62	119	65	137	22	0	53	41	58	172	52	24	17	59
15-301	18	43	50	21	44	48	156	18	45	3489	21	44	53	280	46	44	92	50	21	265	21	80	214	286	53	53	0	55	17	319	75	44	40	81
92-203	62	30	100	63	32	36	142	68	32	3344	63	31	13	134	34	35	78	92	65	118	65	122	73	137	41	41	55	0	61	177	63	35	28	66
97-532	23	47	61	26	49	53	157	29	49	3339	26	49	58	129	51	49	96	55	20	114	20	85	68	135	58	58	17	61	0	172	80	49	45	87
97-608	171	162	388	169	163	167	279	386	166	3756	172	162	171	202	206	150	181	198	172	198	171	201	224	223	172	172	319	177	172	0	154	150	159	203
98-25	81	44	119	82	43	47	154	87	46	3373	82	43	60	152	45	46	91	111	84	137	84	141	92	158	52	52	75	63	80	154	0	46	39	81
99-541	49	16	88	43	15	19	126	56	18	3287	51	15	32	120	17	0	61	80	53	102	53	110	55	122	24	24	44	35	49	150	46	0	6	49
99-801	46	9	84	47	8	12	120	52	11	3250	47	8	25	118	10	6	56	76	49	103	49	106	52	124	17	17	40	28	45	159	39	6	0	46
ADRI 1362	88	51	126	85	50	53	149	94	53	3344	89	50	67	160	52	49	97	117	91	145	91	146	100	166	59	59	81	66	87	203	81	49	46	0

Figura 5. Acumulación de SNPs en el core-genoma de aislamientos locales de *C. fetus*. Matriz de cantidad de SNPs para cada par de cepas locales a partir del alineamiento del core-genoma.

1.3. Georreferenciación de los aislamientos locales de *Campylobacter fetus*

Microreact (<https://microreact.org>) es una herramienta que permite explorar interactivamente la combinación de datos filogenéticos, geográficos y temporales, proceso conocido como georreferenciación filogenética. Incorporando metadatos propios y de dominio público, se empleó dicha herramienta para identificar patrones geográficos a partir del árbol filogenómico obtenido (Figura 6).

No se observó ninguna asociación entre la fuente, origen, características bioquímicas y tipificación de las cepas con los diferentes *clusters*.

La agrupación del 82% de las cepas estudiadas en tres *clusters* sugiere una estructura poblacional clonal para los aislamientos de *C. fetus* de nuestro país.



Figura 6. Georreferenciación de aislamientos locales de *C. fetus*. Visualización de la distribución geográfica y temporal de los datos mediante la herramienta Microreact. Los resultados se pueden observar de forma interactiva en el siguiente link: <https://microreact.org/project/nL5XD1qdA7ALMzgwMXeqiZ>.

1.4. Pangenoma y filogenómica de aislamientos globales de *Campylobacter fetus*

Para estudiar las relaciones filogenéticas de las cepas aisladas en Argentina en un contexto global, incorporamos a este estudio 231 secuencias de genomas completos de *C. fetus* depositados en el Genbank junto con las 34 secuencias de genomas completos locales. Este estudio también será de utilidad para proporcionar un marco genómico comparativo a fin de identificar secuencias conservadas

que permitan establecer posibles estrategias para el diagnóstico molecular de la Campilobacteriosis genital bovina.

Esta colección representa aislamientos de 20 países y de 5 hospedadores distintos cuya fuente de aislamiento es altamente variable (Figura 7). Los países con mayor número de cepas secuenciadas corresponden a Francia (n=39), Reino Unido (n=36), Argentina (n=34) y España (n=31) se mantuvieron los mismos parámetros y modelos que fueron utilizados en análisis local.

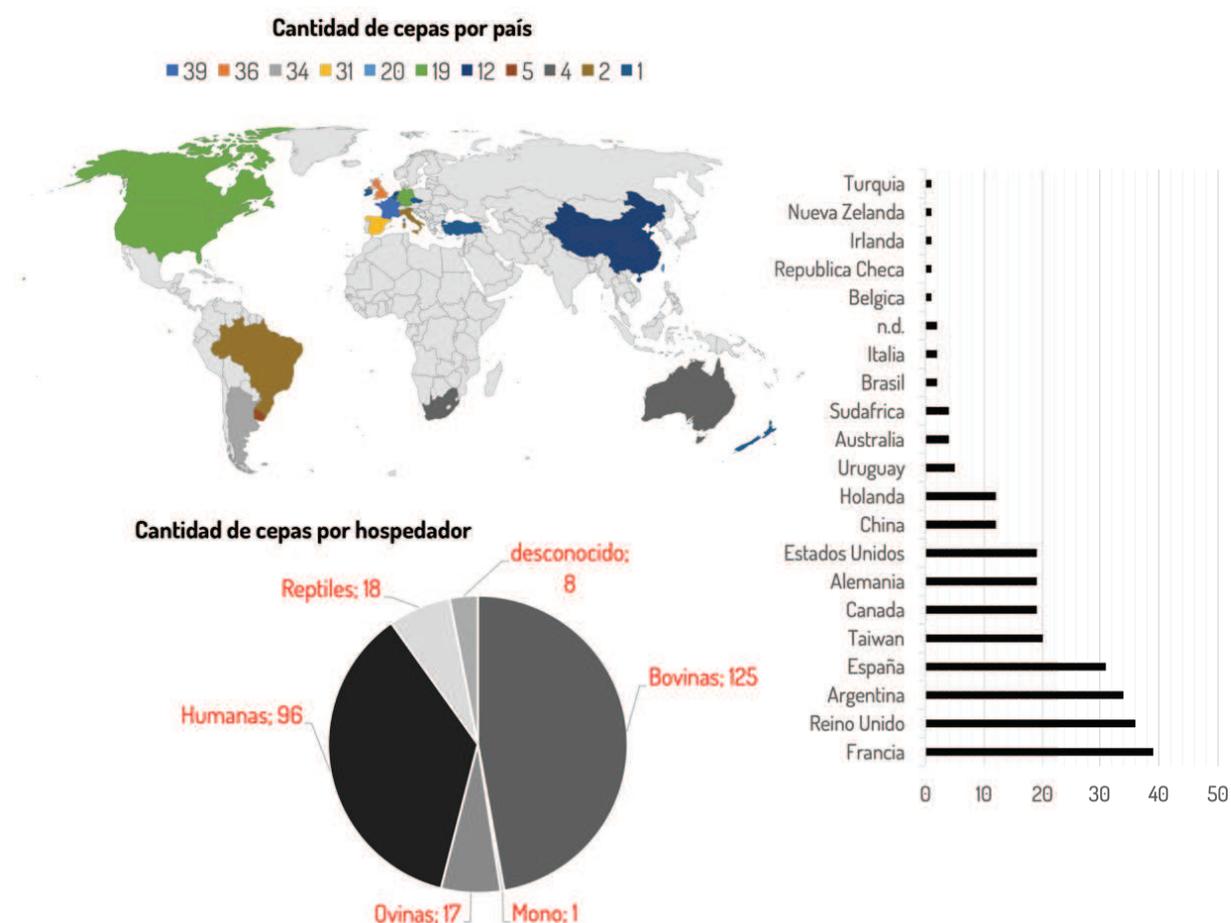


Figura 7. Base de datos global de *C. fetus*. Representación esquemática de la conformación de la base de datos para el análisis global.

El nuevo árbol de máxima verosimilitud generado a partir del análisis de 1.143 genes del *core-genoma* mostró la presencia de 8 *clusters* (Figura 8). Los *clusters* principales no estuvieron definidos geográficamente.

Previamente, Iraola y col. reportaron un árbol filogenético similar al obtenido por nosotros, pero para un conjunto menor y diferente de datos (Iraola et al., 2017). En nuestro trabajo, las cepas de

C. fetus subesp. *testudinum* de reptiles divergen de las cepas de mamíferos *C. fetus* y conforman el *Cluster* 8. Entre los *clusters* principales, el *Cluster* 1 constituiría el “linaje bovino”. Este *cluster* es exclusivo de las cepas aisladas del ganado vacuno, y por este motivo fue denominado como “linaje bovino” por Iraola y col. (Iraola et al., 2017). En consonancia con éste trabajo, los *clusters* 2-7 corresponden al llamado “linaje humano”, ya que en ellos predominan las cepas aisladas en humanos.

También puso en evidencia que la mayoría de las cepas locales se agruparon en los grupos filogenéticos que comprenden exclusivamente las cepas aisladas de Argentina (Figura 8).

De las 34 cepas aisladas en la región pampeana, 33 cepas pertenecieron al *Cluster* 1. Hubo una excepción, la cepa Cff 04-554, que fue descrita en la sección anterior como una cepa filogenéticamente distante en el análisis local. Esto también fue confirmado por el análisis global, ya que esta cepa, llamativamente agrupó dentro del *cluster* 6, anidado en el linaje humano. La misma agrupó junto con 9 cepas bovinas aisladas en Reino Unido y Alemania, una cepa ovina de Uruguay y 2 cepas humanas de Turquía y Canadá (Figura 8).

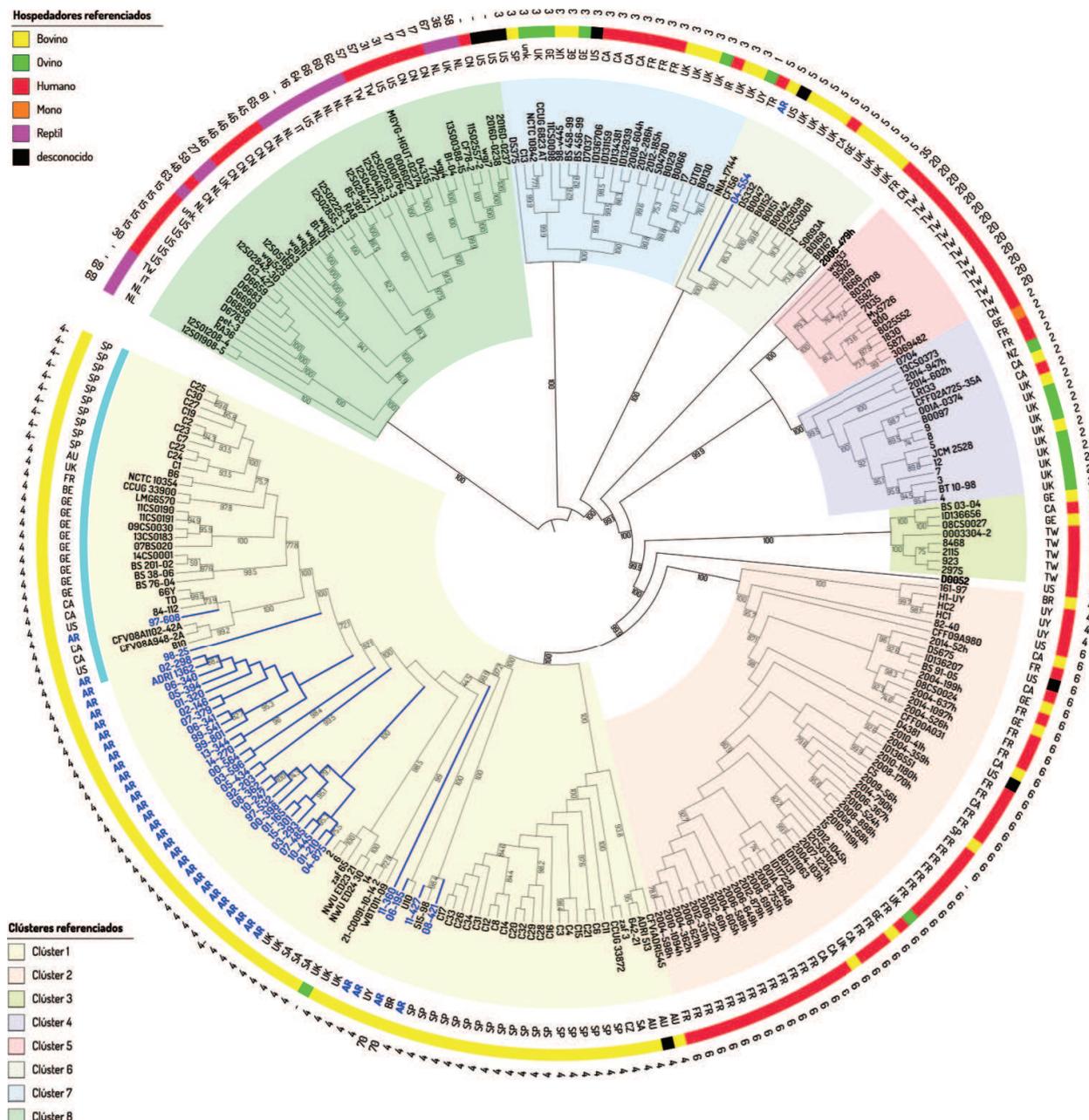


Figura 8. Filogenia global de *C. fetus* en base al core-genoma. Árbol de máxima verosimilitud en base a 1.143 genes de copia única compartidos por 265 cepas de *C. fetus*. Los nodos y clusters coloreados en azul marcan a las cepas argentinas (n=34). La línea turquesa resalta al subgrupo de cepas identificadas como *C. fetus* subsp. *venerealis* (n=31). El anillo externo detalla el ST para cada cepa según el esquema de MLST de *C. fetus*. Código de país: AR=Argentina, AU=Australia, BE=Bélgica, BR=Brasil, CA=Canadá, CN=China, CZ=República Checa, FR=Francia, GE=Alemania, IT=Italia, IR=Irlanda, NL=Países Bajos, NZ=Nueva Zelanda, SA=Sudáfrica, SP=España, TK=Turquía, TW=Taiwán, UK=Reino Unido, UY=Uruguay, US=Estados Unidos.

Por otro lado, se pudieron identificar varios subclusters dentro del Cluster 1, exclusivo para cepas de ganado. La mayoría de las cepas de Argentina (28/34) agruparon exclusivamente con las cepas del

mismo origen. Entre las excepciones, se encuentran las cepas Cff 08-421 y Cff 11-477 que comparten un *cluster* menor con una cepa aislada en Brasil, mientras que la cepa Cfv 06-195 comparte un *cluster* menor con una cepa de Uruguay. De forma similar al análisis local, la cepa Cff 11-360 no agrupó con ninguna de las cepas en el análisis global (singulete).

Las cepas argentinas identificadas como Cfv, Cfv 97/608 y Cfv 98-25 agruparon en una rama diferente del subgrupo mayoritario de las cepas argentinas. Este grupo filogenético menor incluye 31 cepas con una distribución intercontinental. La cepa Cfv 97/608 agrupó con dos cepas aisladas en Canadá y Estados Unidos y la cepa Cfv 98-25 formó un singulete. Curiosamente, dicho *subcluster* incluye exclusivamente cepas identificadas como Cfv mediante diferentes técnicas de tipificación (pruebas bioquímicas y moleculares) (Tabla 2). Una de estas pruebas es una PCR desarrollada en esta Tesis, específica para identificar a cepas productoras de H₂S, característica asociada a *C. fetus* subesp. *venerealis*. La misma está dirigida al transportador de L-cisteína involucrado en la producción de sulfuro de hidrógeno (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a). El desarrollo de ésta técnica se detalla más adelante en la sección 2.2.

La agrupación de las cepas en este *subcluster* refuerza el concepto de la existencia de un grupo de cepas con características moleculares y bioquímicas propias, que podrían coincidir con los de la subespecie Cfv.

Tabla 2. Descripción de las cepas dentro del grupo filogenético putativo de *C. fetus* subesp. *venerealis*. (continúa en la página siguiente)

Cepa	Código de acceso	Año	Origen ^(a)	Hospedador	Fuente	ID reportada ^(b)	ID según PCR transportador L-Cys ^(c)
66Y	ERS672211	2012	CA	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
TD	ERS672212	2011	CA	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
C1	ERS739275	2009	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
C2	ERS739276	2007	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
C7	ERS739281	2007	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
C19	ERS739293	2006	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
C22	ERS739296	2008	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
C23	ERS739297	2007	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
C24	ERS739298	2010	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
C25	ERS739299	2011	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV

Cepa	Código de acceso	Año	Origen ^(a)	Hospedador	Fuente	ID reportada ^(b)	ID según PCR transportador L-Cys ^(c)
C27	ERS739301	2011	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
C30	ERS739304	2014	ES	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
BS 201/02	ERS686632	2002	GE	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
BS 76/04	ERS686633	2004	GE	Bovino	Feto	CFV _(i) ^A	CFV
BS 38/06	ERS686634	2006	GE	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
07BS020	ERS686635	2007	GE	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
09CS0030	ERS686637	2009	GE	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
11CS0190	ERS686638	2011	GE	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
11CS0191	ERS686639	2011	GE	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
13CS0183	ERS686640	2013	GE	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
14CS0001	ERS686641	2014	GE	Bovino	Prepucio	CFV _(i) ^A	CFV
97/608	GCA_000759515.1	1997	AR	Bovino	Placenta	CFV _(iv) ^{A,B}	CFV
84/112	GCA_000967135.1	1984	US	Bovino	Mucus vaginal	CFV _(i) ^A	CFV
NCTC 10354	GCA_000222425.1	1952	UK	Bovino	Mucus vaginal	CFV _(i) ^A	CFV
B6	GCA_000744035.1	1964	AU	Bovino	Mucus vaginal	CFV _(i) ^A	CFV
B10	LRET00000000	2011	US	Bovino	desconocido	CFV _(ii) ^{A,B}	CFV
CFV08A1102-42A	GCA_011600845.2	2008	CA	Bovino	Prepucio	CFV _(iii) ^B	CFV
CFV08A948-2A	GCA_011601005.2	2008	CA	Bovino	Prepucio	CFV _(iii) ^B	CFV
CCUG 33900	LREV00000000	1995	FR	Bovino	Aborto	CFV _(ii) ^{A,B}	CFV
LMG 6570	LREW00000000	1985	BE	Bovino	desconocido	CFV _(ii) ^{A,B}	CFV
98-25	LRES00000000	1998	AR	Bovino	Feto	CFV _(ii) ^{A,B}	CFV

^(a) Código de país: CA, Canada; ES, España; GE, Alemania; AR, Argentina; US, Estados Unidos; UK, Reino Unido; AU, Australia; FR, Francia; BE, Bélgica.

^(b) _(i) Iraola et al., 2017; _(ii) van der Graaf-van Bloois et al., 2014a; _(iii) Mukhtar 2013; ^(A) tipificación molecular; ^(B) fenotipificación.

^(c) Diseñada en la presente tesis, la misma se detalla en la Sección 2.2 de Resultados.

Los resultados del estudio filogenético tanto local como global, sugieren un movimiento activo de animales, probablemente debido al comercio entre diferentes regiones del país, así como con los países vecinos, desde tiempos pasados.

1.5. MLST: Análisis de las cepas de *Campylobacter fetus* aisladas en Argentina

El MLST es una técnica muy difundida para la subtipificación molecular de diferentes patógenos. Al mismo tiempo que se abordó el estudio pangenómico y filogenético, también se analizó por MLST cada cepa *in silico* con el objetivo de conocer cuáles son los ST predominantes en nuestro país y evaluar el desempeño de la técnica como herramienta de tipificación molecular.

En este estudio, se realizó un MLST *in silico* a partir de las secuencias genómicas de las cepas de *C. fetus* de nuestro país. Dicho análisis se llevó a cabo empleando dos servidores de acceso público: PubMLST (<http://pubmlst.org>) y MLST 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>). De las 34 cepas locales, 31 cepas se subtipificaron como ST4. Según el árbol filogenético local, el ST4 se distribuyó homogéneamente en los distintos grupos filogenéticos (Figura 4). De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los análisis filogenéticos local y global, la cepa Cff 04-554 (“linaje humano”) fue la única cepa local que resultó ST5 (Figuras 4 y 8).

Inicialmente, el servidor PubMLST no logró establecer el ST para las cepas Cff 11-427 y Cff 07-485, por lo cual se empleó la herramienta MLST 2.0 para resolver el ST de dichas cepas. En el caso de la cepa Cff 07-485, el *locus uncA* mostró una baja cobertura (85,1%), mientras que el resto de los *loci* tuvieron 100% de identidad nucleotídica con el ST4. Por lo cual, el programa asignó un ST4 putativo como perfil alélico para esta cepa. Por otra parte, el análisis de la secuencia del alelo *uncA* en el genoma de Cff 11-427 mostró una transición de C a T en la posición 293, definiendo así un nuevo alelo (Figura 9).

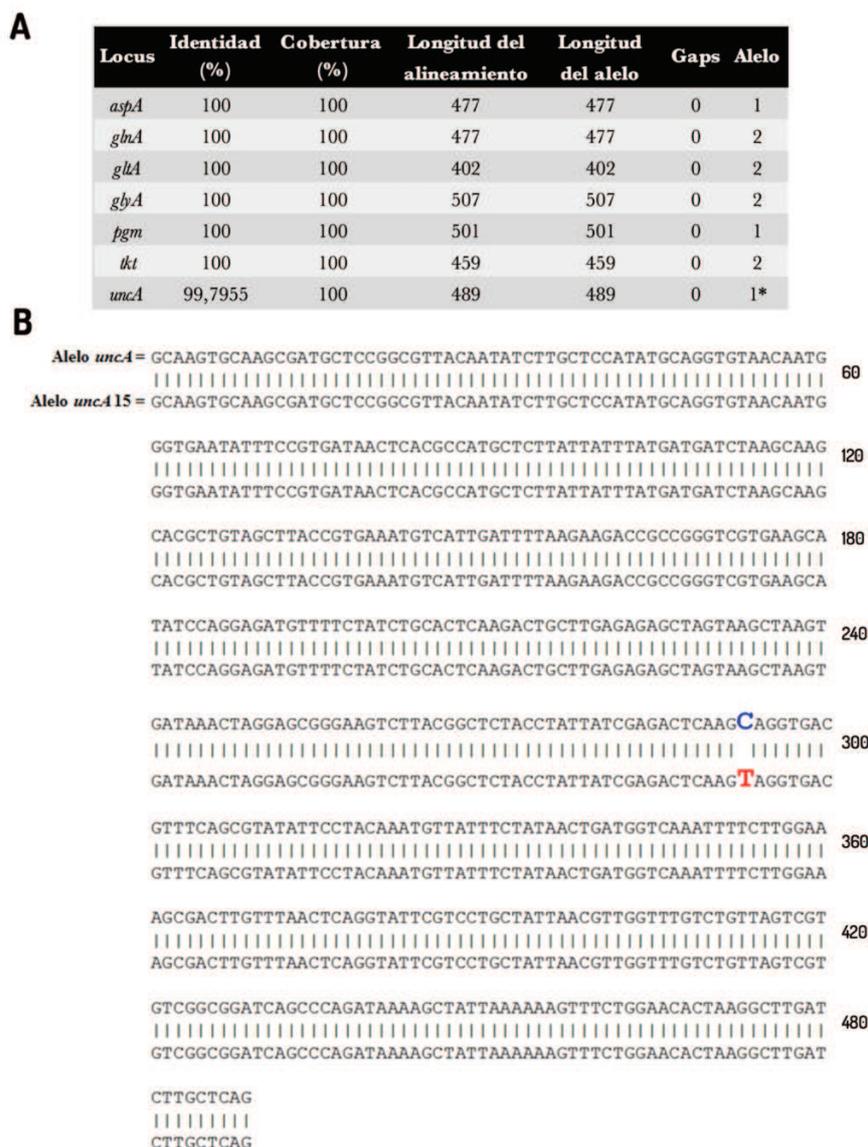


Figura 9. Nuevo alelo *uncA* y ST para la cepa. (A) Se muestra el porcentaje de identidad y cobertura para cada *locus* y alelo en el esquema MLST de *C. fetus* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST>). (B) Alineamiento local para el nuevo alelo *uncA* donde se muestra la transición de C a T en la posición 293.

Este nuevo alelo y su respectivo ST fueron depositados en la base de datos PubMLST (https://pubmlst.org/bigdb?page=profileInfo&db=pubmlst_campylobacter_nonjejuni_seqdef&scheme_id=9&profile_id=70). A esta cepa se le asignó la variante alélica 15 para *uncA* y el subtipo ST70. Esta cepa ST70 fue única y agrupó con una cepa ST4 (Figura 4). Esta variante ha sido reportada por primera vez en el presente estudio.

Los resultados del MLST fueron sustentados por la filogenia, aunque de forma parcial y, revelaron una baja diversidad entre las cepas de *C. fetus* aisladas en la región pampeana.

2. Optimización del diagnóstico molecular de la Campilobacteriosis genital bovina

En nuestro país, el diagnóstico de la CGB se lleva a cabo en muchos laboratorios mediante técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD), complementando en aquellos lugares donde se realiza el cultivo de la bacteria con pruebas fenotípicas, para así confirmar la especie e identificar las subespecies. Pero a pesar de su disponibilidad, ambos métodos tienen sus limitaciones y no siempre las pruebas bioquímicas son concordantes con la genómica de los aislamientos (Silveira et al., 2018).

Es aquí, donde los métodos moleculares tales como la PCR presentan ventajas sobre dichas técnicas debido a su especificidad, sensibilidad y rapidez en la obtención e interpretación de los resultados. Sin embargo, los protocolos vigentes en la actualidad están pobremente caracterizados y fueron diseñados previo a la escalada en la disponibilidad de secuencias de genomas completos.

2.1. Identificación especie- específica de *Campylobacter fetus*

2.1.1. Búsqueda de potenciales secuencias blanco especie- específicas para *Campylobacter fetus*

Si bien a lo largo del tiempo se ha perseguido el diagnóstico diferencial en la bacteria, son escasas las evidencias del impacto de cada una de las subespecies en la eficiencia reproductiva de los rodeos.

Con el objetivo de identificar nuevas regiones blanco y diseñar protocolos confiables para optimizar el diagnóstico de la CGB, se realizó un alineamiento global de múltiples genomas (MSA) con el programa Mauve (Darling et al., 2010) (Figura 10). Para ello, se empleó una secuencia representativa del genoma completo de cada especie del género *Campylobacter* (n=30), cuatro genomas representativos de la especie *C. fetus* y seis genomas correspondientes a géneros estrechamente relacionados con *Campylobacter* (Tabla 3).

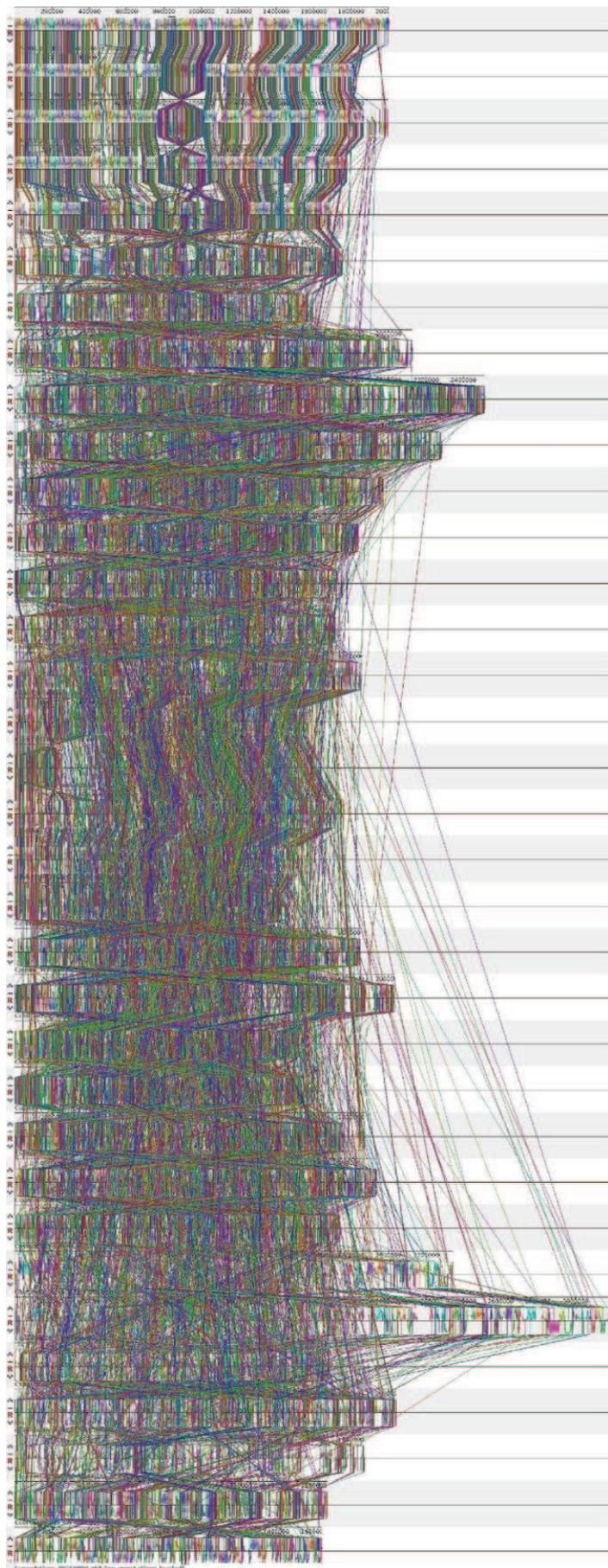


Figura 10. Alineamiento múltiple genómico de las especies que integran el género *Campylobacter* y cercanos. El programa identifica tramos de coincidencias de nucleótidos y selecciona los bloques localmente colineales (LCB) que cumplen un criterio de peso mínimo. Los LCB homólogos entre genomas se conectan con una línea y se identifican con el mismo color.

Tabla 3. Secuencias genómicas de *Campylobacter* empleadas para el alineamiento global de genomas con Mauve.

Cepa	Código de acceso	Nivel de secuenciación	GC%	Tamaño (Mb)
<i>C. armoricus</i> CCUG73571	GCA_013372105.1	completo	28,6	1,64
<i>C. avium</i> LMG24591	GCA_002238335.1	completo	34,2	1,74
<i>C. blaseri</i> LMG30333	GCA_013201895.1	completo	29,2	1,89
<i>C. coli</i> AR-0411	GCA_008727495.1	completo	31,04	1,82
<i>C. concisus</i> 13826	GCA_000017725.2	completo	39,24	2,1
<i>C. corcagiensis</i> LMG27932	GCA_013201645.1	completo	31,86	1,69
<i>C. cuniculorum</i> DSM23162=LMG24588	GCA_002104335.1	completo	31,2	1,94
<i>C. curvus</i> 525-92	GCA_000017465.2	completo	44,5	1,97
<i>C. fetus</i> subesp. <i>fetus</i> 04-554	GCA_000759485.1	completo	33,14	1,83
<i>C. fetus</i> subesp. <i>testudinum</i> 03-427	NC_022759	completo	33,1	1,77
<i>C. fetus</i> subesp. <i>venerealis</i> 97/608	GCA_000759515.1	completo	33,19	2,0
<i>C. fetus</i> subesp. <i>venerealis</i> bv. <i>intermedius</i> 03-293	GCA_000512745.2	completo	33,11	2,0
<i>C. geochelonis</i> LMG29375	GCA_013201685.1	completo	33,5	2,17
<i>C. gracili</i> ATCC33236	GCA_001190745.1	completo	46,6	2,28
<i>C. helveticus</i> 2013D-9613	GCA_004345065.1	completo	34,27	1,91
<i>C. hepaticus</i> HV10	GCA_001687475.2	completo	28,0	1,52
<i>C. hominis</i> ATCC-BAA-381	GCA_000017585.1	completo	31,71	1,71
<i>C. hyointestinalis</i> subesp. <i>hlawsonii</i> CHY5	GCA_013372165.1	completo	33,29	1,81
<i>C. iguaniorum</i> 1485E	GCA_000736415.1	completo	35,79	1,75
<i>C. insulaenigrae</i> NCTC12927	GCA_000816185.1	completo	28,2	1,47
<i>C. jejuni</i> subesp. <i>jejuni</i> NCTC11168=ATCC700819	GCA_900475265.1	completo	30,5	1,64
<i>C. lanienae</i> NCTC13004	GCA_002139935.1	completo	34,6	1,59
<i>C. lari</i> RM2100	GCA_000019205.1	completo	29,62	1,57
<i>C. mucosalis</i> CCUG21559	GCA_004803775.1	completo	36,5	1,86
<i>C. ornithocola</i> MG29815	GCA_013201605.1	completo	29,2	1,64
<i>C. peloridis</i> LMG23910	GCA_000816785.1	completo	28,45	1,76
<i>C. pinnipediorum</i> subesp. <i>caledonicus</i> RM18020	GCA_002021985.1	completo	30,4	1,71
<i>C. rectus</i> RM3267	GCA_000174175.1	contigs	44,8	2,51
<i>C. showae</i> B91_SC	GCA_900699785.1	completo	46,0	2,16
<i>C. sputorum</i> RM8705	GCA_002220775.1	completo	29,3	1,68
<i>C. subantarcticus</i> LMG24377	GCA_000816305.1	completo	29,8	1,85
<i>C. upsaliensis</i> RM3940	GCA_013372245.1	completo	35,1	1,63
<i>C. ureolyticus</i> RIGS 9880	GCA_001190755.1	completo	29,2	1,64
<i>C. volucris</i> LMG24379	GCA_000816345.1	completo	28,6	1,52
<i>Arcobacter butzleri</i> ED-1	GCA_007005625.1	completo	27,2	2,2
<i>Arcobacter nitrofigilis</i> DSM7299	GCA_000092245.1	completo	28,40	3,19
<i>Arcobacter skirrowii</i> A2S6	GCA_003939045.1	completo	27,8	1,88
<i>Helicobacter hepaticus</i> ATCC51449	GCA_000007905.1	completo	35,9	1,8
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	GCA_000307795.1	completo	38,9	1,67
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM1740	GCA_000196135.1	completo	48,5	2,11

Mauve es un programa que permite visualizar reordenamientos, sitios de inserciones/deleciones e inversiones a través de un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) genómicas. En el visualizador gráfico del MSA, cada secuencia está representada por un panel horizontal de bloques de diferentes colores, donde cada bloque coloreado representa una región de la secuencia que se alinea con una región de otro genoma, conectados por líneas verticales. Cada una de estas conexiones suponen que ambas regiones son homólogas, libres de reordenamientos internos y que probablemente procedan de un ancestro común o que hayan sido adquiridas por transferencia horizontal. A partir del MSA obtenido con Mauve, se realizó la exploración visual de las regiones genómicas presentes solo en la especie *C. fetus* (y ausentes en el resto). Los criterios de la búsqueda para considerarlas potenciales regiones específicas fueron los siguientes: un porcentaje de cobertura e identidad mayor a 90% al analizarlas con BLASTn (alineamiento local de secuencias nucleotídicas), exclusividad para *C. fetus* (incluyendo a las tres subespecies) y por último, presencia en el *core-genoma* del pangenoma global de *C. fetus* (este trabajo).

En primera instancia, se obtuvieron a partir del MSA varias regiones potencialmente específicas para *C. fetus*, aunque luego de corroborar su especificidad se seleccionó una única secuencia altamente específica para la especie *C. fetus*.

El gen identificado *yagE*, se encuentra en la región 1.113.419 pb -1.114.306 pb en el genoma de la cepa *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608, 1.0464.777-1.047.364 en *C. fetus* subesp. *venerealis* bv. *intermedius* 03-293, 1.060.619 pb -1.061.505 pb en *C. fetus* subesp. *fetus* 04-554 y 1.069.205 pb -1.070.092 pb en *C. fetus* subesp. *testudinum* 03-427 (Figura 11A) y codifica para una putativa aldolasa clase I, de la familia dihidrodipicolinato sintasa (295 aminoácidos, 33,3 kDa) cuyo dominio DHDPS escinde enlaces carbono-oxígeno (InterProScan: IPR002220). Dicha secuencia génica se encuentra flanqueada por los genes *xynR* y *uxaA*, los cuales codificarían para el regulador transcripcional del gen *yagE* y una altronato dehidratasa involucrada en el metabolismo de azúcares, respectivamente (Figura 11B).

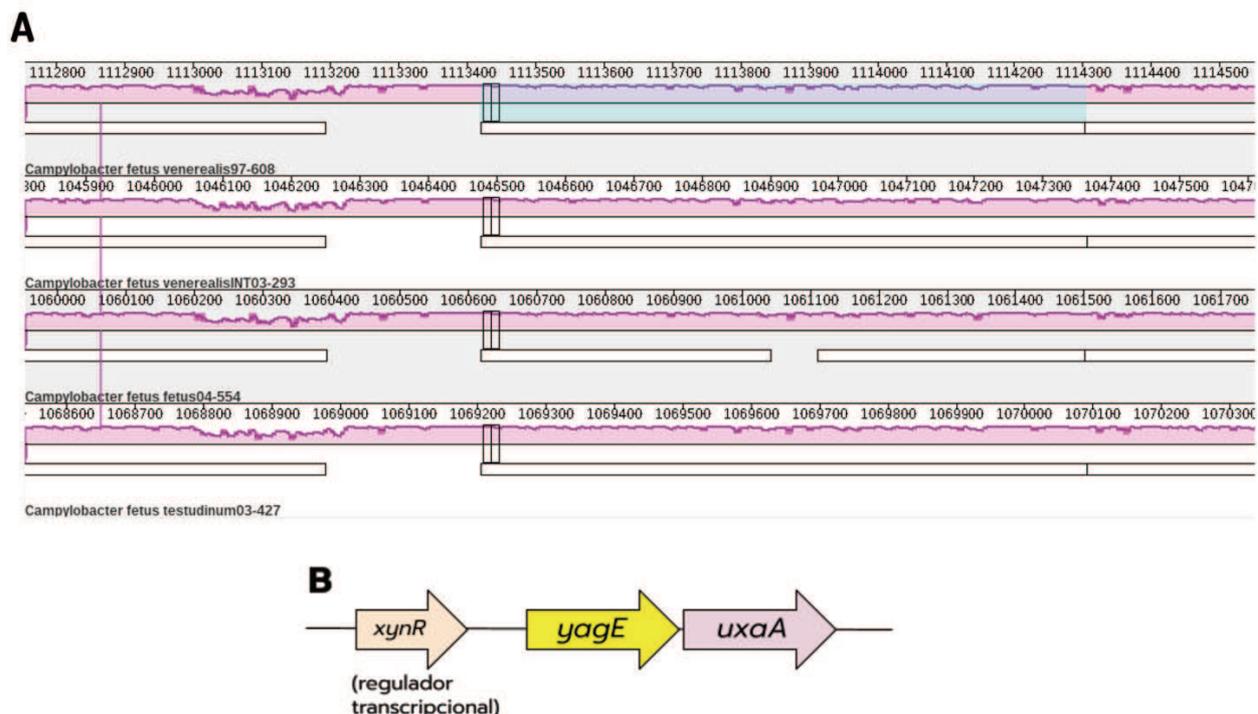


Figura 11. (A) Ampliación de la región de interés (marcada en verde). (B) Esquemización de la región adyacente al gen *yagE*. El gen se encuentra río arriba del gen *uxaA*, que codificaría para una altronato deshidratasa involucrada en el metabolismo y transporte de azúcares; y río abajo del gen *xynR* que codifica para un regulador transcripcional de *yagE*.

2.1.2. Diseño de una PCR especie- específica a partir del gen *yagE*

En base a la secuencia identificada, se diseñó un protocolo de PCR de punto final potencialmente especie-específica para *C. fetus*. El mismo fue nombrado PCR-*yagE*. Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores empleando el programa Clone Manager, cuyo producto de amplificación de 149 pb, permitiría la identificación específica de *C. fetus* (Figura 12A). Para la puesta a punto del protocolo, se utilizó el ADN genómico correspondiente a los aislamientos de *C. fetus* subesp. *fetus* 08-421 y *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608 y se obtuvo un producto de 149 pb para ambos aislamientos (Figura 12B).

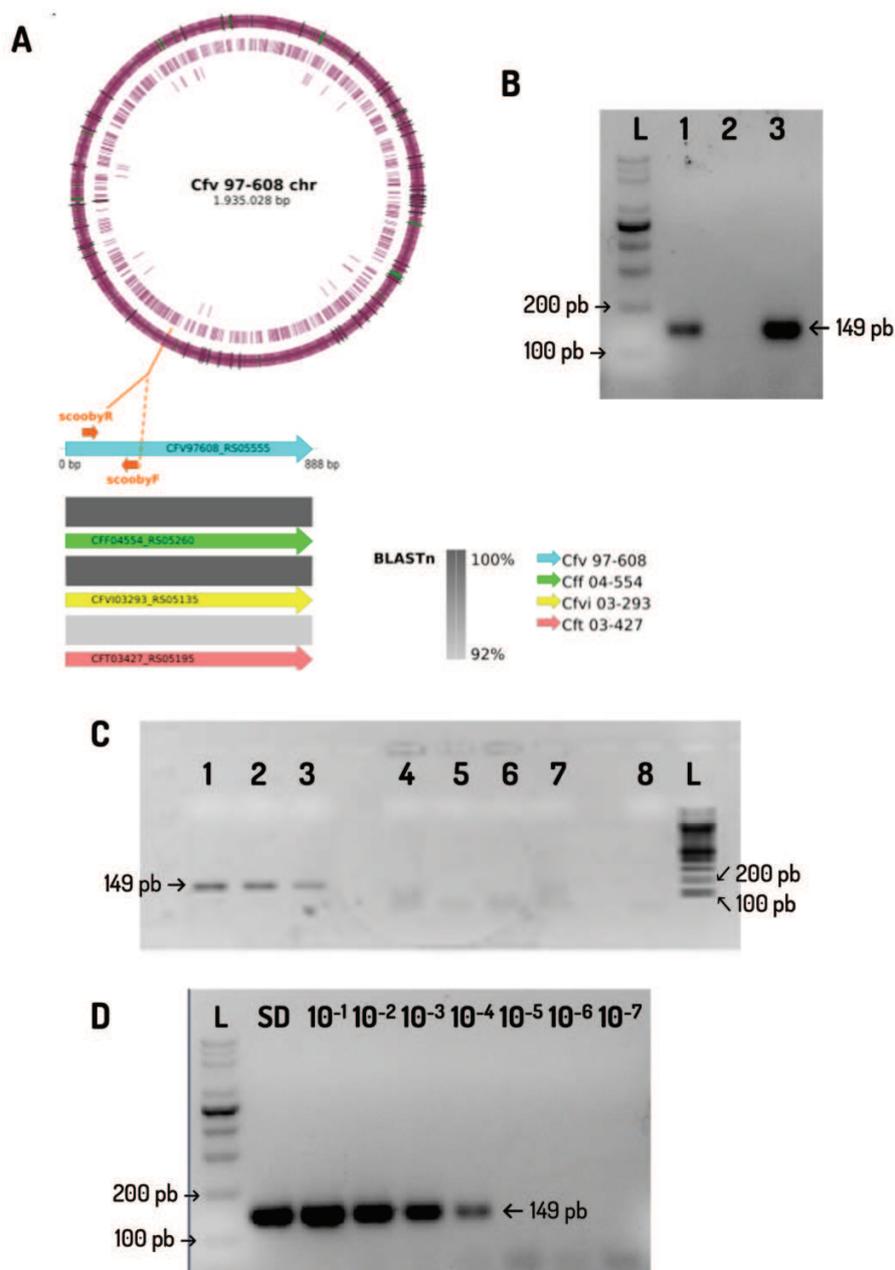


Figura 12. Diseño de la PCR-yagE. (A) **Estrategia de la PCR-yagE.** Esquematización del diseño de los oligonucleótidos iniciadores, los mismos fueron nombrados “scoobyF” y “scoobyR”. (B) **Puesta a punto de la PCR-yagE.** L: Ladder NEB 100 pb; Calle 1: Cfv 97/608; Calle 2: control negativo; Calle 3: Cff 08-421. (C) **Especificidad de la PCR-yagE.** La presencia de un producto de 149 pb es indicativa de *C. fetus*. Electroforesis en gel de agarosa 2% representativa. Calle 1: Cfv 97/608; calle 2: Cff 08-421; calle 3: Cfvi 06-341; calle 4: *C. sputorum* 08-209; calle 5: *C. coli* NCTC 11353; calle 6: *C. hyointestinalis* NCTC 11562; calle 7: *C. jejuni* NCTC 11392; calle 8: control negativo (agua); L: Ladder NEB 100 pb. (D) **Sensibilidad de la PCR-yagE.** Se obtuvo una sensibilidad de 5 pg/μL. L: Ladder NEB 100 pb; SD: ADN sin diluir (50 ng/μL); 10⁻¹: 5 ng/μL; 10⁻²: 500 pg/μL; 10⁻³: 50 pg/μL; 10⁻⁴: 5 pg/μL; 10⁻⁵: 500 fg/μL; 10⁻⁶: 50 fg/μL; 10⁻⁷: 5 fg/μL

Asimismo, se analizó la especificidad de la PCR empleando como templado ADN genómico de distintas especies del género *Campylobacter* incluyendo también *C. fetus* como controles: *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608, *C. fetus* subesp. *fetus* 08-421, *C. fetus* subesp. *venerealis* bv. *intermedius* 06-341, *C. sputorum* 08-209, *C. coli* NCTC 11353, *C. hyointestinalis* NCTC 11562, *C. jejuni* NCTC 11392. De acuerdo a lo esperado, para las cepas *C. fetus* se obtuvo un producto de amplificación de 149 pb y no se obtuvo producto para aquellas cepas de *Campylobacter* spp. distintas de *C. fetus* (*C. hyointestinalis*, *C. coli*, *C. jejuni* y *C. sputorum*) (Figura 12C). Para determinar la sensibilidad analítica de la PCR-*yagE* se construyó una curva estándar con diluciones seriadas 1:10 a partir de una concentración inicial de 50 ng/μL de ADN genómico (extraído con kit comercial) correspondiente a la cepa Cff 04-554, generando así un rango de diferentes concentraciones de 50 ng/μL a 5 fg/μL. En éste ensayo, la PCR-*yagE* logró detectar una cantidad mínima de 5 pg/μL de ADN de *C. fetus* (Figura 12D).

Por lo tanto, estos resultados junto a los obtenidos en el análisis *in silico*, apoyarían fuertemente la especificidad de la PCR-*yagE* con una sensibilidad aceptable para la detección de *C. fetus*.

2.1.3. Evaluación de aislamientos locales de *Campylobacter fetus* mediante la PCR-*yagE*

Con el objetivo de evaluar el desempeño de la PCR-*yagE* sobre un panel más amplio de aislamientos, aplicamos dicho protocolo sobre 34 aislamientos de *C. fetus* obtenidos a partir de muestras clínicas bovinas (Cff, n: 22; Cfv, n: 4; Cfvi, n: 8) (Tabla 4).

Para analizar comparativamente los resultados, se contempló tanto la fenotipificación (tipificación original realizada en el Laboratorio de Bacteriología de la Estación Experimental Agropecuaria- INTA Balcarce) como también la PCR descrita por Hum y col. (1997). Si bien esta es una PCR multiplex dirigida a dos regiones blanco, una secuencia específica para la especie *C. fetus* (gen *csp*) y otra para la subespecie *venerealis* (gen *parA*, localizado en una isla de patogenicidad), se empleó para su comparación solo la secuencia blanco *csp*.

Tabla 4. PCR *yagE*: Análisis de aislamientos argentinos de *C. fetus*. (continua en la siguiente página)

Cepa	Origen ^(a)	Pruebas bioquímicas ^(b)		ID según Hum y col. ^(c)	PCR- <i>yagE</i> ^(d) (Éste trabajo)
		Tolerancia a 1% glicina	Producción H ₂ S		
Cff 96-136	Bahía Blanca, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 08-421	Gral. López, SF	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 14-284	Pila, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 04-240	Olavarría, BA	+	+	-	Cf(+)
Cff 13-344	Balcarce, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 11-572	Balcarce, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 89-222	Balcarce, BA	+	+	-	Cf(+)
Cff 90-189	Balcarce, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff CI N3	Balcarce, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 01-165	Santa Rosa, LP	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 2001-64	Balcarce, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 2005-622	Cnel. Dorrego, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 11-262	Balcarce, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 11-295	Saladillo, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 11-360	Necochea, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 11-685	Balcarce, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 11-408	Necochea, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff btu5	BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff btu6	BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff btu7	BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 947-2018	Gral. Madariaga, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cff 1066-2018	Pila, BA	+	+	Cf(+)	Cf(+)
Cfv 97/608	Hucal, LP	-	-	Cf(+)	Cf(+)
Cfv 95-258	Mar Chiquita, BA	-	-	Cf(+)	Cf(+)
Cfv 2008-382	Gral. Belgrano, BA	-	-	Cf(+)	Cf(+)
Cfv 05-355	Balcarce, BA	-	-	Cf(+)	Cf(+)
Cfvi 06-341	Pehuajó, BA	-	+	Cf(+)	Cf(+)
Cfvi 03-596	Pehuajó, BA	-	+	Cf(+)	Cf(+)
Cfvi 2002-146	BA	-	+	Cf(+)	Cf(+)
Cfvi 98-472	Azul, BA	-	+	Cf(+)	Cf(+)
Cfvi 99-541	Balcarce, BA	-	+	Cf(+)	Cf(+)
Cfvi 2007-379	Mar Chiquita, BA	-	+	Cf(+)	Cf(+)
Cfvi 2000-305	BA	-	+	Cf(+)	Cf(+)
Cfvi 2003-596	Pehuajó, BA	-	+	Cf(+)	Cf(+)

^(a) BA: provincia de Buenos Aires, LP: provincia de La Pampa, SF: provincia de Santa Fe.

^(b) Fenotipificación mediante pruebas bioquímicas. (“+”) y (“-”) significan positivo y negativo, respectivamente para cada prueba empleada.

^(c) Genotipificación según la PCR Hum y col. (1997), “Cf (+)” significa que la cepa ha sido identificada como *C. fetus* debido a la amplificación del producto correspondiente a las secuencia blanco *csp* (“+”). (“-”) significa ausencia del producto de amplificación.

^(d) Genotipificación según la PCR-*yagE* desarrollada, “Cf (+)” significa que la cepa ha sido identificada como *C. fetus* debido a la amplificación del producto correspondiente a las secuencia blanco *yagE* (“+”). (“-”) significa ausencia del producto de amplificación.

Todas las cepas de *C. fetus* analizadas resultaron positivas (34/34) para la PCR-*yagE*, mientras que al emplear la PCR de Hum y col. se pudieron identificar 32/34 (Tabla 4). La PCR-*yagE* demostró ser eficiente para identificar la presencia de *C. fetus* en todas las muestras analizadas.

2.1.4. Análisis *in silico* de la PCR-*yagE* sobre secuencias de genomas completos de *Campylobacter fetus*

Con el propósito de ampliar el análisis del sistema desarrollado hacia cepas de otros países y distintos hospedadores e incluir a la subespecie *C. fetus* subesp. *testudinum*, se evaluó el desempeño de la PCR-*yagE in silico* sobre secuencias de genomas completo. Para ello, se utilizaron 268 secuencias de acceso público en las bases de datos de NCBI y ENA y se realizó la PCR *in silico* empleando el programa PrimerMap (https://www.bioinformatics.org/sms2/primer_map.html) que permite la visualización gráfica de la hibridación de los oligonucleótidos (Tabla 5).

Tabla 5. *In silico* PCR *yagE*: Análisis a partir de las secuencias del genomas completos. (continúa en las siguientes páginas)

Cepa	Código de acceso	Hospedador	Fuente	País ^(a)	PCR- <i>yagE</i> ^(b)
08CS0024	ERS686636	bovino	prepucio	GE	+
08CS0027	ERS686646	bovino	prepucio	GE	+
11CS0098	ERS686648	ovino	placenta	GE	+
12CS0302	ERS686649	bovino	prepucio	GE	+
13CS0001	ERS686650	bovino	prepucio	GE	+
13CS0373	ERS686651	mono	heces	GE	+
BS 03-04	ERS686644	bovino	aborto fetal	GE	+
BS 456-99	ERS686642	ovino	aborto fetal	GE	+
BS 458-99	ERS686643	bovino	aborto fetal	GE	+
BS 91-05	ERS686645	bovino	prepucio	GE	+
07BS020	ERS686635	bovino	prepucio	GE	+

Cepa	Código de acceso	Hospedador	Fuente	País ^(a)	PCR- <i>yagE</i> ^(b)
09CS0030	ERS686637	bovino	prepucio	GE	+
11CS0190	ERS686638	bovino	prepucio	GE	+
11CS0191	ERS686639	bovino	prepucio	GE	+
13CS0183	ERS686640	bovino	prepucio	GE	+
14CS0001	ERS686641	bovino	prepucio	GE	+
BS 201-02	ERS686632	bovino	prepucio	GE	+
BS 38-06	ERS686634	bovino	prepucio	GE	+
BS 76-04	ERS686633	bovino	aborto fetal	GE	+
00-398	ERS739236	bovino	aborto fetal	AR	+
00-564	ERS739237	bovino	prepucio	AR	+
01-165	CP014568-CP014570	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
01-210	ERS739239	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
01-320	ERS739238	bovino	aborto fetal	AR	+
02-146	ERS739240	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
02-298	GCA_001699555.1	bovino	pulmón fetal	AR	+
03-293	CP0006999-CP007002	bovino	pulmón fetal	AR	+
03-596	LRAM00000000	bovino	contenido abomasal fetal	AR	+
04-875	ERS739242	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
05-394	ERS739243	bovino	aborto fetal	AR	+
05-434	ERS739244	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
06-195	ERS739246	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
06-340	ERS739245	bovino	prepucio	AR	+
06-341	SOYW00000000	bovino	pulmón fetal	AR	+
07-379	ERS739247	bovino	contenido abomasal fetal	AR	+
07-485	ERS739248	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
08-362	ERS739249	bovino	aborto fetal	AR	+
08-421	SOOT00000000	bovino	contenido abomasal fetal	AR	+
10-247	ERS739250	bovino	prepucio	AR	+
10-445	ERS739251	bovino	prepucio	AR	+
11-360	ERS739252	bovino	pulmón fetal	AR	+
11-427	ERS739253	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
13-344	SOYX00000000	bovino	contenido abomasal fetal	AR	+
14-270	ERS739254	bovino	aborto fetal	AR	+
15-301	ERS739255	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
92-203	LRVL00000000	bovino	placenta	AR	+
97-532	LRER00000000	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+

Cepa	Código de acceso	Hospedador	Fuente	País ^(a)	PCR- <i>yagE</i> ^(b)
99-541	ASTK00000000	bovino	prepucio	AR	+
99-801	ERS739235	bovino	prepucio	AR	+
ADRI 1362	LREX00000000	bovino	mucus cérvico vaginal	AR	+
04-554	CP008808-CP008809	bovino	contenido abomasal fetal	AR	+
97/608	CP008810-CP008812	bovino	placenta	AR	+
98-25	LRES00000000	bovino	contenido abomasal fetal	AR	+
642-21	AJSG00000000	bovino	útero	AU	+
ADRI 513	LRFA00000000	n.d.	n.d.	AU	+
CFViADRI545	GCA_011601375.2	bovino	tracto reproductivo	AU	+
B6	AJMC00000000	bovino	vagina	AU	+
LMG6570	LREW00000000	bovino	n.d.	BE	+
161-97	ERS846568	bovino	prepucio	BR	+
515-98	ERS846569	bovino	prepucio	BR	+
001A-0374	ERS686652	humano	sangre	CA	+
001A-0648	ERS686653	humano	sangre	CA	+
ID111063	ERS739225	humano	sangre	CA	+
ID117228	ERS739226	humano	sangre	CA	+
ID129038	ERS739227	humano	sangre	CA	+
ID131159	ERS739228	humano	heces	CA	+
ID132939	ERS739234	humano	sangre	CA	+
ID134381	ERS739229	humano	heces	CA	+
ID136207	ERS739230	humano	sangre	CA	+
ID136551	ERS739231	humano	sangre	CA	+
ID136656	ERS739232	humano	sangre	CA	+
ID136706	ERS739233	humano	sangre	CA	+
CFF00A031	GCA_011600945.2	bovino	prepucio	CA	+
CFF02A725-35A	GCA_011600855.2	bovino	prepucio	CA	+
CFF09A980	GCA_011600995.2	bovino	prepucio	CA	+
66Y	JPQC00000000	bovino	prepucio	CA	+
TD	JPPC00000000	bovino	prepucio	CA	+
CFV08A1102-42A	GCA_011600845.2	bovino	prepucio	CA	+
CFV08A948-2A	GCA_011601005.2	bovino	prepucio	CA	+
704	GCA_010120585.1	humano	ascitis	CN	+
wqj33	GCA_001699735.1	humano	sangre	CN	+
772	GCA_002973655.1	humano	ascitis	CN	+
B1-01	GCA_013184565.1	humano	sangre	CN	+
B1-04	GCA_013184585.1	humano	sangre	CN	+
wqj1	GCA_010883085.1	humano	sangre	CN	+
wqj11	GCA_010883105.1	humano	sangre	CN	+

Cepa	Código de acceso	Hospedador	Fuente	País^(a)	PCR-<i>yagE</i>^(b)
wqj2	GCA_010120605.1	humano	sangre	CN	+
wqj3	GCA_010883155.1	humano	sangre	CN	+
wqj4	GCA_001699725.1	humano	sangre	CN	+
wqj525	GCA_010120605.1	humano	fluido amniótico / sangre	CN	+
wqj7	GCA_010883155.1	humano	sangre	CN	+
NCTC 10842	LS483431	ovino	n.d.	n.d.	+
03-427	GCA_000495505.1	humano	n.d.	n.d.	+
C11	ERS739285	bovino	prepucio	ES	+
C12	ERS739286	bovino	prepucio	ES	+
C13	ERS739287	bovino	prepucio	ES	+
C14	ERS739288	bovino	prepucio	ES	+
C15	ERS739289	bovino	prepucio	ES	+
C16	ERS739290	bovino	prepucio	ES	+
C17	ERS739291	bovino	prepucio	ES	+
C20	ERS739294	bovino	prepucio	ES	+
C21	ERS739295	bovino	prepucio	ES	+
C26	ERS739300	bovino	prepucio	ES	+
C28	ERS739302	bovino	prepucio	ES	+
C29	ERS739303	bovino	prepucio	ES	+
C3	ERS739277	bovino	prepucio	ES	+
C31	ERS739305	bovino	prepucio	ES	+
C32	ERS739306	bovino	prepucio	ES	+
C33	ERS739307	bovino	prepucio	ES	+
C34	ERS739308	bovino	prepucio	ES	+
C4	ERS739278	bovino	prepucio	ES	+
C5	ERS739279	bovino	prepucio	ES	+
C6	ERS739280	bovino	prepucio	ES	+
C8	ERS739282	bovino	prepucio	ES	+
C1	ERS739275	bovino	prepucio	ES	+
C19	ERS739293	bovino	prepucio	ES	+
C2	ERS739276	bovino	prepucio	ES	+
C22	ERS739296	bovino	prepucio	ES	+
C23	ERS739297	bovino	prepucio	ES	+
C24	ERS739298	bovino	prepucio	ES	+
C25	ERS739299	bovino	prepucio	ES	+
C27	ERS739301	bovino	prepucio	ES	+
C30	ERS739304	bovino	prepucio	ES	+
C7	ERS739281	bovino	prepucio	ES	+
82-40	CP000487	humano	sangre	US	+
D0052	GCA_008014295.1	humano	absceso	US	+
D4381	GCA_005250905.2	n.d.	n.d.	US	+

Cepa	Código de acceso	Hospedador	Fuente	País ^(a)	PCR- <i>yagE</i> ^(b)
D5332	GCA_005133705.2	n.d.	n.d.	US	+
D5375	GCA_005250865.2	n.d.	n.d.	US	+
D5675	GCA_005137355.2	n.d.	n.d.	US	+
D7037	GCA_005014375.2	n.d.	n.d.	US	+
84-112	HG004426- HG004427	bovino	secreción genital	US	+
B10	LRET00000000	bovino	n.d.	US	+
2016D-0237	GCA_005014935.2	n.d.	n.d.	US	+
2016D-0238	GCA_005255865.2	n.d.	n.d.	US	+
85-387	GCA_001699345.1	reptil	n.d.	US	+
D4335	GCA_001699385.1	humano	heces	US	+
D6659	GCA_001699415.1	humano	fluido pleural	US	+
D6683	GCA_001699425.1	humano	hematoma	US	+
D6690	GCA_001699455.1	humano	sangre	US	+
D6783	GCA_001699465.1	humano	heces	US	+
D6856	GCA_001699485.1	humano	bilis	US	+
MGYG- HGUT-02374	GCA_902386455.1	humano	intestino	US	+
2004-103h	ERS672233	humano	fluido cerebroespinal	FR	+
2004-199h	ERS672234	humano	fluido cerebroespinal	FR	+
2004-359h	ERS672235	humano	sangre	FR	+
2004-362h	ERS672236	humano	placenta	FR	+
2004-526h	ERS672237	humano	heces	FR	+
2004-598h	ERS672238	humano	sangre	FR	+
2004-605h	ERS672239	humano	heces	FR	+
2004-637h	ERS672240	humano	fluido articular	FR	+
2006-222h	ERS672241	humano	sangre	FR	+
2006-367h	ERS672242	humano	fluido cerebroespinal	FR	+
2006-479h	ERS672243	humano	heces	FR	+
2006-588h	ERS672244	humano	fluido cerebroespinal	FR	+
2006-621h	ERS672245	humano	sangre	FR	+
2006-649h	ERS672246	humano	heces	FR	+
2007-123h	ERS672271	humano	fluido cerebroespinal	FR	+
2008-170h	ERS672247	humano	heces	FR	+
2008-568h	ERS672248	humano	fluido articular	FR	+
2008-604h	ERS672249	humano	heces	FR	+
2008-691h	ERS672250	humano	fluido cerebroespinal	FR	+
2008-755h	ERS672251	humano	sangre	FR	+
2008-898h	ERS672252	humano	sangre	FR	+

Cepa	Código de acceso	Hospedador	Fuente	País ^(a)	PCR- <i>yagE</i> ^(b)
2009-56h	ERS672272	humano	fluido cerebroespinal	FR	+
2010-1094h	ERS672255	humano	sangre	FR	+
2010-1119h	ERS672256	humano	heces	FR	+
2010-1180h	ERS672257	humano	sangre	FR	+
2010-41h	ERS672253	humano	heces	FR	+
2010-524h	ERS672254	humano	riñon	FR	+
2012-1045h	ERS672264	humano	fluido articular	FR	+
2012-185h	ERS672259	humano	sangre	FR	+
2012-286h	ERS672260	humano	sangre	FR	+
2012-331h	ERS672261	humano	sangre	FR	+
2012-60h	ERS672258	humano	heces	FR	+
2012-879h	ERS672263	humano	heces	FR	+
2014-1097h	ERS672270	humano	heces	FR	+
2014-52h	ERS672265	humano	fluido cerebroespinal	FR	+
2014-602h	ERS672266	humano	sangre	FR	+
2014-790h	ERS672267	humano	sangre	FR	+
2014-947h	ERS672269	humano	sangre	FR	+
CCUG 33900	LREV00000000	bovino	aborto fetal	FR	+
CIT01	RBHV00000000	humano	cultivo de sangre periférica	IR	+
RA36	ERS672213	reptil	heces	IT	+
RA8	ERS672214	reptil	heces	IT	+
LR133	ERS846544	ovino	aborto fetal	NZ	+
11S02557-2	GCA_001699125.1	reptil	cultivo	NL	+
12S00416-3	GCA_001699205.1	reptil	n.d.	NL	+
12S01208-4	GCA_003994875.1	reptil	hisopado cloacal	NL	+
12S01908-5	GCA_003994885.1	reptil	hisopado cloacal	NL	+
12S02225-3	GCA_001699215.1	reptil	n.d.	NL	+
12S02263-3	GCA_001699255.1	reptil	n.d.	NL	+
12S02842-30	GCA_001699265.1	reptil	n.d.	NL	+
12S02847-1	GCA_001699295.1	reptil	n.d.	NL	+
12S02855-1	GCA_001699305.1	reptil	n.d.	NL	+
12S04217-1	GCA_001699335.1	reptil	heces	NL	+
12S05168	GCA_001699175.1	reptil	n.d.	NL	+
13S00388-15	GCA_001699135.1	reptil	n.d.	NL	+
1	ERS846553	bovino	prepucio	UK	+
2	ERS846554	bovino	prepucio	UK	+
3	ERS846555	ovino	placenta	UK	+
4	ERS846556	ovino	placenta	UK	+
5	ERS846557	ovino	placenta	UK	+

Cepa	Código de acceso	Hospedador	Fuente	País ^(a)	PCR- <i>yagE</i> ^(b)
6	ERS846558	bovino	prepucio	UK	+
7	ERS846559	ovino	aborto fetal	UK	+
8	ERS846560	ovino	aborto fetal	UK	+
9	ERS846561	ovino	placenta	UK	+
12	ERS846562	ovino	placenta	UK	+
13	ERS846563	bovino	prepucio	UK	+
14	ERS846564	ovino	placenta	UK	+
15	ERS846565	ovino	placenta	UK	+
17	ERS846566	ovino	aborto fetal	UK	+
21-C0091-10-14_2	ERS672276	bovino	prepucio	UK	+
98-v445	LMBH00000000	bovino	prepucio	UK	+
B0042	ERR419595	bovino	heces	UK	+
B0047	ERR419600	bovino	heces	UK	+
B0066	ERR419653	bovino	heces	UK	+
B0097	ERR419653	bovino	heces	UK	+
B0129	ERR419637	bovino	heces	UK	+
B0130	ERR419638	bovino	heces	UK	+
B0131	ERR419639	bovino	heces	UK	+
B0151	ERR419648	bovino	heces	UK	+
B0152	ERR419649	bovino	heces	UK	+
B0167	ERR460866	bovino	heces	UK	+
B0168	ERR460867	bovino	heces	UK	+
BT 10-98	LRAL00000000	ovino	n.d.	UK	+
JCM 2528	ERS846567	bovino	mucus cérvico vaginal	UK	+
S0478D	ERR419653	bovino	heces	UK	+
S0693A	ERR419284	bovino	heces	UK	+
WBT 011-09	LMBI00000000	bovino	n.d.	UK	+
CCUG 6823 AT	GCA_008693125.1	ovino	cerebro fetal	UK	+
NCTC 10354	CM001228	bovino	mucus cérvico vaginal	UK	+
CF78-2	GCA_001699365.1	reptil	n.d.	UK	+
Sp3	GCA_001484645.1	reptil	cultivo celular	UK	+
CCUG 33872	LREU00000000	bovino	aborto fetal	CZ	+
zaf3	LREZ00000000	bovino	aborto fetal	SA	+
zaf65	LREY00000000	bovino	n.d.	SA	+
NWU ED23_21	GCA_013406955.1	bovino	n.d.	SA	+
NWU ED24_30	GCA_013406925.1	bovino	n.d.	SA	+
800	ERS739271	humano	sangre	TW	+
923	ERS739257	humano	sangre	TW	+
1592	ERS739260	humano	sangre	TW	+
1666	ERS739267	humano	sangre	TW	+

Cepa	Código de acceso	Hospedador	Fuente	País ^(a)	PCR- <i>yagE</i> ^(b)
1830	ERS739261	humano	sangre	TW	+
2115	ERS739264	humano	sangre	TW	+
2819	ERS739265	humano	sangre	TW	+
2975	ERS739256	humano	sangre	TW	+
5871	ERS739266	humano	sangre	TW	+
7035	ERS739258	humano	sangre	TW	+
8468	ERS739262	humano	sangre	TW	+
9502	ERS739270	humano	sangre	TW	+
3069482	ERS739274	humano	sangre	TW	+
8025552	ERS739273	humano	sangre	TW	+
8031708	ERS739272	humano	sangre	TW	+
0003304-2	ERS739263	humano	sangre	TW	+
My5726	ERS739259	humano	sangre	TW	+
6027	ERS739269	humano	sangre	TW	+
8764	ERS739268	humano	sangre	TW	+
pet-3	GCA_000814265.1	reptil	heces	TW	+
CF156	ERS672273	humano	sangre	TK	+
H1-UY	JYCP00000000	humano	sangre	UY	+
HC1	QJTR00000000	humano	sangre	UY	+
HC2	QJTS00000000	humano	fluido cerebroespinal	UY	+
INIA-17144	GCA_007723545.1	ovino	placenta	UY	+
U10	GCF_007109235	bovino	prepucio	UY	+

^(a) Código de país: AR, Argentina; AU, Australia; BE, Bélgica; BR, Brasil; CA, Canadá; CN, China; CZ, República Checa; FR, Francia; GE, Alemania; IT, Italia; IR, Irlanda; NL, Países Bajos; NZ, Nueva Zelanda; SA, Sudáfrica, ES, España; TK, Turquía; TW, Taiwán; UK, Reino Unido; UY, Uruguay; US, Estados Unidos; n.d., no disponible.

^(b) “+” significa que los oligonucleótidos hibridan y el tamaño del producto putativo posee 149 pb.

Nuevamente, todas las cepas analizadas resultaron positivas para la hibridación putativa de los oligonucleótidos en la secuencia blanco.

Pudimos demostrar tanto experimentalmente como también de manera *in silico* que la secuencia blanco de la PCR-*yagE* se encuentra presente en todas las cepas analizadas. Este resultado nos permite inferir que la PCR diseñada tiene la potencialidad de identificar a los distintos aislamientos de *C. fetus* que circulan en diferentes países y en distintos hospedadores.

2.2. Identificación subespecie- específica de *Campylobacter fetus*

2.2.1. Diseño racional de una PCR específica para las subespecies de

Campylobacter fetus

De acuerdo a la bibliografía existente, la producción de H₂S es un rasgo exclusivo de las cepas Cff y Cfv y se ha utilizado ampliamente para la caracterización de cepas en el diagnóstico diferencial de la CGB (OIE, 2021). Dicho gas es producido a partir del aminoácido L-cisteína y su liberación puede ser estudiada bioquímicamente. Si bien con el advenimiento de las técnicas moleculares, esta tipificación clásica ha sido muy cuestionada, no hay evidencias suficientes para descartar completamente su empleo.

Un trabajo reciente postuló que una delección en un transportador de L-cisteína (L-cys), interrumpe la producción de H₂S en las cepas de Cfv (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a). En el marco de este antecedente, se diseñó una PCR-multiplex dirigida al operón que codifica al transportador de este aminoácido. El diseño está basado en el empleo de tres oligonucleótidos iniciadores, un “*Forward*” y dos “*Reverse*”, que permiten obtener un producto de amplificación diferencial para cada subespecie (Figura 13A).

Para la puesta a punto del protocolo, se utilizó como templado el ADN obtenido a partir de la lisis de cultivos bacterianos de distintas cepas de *C. fetus*: Cff 08-421, Cff 96-136, Cfv 06-341, Cfv 97/608, Cfv 03-596 y Cfv 95-258 (Figura 13B).

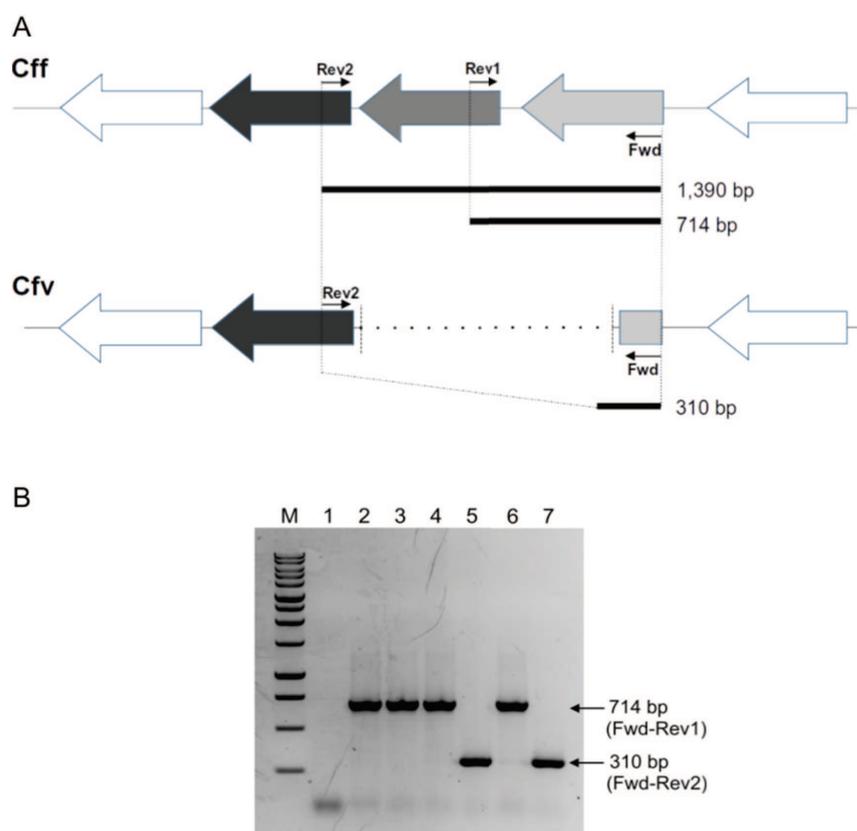


Figura 13. PCR-transportador L-Cys. (A) Representación esquemática de la organización de los genes que codifican el transportador de L-Cys en *C. fetus*, donde se muestran las regiones blanco de los oligonucleótidos iniciadores y los productos esperados de la PCR. La flecha gris representa el gen codificante de la proteína permeasa YckJ (*locus tag* CFF8240_RS03850 en el genoma de Cff 82-40) que está eliminado en las cepas Cfv. La flecha de color gris claro representa el gen que codifica para la proteína de unión extracelular YckK (*locus tag* CFF8240_RS03855), que está parcialmente eliminado en Cfv. El gen que codifica para la proteína de unión a ATP (*locus tag* CFF8240_RS03845), que es otro componente del transportador, se conserva en ambas subespecies y está representado por la flecha negra. (B) Separación electroforética del producto de PCR en gel de agarosa 1,5%. Calle 1: control negativo (agua); calle 2: Cff 08-421; calle 3: Cff 96-136; calle 4: Cffi 06-341; calle 5: Cfv 97/608; calle 6: Cffi 03-596 y calle 7: Cfv 95-258. M: Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

De acuerdo a lo esperado, en las cepas Cff y Cffi se obtuvo un producto de 714 pb (hibridación del oligonucleótido 'Fwd' y el 'Rev1') y este resultado coincidió con una versión completa del operón transportador de L-Cys. Dicho patrón se denominó "CFF/CFVI, ya que estas cepas son capaces de producir el gas (Figura 13A-B). En cambio, para las cepas Cfv, se obtuvo un producto de 310 pb (hibridación del oligonucleótido 'Fwd' y el 'Rev2'), equivalente a un operón parcialmente deletado, y este perfil se denominó "CFV" ya que se corresponde con cepas no productoras de H₂S (Figura 13A-B). En las condiciones establecidas, el producto de 1.390 pb no se obtuvo con ninguna cepa. La ausencia

del producto de 1.390 pb ocurrió exclusivamente cuando se empleó el kit de Promega en las condiciones detalladas en Materiales y métodos. Este aspecto fue considerado positivo ya que simplificó el análisis de los resultados.

Este protocolo se denominó PCR-transportador L-Cys y permitiría entonces identificar de manera eficiente y rápida a los aislamientos de *C. fetus* de acuerdo a la producción de H₂S.

2.2.2. Estudio de la PCR-transportador L-Cys en aislamientos locales

Con el objetivo de evaluar el desempeño de la PCR-multiplex desarrollada sobre un panel más amplio de aislamientos de nuestro país, aplicamos dicho protocolo sobre 36 aislamientos de *C. fetus* obtenidos a partir de muestras clínicas bovinas (Cff, n: 22; Cfv, n: 6; Cfv_i, n: 8) y cuatro aislamientos de otras especies de *Campylobacter* (Tabla 6).

Para la comparación de los resultados, en cada aislamiento se contempló tanto su fenotipificación (tipificación original realizada en el Laboratorio de Bacteriología de la EEA-Balcarce) como también su subtipificación según la PCR descrita por Hum y col. (1997) (gen *csp* y *parA*, secuencias blanco descriptas como específicas para la especie *C. fetus* y la subespecie *venerealis*, respectivamente).

Tabla 6. PCR-transportador L-Cys: Análisis de aislamientos argentinos de *C. fetus* y de otras *Campylobacter* spp. (continúa en las siguientes páginas)

Cepa	Origen ^(a)	Pruebas bioquímicas ^(b)			ID según Hum y col. ^(c)			Patrón PCR transportador L-Cys ^(d)
		Tolerancia 1% Glicina	Producción H ₂ S	ID	<i>csp</i>	<i>parA</i>	ID	
Cff 96-136	Bahía Blanca, BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff 08-421	Gral. López, SF	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff 14-284	Pila, BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff 04-240	Olavarría, BA	+	+	Cff	-	+	-	CFF/CFVI
Cff 13-344	Balcarce, BA	+	+	Cff	+	-	Cff/Cfv _i	CFF/CFVI
Cff 11-572	Balcarce, BA	+	+	Cff	+	-	Cff/Cfv _i	CFF/CFVI
Cff 89-222	Balcarce, BA	+	+	Cff	-	+	-	CFF/CFVI
Cff 90-189	Balcarce, BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff CI N3	Balcarce, BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff 01-165	Santa Rosa, LP	+	+	Cff	+	-	Cff/Cfv _i	CFF/CFVI
Cff 01-64	Balcarce, BA	+	+	Cff	+	-	Cff/Cfv _i	CFF/CFVI
Cff 05-622	Cnel. Dorrego, BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff 11-262	Balcarce, BA	+	+	Cff	+	-	Cff/Cfv _i	CFF/CFVI

Cepa	Origen ^(a)	Pruebas bioquímicas ^(b)			ID según Hum y col. ^(c)			Patrón PCR transportador L-Cys ^(d)
		Tolerancia 1% Glicina	Producción H ₂ S	ID	<i>csp</i>	<i>parA</i>	ID	
Cff 11-295	Saladillo, BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff 11-360	Necochea, BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff 11-685	Balcarce, BA	+	+	Cff	+	-	Cff/Cfvi	CFF/CFVI
Cff 11-408	Necochea, BA	+	+	Cff	+	-	Cff/Cfvi	CFF/CFVI
Cff btu5	BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff btu6	BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff btu7	BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff 18-09	BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cff 18-100	BA	+	+	Cff	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cfv 97/608	Hucal, LP	-	-	Cfv	+	+	Cfv	CFV
Cfv 95-258	Mar Chiquita, BA	-	-	Cfv	+	+	Cfv	CFV
Cfv 08-382	Gral. Belgrano, BA	-	-	Cfv	+	+	Cfv	CFV
Cfv 05-355	Balcarce, BA	-	-	Cfv	+	+	Cfv	CFV
Cfv 98-25	Gral. Pueyrredón, BA	-	-	Cfv	+	+	Cfv	CFV
Cfv 19-01	BA	-	-	Cfv	+	+	Cfv	CFV
Cfvi 06-341	Pehuajó BA	-	+	Cfvi	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cfvi 03-596	Pehuajó, BA	-	+	Cfvi	+	-	Cff/Cfvi	CFF/CFVI
Cfvi 02-146	BA	-	+	Cfvi	-	+	-	CFF/CFVI
Cfvi 98-472	Azul, BA	-	+	Cfvi	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cfvi 99-541	Balcarce, BA	-	+	Cfvi	+	-	Cff/Cfvi	CFF/CFVI
Cfvi 07-379	Mar Chiquita, BA	-	+	Cfvi	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cfvi 00-305	BA	-	+	Cfvi	+	+	Cfv	CFF/CFVI
Cfvi 03-596	Pehuajó, BA	-	+	Cfvi	+	-	Cff/Cfvi	CFF/CFVI
<i>C. sputorum</i> 08-209	Balcarce, BA	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-
<i>C. coli</i> NCTC11353	UK	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-
<i>C. hyointestinalis</i> NCTC11562	UK	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i> NCTC11392	UK	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-

^(a) BA, provincia de Buenos Aires; LP, provincia de La Pampa; SF, provincia de Santa Fe.

^(b) Fenotipificación mediante pruebas bioquímicas. (“+”) y (“-”) significan positivo y negativo, respectivamente para cada prueba empleada; n.d.: no determinado.

^(c) PCR Hum y col. (1997), “Cfv” significa que la cepa ha sido subtipificada como *C. fetus* subesp. *venerealis* debido a la amplificación de los productos correspondientes a las secuencias blanco *csp* (“+”) y *parA* (“+”). “Cff” significa que la cepa ha sido subtipificada como *C. fetus* subesp. *fetus* debido a la amplificación del producto correspondiente a la secuencia blanco *csp* (“+”) y ausencia de *parA*.

^(d) PCR-transportador L-Cys. “Patrón CFF/CFVI” significa que todos los componentes del transportador de L-Cys están presentes y, por tanto, se obtiene un producto de 714 pb. “Patrón CFV” significa que el transportador

de L-Cys está parcialmente deletado y se obtiene un producto de 310 pb. (“-”) significa ausencia del producto de amplificación.

Los resultados obtenidos con la PCR-transportador L-Cys fueron totalmente concordantes con la prueba de producción de H₂S. Mientras que se obtuvo una pobre consistencia ($\kappa=0,134$) entre la subtipificación molecular propuesta por Hum y col. (1997) y la tipificación mediante pruebas fenotípicas (Tabla 7). Dicho resultado en parte era esperable ya que las secuencias blanco de la PCR de Hum y col. se basan en distintos genes, cuya función no se encuentra relacionada con la producción de H₂S.

Tabla 7. Cálculo del coeficiente Kappa de Cohen’s entre la fenotipificación reportada y la genotipificación según la PCR de Hum y col. Se incluyó el conjunto de datos de la Tabla 6 que comprende 36 cepas de *C. fetus*. El análisis mostró una pobre concordancia ($\kappa = 0,134$).

		PCR Hum y col. (gen <i>parA</i>)	
		Cff/Cfvi (-)	Cfv
Producción H ₂ S y PCR-transportador L-cys	Cff/Cfvi	10	21
	Cfv	0	6

2.2.3. Análisis *in silico* de la PCR-transportador L-Cys

Con el objetivo de extender el análisis de la PCR-transportador L-Cys a cepas de otros países y hospedadores, se abordó un análisis *in silico* de secuencias genómicas de *C. fetus*. Para ello, se aplicó la misma estrategia de PCR *in silico* empleada para la PCR-*yagE* (mencionada en la sección anterior), sobre 214 genomas completos de *C. fetus* disponibles en Genbank con el mismo abordaje (Tabla 8).

A través de este programa, se pudo visualizar que los sitios de hibridación de los oligonucleótidos iniciadores se encuentran muy conservados en estas cepas. Esta observación, nos permitió definir el tipo de operón transportador de L-Cys en 213 de las 214 cepas de *C. fetus* estudiadas (Tabla 8).

La excepción ocurrió con el genoma de la cepa Cfv Azul-94 (primera cepa de *C. fetus* secuenciada y remitida al Genbank) (Moolhuijzen et al., 2009) debido a que los sitios blanco de hibridación de los oligonucleótidos iniciadores ‘Fwd’ y ‘Rev2’ se encontraban en diferentes *contigs*. En

consecuencia, el tamaño del producto fue difícil de estimar debido a que el genoma está representado en 1.193 *contigs* y, en consecuencia, con esta cepa no tuvimos resultados concluyentes.

Tabla 8. PCR *in silico*: Análisis de las secuencia de genomas completos disponibles en bases de datos públicas. (continúa en las siguientes páginas)

ID	Cepa	Hospedador	Fuente	País ^(a)	Código de Acceso	Producción H ₂ S (Ref.)	Patrón PCR transportador L-Cys ^(b)
Cff	04-554	Bovino	Feto abortado	AR	CP008808–CP008809	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFF/CFVI
Cff	08-421	Bovino	Feto abortado	AR	SOOT00000000	+ (Éste trabajo)	CFF/CFVI
Cff	110800-21-2	Bovino	Prepucio	NL	LSZN00000000	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFF/CFVI
Cff	13-344	Bovino	Feto abortado	AR	SOYX00000000	+ (Éste trabajo)	CFF/CFVI
Cff	82-40	Humano	Sangre	US	CP000487	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cff	Cff98/v445	Bovino	Prepucio	UK	LMBH00000000	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cff	ATCC 27374	Ovino	Feto (cerebro)	n.d.	MKEI00000000	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cff	BT 10/98	Ovino	n.d.	UK	LRAL00000000	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cff	NCTC10842	n.d.	n.d.	n.d.	LS483431	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cff	B0042	Bovino	Heces	UK	ERR419595	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0047	Bovino	Heces	UK	ERR419600	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0066	Bovino	Heces	UK	ERR419653	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0097	Bovino	Heces	UK	ERR419653	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0129	Bovino	Heces	UK	ERR419637	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0130	Bovino	Heces	UK	ERR419638	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0131	Bovino	Heces	UK	ERR419639	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0151	Bovino	Heces	UK	ERR419648	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0152	Bovino	Heces	UK	ERR419649	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0167	Bovino	Heces	UK	ERR460866	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cff	B0168	Bovino	Heces	UK	ERR460867	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI

ID	Cepa	Hospedador	Fuente	País ^(a)	Código de Acceso	Producción H ₂ S (Ref.)	Patrón PCR transportador L-Cys ^(b)
Cff	S0693A	Bovino	Heces	UK	ERR419284	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVIh
Cff	S0478D	Bovino	Heces	UK	ERR419653	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a)	CFF/CFVI
Cfvi	01-165	Bovino	Mucus	AR	CP014568–CP014570	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cfv	84-112	Bovino	Genital secretion	US	HG004426–HG004427	- (van Bergen et al., 2005a)	CFV
Cfv	97/608	Bovino	Placenta	AR	CP008810–CP008812	- (van Bergen et al., 2005a)	CFV
Cfv	ADRI 1362	Bovino	n.d.	AR	LREX00000000	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFF/CFVI
Cfv	ADRI513	n.d.	n.d.	AU	LRFA00000000	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFF/CFVI
Cfv	B10	Bovino	n.d.	US	LRET00000000	- (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFV
Cfv	CCUG 33872	Bovino	Feto abortado	CZ	LREU00000000	-/+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFF/CFVI
Cfv	CCUG 33900	Bovino	Feto abortado	FR	LREV00000000	- (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFV
Cfv	LMG 6570	Bovino	n.d.	BE	LREW00000000	- (van Bergen et al., 2005a)	CFV
Cfv	NCTC 10354	Bovino	Mucus	UK	CM001228	- (van Bergen et al., 2005a)	CFV
Cfv	WBT 011/09	n.d.	n.d.	UK	LMBI00000000	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFF/CFVI
Cfv	zaf3	Bovino	Feto abortado	SA	LREZ00000000	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFF/CFVI
Cfv	zaf65	Bovino	n.d.	SA	LREY00000000	+ (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a)	CFF/CFVI
Cfvi	02-298	Bovino	Feto abortado	AR	LRVK00000000	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cfvi	03-293	Bovino	Feto abortado	AR	CP0006999–CP007002	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cfvi	03-596	Bovino	Feto abortado	AR	LRAM00000000	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cfvi	06-341	Bovino	Feto abortado	AR	SOYW00000000	+ (Este trabajo)	CFF/CFVI
Cfvi	92-203	Bovino	Placenta	AR	LRVL00000000	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cfvi	97-532	Bovino	Mucus	AR	LRER00000000	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cfvi/ Cfv	98-25	Bovino	Feto abortado	AR	LRES00000000	+/-/- (van Bergen et al., 2005a; van der Graaf-van Bloois et al., 2016a, éste trabajo)	CFV
Cfvi	99-541	Bovino	Prepucio	AR	ASTK00000000	+ (van Bergen et al., 2005a)	CFF/CFVI
Cff	H1-UY	Humano	Sangre	UY	JYCP00000000	n.d.	CFF/CFVI
Cff	HC1	Humano	Sangre	UY	QJTR00000000	n.d.	CFF/CFVI

ID	Cepa	Hospedador	Fuente	País ^(a)	Código de Acceso	Producción H ₂ S (Ref.)	Patrón PCR transportador L-Cys ^(b)
Cff	HC2	Humano	Fluido cerebroes pinal	UY	QJTS00000000	n.d.	CFF/CFVI
Cff	CIT01	Humano	Cultivo de sangre periférica	IR	RBHV00000000	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	642-21	Bovino	Útero	AU	AJSG00000000	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	66Y	Bovino	Prepucio	CA	JPQC00000000	n.d.	CFV
Cfv	Azul-94	Bovino	Feto abortado	AR	ACLG00000000	n.d.	n.d.
Cfv	B6	Bovino	Vagina	AU	AJMC00000000	n.d.	CFV
Cfv	TD	Bovino	Prepucio	CA	JPPC00000000	n.d.	CFV
Cf	MMM01	Humano	Sepsis	IN	JRXX00000000	n.d.	CFF/CFVI
Cff	99-801	Bovino	Prepucio	AR	ERS739235	n.d.	CFF/CFVI
Cff	00-398	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739236	n.d.	CFF/CFVI
Cff	00-564	Bovino	Prepucio	AR	ERS739237	n.d.	CFF/CFVI
Cff	01-320	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739238	n.d.	CFF/CFVI
Cff	01-210	Bovino	Mucus vaginal	AR	ERS739239	n.d.	CFF/CFVI
Cff	04-875	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739242	n.d.	CFF/CFVI
Cff	05-394	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739243	n.d.	CFF/CFVI
Cff	05-434	Bovino	Mucus vaginal	AR	ERS739244	n.d.	CFF/CFVI
Cff	06-340	Bovino	Prepucio	AR	ERS739245	n.d.	CFF/CFVI
Cff	07-485	Bovino	Mucus vaginal	AR	ERS739248	n.d.	CFF/CFVI
Cff	08-362	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739249	n.d.	CFF/CFVI
Cff	10-247	Bovino	Prepucio	AR	ERS739250	n.d.	CFF/CFVI
Cff	10-445	Bovino	Prepucio	AR	ERS739251	n.d.	CFF/CFVI
Cff	11-360	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739252	n.d.	CFF/CFVI
Cff	11-427	Bovino	Mucus vaginal	AR	ERS739253	n.d.	CFF/CFVI
Cff	14-270	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739254	n.d.	CFF/CFVI
Cff	15-301	Bovino	Mucus vaginal	AR	ERS739255	n.d.	CFF/CFVI
Cfvi	02-146	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739240	n.d.	CFF/CFVI
Cfvi	06-195	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739246	n.d.	CFF/CFVI
Cfvi	07-379	Bovino	Feto abortado	AR	ERS739247	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2006/367h	Humano	Fluido cerebroes pinal	FR	ERS672242	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2006/479h	Humano	Heces	FR	ERS672243	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2006/588h	Humano	Fluido cerebroes pinal	FR	ERS672244	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2006/621h	Humano	Sangre	FR	ERS672245	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2006/649h	Humano	Heces	FR	ERS672246	n.d.	CFF/CFVI

ID	Cepa	Hospedador	Fuente	País ^(a)	Código de Acceso	Producción H ₂ S (Ref.)	Patrón PCR transportador L-Cys ^(b)
Cff	2008/170h	Humano	Heces	FR	ERS672247	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2008/568h	Humano	Fluido articular	FR	ERS672248	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2008/604h	Humano	Heces	FR	ERS672249	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2008/691h	Humano	Fluido cerebroes pinal	FR	ERS672250	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2008/755h	Humano	Sangre	FR	ERS672251	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2008/898h	Humano	Sangre	FR	ERS672252	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2010/41h	Humano	Heces	FR	ERS672253	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2010/524h	Humano	Riñon	FR	ERS672254	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2010/1094h	Humano	Sangre	FR	ERS672255	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2010/1119h	Humano	Heces	FR	ERS672256	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2010/1180h	Humano	Sangre	FR	ERS672257	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2012/60h	Humano	Heces	FR	ERS672258	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2012/185h	Humano	Sangre	FR	ERS672259	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2012/286h	Humano	Sangre	FR	ERS672260	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2012/331h	Humano	Sangre	FR	ERS672261	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2012/879h	Humano	Heces	FR	ERS672263	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2012/1045h	Humano	Fluido articular	FR	ERS672264	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2014/52h	Humano	Fluido cerebroes pinal	FR	ERS672265	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2014/602h	Humano	Sangre	FR	ERS672266	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2014/790h	Humano	Sangre	FR	ERS672267	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2014/947h	Humano	Sangre	FR	ERS672269	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2014/1097h	Humano	Heces	FR	ERS672270	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2007/123h	Humano	Fluido cerebroes pinal	FR	ERS672271	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2009/56h	Humano	Fluido cerebroes pinal	FR	ERS672272	n.d.	CFF/CFVI
Cff	CF156	Humano	Sangre	TR	ERS672273	n.d.	CFF/CFVI
Cffi	21-C0091-10-14_2	Bovino	Prepucio	UK	ERS672276	n.d.	CFF/CFVI
Cff	GTC_08732	Humano	Fluido cerebroes pinal	JP	ERS672218	n.d.	CFF/CFVI
Cff	GTC_11236	Humano	Heces	JP	ERS672220	n.d.	CFF/CFVI
Cff	96-48	Humano	Heces	JP	ERS672224	n.d.	CFF/CFVI
Cff	01-187	Humano	Sangre	JP	ERS672226	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2004/103h	Humano	Fluido cerebroes pinal	FR	ERS672233	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2004/199h	Humano	Fluido cerebroes pinal	FR	ERS672234	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2004/359h	Humano	Sangre	FR	ERS672235	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2004/362h	Humano	Placenta	FR	ERS672236	n.d.	CFF/CFVI

ID	Cepa	Hospedador	Fuente	País ^(a)	Código de Acceso	Producción H ₂ S (Ref.)	Patrón PCR transportador L-Cys ^(b)
Cff	2004/526h	Humano	Heces	FR	ERS672237	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2004/598h	Humano	Sangre	FR	ERS672238	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2004/605h	Humano	Heces	FR	ERS672239	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2004/637h	Humano	Fluido articular	FR	ERS672240	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2006/222h	Humano	Sangre	FR	ERS672241	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID111063	Humano	Sangre	CA	ERS739225	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID117228	Humano	Sangre	CA	ERS739226	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID129038	Humano	Sangre	CA	ERS739227	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID131159	Humano	Heces	CA	ERS739228	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID134381	Humano	Heces	CA	ERS739229	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID136207	Humano	Sangre	CA	ERS739230	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID136551	Humano	Sangre	CA	ERS739231	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID136656	Humano	Sangre	CA	ERS739232	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID136706	Humano	Sangre	CA	ERS739233	n.d.	CFF/CFVI
Cff	ID132939	Humano	Sangre	CA	ERS739234	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2975	Humano	Sangre	TW	ERS739256	n.d.	CFF/CFVI
Cff	923	Humano	Sangre	TW	ERS739257	n.d.	CFF/CFVI
Cff	7035	Humano	Sangre	TW	ERS739258	n.d.	CFF/CFVI
Cff	My5726	Humano	Sangre	TW	ERS739259	n.d.	CFF/CFVI
Cff	1592	Humano	Sangre	TW	ERS739260	n.d.	CFF/CFVI
Cff	1830	Humano	Sangre	TW	ERS739261	n.d.	CFF/CFVI
Cff	8468	Humano	Sangre	TW	ERS739262	n.d.	CFF/CFVI
Cff	0003304-2	Humano	Sangre	TW	ERS739263	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2115	Humano	Sangre	TW	ERS739264	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2819	Humano	Sangre	TW	ERS739265	n.d.	CFF/CFVI
Cff	5871	Humano	Sangre	TW	ERS739266	n.d.	CFF/CFVI
Cff	1666	Humano	Sangre	TW	ERS739267	n.d.	CFF/CFVI
Cff	9502	Humano	Sangre	TW	ERS739270	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	800	Humano	Sangre	TW	ERS739271	n.d.	CFF/CFVI
Cff	8031708	Humano	Sangre	TW	ERS739272	n.d.	CFF/CFVI
Cff	8025552	Humano	Sangre	TW	ERS739273	n.d.	CFF/CFVI
Cff	3069482	Humano	Sangre	TW	ERS739274	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	C1	Bovino	Prepucio	SP	ERS739275	n.d.	CFV
Cfv	C2	Bovino	Prepucio	SP	ERS739276	n.d.	CFV
Cff	C3	Bovino	Prepucio	SP	ERS739277	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C4	Bovino	Prepucio	SP	ERS739278	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C5	Bovino	Prepucio	SP	ERS739279	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	C6	Bovino	Prepucio	SP	ERS739280	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C7	Bovino	Prepucio	SP	ERS739281	n.d.	CFV
Cff	C8	Bovino	Prepucio	SP	ERS739282	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C11	Bovino	Prepucio	SP	ERS739285	n.d.	CFF/CFVI

ID	Cepa	Hospedador	Fuente	País ^(a)	Código de Acceso	Producción H ₂ S (Ref.)	Patrón PCR transportador L-Cys ^(b)
Cfi	C12	Bovino	Prepucio	SP	ERS739286	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C13	Bovino	Prepucio	SP	ERS739287	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C14	Bovino	Prepucio	SP	ERS739288	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C15	Bovino	Prepucio	SP	ERS739289	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C16	Bovino	Prepucio	SP	ERS739290	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C17	Bovino	Prepucio	SP	ERS739291	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	C19	Bovino	Prepucio	SP	ERS739293	n.d.	CFV
Cff	C20	Bovino	Prepucio	SP	ERS739294	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C21	Bovino	Prepucio	SP	ERS739295	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	C22	Bovino	Prepucio	SP	ERS739296	n.d.	CFV
Cfv	C23	Bovino	Prepucio	SP	ERS739297	n.d.	CFV
Cfv	C24	Bovino	Prepucio	SP	ERS739298	n.d.	CFV
Cfv	C25	Bovino	Prepucio	SP	ERS739299	n.d.	CFV
Cfi	C26	Bovino	Prepucio	SP	ERS739300	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	C27	Bovino	Prepucio	SP	ERS739301	n.d.	CFV
Cfi	C28	Bovino	Prepucio	SP	ERS739302	n.d.	CFF/CFVI
Cff	C29	Bovino	Prepucio	SP	ERS739303	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	C30	Bovino	Prepucio	SP	ERS739304	n.d.	CFV
Cfi	C31	Bovino	Prepucio	SP	ERS739305	n.d.	CFF/CFVI
Cfi	C32	Bovino	Prepucio	SP	ERS739306	n.d.	CFF/CFVI
Cfi	C33	Bovino	Prepucio	SP	ERS739307	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	C34	Bovino	Prepucio	SP	ERS739308	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	BS 201/02	Bovino	Prepucio	GE	ERS686632	n.d.	CFV
Cfv	BS 76/04	Bovino	Feto abortado	GE	ERS686633	n.d.	CFV
Cfv	BS 38/06	Bovino	Prepucio	GE	ERS686634	n.d.	CFV
Cfv	07BS020	Bovino	Prepucio	GE	ERS686635	n.d.	CFV
Cfv	08CS0024	Bovino	Prepucio	GE	ERS686636	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	09CS0030	Bovino	Prepucio	GE	ERS686637	n.d.	CFV
Cfv	11CS0190	Bovino	Prepucio	GE	ERS686638	n.d.	CFV
Cfv	11CS0191	Bovino	Prepucio	GE	ERS686639	n.d.	CFV
Cfv	13CS0183	Bovino	Prepucio	GE	ERS686640	n.d.	CFV
Cfv	14CS0001	Bovino	Prepucio	GE	ERS686641	n.d.	CFV
Cff	BS 456/99	Ovino	Feto abortado	GE	ERS686642	n.d.	CFF/CFVI
Cff	BS 458/99	Bovino	Feto abortado	GE	ERS686643	n.d.	CFF/CFVI
Cff	BS 03/04	Bovino	Feto abortado	GE	ERS686644	n.d.	CFF/CFVI
Cff	BS 91/05	Bovino	Prepucio	GE	ERS686645	n.d.	CFF/CFVI
Cff	08CS0027	Bovino	Prepucio	GE	ERS686646	n.d.	CFF/CFVI
Cff	11CS0098	Ovino	Placenta	GE	ERS686648	n.d.	CFF/CFVI
Cff	12CS0302	Bovino	Prepucio	GE	ERS686649	n.d.	CFF/CFVI
Cff	13CS0001	Bovino	Prepucio	GE	ERS686650	n.d.	CFF/CFVI

ID	Cepa	Hospedador	Fuente	País ^(a)	Código de Acceso	Producción H ₂ S (Ref.)	Patrón PCR transportador L-Cys ^(b)
Cff	13CS0373	Mono	Heces	GE	ERS686651	n.d.	CFF/CFVI
Cff	001A-0374	Humano	Sangre	CA	ERS686652	n.d.	CFF/CFVI
Cff	001A-0648	Humano	Sangre	CA	ERS686653	n.d.	CFF/CFVI
Cff	LR133	Ovino	Feto abortado	NZ	ERS846544	n.d.	CFF/CFVI
Cff	1	Bovino	Prepucio	UK	ERS846553	n.d.	CFF/CFVI
Cff	2	Bovino	Prepucio	UK	ERS846554	n.d.	CFF/CFVI
Cff	3	Ovino	Placenta	UK	ERS846555	n.d.	CFF/CFVI
Cff	4	Ovino	Placenta	UK	ERS846556	n.d.	CFF/CFVI
Cff	5	Ovino	Placenta	UK	ERS846557	n.d.	CFF/CFVI
Cff	6	Bovino	Prepucio	UK	ERS846558	n.d.	CFF/CFVI
Cff	7	Ovino	Feto abortado	UK	ERS846559	n.d.	CFF/CFVI
Cff	8	Ovino	Feto abortado	UK	ERS846560	n.d.	CFF/CFVI
Cff	9	Ovino	Placenta	UK	ERS846561	n.d.	CFF/CFVI
Cff	12	Ovino	Placenta	UK	ERS846562	n.d.	CFF/CFVI
Cff	13	Bovino	Prepucio	UK	ERS846563	n.d.	CFF/CFVI
Cff	14	Ovino	Placenta	UK	ERS846564	n.d.	CFF/CFVI
Cff	15	Ovino	Placenta	UK	ERS846565	n.d.	CFF/CFVI
Cff	17	Ovino	Feto abortado	UK	ERS846566	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	JCM_2528	Bovino	Mucus vaginal	UK	ERS846567	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	161/97	Bovino	Prepucio	BR	ERS846568	n.d.	CFF/CFVI
Cfv	515/98	Bovino	Prepucio	BR	ERS846569	n.d.	CFF/CFVI

^(a) Código de país: US, Estados Unidos; AR, Argentina; UK, Reino Unido; CZ, República Checa; FR, Francia; AU, Australia; CA, Canadá; SA, Sudáfrica; NL, Países Bajos; UY, Uruguay; BE, Bélgica; IR, Irlanda; IN, India; TR, Turquía; JP, Japón; TW, Taiwán; SP, España; GE, Alemania; BR, Brasil. N.d.: No disponible.

^(b) “Patrón CFF/CFVI” significa que el transportador de L-Cys está completo y ocurre la hibridación del par de oligonucleótidos Fwd-Rev1-templado obteniéndose un producto de 714 pb. El “patrón CFV” significa que el transportador de L-Cys está parcialmente delecionado y ocurre la hibridación del par de oligonucleótidos Fwd-Rev2-templado, y se obtiene un producto de 310 pb.

Por otro lado, los datos de producción de H₂S se encuentran disponibles para 43/214 de cepas estudiadas, de los cuales 3 datos corresponden a este trabajo y los 40 restantes fueron tomadas de la literatura (van Bergen et al., 2005a; van der Graaf-Van Bloois et al., 2014a; 2016a; Willoughby et al., 2005). Sin embargo, dos de las cepas evaluadas han mostrado resultados discrepantes en distintos trabajos y fueron excluidas de este análisis.

Curiosamente, todas las cepas productoras de H₂S mostraron un patrón CFF/CFVI, mientras que las cepas no productoras de H₂S, presentaron un patrón CFV ($\kappa = 1$) (Tabla 9).

Tabla 9. Cálculo del coeficiente Kappa de Cohen entre el resultado reportado por la prueba de producción de H₂S y la PCR-transportador L-Cys. Se incluyó el conjunto de datos de la Tabla que comprende 43 cepas. El análisis mostró una concordancia perfecta ($\kappa = 1$).

		Producción de H ₂ S deducida a partir de la L-Cys-PCR <i>in silico</i>	
		+ (frag. 712 pb)	- (frag. 310 pb)
Producción H ₂ S	+	36	0
	-	0	7

No obstante, 14 de las 43 cepas que se remitieron como Cfv a la base de datos del NCBI no coincidían con los criterios de un transportador de L-Cys deletado para esta subespecie. Dichas cepas mostraron, en cambio, un patrón CFF/CFVI (Tabla 8).

Esta situación también se reflejó en el análisis global *in silico*, en el que se pudo obtener el resultado esperado en el 92% (197/213) de las cepas (una cepa con identificación de subespecie no concluyente fue excluida del análisis). Esta discrepancia parcial podría atribuirse a los diferentes métodos empleados para determinar la subespecie y esta información no está disponible para la mayoría de las cepas utilizadas en este estudio *in silico*.

Como prueba de concepto, evaluamos seis cepas locales de campo (Cff 08-421, Cff 13-344, Cfv 97/608, Cfv 98-25, Cfv 99-541 y Cfv 06-341) mediante el abordaje experimental e *in silico*. Las mismas fueron seleccionadas de la colección de *C. fetus* por la disponibilidad de su secuencia genómica. Como era de esperar, el resultado fue coincidente entre ambas estrategias (Tabla 8).

La performance de la PCR-transportador L-Cys, tanto experimental como *in silico*, nos permite inferir su potencialidad para reemplazar a la prueba bioquímica de producción de H₂S para caracterizar las cepas de *C. fetus*.

3. Diseño y evaluación de la PCR-*yagE* en tiempo real sobre muestras clínicas.

Los métodos de PCR en tiempo real se han empleado ampliamente en los laboratorios debido a su sensibilidad y capacidad operativa ya que combina la amplificación y la detección en un mismo paso (Kieser et al., 1990). Hoy en día existen diferentes protocolos de PCR en tiempo real, algunos de los cuales implementan sondas fluorescentes para la detección mientras que otros, emplean colorantes que se intercalan con el ADN de doble cadena. Esta última opción es menos costosa al omitir la

necesidad de una sonda y la especificidad de los productos de amplificación puede analizarse mediante el análisis de las curvas de disociación (o curva de temperatura de *melting*).

Con el fin de evaluar la PCR-*yagE* como herramienta para el diagnóstico molecular de la CGB potencialmente aplicable en planes de control, se diseñó un ensayo de PCR en tiempo real con SYBR Green para detectar la presencia de *C. fetus*. Se analizaron con esta PCR muestras de smegma prepucial y mucus cérvico vaginal, utilizando el equipo Applied Biosystems StepOnePlus. Las muestras empleadas de smegma prepucial provienen de un modelo de infección experimental realizado en la EEA-Balcarce por el grupo de trabajo del Dr. Paolicchi, mientras que las muestras de mucus cérvico vaginal corresponden a muestras de campo de rodeos con diagnóstico positivo de CGB, provistas por el mismo grupo de trabajo.

Para determinar la eficiencia de amplificación de la PCR-*yagE* en tiempo real se empleó la misma curva estándar que se utilizó para la PCR-*yagE* de punto final detallada en la sección 2.1.2. El ADN_g se purificó a partir de la cepa Cff 04-554. Se seleccionaron 5 puntos de la curva estándar a fin de cubrir un rango de concentración desde 50 pg/μL a 5 fg/μL (Figura 14).

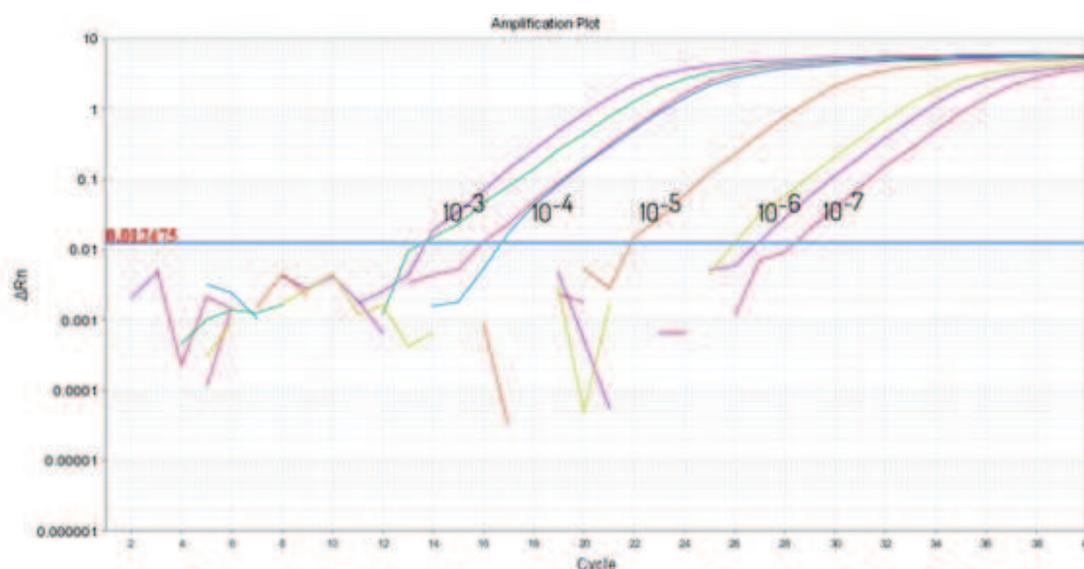


Figura 14. Representación gráfica del cambio logarítmico de la fluorescencia (ΔR_n) frente al número de ciclos. En este gráfico se observa el aumento gradual de la fluorescencia a medida que aumenta el número de ciclos en la amplificación de los 5 puntos de la curva estándar (50 pg/μL - 5 fg/μL). R_n es el cociente entre la intensidad de la fluorescencia del SYBR Green (colorante reportero) y la intensidad de la fluorescencia del colorante de referencia pasiva ROX (6-carboxil-X-rodamina). El ROX fue empleado para normalizar las fluctuaciones de la señal de fluorescencia no relacionadas con la PCR. ΔR_n (Delta R_n) es la magnitud de la señal generada durante la amplificación y se utiliza para determinar el Ct (o umbral de ciclos). El término Ct hace

referencia al número de ciclos en el que la señal fluorescente cruza el umbral, el cual se define como el nivel de la señal fluorescente que representa un incremento estadísticamente significativo respecto al nivel basal.

La interpretación de los resultados de la PCR en tiempo real se puede expresar como el número de ciclos de la PCR (“umbral de ciclo”, Ct) necesarios para alcanzar un nivel determinado de fluorescencia. Se obtuvo señal luego de 14 ciclos de amplificación (Figura 14). Durante la fase exponencial de la PCR, la fluorescencia se duplicó en cada ciclo hasta que la intensidad de la señal fluorescente comenzó a estabilizarse a partir de los 28 ciclos (saturación). Al ser el Ct proporcional al logaritmo de la cantidad inicial de la muestra, la concentración relativa de las 5 diluciones seriadas evaluadas se reflejó en la diferencia del número de ciclos (Δ Ct) necesarios para alcanzar el mismo nivel de fluorescencia. Los resultados mostraron que la PCR en tiempo real fue capaz de detectar 5 fg/ μ L (Figura 14).

Por otro lado, los intervalos de Ct entre cada dilución para la PCR en tiempo real oscilaron entre 3 y 4 ciclos y se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,987 para la curva estándar, con un valor de pendiente de la curva de $-4,04$ y una eficiencia del ensayo de 76,8% (Figura 15). Estos valores sugieren una buena correlación entre los valores Ct y las concentraciones del ADN templado.

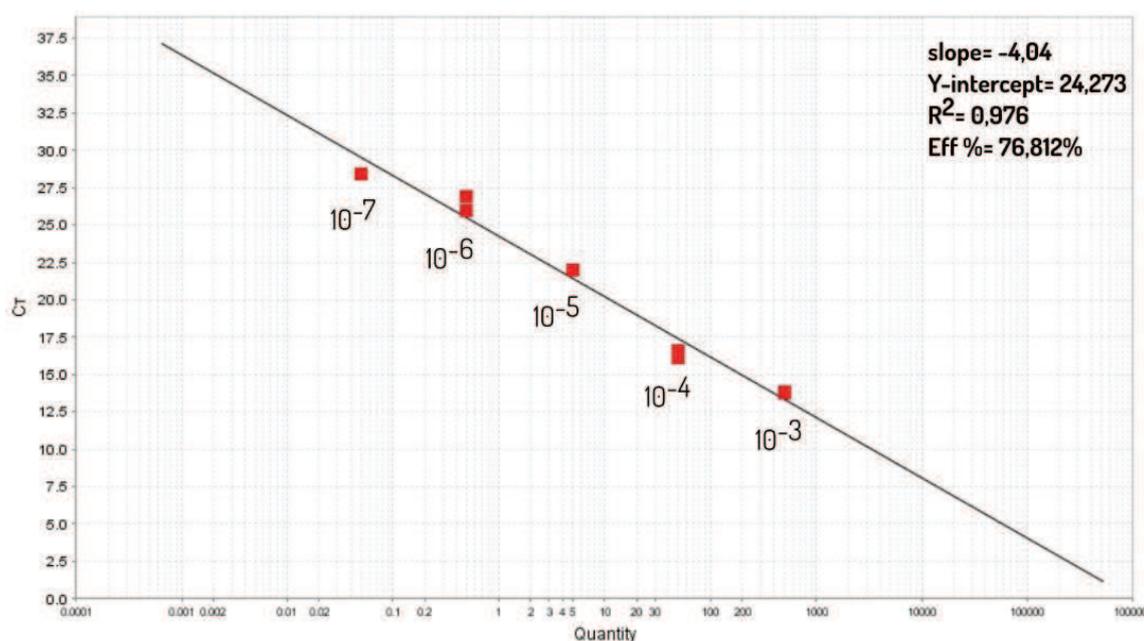


Figura 15. Curva estándar para la PCR-yagE. La curva estándar se obtuvo al realizar 7 diluciones seriadas 1:10 a partir de una concentración conocida de ADN_g de la cepa Cff 04/554. Para este ensayo se eligieron 5 puntos contiguos de dicha curva (50 pg/ μ L - 5 fg/ μ L). La linealidad del gráfico mostró una amplificación uniforme

a lo largo del rango de concentraciones de ADN evaluados, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,976. El experimento fue realizado por duplicado.

Las curvas de disociación (o fusión) proporcionan una representación gráfica del producto de la PCR tras el proceso de amplificación. Como la temperatura de fusión de cada producto de PCR varía y depende de su secuencia y tamaño, esto permite verificar la ausencia de fragmentos de ADN no deseados, producto de una amplificación inespecífica. Dichas curvas de fusión obtenidas para la curva estándar mostraron que la temperatura de fusión característica para el producto amplificado de *C. fetus* fue de 78,29°C (Figura 16).

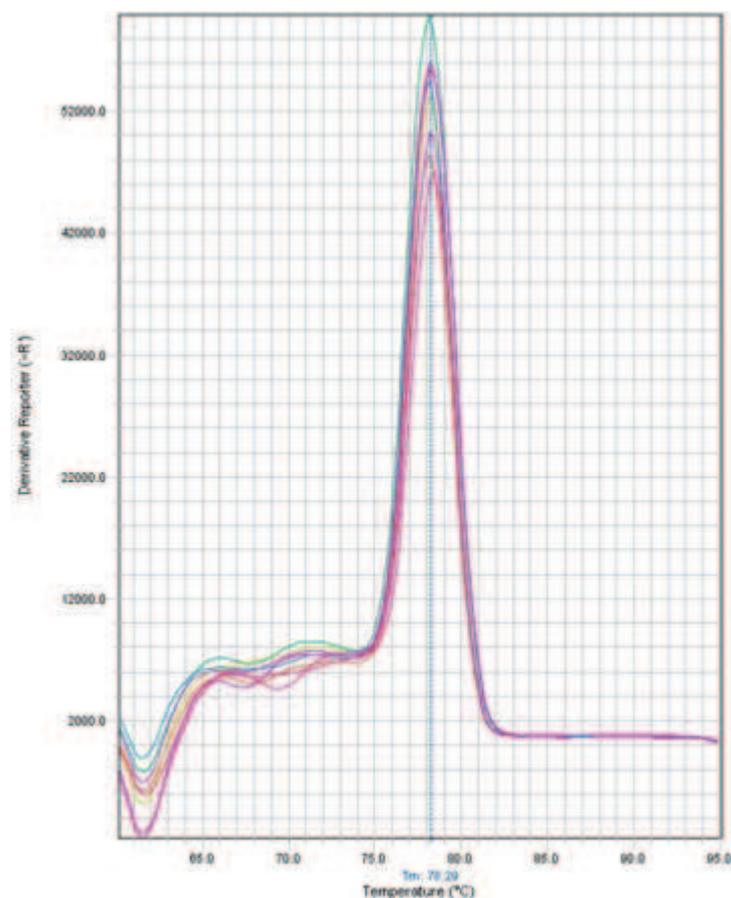


Figura 16. Curvas de disociación de la PCR-yagE en tiempo real para la curva estándar. La presencia de un único pico en las muestras de la curva estándar sugiere un producto de tamaño único (149 pb), con una temperatura de fusión característica de 78,29°C. El producto amplificado contiene 52 adeninas, 50 timinas, 21 citosinas y 26 guaninas, y posee un %CG de 31,54%.

Los resultados obtenidos en la curva estándar (Figura 15) y en las curvas de disociación (Figura 16) (en conjunto) ayudan a la interpretación del resultado para detectar cualitativamente la presencia de *C. fetus* en una muestra biológica.

3.1. Aplicación de la PCR-*yagE* en tiempo real en muestras de smegma prepucial

Se analizó un total de 27 muestras de smegma prepucial pertenecientes a 3 toros infectados con *C. fetus* y a 4 toros sin infectar. Las muestras fueron recolectadas en 9 períodos de tiempo, durante 8 meses: días 13, 52, 95, 117, 145, 178, 206, 241 y 283. El cultivo bacteriológico, la IFD y la extracción de ADN total de *C. fetus* a partir de las muestras de smegma prepucial fueron realizadas en el laboratorio de Bacteriología (EEA-Balcarce) por el Méd.Vet. MSc. Juan Agustín García, tal como se especifica en la sección de Materiales y Métodos.

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue evaluar la eficiencia de la PCR-*yagE* en tiempo real como herramienta de detección de *C. fetus* sobre muestras clínicas de animales infectados. Para ello, utilizando la curva estándar y las curvas de disociación se determinó la presencia de *C. fetus* a partir del ADN total extraído de las muestras biológicas recolectadas en los distintos tiempos de muestreo (Tabla 10). Asimismo, los resultados correspondientes al cultivo bacteriológico y la IFD de todas las muestras se detallan en la misma tabla.

Tabla 10. Comparación de la detección de *C. fetus* mediante las distintas técnicas empleadas.
(continúa en la siguiente página)

Día	Técnicas empleadas	Toro 1	Toro 2	Toro 3	Control negativo
Día 13	Cultivo	-	-	-	n.d.
	Inmunofluorescencia directa	-	-	-	n.d.
	PCR en tiempo real	-	-	-	n.d.
Día 52	Cultivo	-	+	+	-
	Inmunofluorescencia directa	+	+	-	-
	PCR en tiempo real	+ (Ct: 22,93)	+ (Ct: 24,46)	+ (Ct: 27,22)	-
Día 95	Cultivo	+	+	+	n.d.
	Inmunofluorescencia directa	+	+	-	n.d.
	PCR en tiempo real	+ (Ct: 19,67)	+ (Ct: 25,18)	+ (Ct: 23,15)	n.d.

Día	Técnicas empleadas	Toro 1	Toro 2	Toro 3	Control negativo
Día 117	Cultivo	+	+	+	n.d.
	Inmunofluorescencia directa	+	+	-	n.d.
	PCR en tiempo real	+ (Ct: 29,24)	+ (Ct: 31,84)	+ (Ct: 31,61)	n.d.
Día 145	Cultivo	+	+	-	-
	Inmunofluorescencia directa	+	+	+	-
	PCR en tiempo real	+ (Ct: 28,56)	+ (Ct: 25,01)	-	-
Día 178	Cultivo	+	+	+	n.d.
	Inmunofluorescencia directa	+	+	+	n.d.
	PCR en tiempo real	+ (Ct: 33,83)	+ (Ct: 30,87)	+ (Ct: 26,29)	n.d.
Día 206	Cultivo	+	-	-	n.d.
	Inmunofluorescencia directa	-	-	-	n.d.
	PCR en tiempo real	-	-	-	n.d.
Día 241	Cultivo	+	+	-	-
	Inmunofluorescencia directa	+	+	-	-
	PCR en tiempo real	+ (Ct: 27,2)	+ (Ct: 29,93)	-	-
Día 283	Cultivo	+	+	+	-
	Inmunofluorescencia directa	+	+	+	-
	PCR en tiempo real	+ (Ct: 23,23)	+ (Ct: 32,45)	+ (Ct: 28,98)	-

n.d: no determinado.

Se muestran las curvas de disociación obtenidas para todas las muestras en la Figura 17. Las mínimas variaciones de la T_m observadas en la Figura 17 fueron producto de utilizar ADN de distintas fuentes (ADN purificado a partir de cultivo de *C. fetus* para la construcción de la curva estándar *vs.* ADN purificado a partir de muestras clínicas). Aún así, todas las muestras clínicas de smegma prepucial analizadas mostraron un perfil único en las curvas de disociación ($T_m = 79,48$ °C), coincidente con el perfil obtenido para la curva estándar (Figura 16).

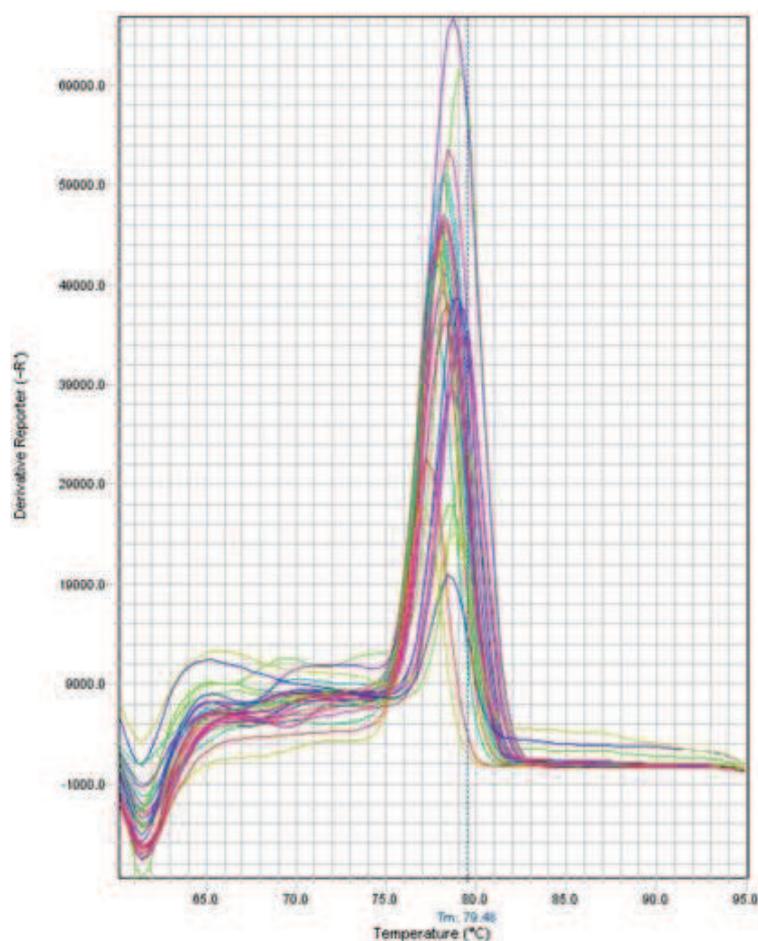


Figura 17. Curvas de disociación de la PCR-*γagE* en tiempo real para las muestras de smegma prepucial. La presencia de un único pico en las muestras de la curva estándar y de smegma prepucial sugiere un producto de tamaño único (149 pb), con una temperatura de fusión característica de 79,48°C. Se observó una baja cantidad dímeros de oligonucleótidos iniciadores en la zona comprendida entre las temperaturas de 65-70°C del control negativo.

Se compararon los resultados obtenidos con las distintas técnicas de diagnóstico empleadas (cultivo bacteriológico e IFD) a través del coeficiente de concordancia. Mientras que la concordancia obtenida entre cultivo e IFD fue moderada (Tabla 11), la PCR en tiempo real desarrollada mostró muy buena concordancia con el cultivo ($\kappa = 0,864$) (Tabla 12).

Tabla 11. Cálculo del coeficiente Kappa de Cohen entre la inmunofluorescencia directa y el cultivo bacteriológico. Se incluyó el conjunto de datos de la Tabla 10 que comprende las 27 muestras prepuciales analizadas. El análisis mostró una concordancia moderada ($\kappa = 0,503$).

		Cultivo bacteriológico	
		+	-
IFD	+	15	2
	-	4	6

Tabla 12. Cálculo del coeficiente Kappa de Cohen entre el cultivo bacteriológico y la PCR-yagE en tiempo real. Se incluyó el conjunto de datos de la Tabla 10 que comprende las 27 muestras prepuciales analizadas. El análisis arrojó un valor de acuerdo muy bueno ($\kappa = 0,864$).

		Cultivo bacteriológico	
		+	-
PCR-yagE en tiempo real	+	18	1
	-	1	11

Estos resultados demuestran que, el empleo de la PCR-yagE mejoraría la detección de *C. fetus* en muestras clínicas, respecto de la IFD.

3.2. Aplicación de la PCR-yagE en tiempo real en muestras de mucus cérvico vaginal

Con el objetivo de analizar distintos tipos de muestras clínicas, se evaluó la PCR-yagE en tiempo real en 29 muestras clínicas de mucus cérvico vaginal. Estas muestras provinieron de vacas vacías a la palpación transrectal y fueron recolectadas de 4 establecimientos ganaderos con problemas reproductivos asociados a *C. fetus* durante los años 2018 y 2019. Este muestreo fue realizado por el grupo de trabajo del Dr. Fernando Paolicchi.

Brevemente, se describen los antecedentes de 3 de los establecimientos del estudio. Las muestras procedentes del rodeo ubicado en Mar Chiquita (Buenos Aires) representan a un lote de cría de 191 animales, cuyo porcentaje de preñez reportado fue de 71%. Los toros utilizados fueron retirados del establecimiento pos servicio (no fueron evaluados pre servicio). En contraposición, otro lote del mismo establecimiento, pero de diferente propietario, registró un porcentaje de preñez del 92%. Las muestras provenientes de un rodeo ubicado en la localidad de San Cayetano (Buenos Aires) representan a un lote de 212 vientres, en el cual se registraron 45 vientres vacíos al tacto y 1 aborto. Los toros ($n=15$) resultaron

negativos por IFD pre y pos servicio. Por otro lado, las muestras recolectadas en un rodeo de la localidad de Balcarce (Buenos Aires) en el año 2019, registraron un porcentaje de preñez del 80%. Todas las muestras fueron procesadas como se mencionó anteriormente en la sección Materiales y métodos. La extracción de ADN total se realizó con el kit comercial ADN Puriprep-S kit (Inbio HighWay).

Las muestras de campo se evaluaron por PCR-*ragE* en tiempo real, del mismo modo que se detalló en la sección anterior. El análisis de las muestras mediante este ensayo permitió detectar la presencia de *C. fetus* en todos los establecimientos evaluados (Figura 18 y Tabla 13).

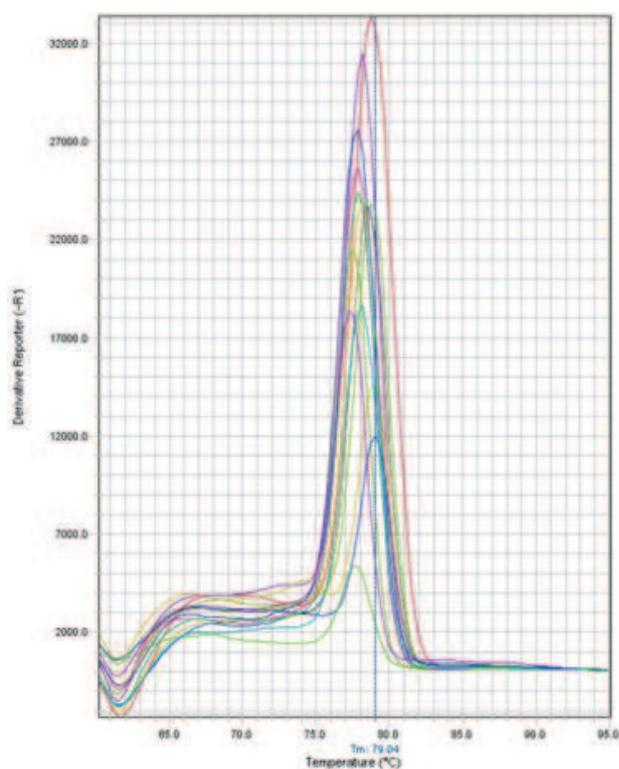


Figura 18. Curvas de disociación de la PCR-*ragE* en tiempo real para las muestras de mucus cérvico vaginal. La presencia de un único pico en las muestras de la curva estándar y de mucus cérvico vaginal sugiere un producto de tamaño único (149 pb), con una temperatura de fusión de 79,04°C. Se observó una baja cantidad de dímeros de oligonucleótidos iniciadores en la zona comprendida entre las temperaturas de 65-70°C del control negativo.

Tabla 13. Detección de *C. fetus* en muestras de mucus cérvico vaginal de vacas provenientes de establecimientos de la provincia de Buenos Aires, mediante cultivo bacteriológico, IFD y PCR en tiempo real.

Año	Localidad	No. de muestras	Detección mediante					
			Cultivo		IFD		PCR- <i>yagE</i> en tiempo real	
			Tasa de positividad (%)	ID muestra (+)	Tasa de positividad (%)	ID muestra (+)	Tasa de positividad (%)	ID muestra (+)
2018	Mar Chiquita	8	2/8 (25%)	#M2 #M4	1/8 (12,5%)	#M2	2/8 (25%)	#M1 #M8
2018	San Cayetano	12	1/12 (8,34%)	#M12	0/12 (0%)	-	3/12 (25%)	#M4 #M5 #M12
2018	Balcarce	4	2/4 (50%)	#M4 #M5	0/4 (0%)	-	1/4 (25%)	#M5
2019	Balcarce	5	2/5 (40%)	#M3 #M4	2/5 (40%)	#M3 #M5	5/5 (100%)	#M1 #M2 #M3 #M4 #M5
<i>Σ de muestras analizadas</i>		29	7/29 (24,13%)		3/29 (10,34%)		11/29 (37,93%)	

Las muestras de mucus cérvico vaginal son complejas de procesar para extraer el ADN debido a su alta viscosidad. A pesar de ello, se obtuvo una tasa de positividad del 37,93% para la PCR-*yagE* en tiempo real, mientras que fue del 24,13% para el cultivo bacteriológico y 10,34% para la IFD (Tabla 13). Estos resultados sugieren una mayor capacidad de detección de la PCR sobre muestras de mucus de animales infectados.

En consecuencia, los resultados obtenidos en el análisis de las muestras clínicas de smegma prepucial (sección anterior) y mucus cérvico vaginal permiten continuar los estudios de la PCR-*yagE* en tiempo real para poder consolidarla como herramienta alternativa para la detección de *C. fetus* en los laboratorios de diagnóstico.

4. Caracterización de los componentes del Secretoma de *Campylobacter fetus*

La importancia de las proteínas secretadas al medio extracelular y de las expuestas en la superficie de la bacteria, radica en que estas son fundamentales en la interacción hospedador-patógeno.

En este trabajo, nos propusimos explorar el Secretoma de *C. fetus* y su repertorio antigénico para el diseño de estrategias de control y prevención de la CGB en el futuro.

4.1.1. Prospección *in silico* del Secretoma de *Campylobacter fetus*

Tradicionalmente, se definió al secretoma bacteriano como una porción del proteoma que comprende proteínas que se dirigen a la envoltura de las células o se secretan en el medio extracelular (Gagic et al., 2016). Sin embargo, este concepto se ha ampliado en los últimos tiempos debido a la descripción de mecanismos alternativos de secreción proteica (Armengaud et al., 2012), como es el caso de las vesículas de membrana externa (VMEs) (Guerrero-Mandujano et al., 2017).

Para explorar el secretoma de *C. fetus* se planteó una estrategia *in silico* a partir del análisis del proteoma de *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608 (UniProt: UP000029503) (Figura 19), el cual está conformado por 1.873 proteínas.

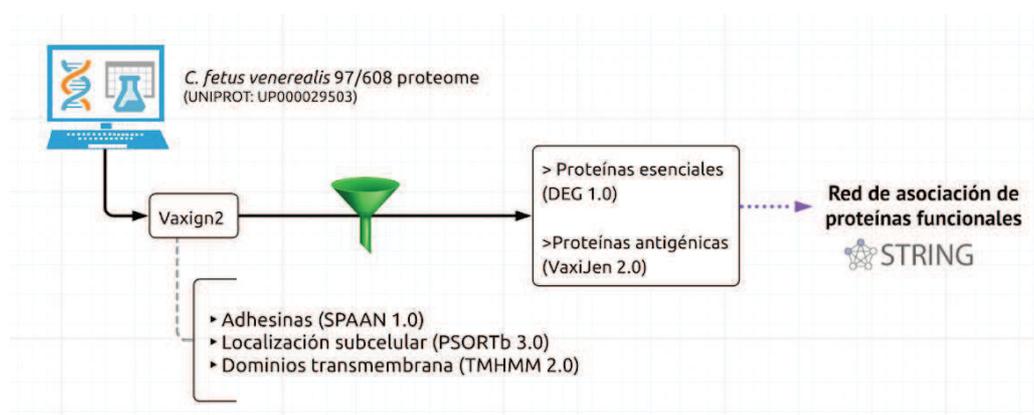


Figura 19. Flujo de trabajo empleado para caracterizar *in silico* el secretoma de *C. fetus*.

Las localizaciones subcelulares de las mismas se predijeron utilizando PSORTb 3.0, el cual tiene en cuenta la presencia de péptido señal, hélices transmembrana, homología con proteínas de localización conocida, composición de aminoácidos y motivos que influyen en la localización subcelular, para clasificar las proteínas. Según las predicciones realizadas con PSORTb, el 47,6%, el 20,5% y el 1,8% de las proteínas se localizan en el citoplasma, la membrana plasmática y el periplasma,

respectivamente, mientras que el 2,2% lo hace en la membrana externa y el 1,3% son extracelulares (Figura 20). PSORTb no pudo predecir la localización del 26,7% del total de proteínas.

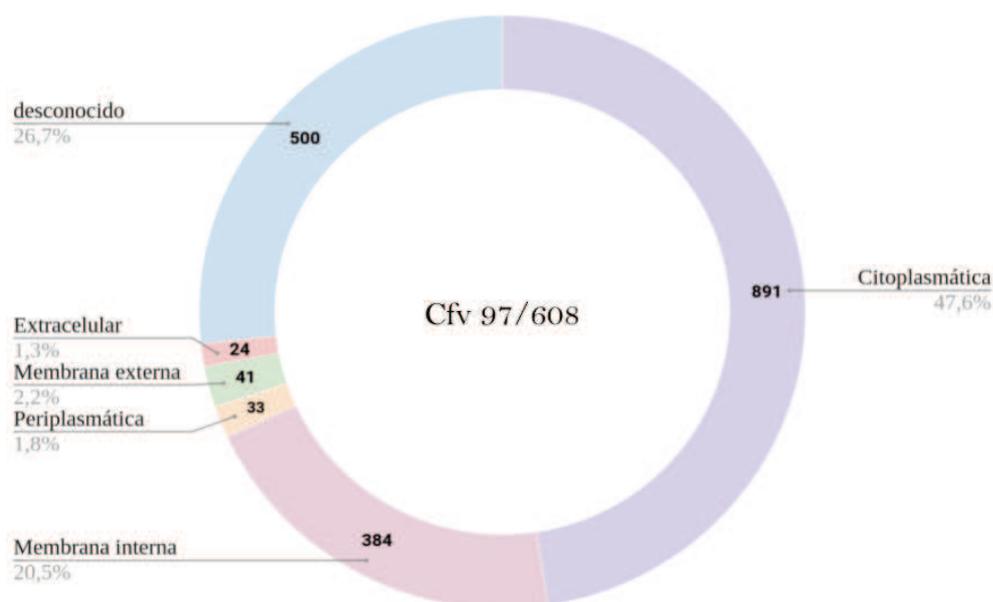


Figura 20. Predicción de la localización subcelular de las proteínas de *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608 mediante PSORTb.

Se seleccionó con PSORTb un *pool* final de 52 proteínas, localizadas en la membrana externa (n= 40) y en el espacio extracelular (n=12) (Tabla 14). Se descartaron las proteínas flagelares (por sus características físicas y funcionales) y aquellas con similitud a proteínas de diferentes hospedadores (humano, porcino y ratón).

Tabla 14. Listado de proteínas del exoproteoma de *C. fetus* caracterizadas *in silico*. (continua en las siguientes páginas)

Código de Acceso (UniProt)	Descripción	AA ^(a)	Vaxign 2.0			Esencialidad (DEG 1.0)	Antigenicidad (Vaxijen 2.0) ^(e)
			LSC ^(b) (PSORTb)	Adhesinas (SPAAN) ^(c)	α-Hélices TM ^(d) (TMHMM 2.0)		
UPI000005F4A5	TolC family protein	433	ME	0,17	no	si	0,53
UPI000068B3A6	WD40 repeat domain-containing protein	299	ME	0,42	no	no	0,46
UPI000068B3BF	cytolethal distending toxin subunit B family protein	264	EX	0,43	no	no	0,6
UPI000068B3D7	pilus (MSHA type) biogenesis protein MshL	512	ME	0,64	no	no	0,61
UPI000068B4C7	VacJ family lipoprotein	237	ME	0,26	no	no	0,38

Código de Acceso (UniProt)	Descripción	AA ^(a)	Vaxign 2.0			Esencialidad (DEG 1.0)	Antigenicidad (VaxiJen 2.0) ^(e)
			LSC ^(b) (PSORTb)	Adhesinas (SPAAN) ^(c)	α -Hélices TM ^(d) (TMHMM 2.0)		
UPI000068B55D	complement resistance protein TraT	259	ME	0,83	no	no	0,67
UPI000068C277	TolC family protein	432	ME	0,43	no	si	0,55
UPI000068CE20	copper resistance protein NlpE N-terminal domain-containing protein	124	ME	0,58	no	no	0,36
UPI000068D3F1	Opr family porin	388	ME	0,61	no	no	0,42
UPI000068D3FC	OmpP1/FadL family transporter	427	ME	0,56	no	no	0,67
UPI000068D48A	UPF0323 family lipoprotein	211	EX	0,85	no	no	0,69
UPI000068D49F	cytolethal distending toxin nuclease subunit Cf-CdtB	266	EX	0,45	no	no	0,52
UPI000068DD19	TonB-dependent receptor	688	ME	0,54	no	no	0,54
UPI000068DD6B	tetratricopeptide repeat protein	293	ME	0,51	no	no	0,44
UPI000068DD8E	hypothetical protein	776	ME	0,4	si	no	0,38
UPI000068DD99	OmpA family protein	173	ME	0,48	no	si	0,82
UPI000068DDBA	Outer membrane protein assembly factor BamA	757	ME	0,31	no	si	0,47
UPI000068DDD3	hypothetical protein	175	ME	0,77	no	si	0,61
UPI000068E34F	hypothetical protein	961	ME	0,66	no	no	0,69
UPI000068E36A	OmpA family protein	334	ME	0,08	si	no	0,61
UPI0000E11D47	hypothetical protein	306	ME	0,77	no	no	0,58
UPI0001987C02	TolC family protein	471	ME	0,51	no	no	0,42
UPI0001BCE2B6	hypothetical protein	148	EX	0,83	no	no	0,52
UPI0002288C6E	TonB-dependent receptor	664	ME	0,6	no	no	0,59
UPI0002288CA0	TonB-dependent receptor	688	ME	0,38	no	no	0,53
UPI0002288CA5	S8 family serine peptidase	1.066	ME	0,8	no	no	0,43
UPI0002288D2F	cytolethal distending toxin subunit B family protein	264	EX	0,49	no	si	0,63
UPI0002288D58	inverse autotransporter beta-barrel domain-containing protein	798	ME	0,67	si	si	0,59
UPI0002288D9A	OmpA family protein	345	ME	0,39	no	no	0,66
UPI0002288DC0	major ME protein	406	ME	0,55	no	no	0,71
UPI0002288DCE	hypothetical protein	849	ME	0,62	si	no	0,65
UPI0002288E11	TonB-dependent receptor	596	ME	0,48	no	no	0,59
UPI0002DE8AF0	TonB-dependent receptor	662	ME	0,65	no	no	0,57
UPI0003D7BFA7	major outer membrane protein (porA)	406	ME	0,55	no	no	0,68
UPI0003D7CB75	DUF748 domain-containing protein	1.022	ME	0,45	si	si	0,8
UPI0003D8839A	protein SprA-related family	201	EX	0,62	no	no	0,96
UPI0003D8A4C9	TonB-dependent receptor	684	ME	0,79	no	no	0,5
UPI0003D90557	PEB1a	264	ME	0,42	no	no	0,48
UPI0003D91A5E	SH3 domain-containing protein	416	ME	0,48	si	no	0,67
UPI0003D94C98	hypothetical protein	1.175	ME	0,52	no	si	0,39
UPI0003E342B6	DDE-type integrase/transposase/recombinase	916	ME	0,37	no	no	0,47
UPI0003E343E8	cell surface protein	1.123	EX	0,89	no	si	0,84

Código de Acceso (UniProt)	Descripción	AA ^(a)	Vaxign 2.0			Esencialidad (DEG 1.0)	Antigenicidad (VaxiJen 2.0) ^(e)
			LSC ^(b) (PSORTb)	Adhesinas (SPAAN) ^(c)	α -Hélices TM ^(d) (TMHMM 2.0)		
UPI0003E346CC	DDE-type integrase/transposase/recombinase	862	ME	0,28	no	no	0,53
UPI0003E3491B	S-layer protein	939	EX	0,83	no	si	0,74
UPI0003E39409	S-layer protein	942	EX	0,84	no	no	0,79
UPI0003E39AA4	cell surface protein	482	EX	0,71	no	si	0,75
UPI000508F390	cell surface protein	1.163	EX	0,85	no	si	0,86
UPI000508FCA3	LPS-assembly protein LptD	728	ME	0,72	no	si	0,63
UPI00050902D4	TonB-dependent receptor	712	ME	0,43	no	no	0,52
UPI000509151C	hypothetical protein	156	EX	0,9	no	si	0,28
UPI00050923B9	ShlB/FhaC/HecB family hemolysin secretion/activation protein	547	ME	0,7	no	no	0,49
UPI0008638400	class I SAM-dependent methyltransferase	242	ME	0,52	no	no	0,41

^(a) Cantidad de aminoácidos.

^(b) Localización subcelular: EX y ME significan extracelular y membrana externa, respectivamente.

^(c) Se utilizó una puntuación >0,51 (por default) para considerar una proteína como adhesina.

^(d) α -hélices transmembrana.

^(e) Se utilizó una puntuación >0,4 (por default) para considerar una proteína como antigénica.

La propiedad de adhesina de las proteínas se analizó con el programa SPAAN, el cual mediante la aplicación de redes neuronales permitió identificar 32 potenciales adhesinas a partir de las 52 proteínas seleccionadas del Secretoma de Cfv 97/608 (Tabla 14). Se utilizó un umbral de 0,51 a fin de aumentar la precisión de la predicción y minimizar los falsos positivos.

La esencialidad de las proteínas se evaluó utilizando el programa DEG 1.0. De las 52 proteínas, 15 se predijeron como esenciales (Tabla 14). Las mismas son: dos proteínas de la familia TolC, una proteína de la familia OmpA (proteína de membrana externa A), una subunidad proteica de la familia Cdt, un factor de ensamblaje de proteínas de la membrana externa (BamA), una proteína de ensamblaje del LPS (LptD), tres proteínas de la superficie celular, una proteína de la capa S (ó *S-layer*), una proteína que contiene un dominio de autotransporte inverso b-barril y cuatro proteínas hipotéticas.

La identificación de la presencia de α -hélices transmembrana se realizó con el programa TMHMM 2.0. El mismo, predijo la topología de las proteínas de membrana empleando el principio de modelo oculto de Markov, permitiendo así discriminar entre las proteínas solubles y de membrana. De

las 52 proteínas seleccionadas, 6 presentaron este ordenamiento, entre ellas, OmpA y una proteína con dominio de autotransporte inverso beta-barril (ambas predichas como esenciales por DEG 1.0), tres proteínas hipotéticas y una proteína con dominio SH3 (del inglés “Src Homology 3”).

La antigenicidad de las proteínas se evaluó con VaxiJen, 47 proteínas se predijeron como antigénicas (puntuación vaxijen >0,4), de las cuales una proteína de la familia SprA mostró la mayor puntuación de antigenicidad dentro del panel de proteínas predichas. Esta proteína extracelular pertenece a la superfamilia de metaloproteasas dependientes de zinc y actúa como reguladora de la expresión de los componentes y sustratos del Sistema de secreción de tipo III. Otras proteínas con una antigenicidad predicha alta son: una proteína que pertenece a la familia OmpA, la cual está involucrada en la patogénesis bacteriana al participar en la interacción con moléculas receptoras del hospedador (Selvaraj et al., 2007) y una proteína de la capa S (o *S-layer*), responsable de la variación antigénica de *C. fetus*. También se identificó una porina principal de la membrana externa de *Campylobacter*, la cual entre muchas de sus funciones, participa en el transporte de iones a través de la pared celular bacteriana y en la adhesión de la bacteria a la mucosa intestinal del hospedador, según trabajos reportados en *C. jejuni* (Islam et al., 2010).

4.1.2. Interacciones proteína-proteína y asociaciones funcionales en el Secretoma de *Campylobacter fetus*

Para comprender las interacciones proteína-proteína (PPI) que ocurren en el exoproteoma predicho de *C. fetus* se utilizó la base de datos STRING v11.5. La misma incluye asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) conocidas, que provienen de la predicción computacional, de la transferencia de conocimientos entre organismos y de las interacciones reportadas en otras bases de datos (en su gran mayoría curadas).

La red PPI construida con las 52 proteínas seleccionadas del secretoma de *C. fetus* mostró que al menos 30 de ellas interactúan entre sí y que varias proteínas que conforman la membrana externa de *C. fetus* son el eje central de la interacción en la red (Figura 21). BamA y LptD son proteínas importantes ya que se encargan de ordenar, ensamblar y anclar diferentes componentes proteicos en la membrana

Por su parte, LptD presenta una interacción con CtsD en el anclaje del sistema de secreción tipo II y con proteínas principales de membrana externa (Cmp1, Cmp2). Estas dos últimas, a su vez interactúan con TraT, una proteína putativa de resistencia al complemento.

Las adhesinas son un componente clave en la capacidad de las bacterias patógenas para reconocer, adherirse a las células del hospedador y alterar su comportamiento. En la red PPI del exoproteoma de *C. fetus* se observó la interacción de dos importantes adhesinas, Peb1 y CadF. PEB1 ha sido catalogado como antígeno en otros patógenos bacterianos ya que participa en la translocación y liberación de los efectores de los Sistemas de secreción tipo II, III y IV en *C. jejuni* (Konkel et al., 2020). Por otro lado, la adhesina CadF es una proteína con dominios de unión a la glicoproteína fibronectina, responsables del reordenamiento del citoesqueleto de actina de la célula hospedadora. La red de interacción PPI evidenció una asociación con la proteína Pal (involucrada en procesos esenciales).

Mediante este abordaje bioinformático se pudieron proponer distintas moléculas que podrían constituir piezas claves para el diseño futuro de herramientas de control y prevención de la infección de *C. fetus*.

4.2. Evaluación de la producción de Vesículas de Membrana Externa en *Campylobacter fetus*

4.2.1. Secreción de Vesículas de Membrana Externa en *Campylobacter fetus*

La secreción de vesículas de membrana externa (VMEs) por parte de las bacterias Gram negativas amplía la definición del término Secretoma de un microorganismo (Guerrero-Mandujano et al., 2017). Las mismas funcionan como vehículo de liberación de distintos componentes con importantes funciones en cuanto a la transferencia de factores de virulencia, comunicación inter-bacteriana y modulación de la patogénesis y resistencia a componentes antibacterianos, entre otros (Jan, 2017).

En primer lugar, para demostrar la formación y secreción de VMEs en *C. fetus*, se evaluó una muestra de cultivo bacteriano en medio sólido y líquido ($DO_{600nm} = 0,4$) de la cepa *C. fetus* subesp. *fetus* 08-421 en un microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL 1200XX (Servicio integral de

Microscopía, CICVyA-INTA) (VMEs sin purificar). Las imágenes permitieron observar la presencia de VMEs de distinto tamaño. También se observó la brotación de vesículas en la superficie de las campilobacterias y su presencia en el medio extracelular (Figura 22A).

Posteriormente, se crecieron cultivos para la purificación de VMEs a partir de los sobrenadantes de cultivo. Luego de su purificación mediante filtración tangencial y ultracentrifugación, se pudo observar por MET que las VMEs tenían una morfología homogénea pero con un tamaño variable que osciló entre 24 -145 nm con un diámetro medio de $76,58 \pm 11,53$ nm (Figuras 22B-C). Dicho tamaño es concordante con datos publicados de VMEs de otras bacterias.

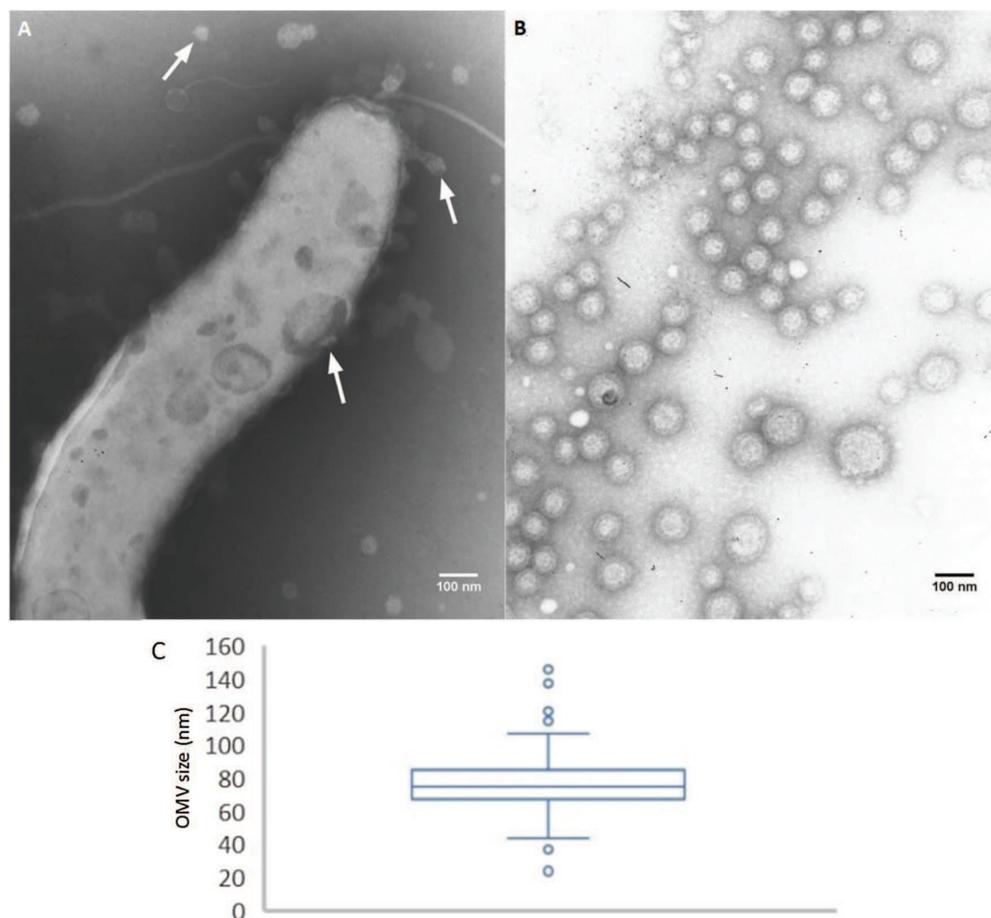


Figura 22. Liberación y purificación de VMEs de *C. fetus*. (A) Microfotografía (tinción negativa) de una alícuota de cultivo de Cff 08-421 en caldo Brucella, donde se aprecia a las VMEs no purificadas alrededor de una célula flagelada o adheridas a ésta. Las flechas indican las VMEs de diferente tamaño y forma. (B) y (C) Morfometría de las VMEs purificadas. Microfotografías de VMEs de *C. fetus* 08-421 (tinción negativa) que muestra las VMEs esféricas de diferentes tamaños (rango 26-141 nm), cuyo diámetro medio: $76,58 \pm 11,53$ nm ($n = 244$, conteo basado en tres micrografías).

Para demostrar la secreción de VMEs en distintas cepas, se procesaron cultivos líquidos correspondientes a las cepas *C. fetus* subesp. *fetus* 13-344, *C. fetus* subesp. *venerealis* bv. *intermedius* 06-341 y *C. fetus* subesp. *venerealis* NCTC 10354.

Independientemente de la subespecie, todas las cepas estudiadas produjeron VMEs (Figuras 23A-D). El análisis por microscopía electrónica de transmisión de las VMEs aisladas reveló la estructura cristalina típica de la capa S en todas las cepas, a excepción de la cepa Cfv NCTC 10354 (Figura 23D). Esta ausencia, también se evidenció en las VMEs no purificadas en medios sólidos para esta cepa (Figura 23E).

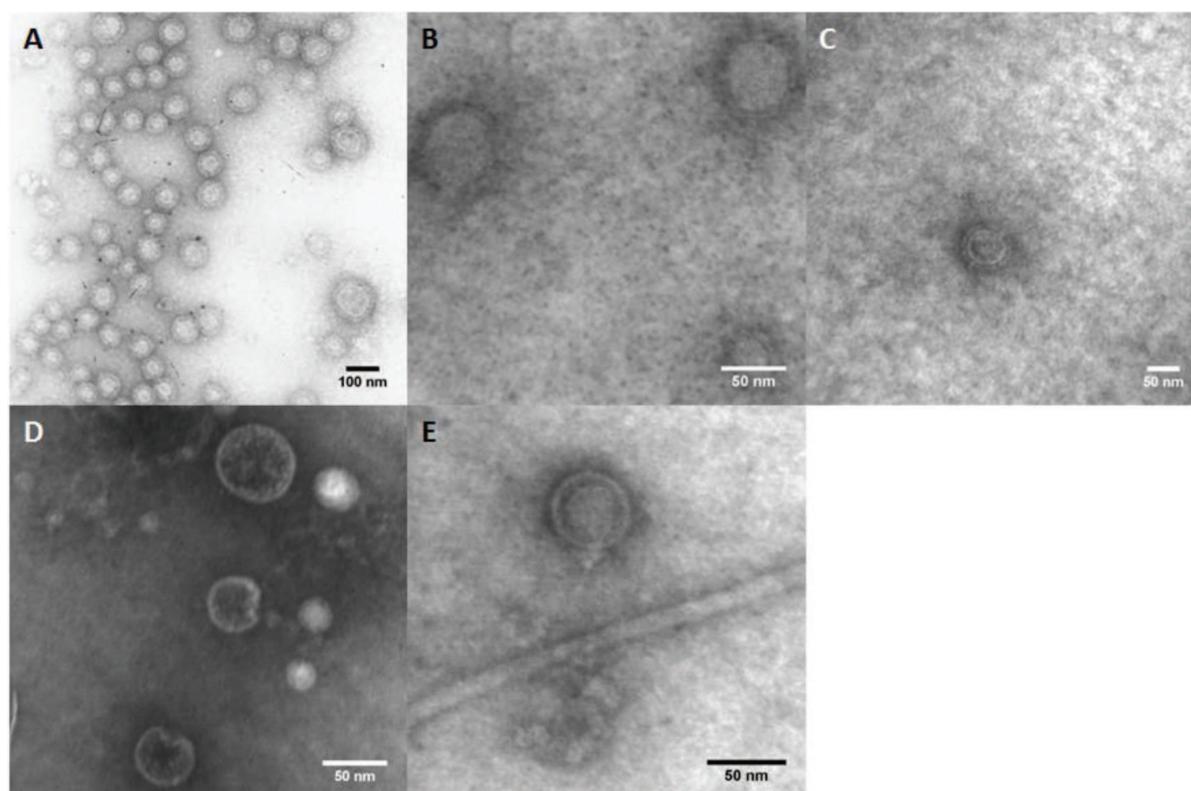


Figura 23. Secreción de VMEs de distintos aislamientos de *C. fetus*. (A) Cff08-421, (B) Cff13-344, (C) Cfv06-341, (D) Cfv NCTC 10354 y (E) Cfv NCTC 10354 (VME no purificadas).

El espesor de la capa S fue de $15,99 \pm 8,91$ nm ($n=20$) (Figura 24). Esta observación confirma que la capa S se mantiene durante la biogénesis de las VMEs.

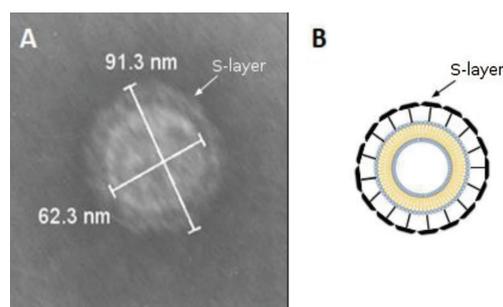


Figura 24. Capa S. (A) Morfometría de una VMEs representativa de *C. fetus* subesp. *venerealis* bv. *intermedius* 06-341. La flecha señala la capa S observada en la superficie más externa. (B) Representación esquemática de una VMEs rodeada por la capa S.

4.2.2. Inmunorreactividad de las Vesículas de Membrana Externa

Con el objetivo de evaluar la presencia de componentes inmunorreactivos en las VMEs purificadas, se realizó un inmuno *dot-blot* a la fracción de VMEs purificadas de la cepa Cff 08-421. Al evaluar la antigenicidad de las fracciones de VMEs con un suero de conejo sensibilizado con proteínas totales de *C. fetus* se observó una fuerte interacción (Figura 25). Esto permite inferir la presencia de componentes inmunorreactivos en las VMEs de *C. fetus*.

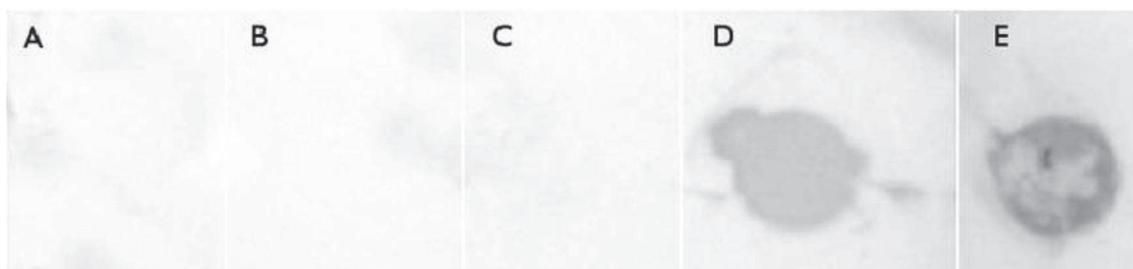


Figura 25. Evaluación de la inmunorreactividad de las VMEs por inmuno dot blot. Se empleó un suero hiperinmune de conejo dirigido a proteínas totales de *C. fetus*. (A) caldo Brucella (control negativo), (B) sobrenadante de cultivo (control negativo) y (C) PBS 1X (control negativo), (D) VMEs purificadas Cff 08-421, (E) Extracto proteico de Cff 08-421 (control positivo).

En este estudio, hemos demostrado por primera vez la producción de VMEs en *C. fetus*, con características similares a las de otras bacterias Gram negativas y la presencia de compuestos inmunorreactivos. La profundización en su conocimiento podría ser de importancia tanto en el estudio de la interacción hospedador-patógeno como también para el diseño de estrategias vacunales.

Discusión

Genómica comparativa y filogenia de los aislamientos locales de

Campylobacter fetus

La Campilobacteriosis genital bovina es una de las principales enfermedades venéreas del ganado bovino y se caracteriza por la producción de abortos, infertilidad temporaria, reducción en los porcentajes de preñez y pérdidas en la eficiencia reproductiva de los rodeos.

La disponibilidad de las distintas secuencias genómicas de cepas locales de las distintas subespecies y del biovar *intermedius* representa una oportunidad única para explorar tanto la filogenia de los aislamientos locales de *C. fetus*, como las posibles secuencias para el diagnóstico y la tipificación molecular del patógeno. En el presente estudio se realizó un análisis filogenético local de 34 cepas de *C. fetus*, aisladas en la región pampeana. El estudio evaluó la existencia de variantes regionales para describir las cepas de *C. fetus* circulantes en Argentina. Los resultados del análisis mostraron la distribución de la mayoría de las cepas en pocos *clusters*, lo que sugiere una estructura poblacional clonal en la que se identificaron dos *clusters* sobresalientes en Argentina. Estos dos *clusters* principales incluyen al 82% de las cepas. Además de estos dos *clusters* principales, se describió la presencia de un *cluster* menor que agrupó a dos cepas (Cff 08-421 y Cff 11-427) aisladas en momentos diferentes, 2008 y 2011. Estas cepas fueron aisladas de dos provincias distintas, Santa Fe y Buenos Aires, de localidades que se encuentran a 500 km de distancia. Por lo tanto, las mismas no estarían relacionadas epidemiológicamente. Aún así, para establecer la existencia de un tercer *cluster* putativo, el análisis debería incluir un número mayor de muestras. La provincia de Córdoba estuvo poco representada ya que sólo se estudiaron dos cepas de esta región (ADRI 1362 y Cffi 02-298). Sin embargo, curiosamente estas cepas formaron un *subcluster* dentro del *cluster* principal B. De forma similar, se incluyeron en el estudio dos cepas aisladas en la provincia de La Pampa, aunque una de estas cepas agrupó en el *cluster* principal A, mientras que la otra resultó filogenéticamente distante.

El uso del software Microreact permitió una visualización interactiva y dinámica de los resultados filogenéticos en función del año de aislamiento de las cepas incluidas en el estudio local y su fuente, y la frecuencia de distribución geográfica para cada una. Los datos de agrupación no mostraron ninguna asociación con la fuente de las muestras, la fecha de aislamiento, el origen o las pruebas bioquímicas.

La naturaleza clonal de *C. fetus* podría atribuirse a la mayor estabilidad genética de este patógeno en comparación con otras especies de *Campylobacter* (Escher et al., 2016; van Bergen et al., 2005a). Por lo tanto, existe una alta posibilidad de que haya una circulación continua de unos pocos genotipos de *C. fetus* en esta región endémica de Argentina. Dicha circulación podría ser indicativa del movimiento de ganado a lo largo del tiempo o del comercio de animales sin testeos previos entre diferentes regiones. Esta misma situación podría observarse en el viejo continente, según se describe en un estudio de prevalencia y distribución espacial de la CGB en España, descrito por Pena-Fernández y col. (2021). Los autores resaltan que, al igual que en nuestro país, la enfermedad es endémica y se encuentra ampliamente distribuida en los rodeos vacunos españoles (Pena-Fernández et al., 2021). En el árbol filogenómico global obtenido, 29 de las 31 cepas españolas analizadas formaron dos *subclusters* exclusivos dentro del *Cluster* 1 (ST4), correspondiente al linaje bovino donde predominan las cepas argentinas. Uno de los *subclusters* españoles se conformó por 19 cepas mientras que el otro por 10 cepas dentro del *subcluster* identificado como Cfv. Ambas agrupaciones, sugerirían también una distribución clonal.

Son muchos los factores que posibilitan la introducción y circulación de la CGB en el rodeo. Entre ellos, podemos mencionar el empleo de toros adultos mayores de 4 años, compartir el pastoreo con hacienda de otros dueños, prestar o alquilar toros y comprar vacas de descarte o vacías, que son algunos de los principales factores que incrementan la incidencia de las enfermedades reproductivas. Por esta razón, el control del movimiento de animales, la correcta gestión de las pasturas y las buenas prácticas sanitarias constituyen puntos claves para reducir la transmisibilidad e incidencia de *C. fetus* en los rodeos vacunos (Alves et al., 2011; Jimenez et al., 2011; Truysers et al., 2014; Pena-Fernández et al., 2021), ante la pobre efectividad de las vacunas disponibles para la CGB (OIE, 2021). Hoy en día, a pesar de que existen varias vacunas formuladas en base a células inactivadas de *C. fetus* como Vibrin

(Pfizer), Vibrio Leptoferm 5 (Pfizer) y BioAbortogen H (San Jorge Bago, Argentina) (EFSA Panel on Animal Health & Welfare et al., 2017) su eficacia no ha sido estudiada en profundidad (OIE, 2021), siendo cuestionada en diferentes estudios por varios autores (Campero et al., 1987, 2003; 2010; Catena et al., 2006; Cobo et al., 2003, 2004, 2011; Morrell et al., 2019). En este contexto, nuestro país ha tomado distintas medidas para prevenir y erradicar la CGB, como la implementación de la inseminación artificial y planes provinciales de erradicación y prevención de las enfermedades reproductivas en el ganado bovino (Campero, 2000; Campero et al., 2003; Gobierno de la Provincia de Buenos Aires, 2021).

El análisis filogenético global proporcionó una visión más amplia de las relaciones entre las cepas obtenidas en Argentina y resto del mundo, las cuales representan a distintos hospedadores. En un estudio reciente, Iraola y col. describieron la filogenia global de *C. fetus* (Iraola et al., 2017), donde los autores propusieron dos linajes principales para las cepas de *C. fetus*, el humano y el bovino. En el presente estudio, con la inclusión de un número aún mayor de cepas, también pudimos visualizar los dos linajes, donde 33 de las 34 cepas aisladas en Argentina pertenecieron al linaje bovino. El árbol de máxima verosimilitud (ML) en base al *core-genoma* global fue consistente con los hallazgos del árbol ML local. Sin embargo, este último análisis permitió clarificar la posición de las cepas filogenéticamente distantes del análisis local. La cepa bovina Cff 04-554, la única que se ubicó dentro linaje humano, mostró una mayor distancia genética en el agrupamiento. Además, presentó diferencias significativas a nivel del *core-genoma*. La secuencia del genoma de esta cepa se evaluó manualmente para evitar cualquier problema derivado de la formación de quimeras u otros artefactos de ensamblado. El análisis comparativo de los genomas mostró la presencia de un gran número de polimorfismos en esta cepa, incluyendo SNPs e inserciones en algunos de los genes (no mostrado).

La cepa Cff 04-554 se aisló de un feto abortado de 7,5 meses de gestación. Este feto pertenecía a un rodeo de la localidad de Lincoln (Buenos Aires), en el que se practicaba tanto la inseminación artificial como la natural. Entre las cepas de Argentina, esta cepa fue la única a la cual se le asignó el ST5 según la base de datos PubMLST. El subtipo ST5 ha sido reportado previamente en cepas de *C. fetus* bovinas y humanas aisladas de diferentes países como Estados Unidos, Bélgica, Alemania y el Reino Unido (van Bergen et al., 2005a). Curiosamente, la cepa Cff 04-554 agrupó con estas cepas. Con los

datos existentes, resulta difícil postular una hipótesis certera que pueda explicar la presencia de esta cepa en el sistema productivo ganadero de Argentina. Sin embargo, no se pueden descartar la existencia del comercio internacional de ganado (semen, embriones o incluso animales) en el pasado y la transmisión humano-bovino, ya que la transmisión zoonótica es actualmente una vía aceptada y documentada (Iraola et al., 2015; Wagenaar et al., 2014). Además, esta cepa agrupó con una cepa ovina (ST1) obtenida en Uruguay (Costa et al., 2020). Por lo tanto, es probable que este genotipo circule en diferentes hospedadores en Sudamérica. Sin embargo, se necesitan más estudios que engloben mayor número de cepas, de distintos orígenes y fuentes, para conocer la prevalencia y relevancia de este genotipo.

Varios estudios anteriores han sostenido la capacidad de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (On & Harrington, 2001), los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Wagenaar et al., 2001) y el MLST (van Bergen et al., 2005a) como herramientas para la subtipificación de las cepas de *C. fetus*. El PFGE y el AFLP primeramente fueron utilizados para la diferenciación de subespecies, pero no han sido estudiados ampliamente y en la actualidad, han caído en desuso (Iraola et al., 2017). En comparación con estas técnicas, el MLST es un procedimiento menos complejo, que se basa en la amplificación y secuenciación de genes *housekeeping*. Esta técnica es robusta y las secuencias pueden ser comparadas con la ayuda de una base de datos de dominio público. Por lo tanto, al igual que con otros patógenos, el MLST ha ganado una amplia aceptación para la evaluación de la diversidad de *C. fetus* en los últimos años. Esto fue promovido en gran parte por la reducción de los costos de secuenciación.

En el primer estudio basado en MLST en *C. fetus* realizado por van Bergen y col. (2005), se reportó que las dos subespecies (Cff y Cfv) tenían una estrecha relación filogenética y que dicha técnica era apropiada para los análisis epidemiológicos a largo plazo, debido a la estabilidad genética de los *loci* (van Bergen, et al., 2005a). Más tarde, los mismos autores sugirieron que los *loci* incluidos en el esquema del MLST representan un subconjunto adecuado de genes del *core-genoma* (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a). Sin embargo, distintos estudios posteriores revelaron que el esquema actual del MLST no era capaz de diferenciar de forma fiable las subespecies, ya que se había aislado una cepa Cff con el genotipo ST4 asociado exclusivamente a Cfv (Iraola et al., 2015; van der Graaf-van Bloois et al., 2016b).

Aún así, se observó que el ST4 es el más frecuente dentro del conjunto de cepas bovinas (Calleros et al., 2017; Iraola et al., 2015, 2017).

En nuestro estudio, los resultados del MLST revelaron una baja diversidad entre las cepas de *C. fetus* aisladas de la región pampeana, en concordancia con el análisis filogenético. Se encontró que el ST4 es el subtipo más común, con la inclusión de 31 cepas. Como ya se mencionó anteriormente, una única cepa perteneció al ST5, mientras que otra fue identificada como una nueva variante y fue designada como un nuevo subtipo, el ST70. Sin embargo, esta técnica no logró discriminar eficazmente entre las cepas de los principales *clusters* ya que el ST4 estuvo presente en todos los agrupamientos. Aún así, las cepas ST5 y ST70 agruparon fuera de los *clusters* principales, lo cual es consistente con la filogenia.

En los primeros trabajos, se describió que el ST4 estaba asociado exclusivamente a las cepas Cfv del ganado (van Bergen, et al., 2005a). Por lo tanto, se sostuvo por bastante tiempo que el ST4 era un genotipo asociado exclusivamente al bovino. Sin embargo, más tarde, Iraola y col. identificaron una cepa Cff ST4 aislada de un trabajador rural, lo que representaba un caso probable de transmisión zoonótica (Iraola et al., 2015) o que estas cepas, también son frecuentes en otros hospedadores. El mismo trabajo también informó sobre inconsistencias entre los resultados del MLST y la tipificación basada en el análisis de genomas completos. En la misma línea que lo reportado por estos autores, la tipificación de las cepas mediante MLST en el presente trabajo, también resultó ser parcialmente concordante con el análisis filogenético. Por lo tanto, todas estas observaciones sugieren que el empleo del MLST como herramienta para evaluar la diversidad genética de las cepas de *C. fetus* circulantes en Argentina, podría ser factible, pero teniendo en cuenta sus limitaciones.

La secuenciación de nueva generación y los estudios filogenéticos han proporcionado información importante sobre este patógeno. Sin embargo, la asignación de subespecies y su diagnóstico diferencial continúan siendo un gran desafío. Más aún, muchos actores de la comunidad, empiezan a cuestionar la necesidad de determinar la subespecie de los aislamientos.

En el presente trabajo, incorporamos todas las secuencias genómicas disponibles a la fecha y se siguió un enfoque similar al empleado por Iraola y col., que dio como resultado la misma topología de árbol y agrupación (Iraola et al., 2017). Curiosamente, identificamos un *subcluster* particular de 31 cepas

con características comunes dentro del linaje bovino asociadas a la producción de H₂S. En la sección de resultados de la presente tesis, se informó del desarrollo de un método de prueba basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para evaluar la presencia de un operón transportador de cisteína (transportador L-Cys), relacionado con la producción de sulfuro de hidrógeno en las cepas de *C. fetus*. Todas las cepas de este *subcluster* fueron analizadas mediante la PCR-*in silico* y fueron identificadas como no productoras de sulfuro de hidrógeno, un rasgo típico de Cfv. Además, este análisis fue consistente con los resultados bioquímicos obtenidos para las cepas incluidas en este *subcluster*. La mayoría de estas cepas fueron aisladas de muestras prepuciales (71%). Las criptas prepuciales de los toros han sido descritas previamente como el principal nicho para la existencia de esta subespecie (Campero et al., 2005). Además, la mayoría de estas cepas compartieron rasgos moleculares ya que fueron identificadas como Cfv mediante métodos de tipificación molecular. Entre ellas, la cepa española C7 fue la única excepción. Esta cepa fue tipificada molecularmente como Cff por Iraola y col. (Iraola et al., 2017). En contraste, nuestros resultados basados en la PCR-transportador L-Cys la describieron como Cfv. Otro caso similar corresponde a la cepa Cfv 98-25, aislada en Argentina, con diferentes clasificaciones bioquímicas en distintos laboratorios. Sin embargo, en el presente estudio, esta cepa se tipificó bioquímicamente como Cfv, lo que fue concordante con los resultados de la PCR-transportador L-Cys, la tipificación molecular convencional (Hum et al., 1997) y el análisis filogenético. Curiosamente, el resto de las cepas dentro del linaje bovino resultaron ser cepas productoras de sulfuro de hidrógeno, una característica común a las cepas Cff y el biovar intermedius (Cfvi), las cuales en el árbol filogenético compartieron exclusivamente el *Cluster 1* por fuera del *subcluster* Cfv (identificado por la PCR-transportador L-cys). En adición, las cepas Cff agruparon en los *clusters* 2 a 7. Estos resultados sugieren de forma llamativa una consistencia entre la agrupación filogenética de las cepas y su fenotipo, lo cual podría sostener en parte la tipificación bioquímica.

En un estudio anterior, van der Graaf-van Bloois y col. realizaron un análisis filogenético del *core-genoma* para 21 secuencias genómicas de *C. fetus* (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a) y resaltaron que los resultados de la agrupación del estudio fueron inconsistentes con el fenotipo de las cepas. Las discrepancias en los resultados del presente estudio y del estudio de van der Graaf-van Bloois y col. podrían atribuirse a la composición del conjunto de datos genómicos. Se utilizó un tamaño de muestra

significativamente diferente en ambos estudios, lo que podría tener un impacto significativo en la constitución del *core-genoma* y la agrupación.

Hay muchas preguntas que siguen sin respuesta, en particular en lo que respecta a la importancia de cada subespecie en la salud del ganado y su diagnóstico diferencial. Habría que discutir dentro de la comunidad científica y en el ámbito veterinario varios puntos interesantes, entre ellos: si estas subespecies son realmente distintas desde el punto de vista genético, si existe realmente un tropismo diferencial y si hay suficientes pruebas para confirmar (o negar) la importancia de una subespecie sobre la otra. Es importante tener en cuenta que la asignación de subespecies debe ser confirmada tanto por las evidencias fenotípicas como por las moleculares y sin perder de vista que también debe ser apoyada por el análisis filogenético. En el presente estudio, el análisis filogenético logró diferenciar un subconjunto de cepas que compartían rasgos fenotípicos y genotípicos típicos de Cfv, y los estudios futuros deberán evaluar más a fondo su relevancia en la salud del ganado. Los ensayos de infecciones experimentales llevados adelante por el Med. Vet. J. A. García (EEA-INTA Balcarce), seguramente arrojarán resultados que ayuden a responder estas preguntas.

Argentina (2.780.400 km²) contiene diferentes regiones fitogeográficas donde la ganadería es menos importante en comparación con la región pampeana. Sin embargo, la producción ganadera es relevante para las economías locales y las enfermedades reproductivas también son prevalentes. En estas regiones, el diagnóstico se basa frecuentemente en técnicas que no implican el aislamiento de *C. fetus* y esto ha retrasado especialmente el estudio de las cepas circulantes en Argentina.

La realización de nuevos estudios filogenéticos, especialmente enfocados en la inclusión de regiones insuficientemente muestreadas y en el aumento del número total de muestras, podría ser útil para proporcionar una visión más precisa de las relaciones filogenéticas de las cepas de *C. fetus* aisladas en Argentina. Asimismo, la inclusión de muestras ambientales y de cepas humanas constituye un desafío que debe afrontarse, en línea con el enfoque de “Una salud” (OMS) (Bidaisee & Macpherson, 2014; Mackenzie & Jeggo, 2019).

Nuevas herramientas para el diagnóstico molecular de la Campilobacteriosis genital bovina

En la actualidad, el aislamiento y las pruebas bioquímicas para la tipificación de las distintas subespecies, son de gran utilidad para el diagnóstico. Sin embargo, estas pruebas suelen requerir mucho tiempo, ya que están sujetas al aislamiento, a la tasa de crecimiento del microorganismo y todo el proceso depende en gran parte de la objetividad y de las habilidades del operador. Además, a menudo no existe una estandarización adecuada, que es esencial para obtener resultados fiables y reproducibles. A pesar de lo mencionado, la sustitución de estas pruebas fenotípicas por técnicas moleculares no es siempre una alternativa hoy en día. La resistencia a los antimicrobianos constituye un buen ejemplo de prueba complementaria, y este rasgo fenotípico particular puede ser probado por métodos bioquímicos y a nivel molecular en varios patógenos (Fluit et al., 2001).

Varios estudios han reportado el desarrollo de distintos protocolos de PCR de punto final especie-específica para *C. fetus*. Sin embargo, los protocolos diseñados presentan inconvenientes a la hora de obtener un resultado confiable ya sea por resultados falso-negativos o positivos (Silveira et al., 2018a; van der Graaf-van Bloois et al., 2013). Por ejemplo, Hum y col. reportaron una PCR-multiplex de punto final ampliamente utilizada hasta el día de hoy para la identificación de especie y subespecies, cuyo diseño se basa en la amplificación específica de dos regiones que corresponden a los genes *csp* (específica para la especie *C. fetus*) y *parA* (específica para *Cfv*) (Hum et al., 1997). No obstante, distintos estudios han cuestionado el empleo de dicho protocolo debido a la ausencia de amplificación de la región correspondiente al gen *csp* tanto en aislamientos de origen mamífero como reptiliano (Fitzgerald et al., 2014; Iraola et al., 2016; Polo et al., 2021; Schmidt et al., 2010). Además, un estudio descrito por Rasmussen y col. (2013) reportó la presencia de dicho gen en *C. jejuni* (Rasmussen et al., 2013), por lo cual esta secuencia no es específica de *C. fetus*. Otro ejemplo es el protocolo de PCR reportado por Abril y col., cuya región blanco es el gen *nahE* que codifica para una proteína intercambiadora de iones (Abril et al., 2007). A pesar de que este ensayo ha sido rediseñado también en formato de PCR en tiempo real por van der Graaf-van Bloois y col. (van der Graaf-van Bloois et al., 2013), el mismo también ha sido cuestionado por varios autores. Esto se debe, por un lado a la baja eficiencia en la detección de muestras

positivas de *C. fetus* en muestras prepuciales de campo (Polo et al., 2021), y por el otro, al emplear dichos oligonucleótidos iniciadores para identificar a la especie en las cepas Cft los mismos presentan *mismatches* en los sitios de hibridación (Iraola et al., 2016).

En este trabajo se desarrolló un protocolo de PCR en formato de punto final y de PCR en tiempo real (PCR-*yagE*) con el propósito de aportar nuevas herramientas moleculares para la identificación especie-específica de *C. fetus*. Dicha estrategia fue direccionada a una región blanco exclusiva de *C. fetus* correspondiente a la secuencia del gen *yagE* que codifica para una aldolasa putativa de clase I (familia dihidrodipicolinato sintasa). La misma se obtuvo luego de realizar un alineamiento global multiple con 34 secuencias de genomas completos representativos de las especies del género *Campylobacter* y 6 secuencias de genomas completos representativos de otros géneros cercanos a *C. fetus*.

El desempeño de la PCR de punto final fue evaluado en aislamientos obtenidos a partir de muestras clínicas y tipificados en la Unidad de Bacteriología del INTA-Balcarce (Argentina), que tiene una larga trayectoria en el cultivo de esta bacteria y en la realización de su clasificación basada en la fenotipificación. En este trabajo, todas las cepas evaluadas pudieron ser identificadas con la PCR-*yagE*. Al comparar los resultados obtenidos de la PCR-*yagE* de punto final con el desempeño de la PCR del gen *csp* propuesta por Hum y col. (Hum et al., 1997), pudimos observar que las cepas Cff 04-240 y Cff 89-222 no pudieron ser detectadas por la PCR de Hum. Esto podría deberse a la ausencia del gen *csp* en ambas cepas o a la presencia de variaciones en la secuencia nucleotídica que impiden la hibridación de los oligonucleótidos iniciadores. El caso de la cepa Cff 89-222 coincide con un estudio reciente realizado por Iraola y col. (2016), donde se reportó la ausencia del producto amplificado del gen *csp* en la misma cepa.

Cuando se analizó el rendimiento de la PCR-*yagE* *in silico* sobre 268 secuencias de genomas completos de *C. fetus*, todas las cepas pudieron ser identificadas como *C. fetus*. Es importante destacar que en este análisis se incorporaron 18 secuencias de genomas completos correspondientes a cepas Cft, las cuales también resultaron positivas al evaluarlas mediante la PCR *in silico* con PrimerMap. Es importante mencionar que dicho programa no permite identificar la amplificación del templado en aquellos casos de existencia de *mismatches* en los sitios de hibridación. Este hecho respalda la hibridación perfecta de los oligonucleótidos iniciadores diseñados con todas las secuencias evaluadas.

Los métodos de PCR en tiempo real se destacan por sobre los métodos de PCR de punto final debido que poseen mayor simplicidad en la detección del producto y permiten realizar ensayos *high-throughput*. En este estudio, al comparar la sensibilidad analítica entre la PCR convencional y en tiempo real, el límite de detección para la PCR-*yagE* en tiempo real fue de 5 fg/ μ L, resultando 1.000 veces mayor que la de la PCR de punto final.

Al evaluar la eficiencia de la PCR-*yagE* en tiempo real sobre muestras clínicas de smegma prepucial y mucus cérvico vaginal, los resultados pudieron determinarse con claridad luego del análisis de las curvas de disociación. Para la detección del patógeno en las 27 muestras analizadas de smegma prepucial, se obtuvo un índice de concordancia muy bueno (kappa: 0,864) al comparar la PCR-*yagE* en tiempo real desarrollada con el cultivo (prueba de oro según la OIE). Aún más, esta concordancia resultó mejor que la obtenida entre el cultivo y el método de inmunofluorescencia directa (IFD) (kappa: 0,503). Por otra parte, al evaluar el desempeño de la PCR-*yagE* en tiempo real sobre muestras de mucus cérvico vaginal provenientes de diferentes casos de infección natural, se obtuvo una positividad del 37,93% para la PCR desarrollada, mientras que fue del 24,13% para el método de cultivo bacteriológico. Si se hubiese evaluado la presencia de *C. fetus* solamente mediante IFD, se habría detectado la presencia del patógeno en 2 de los 4 establecimientos analizados, reflejando una tasa de positividad de 10,34%. Si bien estos valores demuestran una sensibilidad aparentemente mayor de los métodos moleculares por sobre los métodos tradicionales, es importante destacar la complejidad que conlleva procesar las muestras de mucus cérvico vaginal para la extracción del ADN. Esto se debe a la naturaleza de la muestra (alta densidad) y a la gran cantidad de inhibidores en la misma. Por este motivo al día de hoy no es posible contar con protocolos apropiados para analizar este tipo de muestra.

El protocolo de PCR-*yagE* en tiempo real desarrollado en esta Tesis posee algunas ventajas sobre otros métodos de PCR en tiempo real publicados anteriormente. Los protocolos descritos por van der Graaf-van Bloois y col. (van der Graaf-van Bloois et al., 2013) e Iraola y col. (Iraola et al., 2016) emplean sondas TaqMan. Pese a las ventajas de especificidad que aportan las sondas, la principal limitación para implementar estos diseños en laboratorios donde los recursos son limitados, es el costo de las sondas (Patel et al., 2016; Ponchel et al., 2003). Por lo cual, los protocolos que emplean SYBR Green como el descrito en esta Tesis, son más accesibles y de acuerdo a la selección del gen blanco y la

puesta a punto, pueden ser altamente específicos. Además, las curvas de disociación y el valor de T_m obtenidos con el protocolo desarrollado permitieron evaluar si el producto de la reacción correspondía o no a la secuencia blanco de interés. En un estudio reciente reportado por Iraola y col. (2016), se describió una PCR en tiempo real dirigida al gen de la subunidad 16S del ARNr de *C. fetus* (Iraola et al., 2016). Si bien este diseño apunta a una secuencia del gen característica de la especie, puede presentar limitaciones para la identificación a nivel de género y especie, debido a que algunos microorganismos filogenéticamente cercanos pueden tener regiones blanco casi idénticas. Según nuestra experiencia, consideramos que deberían evaluarse en número mayor de cepas dentro del género y no relacionadas, para asegurar su confiabilidad.

En los últimos años, distintos estudios han propuesto varias pruebas genotípicas para la diferenciación de *C. fetus*. Por ejemplo, diferentes grupos han empleado técnicas moleculares como la PCR basada en diferentes genes blanco para diferenciar Cfv de Cff (Abril et al., 2007; Hum et al., 1997; van Bergen et al., 2005a). Sin embargo, hasta la fecha no existe un consenso claro sobre el mejor método para determinar las subespecies de *C. fetus*. Los principales problemas surgen habitualmente del número limitado de cepas analizadas, o al fracaso en la identificación de las cepas Cfvi y/o a la baja concordancia con otras técnicas moleculares y, principalmente, con las pruebas bioquímicas (Schmidt et al., 2010; Schulze et al., 2006; Willoughby et al., 2005).

Un estudio genómico de secuenciación de genomas completos ha propuesto la asociación entre la presencia de un operón que codifica para el transportador de L-Cys y la producción de H_2S , que junto con la resistencia a la glicina, ha sido uno de los rasgos fenotípicos tradicionalmente empleados para determinar las subespecies de *C. fetus*. Según esto, las cepas de *C. fetus* productoras de H_2S , comúnmente clasificadas como Cff y Cfvi, tienen un operón completo del transportador de L-Cys, mientras que las cepas de *C. fetus* no productoras de H_2S , clásicamente clasificadas como Cfv, tienen un transportador de L-Cys parcialmente deletado. Es importante mencionar que Cft, la última subespecie propuesta de *C. fetus*, tiene una versión completa del operón. Es el caso de la cepa Cft 03-427, cuyo genoma es el representante de la especie y ha sido descrita concordantemente como una cepa

productora de H₂S (van der Graaf-van Bloois et al., 2016a). Hasta la fecha, esta subespecie no ha sido descrita en el ganado, y por esta razón no fue incluida en este estudio.

En este trabajo, hemos diseñado un protocolo de PCR multiplex para proporcionar una herramienta molecular que contribuya a la caracterización y diferenciación de *C. fetus*. Esta PCR-transportador L-Cys mostró una excelente correlación con la prueba de producción de H₂S, tanto experimentalmente como *in silico*. Un patrón CFF-CFVI, que es indicativo de un transportador completo de L-Cys, se asoció con cepas productoras de H₂S clasificadas típicamente como Cff o Cfvi. Por el contrario, un patrón CFV, que es indicativo de un transportador eliminado, se asoció exclusivamente con cepas no productoras de H₂S, que se clasifican típicamente como Cfv. Al igual que otras técnicas moleculares, esta PCR no logró diferenciar las cepas Cff de las Cfvi. Esto limitará su uso en los países en los que este biovar es prevalente. Sin embargo, hasta que se desarrollen técnicas más discriminativas, su utilidad podría aumentar combinando esta técnica con otras pruebas complementarias como el ensayo de resistencia a la glicina. Además de las implicancias prácticas de esta herramienta en el laboratorio, este estudio también contribuye al debate existente en torno a la clasificación de subespecies de *C. fetus*.

Por otra parte, cuando realizamos el estudio *in silico*, analizamos los datos genómicos de las cepas clasificadas en otros laboratorios mediante enfoques basados en métodos moleculares y/o pruebas bioquímicas y, como se ha mencionado anteriormente, ambas técnicas mostraron con frecuencia resultados discordantes. De este modo, hemos obtenido una correlación perfecta con la prueba de producción de H₂S, pero no con las subespecies de las cepas reportadas.

Un ejemplo de esta discordancia está representado por la cepa 98-25. Investigadores de la Unidad de Bacteriología del INTA-Balcarce aislaron esta cepa en 1998 a partir de fetos abortados y la tipificaron originalmente como Cfv por su sensibilidad a la glicina y su incapacidad para producir H₂S. Esta cepa se incluyó en este estudio y el resultado de la PCR-transportador L-Cys fue concordante con el fenotipo de esta cepa. Posteriores estudios, también han evaluado a esta cepa y su genoma ha sido secuenciado. En efecto, van Bergen y col. (2005) la describieron como sensible a la glicina y productora de H₂S (rasgos típicos de las cepas Cfvi). Contrariamente, van der Graaf-van Bloois y col. (2014a) informaron a esta cepa como no productora de H₂S. Sin embargo, en ese mismo trabajo, la han

denominado Cfv 98-25 independientemente de los rasgos bioquímicos reportados. En nuestro estudio, el análisis *in silico* de los datos de la secuencia puso en evidencia el polimorfismo del transportador de L-Cys típico de las cepas no productoras de H₂S (patrón CFV). Por lo tanto, la misma cepa podría mostrar diferentes rasgos bioquímicos al ser ensayada en diferentes laboratorios (o en distintos tiempos) y esto es el clásico “cuello de botella” de las pruebas fenotípicas.

En este estudio, también se observaron otras discrepancias en algunos aislamientos. Sorprendentemente, 14 de las 43 secuencias genómicas de Cfv analizadas *in silico* mostraron una versión completa del transportador del L-Cys (patrón CFF/CFVI). Por lo tanto, según el análisis *in silico*, la hipótesis de que todos los aislamientos de Cfv tienen un transportador de L-Cys delecionado parecía no ser válida. Sin embargo, al rastrear las pruebas bioquímicas reportadas para algunas de estas cepas, se concluyó que los resultados *in silico* presentados aquí son concordantes con la prueba de producción de H₂S. Esta discrepancia con la subespecie asignada podría deberse al método de clasificación de las cepas que frecuentemente se basa en técnicas moleculares ignorando los resultados de las pruebas bioquímicas y además; no siempre se especifica el método elegido (Iraola et al., 2017). En conjunto, el análisis *in silico* también apoya la relación propuesta entre la presencia de una deleción en el operón del transportador con las cepas no productoras de H₂S que son clasificadas como Cfv según los métodos bioquímicos.

Como se ha mencionado anteriormente, es importante destacar que las cepas de las bases de datos no están tipificadas con la misma metodología y este hecho no siempre se tiene en cuenta en los diferentes trabajos. En consecuencia, esto podría ser problemático a la hora de interpretar los resultados como demostró nuestro estudio. El método molecular más empleado en distintos laboratorios del mundo es la PCR múltiple descrita por Hum y col. (1997). Esta PCR está dirigida al gen *parA* para identificar las cepas Cfv. Este gen, asociado a la transferencia de genes, se localiza en una isla de patogenicidad que codifica al Sistema de secreción de tipo IV. Aunque la presencia de este Sistema de secreción ha sido asociada previamente a las cepas Cfv (Gorkiewicz et al., 2010), también se ha demostrado posteriormente su presencia en algunas cepas Cff (van der Graaf-van Bloois et al., 2016b). Además, de estas inconsistencias, distintos análisis filogenéticos sugieren que la actual clasificación en subespecies debe ser redefinida. Un estudio filogenómico basado en el genoma central ha descrito que las cepas se dividen en dos grupos. Mientras que todas las cepas Cfv y Cfv i agruparon en un único *cluster*

del árbol filogenético, las cepas Cff se distribuyeron por igual en ambos *clusters* (van der Graaf-van Bloois et al., 2014a). Además, una reconstrucción filogenética basada en la divergencia adquirida por recombinación también ha puesto en evidencia que las cepas Cfv y Cff comparten el mismo *cluster*, que difiere claramente del *cluster* de cepas Cft de origen reptil (Gilbert et al., 2018). Esto enfatiza una necesidad real de una revisión en la clasificación de las subespecies e identificación actual de *C. fetus*, lo que tendrá un impacto significativo en la práctica diagnóstica. Como se mencionó anteriormente, aunque este tema ha sido abordado en la literatura y los estudios genómicos han ampliado y fortalecido nuestro conocimiento de esta bacteria (Iraola et al., 2017; van der Graaf-van Bloois et al., 2014a; 2016a; 2016b), se ha descuidado una acción concertada hacia la clasificación y diferenciación de las subespecies de *C. fetus*. No existen aún, marcadores moleculares asociados al tropismo o virulencia de Cfv que puedan ayudar a un diagnóstico diferencial de la CGB (Gilbert et al., 2018), como tampoco evidencias suficientes de exclusividad de nicho y patología.

Por lo tanto, a la luz de estas evidencias, es esencial que se realicen más investigaciones para determinar, como primer paso, si se debe promover el diagnóstico diferencial y, en caso afirmativo, mejorar o sustituir definitivamente las pruebas actualmente disponibles. Otro punto a tener en cuenta es que los laboratorios de diagnóstico veterinario de los países en vías de desarrollo suelen ser refractarios a sustituir aquellos métodos que han demostrado ser útiles, aunque no sean los más adecuados. Por este motivo, se ha retrasado la adopción de los métodos moleculares o incluso genómicos. Una posible razón es el costo relacionado con cada método. La segunda razón principal es el tiempo que demanda la transferencia del conocimiento científico hasta los usuarios finales.

La investigación interdisciplinaria que combina la genómica, la bioquímica, la medicina veterinaria y la epidemiología, así como el suministro de información actualizada y la formación de los usuarios finales de la tecnología, podría arrojar luz sobre esta cuestión en un futuro próximo.

Exploración del Secretoma de *Campylobacter fetus*

Hoy en día, dentro del género *Campylobacter*, la patogénesis de *C. jejuni* ha sido ampliamente estudiada al ser reconocida como la principal causa de gastroenteritis en todo el mundo (Lindmark et al., 2009; Robinson et al., 2021). A pesar de ello, se conoce poco sobre otros miembros del género como

C. fetus (Ali et al., 2012; Kaakoush et al., 2011). Por lo cual, el presente estudio tuvo como objeto caracterizar el repertorio antigénico de *C. fetus* con el fin de sentar las bases para el diseño futuro de nuevas herramientas de prevención y control de la CGB, mediante una estrategia de trabajo que contempla dos enfoques. Por un lado, una estrategia computacional *in silico* con el fin de identificar las proteínas que forman parte del secretoma, y por el otro, una estrategia experimental para indagar sobre la secreción de Vesículas de Membrana Externa (VMEs).

El secretoma de las bacterias patógenas puede definirse como un elemento esencial de su arsenal virulento y puede dar indicios sobre cómo es su estilo y capacidad de invasión e interacción inicial con el hospedador (Kaakoush et al., 2011). Dentro de las bacterias Gram negativas, los patógenos intracelulares y facultativos, por lo general, se caracterizan por tener secretomas reducidos (Song et al., 2009). Esta cualidad, ha sido descrita hasta el momento en algunas campilobacterias como *C. curvus*, *C. hominis*, *C. lari*, *C. jejuni* y *C. concisus*, quienes se caracterizan por tener un secretoma discreto (Kaakoush et al., 2010; Ali et al., 2012).

En nuestro estudio del secretoma de *C. fetus*, este rasgo se reflejó en los resultados obtenidos al realizar una predicción de la localización subcelular de todas las proteínas de *C. fetus* subesp. *venerealis* 97/608. Solo el 2,2% (n= 41) del proteoma de CfV 97/608 fue predicho como proteínas de la membrana externa y el 1,3% (n= 24) como proteínas extracelulares. Dichos valores, coinciden con la proporción de proteínas que forma parte del secretoma de *C. jejuni* en un estudio de vacunología reversa realizado por Gupta y col. (2019). La localización de estas proteínas fue predicha con PSORTb 3.0 (Yu et al., 2010). Este programa sigue siendo uno de los más precisos y actualmente empleados en varios trabajos en otros géneros (Rashid et al., 2017; Sankarasubramanian et al., 2015; Soltan et al., 2021) ya que analiza la localización subcelular mediante módulos analíticos múltiples incorporando métodos de *machine learning*, una herramienta valiosa para el análisis (Gupta et al., 2019; Gupta & Kumar, 2020).

Las proteínas esenciales son necesarias para la supervivencia del patógeno por lo cual, estas proteínas pueden ser un punto de partida para el desarrollo de herramientas que inhiban el crecimiento y la colonización del entorno (Vishnu et al., 2015). La antigenicidad es otro factor clave de las bacterias patógenas. En este estudio, se han priorizado estas propiedades para identificar computacionalmente qué candidatos podrían tenerse en cuenta para el diseño de estrategias de prevención en el futuro. Para

evitar la reactividad cruzada y las respuestas autoinmunes, los candidatos no deben tener similitudes con ninguna proteína del hospedador. En consecuencia, en base a estas puntualizaciones, mediante el empleo de la base de datos de DEG (Luo et al., 2014) y el servidor VaxiJen (Doytchinova & Flower, 2007) se identificaron 15 proteínas esenciales y 47 proteínas antigénicas respectivamente, del conjunto de 52 proteínas predichas de la membrana externa y extracelulares. Entre las cuales, se encontró a la proteína PorA, una porina multifuncional principal de la membrana externa de *Campylobacter* que participa en el transporte de iones a través de la pared celular bacteriana y en la adhesión de la bacteria a la mucosa intestinal del hospedador. Asimismo, constituye un buen candidato vacunal, según trabajos realizados en *C. jejuni* (Albert et al., 2019; Annamalai et al., 2013; Islam et al., 2010; Zhang et al., 2000) y en otros géneros como *Neisseria meningitidis* (Cartwright et al., 1999). Otras proteínas de este grupo son las proteínas de la familia TolC, que son transportadores de la membrana externa y dirigen el movimiento de pequeñas moléculas tóxicas dentro y fuera de la célula (Bleuel et al., 2005; Tatsumi & Wachi, 2008). La proteína OmpA es otra proteína importante predicha, ya que desempeña un papel clave en la estabilidad estructural de la membrana externa. Además, es considerada un factor importante en la virulencia de muchos patógenos Gram negativos, debido a que posee también funciones de adhesina e invasina, por lo cual ha sido ampliamente evaluada en diferentes géneros bacterianos como candidato a vacuna (Confer & Ayalew, 2013; Krishnan & Prasadarao, 2012; Smith et al., 2007).

Uno de los mecanismos más importantes de la virulencia de *Campylobacter* es la producción de la toxina de distensión citoletal (Cdt), la cual está regulada por tres genes: *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, siendo *cdtB* la subunidad activa y tóxica (Pickett & Whitehouse, 1999). En un estudio realizado por Dasti y col. (2010) en la especie *C. jejuni*, mutaciones producidas en este gen resultaron en una toxina no funcional (Dasti et al., 2010). Esta subunidad proteica fue predicha como una proteína antigénica en nuestro análisis. Dentro de los modelos de infección reportados en el género *Campylobacter*, es conocido que tras colonizar la mucosa intestinal, *C. jejuni* se adhiere a las células epiteliales mediante adhesinas asociadas a su superficie y puede inducir la muerte celular por apoptosis a través de la expresión y secreción de la Cdt dentro de las células del hospedador (Asakura et al., 2008; Hickey et al., 2005). Esta toxina, también ha sido descrita en *C. concisus* (Engberg et al., 2005; Kaakoush et al., 2010) y en *Helicobacter* (Güven-

Maierov et al., 2017; Naz et al., 2015). Una vez dentro de las células hospedadoras, la Cdt puede causar progresivamente la extensión del citoplasma y del núcleo y detener el crecimiento celular en la fase G2/M del ciclo celular eucariota (Asakura et al., 2007), impidiendo así el crecimiento de las células hospedadoras infectadas y contribuyendo a la persistencia de la infección. Por sus efectos directos y/o indirectos sobre las células T y las células presentadoras de antígenos, la Cdt también es capaz de interrumpir la respuesta inmunitaria (Lindmark et al., 2009). Por lo tanto, la subunidad CdtB podría constituir un buen blanco de acción para el diseño de estrategias de prevención de la CGB.

Si bien se ha catalogado a *C. fetus* como un patógeno extracelular, varios autores han reportado que puede invadir líneas celulares humanas (Hep-2 y Caco-2) (Baker & Graham, 2010; Konkel & Joens, 1989). También, se ha reportado su capacidad de invadir células epiteliales del endometrio bovino (Campos-Múzquiz et al., 2019), aunque los mecanismos moleculares de su internalización en las células eucariotas son desconocidos. El conocimiento previo en otros géneros y especies acerca de las adhesinas (CadF y PEB1) y los factores de toxicidad (Cdt) más relevantes predichos en esta tesis, podrían brindar indicios del mecanismo de internalización de *C. fetus* en el hospedador. PEB1 es una de las principales adhesinas de *C. jejuni* y desempeña una función importante en las interacciones con las células epiteliales (Konkel et al., 2020). Por su parte, CadF es otra adhesina de la membrana externa ampliamente caracterizada en *C. jejuni* cuya función principal es la unión a fibronectina, facilitando la colonización de las células del hospedador (Konkel et al., 1997, 2020). Asimismo, ambas proteínas han sido identificadas como antígenos en otras especies y géneros y son capaces de inducir una respuesta inmune (Moballeggh Naseri et al., 2020). En un estudio llevado a cabo por Rivera-Amill y col. (2001) de expresión génica *in vitro* e *in vivo* en *C. jejuni*, reportaron que la ausencia de ambas proteínas disminuye la capacidad de invasión celular de las campilobacterias. Por lo tanto, CadF y PEB1 podrían constituir la base del desarrollo de nuevas estrategias de control de la infección de *C. fetus*.

El análisis de la red de interacción proteína-proteína (PPI) reveló que las proteínas predichas pueden interactuar con varias proteínas, incluyendo factores de virulencia, proteínas de resistencia a los antibióticos y proteínas del sistema de secreción, metabolismo y transporte. La localización de las proteínas LptD (proteína de ensamblaje del lipopolisacárido) y BamA (factor de ensamblaje de proteínas

a la membrana externa) en el centro de la red de interacción proteína-proteína obtenida con STRING, permite inferir su importancia en la estabilidad morfológica y funcional de *C. fetus*.

Los lipopolisacáridos (LPS) son esenciales para la mayoría de las bacterias Gram negativas y desempeñan un papel crucial en la supervivencia en el ambiente y en la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Ruiz et al., 2009). También, impiden la entrada de antibióticos hidrofóbicos en la bacteria, favoreciendo así la resistencia a los antibióticos (Mukherjee et al., 2020). El transporte de LPS a la membrana externa requiere de diferentes componentes proteicos esenciales conocidos como proteínas transportadoras de lipopolisacáridos (Lpt). El sistema Lpt contiene siete componentes: LptB (proteína citoplasmática soluble), LptF y LptG (proteínas de la membrana interna), LptC (proteína periplásmica anclada a la membrana interna), LptA (proteína periplásmica soluble), LptE (proteína periplásmica anclada a la membrana externa) y LptD (proteína de la membrana externa) (Dong et al., 2014; Okuda et al., 2016). En este sistema, LptD se asocia con LptE y forma un complejo, que es el responsable de translocar el LPS en la membrana externa (Dong et al., 2014). Varios estudios demostraron que la proteína LptD es un inductor importante de la respuesta inmune en distintos patógenos como *Vibrio* (Zha et al., 2016), *Salmonella typhi* (Mukherjee et al., 2020), *Moraxella catarrhalis* (Soltan et al., 2021) y *Brucella melitensis* (Vishnu et al., 2015). Por lo cual, LptD también podría constituir un antígeno candidato a vacuna para la prevención y el control de la CGB.

Por su parte, varios autores han considerado a BamA como la segunda proteína de relevancia y esencial de la membrana externa de *Escherichia coli* (Albrecht et al., 2014; Rooke et al., 2021). Esta proteína es el componente de mayor tamaño y el más conservado de la maquinaria de ensamblaje de proteínas β -barril (BAM) en la membrana externa, que en *E. coli* consta de cinco lipoproteínas (BamB-E) (Knowles et al., 2009; Misra et al., 2015). Estructuralmente, BamA está formada por un β -barril de 16 cadenas aminoacídicas con cinco dominios asociados al transporte de polipéptidos que se sitúan en el periplasma (Knowles et al., 2009). Sólo BamA y BamD son esenciales en *E. coli* (Rooke et al., 2021) aunque las subunidades BamB, BamC y BamE son necesarias para la inserción eficiente de los precursores proteicos de la membrana externa. Asimismo, en los últimos años se han reportado varios trabajos de vacunología reversa que han empleado a la proteína BamA en el diseño de vacunas

multiepitope contra las infecciones por *M. catarrhalis* (Soltan et al., 2021), *Acinetobacter baumannii* (Singh et al., 2017), *Vibrio anguillarum* (Baliga et al., 2018) y *Leptospira* spp. (Grassmann et al., 2017).

La identificación de las proteínas (predichas) descritas hasta aquí en el secretoma de *C. fetus* podrían ayudar a desentrañar el comportamiento del patógeno en la infección y la respuesta del hospedador. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las proteínas identificadas fueron seleccionadas en base a las predicciones de varios algoritmos, por lo cual sólo los posteriores experimentos *in vitro* e *in vivo* confirmarán o refutarán el potencial de estas proteínas. No obstante, ninguna de estas proteínas predichas ha sido considerada hasta ahora como candidatos vacunales en *C. fetus*.

Actualmente, el término “secretoma” hace referencia al conjunto de proteínas que son secretadas a través de mecanismos tanto clásicos como no clásicos o alternativos, como lo es la secreción de VMEs (Armengaud et al., 2012). Por lo cual, la presencia de estas estructuras extracelulares en las bacterias patógenas hace que sea relevante su estudio (Guerrero-Mandujano et al., 2017). Trabajos anteriores basados en microscopía electrónica han aportado pruebas de la presencia de “cuerpos globulares” en *C. fetus*, anteriormente denominada *Vibrio fetus* (Ritchie et al., 1966). Estas estructuras fueron ignoradas en ese momento como VMEs y se caracterizaron como estructuras asociadas a la membrana que co-purificaban con los flagelos (McCoy et al., 1975). Mas tarde, mediante técnicas inmunológicas, Winter y col. (Winter et al., 1978) describieron la presencia de la proteína de la capa S (antes conocida como proteína A) asociada a vesículas no producidas espontáneamente y obtenidas por rotura (*shearing*) de la bacteria. Pese a estos estudios, en la actualidad no se ha descrito otras evidencias de secreción de VMEs ni su aislamiento en *C. fetus*.

En este trabajo, todos los aislamientos de campo de *C. fetus* evaluados produjeron VMEs *in vitro* y las mismas fueron purificadas con éxito mediante protocolos estandarizados. La forma y los tamaños obtenidos son similares a los descritos previamente en otras bacterias Gram negativas (Mashburn-Warren et al., 2008). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los tamaños de las VMEs podrían ser incluso más variables, ya que en la etapa de filtración del proceso de purificación se pudieron haber eliminado las VMEs más grandes.

En casi todas las cepas ensayadas se evidenció la capa S característica de *C. fetus* en la superficie de las VMEs (3/4). Otros trabajos de microscopía electrónica transmisión (MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB) evidenciaron que la mayoría de las capas S bacterianas poseen un grosor de entre 5 y 25 nm (Schuster et al., 2008), lo que coincide con nuestras observaciones por MET.

La capa S es uno de los primeros componentes bacterianos que interactúan con el huésped. Algunas de sus diferentes funciones son la adhesión celular, la protección frente a la fagocitosis, el mantenimiento de la membrana celular y el despliegue de enzimas, entre otros (Beveridge et al., 1997; Fagan & Fairweather, 2014). Esta estructura cristalina también proporciona a la bacteria un núcleo protector frente a las condiciones ambientales. Por lo tanto, algunas de estas funciones también pueden ser válidas para las VMEs, por ejemplo, aumentar la vida útil de estos transportadores para alcanzar objetivos distantes.

Esta capa S estuvo ausente o fue indetectable en las VMEs de Cfv NCTC 10354. Este resultado se observó tanto en cultivo como tras la purificación a partir de medios de cultivo libres de células. Curiosamente, Blaser y Pei (Blaser & Pei, 1993) describieron mutantes espontáneos de la capa S obtenidos tras múltiples pasajes de una cepa de *C. fetus* de tipo salvaje en medios artificiales. Este podría ser el caso de la cepa Cfv NCTC 10354. Esta cepa probablemente exprese las SLP (“*surface layer protein*”) de forma menos eficiente, o podría ocurrir que no las exprese o que incluso exprese las SLP pero el proceso de ensamblado de la capa S podría estar alterado. Por lo cual, habría que seguir investigando la secreción de VMEs con o sin capa S y debe considerarse este aspecto al emplear esta cepa en estudios futuros, especialmente en aquellos en que pueda ser esencial su presencia. La presencia de vesículas con capa S es relevante y podría tener consecuencias importantes en la adhesión a las células o a la matriz extracelular y en la modulación de la respuesta del hospedador.

Para comprobar la presencia de componentes inmunorreactivos, se realizó un *dot-immunoblot* empleando un suero policlonal dirigido a proteínas totales de *C. fetus* producido en conejo. En nuestro estudio, Cff 08-421 fue la cepa productora de VMEs más activa. A pesar de esto, se empleó un ensayo *dot-blot* para concentrar en un punto las proteínas presentes en la muestra. Las proteínas de la capa superficial se han descrito previamente como antígenos importantes en *C. fetus* (Blaser, 1993). Por lo tanto, la inmunoreactividad de las VMEs que observamos podría explicarse, en parte, por la presencia

de la capa S. Además, dado que no podemos descartar que los anticuerpos policlonales puedan llegar al interior de las VMEs, otras moléculas antigénicas podrían contribuir también con la inmunorreactividad observada.

Por otro lado, las proteínas de la capa superficial de distintas bacterias han sido descritas como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP). Estos PAMPs podrían ser reconocidos por los receptores tipo Toll (TLR) o por la no-integrina ICAM-3 (DC-SIGN) presentes en los macrófagos y, en el caso de DC-SIGN, en las células dendríticas, dando lugar a la activación celular y a la secreción de citoquinas (Gerbino et al., 2015; Konstantinov et al., 2008). De este modo, la presencia de la capa S en las VMEs de *C. fetus* podría cumplir un rol importante en la modulación de la respuesta innata y adaptativa, lo cual también podría transformarlas en un potencial candidato para ser evaluadas como adyuvante de las vacunas actuales utilizadas en el ámbito veterinario, mejorando la eficiencia de las bacterinas.

Los bajos rendimientos obtenidos con la mayoría de las cepas estuvieron de acuerdo a lo esperado (Manning & Kuehn, 2011; Klimentová & Stulík, 2015; Balhuizen et al., 2021). Cabe destacar que la obtención de VMEs es un reto ya que su productividad es baja. Diferentes tiempos de cultivo, crecimiento estático *vs.* agitación, volumen de cultivo, inóculo inicial, así como diferentes medios de cultivo fueron algunas de las variables ensayadas para establecer el protocolo final.

La estimulación de la secreción de VMEs podría mejorar los rendimientos obtenidos. Diferentes estímulos como el agotamiento de nutrientes, la exposición a antibióticos, el peróxido de hidrógeno, el choque térmico o incluso la extracción de detergentes, entre otros, han demostrado ser útiles en diferentes bacterias (MacDonald & Kuehna, 2013; Zariri et al., 2016) y deben ser evaluados en *C. fetus*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la composición de las VMEs podría ser diferente (Zariri et al., 2016). Por ejemplo, la capa S podría verse afectada lo cual tendría un efecto perjudicial sobre la adhesión y la inmunogenicidad. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la expresión de VMEs de forma no inducida, por ese motivo no modificamos el protocolo con aditivos.

De acuerdo con Thompson y col. (Thompson et al., 1998), pensamos que la ingeniería de las VMEs tiene el potencial para constituir una estrategia prometedora en el campo de la Vacunología. A través del diseño racional, sería posible reducir la unión de la membrana externa al peptidoglicano a fin

de aumentar la liberación de VMEs (Kulp & Kuehn, 2010) o también, podrían ser empleadas como transportadores eficaces de moléculas de interés (antígenos, mediadores inmunológicos como citoquinas, entre otros) (Beernink et al., 2019) e incluso controlar la respuesta del hospedador (por ejemplo, reduciendo el contenido de LPS) (Zariri et al., 2016). En consecuencia, su combinación con vacunas vectorizadas o tradicionales podría ser una mejor opción para potenciar una respuesta inmunológica global.

Estudios proteómicos posteriores podrían sin duda contribuir a determinar la composición proteica y las funciones de estas nanopartículas en *C. fetus*. Este estudio representa un punto de partida para investigaciones futuras en *C. fetus* centradas en dilucidar la interfase hospedador-patógeno, la modulación de la respuesta del hospedador y el desarrollo de vacunas.

Conclusiones

En base a los resultados derivados del presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

El abordaje conjunto de genómica comparativa y filogenética permitió describir una estructura poblacional clonal de las cepas locales, donde los genotipos están distribuidos en distintas regiones geográficas lo que sugiere un movimiento activo de animales.

Las cepas argentinas mostraron características propias ya que agruparon mayormente en un único *cluster* en el contexto global, aunque algunas de ellas estuvieron filogenéticamente relacionadas con cepas de otros países de Sudamérica y una cepa se relacionó con cepas de países más lejanos como parte de un linaje distinto. Esto sugiere un escenario epidemiológico más complejo, que podría reflejar relaciones comerciales de animales o sus productos en el presente o el pasado.

El estudio filogenómico permitió discriminar a las cepas de *C. fetus* subesp. *venerealis* y este agrupamiento fue concordante con los resultados de la PCR-transportador L-Cys, diseñado para identificar a las cepas en base a la producción H₂S, lo que sostiene a este rasgo fenotípico para la diferenciación de las subespecies.

Existe una correlación entre los polimorfismos del operón del transportador L-Cys y el fenotipo reportado de las cepas analizadas, lo que permitiría el reemplazo de la prueba bioquímica que valora la producción de H₂S por una prueba molecular. Sin embargo, resta aún una revisión integral de la importancia de discriminar las subespecies para el diagnóstico diferencial.

El análisis comparativo global de secuencias permitió diseñar un protocolo, altamente específico (PCR-*yagE*) que demostró ser de gran utilidad como herramienta de detección del patógeno a partir de distintos tipos de muestras clínicas.

La disponibilidad de secuencias de genomas completos permite complementar los “experimentos de mesada”, mejorando la descripción de las secuencias blanco para el diseño de estrategias de diagnóstico molecular.

La descripción de distintas proteínas relevantes en la interacción con el hospedador y de la secreción de VMEs en *C. fetus* amplían el abanico de estrategias posibles para el control y prevención de la CGB.



Lic. Pablo Daniel Farace



Dra. Andrea Gioffré



Dr. Ariel Amadio

Comisión de Seguimiento de Tesis:



Dra. Valeria Tekiel



Dra. Karina Caimi



Dr. Maximo Rivarola

Bibliografia

- Abril, C., Vilei, E. M., 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. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2007.01787.X>
- Albert, M. J., Raghupathy, R., Khan, I., & Azizieh, F. Y. (2019). In vitro spleen cell cytokine responses of adult mice immunized with a recombinant PorA (major outer membrane protein [MOMP]) from *Campylobacter jejuni*. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48249-3>
- Albrecht, R., Schütz, M., Oberhettinger, P., Faulstich, M., Bermejo, I., Rudel, T., Diederichs, K., & Zeth, K. (2014). Structure of BamA, an essential factor in outer membrane protein biogenesis. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(6), 1779–1789. <https://doi.org/10.1107/S1399004714007482>
- Ali, A., Soares, S. C., Santos, A. R., Guimarães, L. C., Barbosa, E., Almeida, S. S., Abreu, V. A. C., Carneiro, A. R., Ramos, R. T. J., Bakhtiar, S. M., Hassan, S. S., Ussery, D. W., On, S., Silva, A., Schneider, M. P., Lage, A. P., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2012). *Campylobacter fetus* subspecies: Comparative genomics and prediction of potential virulence targets. *Gene*, 508(2), 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.070>
- Alves, T. M., Stynen, A. P. R., Miranda, K. L., & Lage, A. P. (2011). Campilobacteriose genital bovina e tricomonose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(4), 336–344. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000400011>
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.
- Annamalai, T., Pina-Mimbela, R., Kumar, A., Binjawadagi, B., Liu, Z., Renukaradhya, G. J., & Rajashekara, G. (2013). Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. *Poultry Science*, 92(8), 2201–2211. <https://doi.org/10.3382/PS.2012-03004>
- Argimón, S., Abudahab, K., Goater, R. J. E., Fedosejev, A., Bhai, J., Glasner, C., Feil, E. J., Holden, M. T. G., Yeats, C. A., Grundmann, H., Spratt, B. G., & Aanensen, D. M. (2016). Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microbial Genomics*, 2(11), e000093. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000093>
- Armengaud, J., Christie-Oleza, J. A., Clair, G., Malard, V., & Duport, C. (2012). Exoproteomics: exploring the world around biological systems. *Expert Review of Proteomics*, 9(5), 561–575. <https://doi.org/10.1586/EPR.12.52>
- Asakura, M., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nishimura, K., Matsuhisa, A., & Yamasaki, S. (2008). Development of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(2), 260–266. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00369.x>
- Asakura, M., Samosornsuk, W., Taguchi, M., Kobayashi, K., Misawa, N., Kusumoto, M., Nishimura, K., Matsuhisa, A., & Yamasaki, S. (2007). Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microbial Pathogenesis*, 42(5–6), 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.01.005>

- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formis, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, *9*(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Baker, N. T., & Graham, L. L. (2010). *Campylobacter fetus* translocation across Caco-2 cell monolayers. *Microbial Pathogenesis*, *49*(5), 260–272. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2010.06.008>
- Balhuizen, M. D., Veldhuizen, E., & Haagsman, H. P. (2021). Outer Membrane Vesicle Induction and Isolation for Vaccine Development. *Frontiers in microbiology*, *12*, 629090. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629090>
- Baliga, P., Shekar, M., & Venugopal, M. N. (2018). Potential Outer Membrane Protein Candidates for Vaccine Development Against the Pathogen *Vibrio anguillarum*: A Reverse Vaccinology Based Identification. *Current Microbiology*, *75*(3), 368–377. <https://doi.org/10.1007/S00284-017-1390-Z>
- Balzan, C., Ziech, R. E., Gressler, L. T., & de Vargas, A. P. C. (2020). Bovine genital campylobacteriosis: Main features and perspectives for diagnosis and control. *Ciencia Rural*, *50*(3). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190272>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, A. D., Pyshkin, A. v., Sirotkin, A. v., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bidaisee, S., & Macpherson, C. N. L. (2014). Zoonoses and One Health: A Review of the Literature. *Journal of Parasitology Research*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/874345>
- Bier, P. J., Hall, C. E., Duncan, J. R., & Winter, A. J. (1977). Experimental infections with *Campylobacter fetus* in bulls of different ages. *Veterinary Microbiology*, *2*(1), 13–27. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(77\)90028-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(77)90028-1)
- Blaser, M. J. (1993). Role of the S-Layer Proteins of *Campylobacter fetus* in Serum-Resistance and Antigenic Variation: A Model of Bacterial Pathogenesis. *The American Journal of the Medical Sciences*, *306*(5), 325–329. <https://doi.org/10.1097/00000441-199311000-00011>
- Blaser, M. J., Wang, E., Tummuru, M. K. R., Washburn, R., Fujimoto, S., & Labigne, A. (1994). High-frequency S-layer protein variation in *Campylobacter fetus* revealed by sapA mutagenesis. *Molecular Microbiology*, *14*(3), 453–462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb02180.x>
- Blaser, M. J., Smith, P. F., Repine, J. E., & Joiner, K. A. (1988). Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Failure of encapsulated *Campylobacter fetus* to bind C3b explains serum and phagocytosis resistance. *The Journal of clinical investigation*, *81*(5), 1434–1444. <https://doi.org/10.1172/JCI113474>
- Bleuel, C., Große, C., Taudte, N., Scherer, J., Wesenberg, D., Krauß, G. J., Nies, D. H., & Grass, G. (2005). TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *187*(19), 6701–6707. <https://doi.org/10.1128/JB.187.19.6701-6707.2005>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>

- BonDurant, R. H. (2005). Venereal diseases of cattle: Natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 21(2 SPEC. ISS.), 383–408. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2005.03.002>
- Cagnoli, C. I., Chiapparrone, M. L., Cacciato, C. S., Rodríguez, M. G., Aller, J. F., & Catena, M. del C. (2020). Effects of *Campylobacter fetus* on bull sperm quality. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104486. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104486>
- Calleros, L., Betancor, L., Iraola, G., Méndez, A., Morsella, C., Paolicchi, F., Silveyra, S., Velilla, A., & Pérez, R. (2017). Assessing the intra-species genetic variability in the clonal pathogen *Campylobacter fetus*: CRISPRs are highly polymorphic DNA markers. *Journal of Microbiological Methods*, 132, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.012>
- Campero, C. M., Anderson, M. L., Walker, R. L., Blanchard, P. C., Barbano, L., Chiu, P., Martínez, A., Combessies, G., Bardon, J. C., & Cordeviola, J. (2005). Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. *Journal of veterinary medicine, B, Infectious diseases, and veterinary public health*, 52(3), 138–141. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00834.x>
- Campero, C. M., Ballabene, N. C., Cipolla, A. C., & Zamora, A. S. (1987). Dual infection of bulls with campylobacteriosis and trichomoniasis: Treatment with dimetridazole chlorhydrate. *Australian Veterinary Journal*, 64(10), 320–321. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.1987.TB07344.X>
- Campero, C. M., Moore, D. P., Odeón, A. C., Cipolla, A. L., & Odriozola, E. (2003). Aetiology of Bovine Abortion in Argentina. *Veterinary Research Communications 2003* 27:5, 27(5), 359–369. <https://doi.org/10.1023/A:1024754003432>
- Campos-Múzquiz, L. G., Méndez-Olvera, E. T., Arellano-Reynoso, B., & Martínez-Gómez, D. (2019). *Campylobacter fetus* is internalized by bovine endometrial epithelial cells. *Polish Journal of Microbiology*, 68(2), 217–224. <https://doi.org/10.33073/PJM-2019-022>
- Carlos Manuel Campero. (2000). *Las enfermedades reproductivas en los bovinos: ayer y hoy*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/29621>
- Cartwright, K., Morris, R., Rümke, H., Fox, A., Ray Borrow, Begg, N., Richmond, P., & Poolman, J. (1999). Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. *Vaccine*, 17(20–21), 2612–2619. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00044-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00044-4)
- Casadémont, I., Chevrier, D., & Guesdon, J.-L. (1998). Cloning of a sapB homologue (sapB2) encoding a putative 112-kDa *Campylobacter fetus* S-layer protein and its use for identification and molecular genotyping. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 21(4), 269–281. <https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.1998.TB01174.X>
- Casimiro-Soriguer, C. S., Muñoz-Mérida, A., & Pérez-Pulido, A. J. (2017). Sma3s: A universal tool for easy functional annotation of proteomes and transcriptomes. *PROTEOMICS*, 17(12), 1700071. <https://doi.org/10.1002/PMIC.201700071>
- Chiapparrone, M. L., Soto, P., & Catena, M. (2016). Characterization of the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* Adhesion to Bovine Sperm Cells. *International Journal of Morphology*, 34(4), 1419–1423. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000400040>
- Chung, M., Munro, J. B., & Hotopp, J. C. D. (2018). Using Core Genome Alignments to Assign Bacterial Species. *BioRxiv*, 3(6), 328021. <https://doi.org/10.1101/328021>

- Cobo, E. R., Cipolla, A., Morsella, C., Cano, D., & Campero, C. (2003). Effect of two commercial vaccines to *Campylobacter fetus* subspecies on heifers naturally challenged. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 50(2), 75–80. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0450.2003.00612.X>
- Cobo, E. R., Corbeil, L. B., & BonDurant, R. H. (2011). Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. *Journal of Reproductive Immunology*, 89(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2011.02.002>
- Cobo, E. R., Morsella, C., Cano, D., Cipolla, A., & Campero, C. M. (2004). Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. *Theriogenology*, 62(8), 1367–1382. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.034>
- Confer, A. W., & Ayalew, S. (2013). The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Veterinary Microbiology*, 163(3–4), 207–222. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2012.08.019>
- Corbeil, L. B. (1999). Immunization and Diagnosis in Bovine Reproductive Tract Infections. *Advances in Veterinary Medicine*, 41, 217-239. [https://doi.org/10.1016/S0065-3519\(99\)80018-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3519(99)80018-4)
- Costa, D., & Iraola, G. (2019). Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-18>
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence with Rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/GR.2289704>
- Darling, A. E., Mau, B., & Perna, N. T. (2010). progressiveMauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss and Rearrangement. *PLOS ONE*, 5(6), e11147. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0011147>
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., & Groß, U. (2010). *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(4), 205–211. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2009.07.002>
- Dekeyser, J. (2018). Bovine Genital Campylobacteriosis. *Campylobacter Infection in Man and Animals*, 181–192. <https://doi.org/10.1201/9781351070393-15>
- Delpiazzo, R., Barcellos, M., Barros, S., Betancor, L., Fraga, M., Gil, J., Iraola, G., Morsella, C., Paolicchi, F., Pérez, R., Riet-Correa, F., Sanguinetti, M., Silva, A., da Silva Silveira, C., & Calleros, L. (2021). Accurate and fast identification of *Campylobacter fetus* in bulls by real-time PCR targeting a 16S rRNA gene sequence. *Veterinary and Animal Science*, 11, 100163. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100163>
- Dong, H., Xiang, Q., Gu, Y., Wang, Z., Paterson, N. G., Stansfeld, P. J., He, C., Zhang, Y., Wang, W., & Dong, C. (2014). Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature* 2014 511:7507, 511(7507), 52–56. <https://doi.org/10.1038/nature13464>
- Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2007). VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4/TABLES/2>
- Dworkin, J., & Blaser, M. J. (1997). Molecular mechanisms of *Campylobacter fetus* surface layer protein expression. *Molecular Microbiology*, 26(3), 433–440. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1997.6151958.X>

- Eaglesome, & Garcia, M. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Bulletin*, 62(8), 743-775.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), More, S., Bøtner, A., Butterworth, A., Calistri, P., Depner, K., Edwards, S., Garin-Bastuji, B., Good, M., Gortázar Schmidt, C., Michel, V., Miranda, M. A., Nielsen, S. S., Raj, M., Sihvonen, L., Spooler, H., Stegeman, J. A., Thulke, H. H., Velarde, A., Willeberg, P., ... Bicout, D. (2017). Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): bovine genital campylobacteriosis. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 15(10), e04990. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4990>
- Elmi, A., Watson, E., Sandu, P., Gundogdu, O., Mills, D. C., Inglis, N. F., Manson, E., Imrie, L., Bajaj-Elliott, M., Wren, B. W., Smith, D. G. E., & Dorrell, N. (2012). *Campylobacter jejuni* Outer Membrane Vesicles Play an Important Role in Bacterial Interactions with Human Intestinal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 80(12), 4089–4098. <https://doi.org/10.1128/IAI.00161-12>
- Engberg, J., Bang, D. D., Aabenhus, R., Aarestrup, F. M., Fusing, V., & Gerner-Smidt, P. (2005). *Campylobacter concisus*: an evaluation of certain phenotypic and genotypic characteristics. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(4), 288–295. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2005.01111.X>
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., & Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1008–1015. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000>
- Erickson, N. E. N., Lanigan, E., Waugh, T., Gesy, K., & Waldner, C. (2017). Evaluation of long-acting oxytetracycline and a commercial monovalent vaccine for the control of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* infection in beef bulls. *Canadian Veterinary Journal*, 58(10), 1051–1058.
- Fiorentino, M. A., Stazionati, M., Hecker, Y., Morsella, C., Cantón, G., Harry, H. R., Velilla, A. v., Vaulet, L. G., Fermepin, M. R., & Bedotti, D. O. (2017). *Campylobacter fetus* subsp. *Fetus* ovine abortion outbreak in Argentina. *Revista Electronica de Veterinaria*, 18(11), 1–11.
- Fitzgerald, C., Tu, Z. C., Patrick, M., Stiles, T., Lawson, A. J., Santovenia, M., Gilbert, M. J., van Bergen, M., Joyce, K., Pruckler, J., Stroika, S., Duim, B., Miller, W. G., Loparev, V., Sinnige, J. C., Fields, P. I., Tauxe, R. v., Blaser, M. J., & Wagenaar, J. A. (2014). *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(9), 2944–2948. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.057778-0>
- Fujimoto, S., Takade, A., Amako, K., & Blaser, M. J. (1991). Correlation between molecular size of the surface array protein and morphology and antigenicity of the *Campylobacter fetus* S layer. *Infection and Immunity*, 59(6), 2017–2022. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.6.2017-2022.1991>
- Gagic, D., Ciric, M., Wen, W. X., Ng, F., & Rakonjac, J. (2016). Exploring the Secretomes of Microbes and Microbial Communities Using Filamentous Phage Display. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00429>
- Garcia, M. M., Lutze-Wallace, C. L., Denes, A. S., Eaglesome, M. D., Holst, E., & Blaser, M. J. (1995). Protein shift and antigenic variation in the S-layer of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of *sapA* homologs. *Journal of Bacteriology*, 177(8), 1976–1980. <https://doi.org/10.1128/JB.177.8.1976-1980.1995>

- Gilbert, M. J., Duim, B., van der Graaf-van Bloois, L., Wagenaar, J. A., & Zomer, A. L. (2018). Homologous Recombination between Genetically Divergent *Campylobacter fetus* Lineages Supports Host-Associated Speciation. *Genome Biology and Evolution*, *10*(3), 716–722. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy048>
- Gilbert, M. J., Duim, B., Zomer, A. L., & Wagenaar, J. A. (2019). Living in cold blood: *Arcobacter*, *Campylobacter*, and *Helicobacter* in reptiles. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAY), 1086. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01086>
- Gilbert, M. J., Miller, W. G., Yee, E., Blaser, M. J., Wagenaar, J. A., & Duim, B. (2013). Complete genome sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* strain 03-427T. *Genome Announcements*, *1*(6). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01002-13>
- Gobierno de la Provincia de Buenos Aires. (2021, May 12). *Se lanzó el Plan Oficial de Prevención de ETS en Bovinos 2021 | Provincia de Buenos Aires*. https://www.gba.gob.ar/desarrollo_agrario/Noticias/se_lanzo_el_plan_oficial_de_prevenccion_de_et_s_en_bovinos_2021
- Gorkiewicz, G., Kienesberger, S., Schober, C., Scheicher, S., & Gully, C. (2010). A genomic island defines subspecies-specific virulence features of the host-adapted pathogen *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J Bacteriol*, *192*(2), 502–517. <https://dx.doi.org/10.1128%2FJ.B.00803-09>
- Grassmann, A. A., Kremer, F. S., Santos, J. C. dos, Souza, J. D., Pinto, L. da S., & McBride, A. J. A. (2017). Discovery of novel leptospirosis vaccine candidates using reverse and structural vaccinology. *Frontiers in Immunology*, *8*, 463. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00463>
- Groff, A. C. M., Kirinus, J. K., Sá e Silva, M., Machado, G., Costa, M. M., & Vargas, A. P. C. (2010). Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *30*(12), 1031–1035. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010001200005>
- Guerra, A. G., Chaban, B., Hill, J. E., Waldner, C. L., & Hendrick, S. H. (2014). Clinical sensitivity and specificity of a real-time PCR assay for *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* in preputial samples from bulls. *American Journal of Veterinary Research*, *75*(9), 851–860. <https://doi.org/10.2460/AJVR.75.9.851>
- Guerrero-Mandujano, A., Hernández-Cortez, C., Ibarra, J. A., & Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic*, *18*(7), 425–432. <https://doi.org/10.1111/TRA.12488>
- Gupta, N., Khan, F., & Kumar, A. (2019). Exploring Highly Antigenic Protein of *Campylobacter jejuni* for Designing Epitope Based Vaccine: Immunoinformatics Approach. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *25*(3), 1159–1172. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9764-z>
- Gupta, N., & Kumar, A. (2020). Designing an efficient multi-epitope vaccine against *Campylobacter jejuni* using immunoinformatics and reverse vaccinology approach. *Microbial Pathogenesis*, *147*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104398>
- Güven-Maiorov, E., Tsai, C. J., Ma, B., & Nussinov, R. (2017). Prediction of Host–Pathogen Interactions for *Helicobacter pylori* by Interface Mimicry and Implications to Gastric Cancer. *Journal of Molecular Biology*, *429*(24), 3925–3941. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.10.023>
- Hickey, T. E., Majam, G., & Guerry, P. (2005). Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytolethal distending toxin. *Infection and Immunity*, *73*(8), 5194–5197. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.5194-5197.2005>

- Hirakawa, H., Suzue, K., Kurabayashi, K., & Tomita, H. (2019). The Tol-Pal System of Uropathogenic *Escherichia coli* is responsible for optimal internalization into and aggregation within bladder epithelial cells, colonization of the urinary tract of mice, and bacterial motility. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01827>
- Hoffer M. A. (1981). Bovine campylobacteriosis: a review. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, *22*(11), 327–330.
- Hum, S., Quinn, K., Brunner, J., & On, S. L. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Australian Veterinary Journal*, *75*(11), 827–831. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.1997.TB15665.X>
- Iraola, G., Betancor, L., Calleros, L., Gadea, P., Algorta, G., Galeano, S., Muxi, P., Greif, G., & Pérez, R. (2015). A rural worker infected with a bovine-prevalent genotype of *Campylobacter fetus* subsp. supports zoonotic transmission and inconsistency of MLST and whole-genome typing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* *2015 34:8*, *34*(8), 1593–1596. <https://doi.org/10.1007/S10096-015-2393-Y>
- Iraola, G., Forster, S. C., Kumar, N., Lehours, P., Bekal, S., García-Peña, F. J., Paolicchi, F., Morsella, C., Hotzel, H., Hsueh, P. R., Vidal, A., Lévesque, S., Yamazaki, W., Balzan, C., Vargas, A., Piccirillo, A., Chaban, B., Hill, J. E., Betancor, L., Collado L., Truysers I., Midwinter A. C., Dagi H. T., Mégraud F., Calleros L., Pérez R., Naya H., & Lawley, T. D. (2017). Distinct *Campylobacter fetus* lineages adapted as livestock pathogens and human pathobionts in the intestinal microbiota. *Nature Communications*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01449-9>
- Iraola, G., Hernández, M., Calleros, L., Paolicchi, F., Silveyra, S., Velilla, A., Carretto, L., Rodríguez, E., & Pérez, R. (2012). Application of a multiplex PCR assay for *Campylobacter fetus* detection and subspecies differentiation in uncultured samples of aborted bovine fetuses. *Journal of Veterinary Science*, *13*(4), 371–376. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.4.371>
- Iraola, G., Pérez, R., Betancor, L., Marandino, A., Morsella, C., Méndez, A., Paolicchi, F., Piccirillo, A., Tomás, G., Velilla, A., & Calleros, L. (2016). A novel real-time PCR assay for quantitative detection of *Campylobacter fetus* based on ribosomal sequences. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0913-3>
- Iraola, G., Pérez, R., Naya, H., Paolicchi, F., Harris, D., Lawley, T. D., Rego, N., Hernández, M., Calleros, L., Carretto, L., Velilla, A., Morsella, C., Méndez, A., & Gioffre, A. (2013). Complete Genome Sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* Biovar Intermedius, Isolated from the Prepuce of a Bull. *Genome announcements*, *1*(4), e00526-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00526-13>
- Islam, A., Raghupathy, R., & Albert, M. J. (2010). Recombinant PorA, the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*, provides heterologous protection in an adult mouse intestinal colonization model. *Clinical and Vaccine Immunology*, *17*(11), 1666–1671. <https://doi.org/10.1128/CVI.00255-10>
- Jimenez, D. F., Perez, A. M., Carpenter, T. E., & Martinez, A. (2011). Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, *101*(3–4), 157–162. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2011.05.014>
- Kaakoush, N. O., Deshpande, N. P., Wilkins, M. R., Raftery, M. J., Janitz, K., & Mitchell, H. (2011). Comparative analyses of *Campylobacter concisus* strains reveal the genome of the reference strain BAA-1457 is not representative of the species. *Gut Pathogens*, *3*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-3-15>

- Kaakoush, N. O., Man, S. M., Lamb, S., Raftery, M. J., Wilkins, M. R., Kovach, Z., & Mitchell, H. (2010). The secretome of *Campylobacter concisus*. *FEBS Journal*, 277(7), 1606–1617. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07587.x>
- Katoh, K. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kienesberger, S., Gorkiewicz, G., Joainig, M. M., Scheicher, S. R., Leitner, E., & Zechner, E. L. (2007). Development of experimental genetic tools for *Campylobacter fetus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4619–4630. <https://doi.org/10.1128/AEM.02407-06>
- Kienesberger, S., Sprenger, H., Wolfgruber, S., Halwachs, B., Thallinger, G. G., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J., Zechner, E. L., & Gorkiewicz, G. (2014). Comparative genome analysis of *Campylobacter fetus* subspecies revealed horizontally acquired genetic elements important for virulence and niche specificity. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085491>
- Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological research*, 170, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.006>
- Knowles, T. J., Scott-Tucker, A., Overduin, M., & Henderson, I. R. (2009). Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nature Reviews Microbiology* 2009 7:3, 7(3), 206–214. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2069>
- Konkel, M. E., Garvis, S. G., Tipton, S. L., Anderson, D. E., & Cieplak, W. (1997). Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 24(5), 953–963. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1997.4031771.X>
- Konkel, M. E., & Joens, L. A. (1989). Adhesion to and invasion of HEP-2 cells by *Campylobacter* spp. *Infection and Immunity*, 57(10), 2984–2990. <https://doi.org/10.1128/IAI.57.10.2984-2990.1989>
- Konkel, M. E., Talukdar, P. K., Negretti, N. M., & Klappenbach, C. M. (2020). Taking Control: *Campylobacter jejuni* Binding to Fibronectin Sets the Stage for Cellular Adherence and Invasion. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00564>
- Krishnan, S., & Prasadarao, N. v. (2012). Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *FEBS Journal*, 279(6), 919–931. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08482.x>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2000.4315>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Lindmark, B., Rompikuntal, P. K., Vaitkevicius, K., Song, T., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., Guerry, P., & Wai, S. N. (2009). Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiology*, 9(220), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-220>
- Mackenzie, J. S., & Jeggo, M. (2019). The One Health Approach—Why Is It So Important? *Tropical Medicine and Infectious Disease* 2019, Vol. 4, Page 88, 4(2), 88. <https://doi.org/10.3390/TROPICALMED4020088>

- Mangas, E. L., Rubio, A., Álvarez-Marín, R., Labrador-Herrera, G., Pachón, J., Pachón-Ibáñez, M. E., Divina, F., & Pérez-Pulido, A. J. (2019). Pangenome of *Acinetobacter baumannii* uncovers two groups of genomes, one of them with genes involved in CRISPR/Cas defence systems associated with the absence of plasmids and exclusive genes for biofilm formation. *Microbial genomics*, 5(11), e000309. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000309>
- Manning, A. J., & Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC microbiology*, 11, 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>
- McMillen, L., Fordyce, G., Doogan, V. J., & Lew, A. E. (2006). Comparison of Culture and a Novel 5'Taq Nuclease Assay for Direct Detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in Clinical Specimens from Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 938–945. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.938-945.2006>
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Masignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current opinion in genetics & development*, 15(6), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., Lanfear, R., & Teeling, E. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Misra, R., Stikeleather, R., & Gabriele, R. (2015). In vivo roles of BamA, BamB and BamD in the biogenesis of BamA, a core protein of the β -barrel assembly machine of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 427(5), 1061. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2014.04.021>
- Moballeghe Naseri, M., Shams, S., Moballeghe Naseri, M., & Bakhshi, B. (2020). In silico analysis of epitope-based CadF vaccine design against *Campylobacter jejuni*. *BMC Research Notes*, 13(1), 518. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05364-z>
- Molina, L. L., Angón, E., García, A., Caballero-Villalobos, J., Giorgis, A. O., Moralejo, R. H., & Perea, J. (2018). A retrospective epidemiological analysis of shared risk factors for bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Preventive Veterinary Medicine*, 161, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.022>
- Molina, L., Perea, J., Meglia, G., Angón, E., & García, A. (2013). Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Preventive Veterinary Medicine*, 110(3–4), 388–394. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2013.02.019>
- Molina, L. L., García, A., Angón, E., Moralejo, R., Caballero-Villalobos, J., & Perea, J. (2020). Incidence, prevalence and persistence of bovine venereal diseases in La Pampa (Argentina): estimations for the period 2007 - 2020. *Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias UNCUYO*, 52(1), 320–331. <https://revistas.uncu.edu.ar/ojs/index.php/RFCA/article/view/3056>
- Moolhuijzen, P. M., Lew-Tabor, A. E., Wlodek, B. M., Agüero, F. G., Comerci, D. J., Ugalde, R. A., Sanchez, D. O., Appels, R., & Bellgard, M. (2009). Genomic analysis of *Campylobacter fetus* subspecies: identification of candidate virulence determinants and diagnostic assay targets. *BMC Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-86>
- Morrell, E. L., Campero, C. M., Cantón, G. J., Odeón, A. C., Moore, D. P., Odriozola, E., Paolicchi, F., & Fiorentino, M. A. (2019). Current trends in bovine abortion in Argentina. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 39(1), 12–19. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5668>

- Mshelia, G. D., Amin, J. D., Woldehiwet, Z., Murray, R. D., & Egwu, G. O. (2010). Epidemiology of bovine venereal campylobacteriosis: geographic distribution and recent advances in molecular diagnostic techniques. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 45(5), e221–e230. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01546.x>
- Mukherjee, S., Gangopadhyay, K., & Mukherjee, S. B. (2020). Identification of potential new vaccine candidates in *Salmonella typhi* using reverse vaccinology and subtractive genomics-based approach. *BioRxiv*, 521518. <https://doi.org/10.1101/521518>
- Muñoz-Mérida, A., Viguera, E., Claros, M. G., Trelles, O., & Pérez-Pulido, A. J. (2014). Sma3s: A Three-Step Modular Annotator for Large Sequence Datasets. *DNA Research*, 21(4), 341–353. <https://doi.org/10.1093/DNARES/DSU001>
- Naz, A., Awan, F. M., Obaid, A., Muhammad, S. A., Paracha, R. Z., Ahmad, J., & Ali, A. (2015). Identification of putative vaccine candidates against *Helicobacter pylori* exploiting exoproteome and secretome: A reverse vaccinology based approach. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.027>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- OIE. (2021). *Manual Terrestre de la OIE 2021*.
- Okuda, S., Sherman, D. J., Silhavy, T. J., Ruiz, N., & Kahne, D. (2016). Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model. *Nature Reviews Microbiology* 2016 14:6, 14(6), 337–345. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.25>
- On, S. L. W. (2013). Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? *Journal of Microbiological Methods*, 95(1), 3–7. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2013.06.011>
- Ong, E., Cooke, M. F., Huffman, A., Xiang, Z., Wong, M. U., Wang, H., Seetharaman, M., Valdez, N., & He, Y. (2021). Vaxign2: the second generation of the first Web-based vaccine design program using reverse vaccinology and machine learning. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W671–W678. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab279>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Patel, C. B., Shanker, R., Gupta, V. K., & Upadhyay, R. S. (2016). Q-PCR based culture-independent enumeration and detection of enterobacter: An emerging environmental human pathogen in riverine systems and potable water. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 172. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00172>
- Pei, Z., & Blaser, M. (1990). Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Role of surface array proteins in virulence in a mouse model. *J Clin Invest*, 85(4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1172/JCI114533>
- Pei, Z., Ellison, R. T., Lewis, R. v., & Blaser, M. J. (1988). Purification and characterization of a family of high molecular weight surface-array proteins from *Campylobacter fetus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(13), 6416–6420. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)68801-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)68801-5)
- Pena-Fernández, N., Cano-Terriza, D., García-Bocanegra, I., Horcajo, P., Vázquez-Arbaizar, P., Cleofé-Resta, D., Pérez-Arroyo, B., Ortega-Mora, L. M., & Collantes-Fernández, E. (2021). Prevalence of Bovine Genital Campylobacteriosis, Associated Risk Factors and Spatial Distribution in Spanish Beef

- Cattle Based on Veterinary Laboratory Database Records. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1479. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.750183>
- Penner, J. L. (1988). The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(2), 157. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.157>
- Pickett, C. L., & Whitehouse, C. A. (1999). The cytolethal distending toxin family. *Trends in Microbiology*, 7(7), 292–297. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01537-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01537-1)
- Polo, C., García-Seco, T., Hernández, M., Fernández, V., Rodríguez-Lázaro, D., Goyache, J., Domínguez, L., & Pérez-Sancho, M. (2021). Evaluation of PCR assays for *Campylobacter fetus* detection and discrimination between *C. fetus* subspecies in bovine preputial wash samples. *Theriogenology*, 172, 300–306. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2021.06.020>
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P. A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D., & Markham, A. F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1), e102. <https://doi.org/10.1002/CPBI.102>
- Rashid, M. I., Naz, A., Ali, A., & Andleeb, S. (2017). Prediction of vaccine candidates against *Pseudomonas aeruginosa*: An integrated genomics and proteomics approach. *Genomics*, 109(3–4), 274–283. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2017.05.001>
- Robinson, L., Liaw, J., Omole, Z., Xia, D., van Vliet, A. H. M., Corcionivoschi, N., Hachani, A., & Gundogdu, O. (2021). Bioinformatic Analysis of the *Campylobacter jejuni* Type VI Secretion System and Effector Prediction. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.694824>
- Rooke, J. L., Icke, C., Wells, T. J., Rossiter, A. E., Browning, D. F., Morris, F. C., Leo, J. C., Schütz, M. S., Autenrieth, I. B., Cunningham, A. F., Linke, D., & Henderson, I. R. (2021). BamA and BamD Are Essential for the Secretion of Trimeric Autotransporter Adhesins. *Frontiers in Microbiology*, 12, 243. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.628879>
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New Microbes and New Infections*, 7, 72–85. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2015.06.005>
- Ruiz, N., Kahne, D., & Silhavy, T. J. (2009). Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. *Nature Reviews Microbiology* 2009 7:9, 7(9), 677–683. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2184>
- Sachdeva, G., Kumar, K., Jain, P., & Ramachandran, S. (2005). SPAAN: a software program for prediction of adhesins and adhesin-like proteins using neural networks. *Bioinformatics*, 21(4), 483–491. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti028>
- Samuelson, J. D., & Winter, A. J. (1966). Bovine Vibriosis: The Nature of the Carrier State in the Bull. *The Journal of Infectious Diseases*, 116(5), 581–592. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/116.5.581>
- Sankarasubramanian, J., Vishnu, U. S., Dinakaran, V., Sridhar, J., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2015). Computational prediction of secretion systems and secretomes of *Brucella*: identification of novel type IV effectors and their interaction with the host. *Molecular BioSystems*, 12(1), 178–190. <https://doi.org/10.1039/c5mb00607d>

- Schmidt, T., Venter, E. H., & Picard, J. A. (2010). Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. *Journal of the South African Veterinary Association*, 81(2), 87–92. <https://doi.org/10.4102/JSAVA.V81I2.111>
- Schuster, B., & Sleytr, U. B. (2000). S-layer-supported lipid membranes. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(3), 233–254. [https://doi.org/10.1016/S1389-0352\(00\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S1389-0352(00)00014-3)
- Scribano, D., Marzano, V., Mortera, S. L., Sarshar, M., Vernocchi, P., Zagaglia, C., Putignani, L., Palamara, A. T., & Ambrosi, C. (2019). Insights into the Periplasmic Proteins of *Acinetobacter baumannii* AB5075 and the Impact of Imipenem Exposure: A Proteomic Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/IJMS20143451>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Selvaraj, S. K., Periandythevar, P., & Prasadarao, N. v. (2007). Outer membrane protein A of *Escherichia coli* K1 selectively enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in brain microvascular endothelial cells. *Microbes and Infection*, 9(5), 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.020>
- Silveira, C. da S., Fraga, M., Giannitti, F., Macías-Rioseco, M., & Riet-Correa, F. (2018). Diagnosis of bovine genital campylobacteriosis in South America. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(NOV), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00321>
- Singh, R., Capalash, N., & Sharma, P. (2017). Immunoprotective potential of BamA, the outer membrane protein assembly factor, against MDR *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12789-3>
- Skirrow, M. B. (2006). John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clinical Infectious Diseases*, 43(9), 1213–1217. <https://doi.org/10.1086/508201>
- Smibert, R. M. (1978). The genus *Campylobacter*. *Annual Review of Microbiology*, 32, 673–709. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.32.100178.003325>
- Smith, S. G. J., Mahon, V., Lambert, M. A., & Fagan, R. P. (2007). A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiology Letters*, 273(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2007.00778.X>
- Smith, T., & Taylor, M. S. (1919). Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, N. SP.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *The Journal of Experimental Medicine*, 30(4), 299. <https://doi.org/10.1084/JEM.30.4.299>
- Soltan, M. A., Elbassiouny, N., Gamal, H., Elkaced, E. B., Eid, R. A., Eldeen, M. A., & Al-karmalawy, A. A. (2021). In Silico Prediction of a Multitope Vaccine against *Moraxella catarrhalis*: Reverse Vaccinology and Immunoinformatics. *Vaccines*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/VACCINES9060669>
- Song, C., Kumar, A., & Saleh, M. (2009). Bioinformatic Comparison of Bacterial Secretomes. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 7(1–2), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60031-5](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60031-5)
- Sprenger, H., Zechner, E. L., & Gorkiewicz, G. (2012). So close and yet so far — Molecular microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2(1), 66–75. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.2.2012.1.10>
- Stegenga and Terpstra. (1949). Over *Vibrio foetus* infecties bij het rund en enzootische steriliteit. *Tijdschr Diergeneesk*, 74, 293–296.

- Stynen A. P. R., Lage A. P., Moore R. J., Rezende A. M., de Resende V. D. A. da S., Ruy P. de C., Daher N., Resende D. de M., de Almeida S. S., Soares, S. de C., de Abreu V. A. C., Rocha A. A. C. M., dos Santos A. R., Barbosa E. G. V., Costa D. F., Dorella F. A., Miyoshi A., de Lima A. R. J., Campos F. D. da S., ... Ruiz J. C. (2011). Complete genome sequence of type strain *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354T. *Journal of Bacteriology*, 193(20), 5871–5872. <https://doi.org/10.1128/JB.05854-11>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1131>
- Tatsumi, R., & Wachi, M. (2008). TolC-dependent exclusion of porphyrins in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(18), 6228–6233. <https://doi.org/10.1128/JB.00595-08>
- Tatusova, T., Dicuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., & Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44(14), 6614–6624. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW569>
- Theodor Escherich. (1886). Beitrage zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Ueber das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgangen der Sauglinge. (Articles adding to the knowledge of intestinal bacteria. III. On the existence of vibrios in the intestines and feces of babi. *Münchener Med Wochenschrift*, 33, 815–817.
- Thompson, S. (2002). *Campylobacter* surface-layers (S-layers) and immune evasion. *Ann Periodontol*, 7(2), 43–53. <https://doi.org/10.1902/annals.2002.7.1.43>
- Thompson, S. A., Shedd, O. L., Ray, K. C., Beins, M. H., Jorgensen, J. P., & Blaser, M. J. (1998). *Campylobacter fetus* surface layer proteins are transported by a type I secretion system. *Journal of Bacteriology*, 180(24), 6450–6458. <https://doi.org/10.1128/JB.180.24.6450-6458.1998>
- Truyers, I., Luke, T., Wilson, D., & Sargison, N. (2014). Diagnosis and management of venereal campylobacteriosis in beef cattle. *BMC veterinary research*, 10, 280. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0280-x>
- Tu, Z. C., Dewhirst, F. E., & Blaser, M. J. (2001). Evidence that the *Campylobacter fetus* sap locus is an ancient genomic constituent with origins before mammals and reptiles diverged. *Infection and Immunity*, 69(4), 2237–2244. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2237-2244.2001>
- Tummuru, M. K. R., & Blaser, M. J. (1993). Rearrangement of sapA homologs with conserved and variable regions in *Campylobacter fetus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(15), 7265–7269. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.15.7265>
- van Bergen, M. A. P., Dingle, K. E., Maiden, M. C. J., Newell, D. G., van der Graaf-Van Bloois, L., van Putten, J. P. M., & Wagenaar, J. A. (2005a). Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5888–5898. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5888-5898.2005>
- van Bergen, M. A. P., Linnane, S., van Putten, J. P. M., & Wagenaar, J. A. (2005b). Global detection and identification of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 24(3), 1017–1026. <https://doi.org/10.20506/RST.24.3.1629>
- van Bergen, M. A. P., Simons, G., van der Graaf-Van Bloois, L., van Putten, J. P. M., Rombout, J., Wesley, I., & Wagenaar, J. A. (2005c). Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic

- markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Journal of Medical Microbiology*, 54(12), 1217–1224. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.46186-0>
- van Bergen, M. A. P., van der Graaf-van Bloois, L., Visser, I. J. R., van Putten, J. P. M., & Wagenaar, J. A. (2006). Molecular epidemiology of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on bovine artificial insemination stations using pulsed field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 112(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2005.09.009>
- van der Graaf-van Bloois, L., van Bergen, M. A. P., van der Wal, F. J., de Boer, A. G., Duim, B., Schmidt, T., & Wagenaar, J. A. (2013). Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 95(1), 93–97. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2013.06.005>
- van der Graaf-van Bloois, L., Miller, W. G., Yee, E., Rijnsburger, M., Wagenaar, J. A., & Duim, B. (2014a). Inconsistency of phenotypic and genomic characteristics of *Campylobacter fetus* subspecies requires reevaluation of current diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4183–4188. <https://doi.org/10.1128/JCM.01837-14>
- van der Graaf-van Bloois, L., Miller, W. G., Yee, E., Bono, J. L., Rijnsburger, M., Campero, C., Wagenaar, J. A., & Duim, B. (2014b). First Closed Genome Sequence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* bv. *intermedius*. *Genome announcements*, 2(1), e01246-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01246-13>
- van der Graaf-van Bloois, L., Duim, B., Miller, W. G., Forbes, K. J., Wagenaar, J. A., & Zomer, A. (2016a). 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), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3058-7>
- van der Graaf-van Bloois, L., Miller, W. G., Yee, E., Gorkiewicz, G., Forbes, K. J., Zomer, A. L., Wagenaar, J. A., & Duim, B. (2016b). *Campylobacter fetus* subspecies contain conserved type IV secretion systems on multiple genomic islands and plasmids. *PLoS ONE*, 11(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152832>
- Venter, S. N., Palmer, M., Beukes, C. W., Giyoon, W. C., Elritha, S., Seale, T., Coutinho, T. A., & Steenkamp, E. T. (2017). Practically delineating bacterial species with genealogical concordance. *Antonie van Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0869-8>
- Verón, M., & Chatelain, R. (1973). Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(2), 122–134. <https://doi.org/10.1099/00207713-23-2-122>
- Vishnu, U. S., Sankarasubramanian, J., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2015). Novel Vaccine Candidates against *Brucella melitensis* Identified through Reverse Vaccinology Approach. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 19(11), 722–729. <https://doi.org/10.1089/omi.2015.0105>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., & Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Wagenaar, J. A., van Bergen, M. A. P., Blaser, M. J., Tauxe, R. v., Newell, D. G., & van Putten, J. P. M. (2014). *Campylobacter fetus* infections in humans: Exposure and disease. *Clinical Infectious Diseases*, 58(11), 1579–1586. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu085>

- Wang, C. M., Shia, W. Y., Jhou, Y. J., & Shyu, C. L. (2013). Occurrence and molecular characterization of reptilian *Campylobacter fetus* strains isolated in Taiwan. *Veterinary Microbiology*, *164*(1–2), 67–76. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2013.01.008>
- Wang, E., Garcia, M. M., Blake, M. S., Pei, Z., & Blaser, M. J. (1993). Shift in S-layer protein expression responsible for antigenic variation in *Campylobacter fetus*. *Journal of Bacteriology*, *175*(16), 4979–4984. <https://doi.org/10.1128/JB.175.16.4979-4984.1993>
- Willoughby, K., Nettleton, P. F., Quirie, M., Maley, M. A., Foster, G., Toszeghy, M., & Newell, D. G. (2005). A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* -species *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(4), 758–766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02680.x>
- Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S. C., Ester, M., Foster, L. J., & Brinkman, F. S. L. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, *26*(13), 1608–1615. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249>
- Zha, Z., Li, C., Li, W., Ye, Z., & Pan, J. (2016). LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep38577>
- Zhang, Q., Meitzler, J. C., Huang, S., & Morishita, T. (2000). Sequence polymorphism predicted secondary structures, and surface-exposed conformational epitopes of *Campylobacter* major outer membrane protein. *Infection and Immunity*, *68*(10), 5679–5689. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5679-5689.2000>

La presente tesis corresponde a la última versión de la misma e incluye las correcciones propuestas por los jurados.



Firma del Autor



Firma del Director